



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

**Estabilización de sistemas multifásicos basados en lípidos de
origen marino mediante derivados conjugados de polifenoles:
mecanismo de acción**

María Jesús González Pérez

**ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIA E
TECNOLOXÍA QUÍMICA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2018



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Estabilización de sistemas multifásicos basados en lípidos de origen marino mediante derivados conjugados de polifenoles: mecanismo de acción

I

Dna. María Jesús González Pérez

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 31 de xullo de 2018

Asdo. Dna. María Jesús González Pérez



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Estabilización de sistemas multifásicos basados en lípidos de origen marino mediante derivados conjugados de polifenoles: mecanismo de acción

A directora:

Dna. María Isabel Medina Méndez, Profesora de Investigación no Instituto de Investigacións Mariñas de Vigo (CSIC).

Informa:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna.. **María Jesús González Pérez**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directora desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En Vigo, 31 de xullo de 2018.

Asdo. Dra. María Isabel Medina Méndez









AGRADECIMIENTOS



Hay una frase que durante mi niñez escuché hasta la saciedad:

“Es de bien nacido, el ser agradecido”

Ha llegado ese momento: el de agradecer.

Durante estos años en los que se ha realizado este trabajo de Tesis, son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.

Este trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC en Vigo bajo la dirección de la Profesora Dña. Isabel Medina Méndez. Por ello, en primer lugar quiero agradecerle todo el apoyo, dedicación e interés dispensados en la realización de este trabajo y de tantos otros y darme la oportunidad de formar parte de este gran grupo.

Agradecer de forma muy especial al Profesor D. José Manuel Gallardo por todos los consejos recibidos a lo largo de todos estos años, tanto en el ámbito científico como personal. Su vitalidad y su pasión por la investigación son realmente admirables.

De igual manera, también quisiera agradecer al Profesor D. Santiago Aubourg, su generosidad y ayuda desinteresada siempre que la he necesitado.

Quisiera agradecer al Dr. Juan Carlos Morales su inestimable ayuda para la realización de este trabajo.

Gracias a mi tutora de Tesis, la Dra. Carmen Mejuto Martí, por su labor de supervisión, sus ánimos en la etapa final y darme la oportunidad de poder llevar a cabo esta Tesis.

También me gustaría dar las gracias a mis compañeros de laboratorio, los que ya no están y los que siguen, por estar siempre disponibles, por toda la ayuda y el ánimo que de ellos he recibido. Todos y cada uno de ellos han contribuido, de una u otra manera, a la realización de este trabajo, en especial a Salomé por su ayuda técnica y a Lucia y Mónica que me han animado especialmente en esta última etapa.

Agradecer a todo el personal del Instituto de Investigaciones Marinas: Biblioteca, Almacén, Administración, Mantenimiento y Servicio de Instrumentación, por facilitar el desarrollo de este trabajo.

Quisiera también dar las gracias a todos mis amigos de “alas11encenfer” por sus ánimos, su alegría, sus consejos y por todo lo que compartimos en el pasado y compartiremos en el los años venideros. Luce, esa carta que vino del futuro se hizo realidad.

Un cariñoso recuerdo para mis “serieadictos” por esas largas sesiones de cine, debates precedidos de alguna que otra cena y que han animado las noches del fin de semana de estos últimos años.

Quisiera tener un recuerdo muy especial para, Edu, Miryam, Marta, Carmen y Chelo, mis primeros compañeros de laboratorio y, sobre todo, grandes amigos, con los que inicié hace muchos años este apasionante viaje a través de la investigación.

Una mención especial para mi querida Susana con la que compartí aquellos años de Facultad y que, el mundo de la investigación, nos ha permitido coincidir de nuevo años después.

No podría olvidarme de mi querida Blanca, por todas esas vivencias y confianzas que hemos compartido todos estos años y las que quedan. En definitiva, por estar siempre ahí.

Carliños, corazón, ya sabes ...

A mi hermana Mary por todo lo que me ha enseñado y por haber estado siempre a mi lado y, por supuesto, por todo lo que hemos disfrutado y disfrutaremos juntas. Unas palabras llenas de cariño para mi querido Manu, que puso una luz en nuestras vidas.

Y por último, y no por ello menos importante, quisiera agradecer a mis padres, Emilio y M^a del Carmen, todo lo que han dado por mí a lo largo de sus vidas, la educación, los consejos y el cariño que de ellos siempre he recibido y por ser para mí un ejemplo diario de trabajo, respeto, honestidad, paciencia, nobleza y tantas y tantas cosas que no cabrían aquí. Porque sin ellos, esta Tesis no hubiese sido posible.

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



A mi pequeña y gran familia

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad".

(Albert Einstein)





ÍNDICE



Símbolos y abreviaturas

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. SISTEMAS MULTIFÁSICOS. ASPECTOS GENERALES.	7
2.1.1. <i>Tipos de emulsiones</i>	9
2.1.2. <i>Emulsificantes</i>	11
2.1.2.1. Características.	11
2.1.2.2. Clasificación.....	12
2.1.2.3. Emulsificantes empleados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.	14
2.1.3. <i>Preparación de emulsiones. Estabilidad</i>	16
2.2. LÍPIDOS DE ORIGEN MARINO Y EMULSIONES.	18
2.3. EL PROBLEMA DE LA OXIDACIÓN EN LÍPIDOS MARINOS. MECANISMOS Y EFECTOS.....	22
2.4. OXIDACIÓN EN SISTEMAS MULTIFÁSICOS.....	26
2.5. MECANISMOS PARA INHIBIR LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LOS SISTEMAS DE EMULSIONES.	28
2.5.1. <i>Sustancias antioxidantes de uso alimentario</i>	33
2.5.2. <i>Compuestos antioxidantes de origen natural</i>	34
2.5.2.1. Ácidos fenólicos simples.....	36
2.5.2.2. Flavonoides.	38
2.5.2.3. Lignanos.	39
2.5.2.4. Taninos hidrolizables.....	40
2.5.3. <i>Antioxidantes naturales para la inhibición de la rancidez en sistemas multifásicos</i>	42
3. OBJETIVOS.....	47
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
4.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE HIDROXITIROSOLO 53	53
4.1.1. <i>Reactivos</i>	54
4.1.2. <i>Procedimiento experimental</i>	54
4.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE RESVERATROLO 56	56
4.2.1. <i>Reactivos</i>	57
4.2.2. <i>Procedimiento experimental</i>	58
4.3. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO. 58	58
4.3.1. <i>Reactivos</i>	59
4.3.2. <i>Procedimiento experimental</i>	59
4.4. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ISOQUERCITRINA. 60	60
4.4.1. <i>Reactivos</i>	61
4.4.2. <i>Procedimiento experimental</i>	61
4.5. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) DE COMPUESTOS FENÓLICOS. 61	61
4.6. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN AGUA/1-OCTANOL, LOG <i>P</i> 62	62
4.6.1. <i>Derivados de hidroxitirosolo y resveratrol</i>	62
4.6.2. <i>Derivados de ácido gálico e isoquercitrina</i>	62
4.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA. 63	63
4.7.1. <i>DPPH</i>	63
4.7.1.1. Reactivos.	64
4.7.1.2. Procedimiento experimental.....	64
4.7.2. <i>ABTS⁺ (TEAC)</i>	64
4.7.2.1. Reactivos.	64
4.7.2.2. Procedimiento experimental.....	65
4.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA. 65	65
4.8.1.1. Reactivos.	65
4.8.1.2. Procedimiento experimental.....	65
4.9. ANÁLISIS SENSORIAL. 66	66
4.10. SISTEMA MODELO. ACEITES..... 66	66
4.10.1. <i>Descripción del sistema modelo. Caracterización</i>	66
4.10.1.1. Reactivos.	66
4.10.1.2. Procedimiento experimental de determinación de composición en ácidos grasos del aceite.....	66
4.10.2. <i>Preparación de los antioxidantes. Adición al sistema modelo</i>	67

4.10.3. Estudio del desarrollo de la oxidación.....	67
4.10.3.1. Reactivos.....	67
4.10.3.2. Procedimiento experimental.....	67
4.11. SISTEMA MODELO: EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA.....	68
4.11.1. Descripción del sistema. Preparación.....	68
4.11.2. Reactivos.....	69
4.11.3. Procedimiento experimental.....	69
4.11.4. Preparación de los antioxidantes. Adición.....	69
4.11.5. Estudio del desarrollo de la oxidación.....	69
4.11.5.1. Reactivos.....	70
4.11.5.2. Procedimiento experimental.....	70
4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
5.1. DERIVADOS DE HIDROXITIROSO.....	75
5.1.1. Síntesis y estabilidad.....	75
5.1.2. Coeficiente de partición: $\log P$	77
5.1.3. Capacidad antirradicalaria: ensayos DPPH y TEAC (ABTS ⁺).....	78
5.1.4. Capacidad reductora: FRAP.....	78
5.1.5. Actividad de los compuestos derivados de Hyd en sistemas basados en aceite de pescado.....	80
5.1.5.1. Caracterización del aceite.....	80
5.1.5.2. Estudio de la inhibición de los derivados acilados de Hyd en aceites de pescado.....	80
5.1.5.3. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de Hyd en aceites de pescado.....	86
5.1.6. Actividad de los compuestos derivados de Hyd en sistemas basados en emulsiones de aceite de pescado.....	88
5.1.6.1. Estudio de la inhibición de los derivados acilados de Hyd.....	92
5.1.6.2. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de Hyd.....	94
5.1.7. Discusión de resultados.....	97
5.2. DERIVADOS DE RESVERATROLO.....	101
5.2.1. Síntesis y estabilidad.....	101
5.2.2. Coeficientes de partición: $\log P$	104
5.2.3. Capacidad antirradicalaria: DPPH y TEAC (ABTS ⁺).....	105
5.2.4. Capacidad reductora. FRAP.....	107
5.2.5. Actividad de los compuestos derivados de resveratrol en sistemas basados en aceite de pescado.....	110
5.2.5.1. Estudio de la inhibición de derivados acilados de resveratrol en aceites de pescado.....	110
5.2.5.2. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de Res en aceites de pescado.....	117
5.2.6. Actividad de los compuestos derivados de resveratrol en sistemas basados en emulsiones de aceite de pescado.....	122
5.2.6.1. Estudio de la inhibición de derivados acilados de resveratrol en emulsiones de aceite de pescado en agua.....	125
5.2.6.2. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de resveratrol en emulsiones de aceite de pescado en agua.....	131
5.2.7. Discusión de resultados.....	135
5.3. DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO.....	143
5.3.1. Síntesis y estabilidad.....	143
5.3.2. Coeficientes de partición: $\log P$	145
5.3.3. Capacidad antirradicalaria. DPPH.....	145
5.3.4. Capacidad reductora. FRAP.....	146
5.3.5. Actividad de compuestos derivados de ácido gálico en sistemas basados en aceites de pescado.....	148
5.3.5.1. Estudio de la inhibición de ésteres de ácido gálico en un sistema de aceite de pescado.....	148
5.3.5.2. Estudio de la inhibición de glucosil alquil galatos en aceite de pescado.....	150
5.3.6. Actividad de los compuestos derivados de ácido gálico en emulsiones de aceite de pescado.....	152
5.3.6.1. Estudio de la inhibición de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite de pescado en agua, suplementada con ésteres de ácido gálico. Influencia del emulsificante.....	152
5.3.6.2. Estudio de la inhibición de glucosil alquil derivados en emulsiones de aceite de pescado en agua. Influencia del emulsificante.....	159

5.3.7. <i>Discusión de resultados</i>	167
5.4. DERIVADOS DE ISOQUERCITRIN	174
5.4.1. <i>Síntesis y estabilidad</i>	174
5.4.2. <i>Coefficientes de partición: log P</i>	175
5.4.3. <i>Capacidad antirradicalaria: DPPH y TEAC</i>	176
5.4.4. <i>Capacidad reductora. FRAP</i>	177
5.4.5. <i>Actividad de los compuestos derivados de isoquercitrin en sistemas basados en aceites de pescado</i>	178
5.4.6. <i>Estudio de la inhibición de derivados de isoquercitrin en emulsiones de aceite de pescado en agua. Influencia del emulsificante</i>	180
5.4.7. <i>Discusión de resultados</i>	191
6. CONCLUSIONES	203
7. BIBLIOGRAFÍA	207
8. ANEXO	227
8.1. ÍNDICE DE FIGURAS	229
8.2. ÍNDICE DE TABLAS	234
8.3. ÍNDICE DE ESQUEMAS	239









SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Å: angstrom.
AA: ácido araquidónico.
ACN: acetonitrilo.
AcONa: Acetato sódico.
AGE: ácidos grasos esenciales.
ALA: ácido alfa-linolénico.
° C: grado centígrado.
DHA: ácido docosahexaenoico.
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhydracilo.
equiv: equivalente.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EPA: ácido eicosahexaenoico.
Esq: esquema.
Fig: figura.
FL: fluorescencia.
FRAP: poder antioxidante de reducción del hierro (Ferric reducing antioxidant power).
g: gramo.
GLA: ácido γ -linolenico.
HLB: balance hidrofílico-lipofílico.
HPLC-DAD-MS: Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de diodos acoplado a espectrómetro de masas.
IPA: isopropanol.
kg: kilogramo.
kV: kilo voltios.
L: litro.
LA: ácido linoleico.
min: minuto.
mg: miligramo.
mL: mililitro.
mmol: milimoles.
 μ L: microlitro.
 μ m: micrómetros.
nm: nanometro.
ppm: partes por millón.
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.
rpm: revoluciones por minuto
s: segundo.
ROS: especies reactivas de oxígeno.
sd: desviación estándar.
SDS: dodecil sulfato sódico.
Tab: Tabla.
TFA: ácido trifluoroacético.
THF: tetrahidrofurano.
TEAC: capacidad antioxidante equivalente de Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity).
UV: Ultravioleta.





1. RESUMEN



En los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de las propiedades beneficiosas de los lípidos marinos para la salud. Ello ha conllevado un interés por parte de la industria tanto farmacéutica y cosmética o de tecnología de alimentos, a incorporarlos en múltiples formulaciones. Una gran variedad de productos que incorporan este tipo de compuestos son sistemas multifásicos o emulsiones.

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles, normalmente de distinta polaridad, en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño (0,1-100 micras) denominada fase dispersa o interna, en el seno del segundo denominado fase continua o externa. Para mantener la estabilidad de la emulsión durante un período de tiempo razonable es necesario el uso de emulsificantes (o agentes surfactantes), los cuales presentan una afinidad por la superficie de las gotas formando una capa que cubre las gotas. Estas sustancias son de naturaleza anfifílica y están compuestas por un grupo polar orientado en una de las fases y otro grupo no polar orientado en la otra. Las emulsiones se pueden clasificar en función de las fases dispersa y continua en emulsiones de aceite en agua, (O/W, la fase dispersa es un aceite), emulsiones de agua en aceite (W/O, fase dispersa es de naturaleza acuosa) y micelas en las que un ácido graso se dispersa en agua.

La naturaleza de estos lípidos marinos los hace muy susceptibles a procesos de oxidación en los que se generan radicales libres así como compuestos volátiles y que afectan a las propiedades organolépticas de la emulsión, así como, a su estabilidad.

La adición de antioxidantes a estos sistemas es una de las estrategias más extendidas para preservarlos de reacciones químicas indeseables. Uno de los grupos más estudiado desde el punto de vista de la inhibición de la oxidación lipídica es el de los polifenoles, compuestos naturales distribuidos ampliamente en el mundo vegetal. Se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol pudiendo ser simples, (gálico, hidroxitirosol, resveratrol, etc.) como más complejos (catequina; quercetina, etc.).

Su posible incorporación como antioxidantes a distintas formulaciones presenta, en muchos casos, el inconveniente de la escasa solubilidad en la matriz. En los últimos años se han desarrollado procedimientos sintéticos dirigidos a la incorporación de grupos funcionales, como pueden ser ácidos grasos de distinta longitud de cadena o unidades de azúcar, que modifican la polaridad de la molécula original facilitando, de esta manera, su incorporación a estos sistemas multifásicos o de naturaleza grasa. Las modificaciones permiten conservar la actividad antioxidante o incluso incrementarla.

Bajo este contexto, los objetivos globales de este trabajo han sido, por un lado, el diseño de compuestos conjugados a partir de productos naturales de reconocida actividad antioxidante. Las modificaciones en las moléculas tuvieron como objeto facilitar su incorporación a este tipo de matrices ampliamente utilizadas en la industria favoreciendo su estabilidad oxidativa. Un segundo objetivo ha sido el estudio del posible mecanismo de acción como antioxidante en función de su estructura química empleando sistemas modelo de aceite de pescado (que contiene un porcentaje elevado de ácidos grasos poliinsaturados, susceptibles de sufrir oxidación) y emulsiones de aceite de pescado en agua. Dada la dependencia del comportamiento antioxidante con el tipo de emulsificante empleado, también se ha abordado un estudio considerando distintos tipos de los mismos.

Para ello se han seleccionado compuestos con excelentes expectativas como candidatos antioxidantes: hidroxitirosol, resveratrol, ácido gálico, e isoquercitrin. Las modificaciones estructurales llevadas a cabo han consistido en la incorporación de ácidos grasos con distinta longitud de cadena sobre la unidad fenólica básica, así como la introducción de una unidad de glucosa sobre la que también se ha llevado a cabo la incorporación de ácidos grasos con distinta longitud de cadena.

Para la realización de estos objetivos generales, en primer lugar se llevó a cabo la síntesis química de los distintos compuestos y, en una primera aproximación se determinaron sus propiedades antioxidantes *in vitro*. Además, dado que la lipofilicidad es un parámetro importante a tener en cuenta para poder disponerse de forma adecuada en la matriz, se determinó la misma en términos del coeficiente de partición $\log P$.

Posteriormente, estos antioxidantes potenciales se adicionaron en sistemas modelo de aceite de pescado y emulsión de aceite de pescado en agua y se evaluó su capacidad de inhibición del desarrollo de la oxidación lipídica. Para ello se llevó a cabo la determinación química de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y de los compuestos fluorescentes de interacción (estos últimos, sólo en emulsiones). En ambos casos se optimizaron variables como la temperatura o la concentración del antioxidante a añadir. Además, en el caso de las emulsiones de aceite también se abordó la influencia del emulsificante en la capacidad antioxidante de estas moléculas.

Los resultados obtenidos mostraron una elevada eficacia para los derivados de hidroxitirosol, compuestos que siguieron el comportamiento predicho por la “paradoja polar”. Asimismo, los derivados de resveratrol mostraron una dependencia de la actividad antioxidante con el tipo de sustituyente introducido y la posición de la molécula donde tiene lugar dicha modificación. Todos los alquil galatos presentaron una elevada eficacia para inhibir la oxidación lipídica en aceites de pescado. Los glucosil alquil galatos resultaron también eficaces para inhibir la oxidación en aceites de pescado, si bien con un grado de eficacia inferior a los alquil galatos. Por último, todos los derivados acilados de isoquercitrin resultaron eficaces para inhibir de la oxidación lipídica en aceites de pescado. Los resultados obtenidos en las distintas emulsiones estudiadas evidenciaron, de nuevo, la fuerte dependencia de la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos con el emulsificante empleado.

En general, los resultados obtenidos mostraron que la actividad antioxidante de los distintos compuestos se vio claramente influida por las modificaciones introducidas en el esqueleto de la molécula original. Los derivados de resveratrol, ácido gálico e isoquercitrin mostraron una dependencia no lineal entre la actividad antioxidante y el incremento de la longitud de cadena observándose una longitud de cadena óptima a la que la actividad antioxidante es mayor, efecto “cut-off”.

En definitiva, la elucidación de los mecanismos implicados en estos procesos es necesario para poder diseñar compuestos a la carta que permitan su incorporación en estas matrices permitiendo, además, el diseño de nuevas formulaciones que incluyan lípidos marinos altamente insaturados y con un gran efecto positivo no solo desde el punto de vista nutricional, sino también desde el punto de vista de la salud.



2. INTRODUCCIÓN



2.1. SISTEMAS MULTIFÁSICOS. ASPECTOS GENERALES.

Una gran cantidad de productos presentes en la vida diaria, bien de origen natural (leche, margarinas, etc.), bien procesados, son emulsiones. Dentro de la industria alimentaria, mayonesas, salsas, condimentos, alimentos infantiles son ejemplos de alimentos que se presentan en estado emulsionado mientras que, en la industria farmacéutica y cosmética, cremas o emulsiones microscópicas (empleadas para distribuir vacunas y matar microbios) son ejemplo de este tipo de sistemas. Además, la introducción de nuevas texturas a la hora de presentar nuevos productos y que estos resulten más atractivos para el consumidor, ha abierto un sinfín de posibilidades y cuenta con un gran potencial a la hora de diseñar alimentos funcionales. Se pueden definir estos alimentos como aquellos que, además de las propiedades nutricionales presentes en cualquier alimento, poseen también propiedades beneficiosas para la salud. En los últimos años se han diseñado diferentes sistemas emulsionados que permiten la incorporación de compuestos bioactivos, tanto de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica, en distintos alimentos (Garti, 1997; Sagalowicz & Leser, 2010; Dickinson, 2013). En este contexto, las emulsiones de aceite en agua (O/W) se han empleado en gran medida para la incorporación de compuestos hidrofóbicos como tocoferol o ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ en alimentos, en bebidas o en preparados alimenticios multicomponente (Lee, S., et al., 2006; McClements, David Julian, et al., 2009; Sagalowicz & Leser, 2010; Dickinson, 2013).

A pesar de la dificultad en su formulación y los numerosos factores que afectan a su estabilización, las emulsiones son el vehículo más empleado habitualmente en cosmética, debido a la afinidad fisicoquímica y estructural existente entre este tipo de preparados y el substrato sobre el que se aplican que es el manto epicutáneo. En este sector de los cosméticos, las cremas hidratantes, protectoras para los rayos UV, etc. son ejemplos de emulsiones. En el sector farmacéutico, las emulsiones pueden servir para encapsular los fármacos activos y después liberarlos cuando se encuentran en el torrente sanguíneo.

Por ello, el estudio de las propiedades físicas y químicas de los sistemas multifásicos o emulsiones, es de gran importancia en la industria (alimentaria, farmacéutica, cosmética).

Una emulsión es una dispersión de dos líquidos inmiscibles, normalmente de distinta polaridad, en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño (0,1-100 micras), denominada fase dispersa o interna, en el seno del segundo, denominado fase continua o externa. Es conveniente dividir una emulsión en tres regiones claramente diferenciadas: el interior de las gotas, la fase continua y la región interfacial (McClements, D. J. & Decker, 2000). Una de las características importantes que se tiene al poner dichas fases en contacto es la tensión superficial, la cual es resultado de las fuerzas de atracción de las moléculas de la fase dispersa con las moléculas del seno de la fase continua. A medida que se incrementa la tensión superficial de la gota, ésta tiende a separarse de la fase continua.

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que su energía libre de formación es mayor que cero y, en consecuencia, la tendencia natural es la separación de ambos líquidos disponiéndose en función de su densidad. Para mantener la estabilidad de la emulsión durante un cierto período de tiempo, es necesaria la adición de emulsificantes (o agentes surfactantes) en la etapa de homogeneización. Estos compuestos se adsorben en la superficie de las gotas formando una capa que recubre las mismas y evitan que se vuelvan a agregar. Los surfactantes intervienen de dos maneras en la formación de emulsiones; por una

parte reducen la tensión superficial (cantidad de energía necesaria para crear un área interfacial unida) entre los líquidos inmiscibles; por otro lado, forman una película interfacial entre el líquido disperso (fase interna) y el medio continuo (fase externa), actuando como una barrera protectora que retarda o impide la separación de dos líquidos inmiscibles. Esta barrera puede producir una repulsión de naturaleza electrostática (adsorción de emulsificantes iónicos) o estérica (adsorción de emulsificantes no iónicos o polímeros). En un sistema emulsionado, las diferentes moléculas se van a distribuir entre las diferentes fases (acuosa, aceitosa y la interfase) en función de su polaridad. La región interfacial o interfase es una delgada película entre las fases en la que se tiene una mezcla de aceite, agua y emulsificante. Por lo tanto, acorde a su polaridad, las moléculas no polares se situarán en la fase aceitosa, las moléculas polares se situarán en la fase acuosa y las moléculas anfifílicas (emulsificantes) se situarán en la interfase.

Las características de las emulsiones pueden resumirse en:

- Fracción de volumen de fase dispersa: Esta fracción representa la concentración de las gotas de la fase dispersa en el seno de la emulsión. Este parámetro está íntimamente relacionado con la apariencia, textura, aromas, estabilidad y el coste en la obtención de productos alimentarios basados en emulsiones.
- Distribución del tamaño de partícula: Es un parámetro muy importante que va a determinar la gran mayoría de las propiedades de productos alimentarios basados en emulsiones (Dickinson & Stainsby, 1982; Dickinson, 1992). Si todas las gotas que forman la emulsión tienen el mismo tamaño, hablamos de emulsión monodispersa, y en este caso, pueden caracterizarse totalmente con el radio o el diámetro de gota. Por otro lado, si la emulsión está compuesta por un número variable de tamaño de gota tenemos una emulsión polidispersa. En este caso, su caracterización es más complicada y se habla de un tamaño medio de gota o de un rango de tamaño de gota.
- Propiedades de la interfase: La interfase de la gota es una región muy estrecha que rodea cada gota y que está compuesta de una mezcla de aceite, agua y emulsificante (Hunter, 1986, 1989). Su composición y su estructura vendrá determinada por el tipo y la concentración de las moléculas con actividad superficial, así como, por los procesos que tienen lugar durante y después de la formación de la emulsión.
- Carga de la gota: Las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de muchos productos alimentarios basados en emulsiones vienen determinadas por la carga que presentan las gotas (Dickinson & Stainsby, 1982). La presencia o no de gotas cargadas en la emulsión vendrá determinada por el tipo de emulsificante empleado (si es iónico o neutro) y por el pH de la fase acuosa. Es una característica muy importante que va a determinar las propiedades físicas (como la viscosidad) y químicas de los productos alimenticios basados en emulsiones. Además, también se pueden producir interacciones electrostáticas entre gotas cargadas y otras sustancias como antioxidantes, vitaminas etc. (Dickinson, 1992; Coupland & McClements, 1996; Landy, et al., 1996; Mei, et al., 1998).

- Estado de agregación de la gota: El estado físico de la gota puede influir en propiedades físicas y organolépticas de la emulsión como la apariencia, la viscosidad, el aroma o su estabilidad (Dickinson & McClements, 1995). Un ejemplo de ello es la producción de mantequilla o margarina que depende de una desestabilización controlada de una emulsión de aceite que contiene gotas parcialmente cristalizadas.
- Otras propiedades de las emulsiones son la reología de la emulsión (viscosidad) o la transparencia de la misma.

2.1.1. Tipos de emulsiones.

Las emulsiones se pueden clasificar en función de la naturaleza de las fases dispersa y continua en (Frankel, E.N., 1998):

a) Emulsiones de aceite en agua (O/W, del inglés *oil in water*): Son aquellas en las que las gotas de aceite (fase dispersa) están dispersadas en agua (fase continua). El agente emulsificante está formado por un parte lipofílica o hidrofóbica (residuo alquilo de cadena larga) soluble en la fase aceitosa, y una parte hidrofílica con un grupo iónico o un determinado número de grupos hidroxilo, que es soluble en la fase acuosa. En este tipo de emulsiones, el agente emulsificante se sitúa en la interfase donde disminuye la tensión superficial, facilitando la dispersión de una fase en la otra. La leche o la mayonesa son emulsiones de este tipo.

b) Emulsiones de agua en aceite (W/O, del inglés *water in oil*): Las gotas de agua son las que se encuentran dispersadas en una fase continua oleosa. Para estabilizar este tipo de emulsiones es necesario que el emulsificante esté compuesto de un grupo hidrofílico relativamente fuerte y un grupo lipofílico más débil. De esta forma será predominantemente soluble en la fase acuosa. Las mantequillas y las margarinas se encuadran en este grupo.

c) Micelas: Son aquellas en las que un ácido graso se dispersa en agua. En estas circunstancias, los ácidos grasos adquieren una distribución de tipo micelar en el seno de la fase acuosa. De esta manera, las cabezas de los grupos polares están orientadas hacia la fase acuosa, y las colas no polares están orientadas hacia la fase aceitosa. Este tipo de emulsiones no se suelen encontrar en los alimentos ya que están compuestos mayoritariamente por triacilglicerol y fosfolípidos. En emulsiones de triacilglicerol se pueden encontrar pequeñas cantidades de ácidos grasos libres dando lugar a la formación de micelas mixtas y emulsiones.

d) Liposomas: Se producen cuando de forma natural los fosfolípidos se dispersan en agua. De forma natural se distribuyen formando multicapas que consisten en bicapas formadas entre la fase acuosa y la capa más próxima a la fase aceitosa en forma de monocapa. Los fosfolípidos se distribuyen de tal manera que las cabezas no polares se sitúan lo más alejadas posible del agua y las cabezas polares se localizan en contacto con ella.

En la **Fig. 1** se representan los distintos tipos de emulsiones citadas.

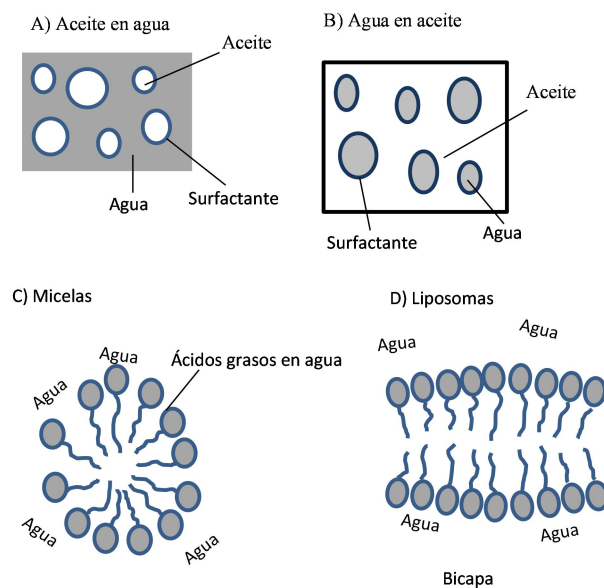


Fig. 1 Tipos de emulsiones.

Otra clasificación más sencilla sería:

- Emulsiones simples son aquellas en las que las gotas de aceite están dispersadas en agua (O/W) o gotas de agua dispersadas en el aceite (W/O).
- Emulsiones múltiples son aquellas en las que un líquido está disperso en la fase continua, la cual es, a su vez, otra emulsión (W/O/W, agua en una emulsión de aceite agua; O/W/O, gotas de aceite en una emulsión de agua y aceite).

En los últimos años se han propuesto nuevos tipos de emulsiones especialmente destinadas a servir como vehículo de la incorporación de compuestos con bioactividad destinados a reforzar el valor saludable de los alimentos en los que son incluidos.

Las emulsiones múltiples o agua-aceite-agua o dobles emulsiones son dispersiones en líquidos de naturaleza más compleja en las cuales las gotas de aceite que contienen pequeñas gotas de agua en su interior, están dispersas en una fase acuosa continua. Hay dos interfaces en estos sistemas complejos; un emulsionante hidrofóbico con un bajo valor de HLB estabiliza la primera interfase, y un emulsionante hidrofílico con un alto valor de HLB está presente en la segunda interfase (Benichou, et al., 2004). Este tipo de emulsiones ofrece una serie de oportunidades muy prometedoras para la industria alimentaria, por ejemplo, la incorporación de compuestos hidrofóbicos en sistemas acuosos, permite la encapsulación de compuestos bioactivos hidrofílicos y puede ayudar a mejorar el contenido de grasa de los alimentos (reduciendo el contenido en grasa y dando lugar a una composición en ácidos grasos más saludable) (Jiménez-Colmenero, 2013).

Las emulsiones gelificadas, emulsiones múltiples estabilizadas con gelatina, tienen numerosas aplicaciones en la industria alimentaria encaminadas al desarrollo de nuevos productos mejorando sus atributos sensoriales y sus características nutricionales y/o funcionales (Weiss, et al., 2005; Lobato-Calleros, et al., 2008; Li, et al., 2014). Por lo tanto, este tipo de emulsiones ofrecen una gama de posibilidades interesantes para la industria alimentaria ya que pueden mejorar la composición lipídica, encapsular los compuestos bioactivos y proporcionar ciertas propiedades plásticas. Sus características físicas y estructurales (estabilidad, viscoelasticidad, eficiencia de encapsulación, minimización de separación de fases, etc.) ofrecen productos de ventajas tecnológicas (ingredientes alimentarios) para optimizar la presencia de compuestos bioactivos. Además, esta estrategia puede influir en la biodisponibilidad y oxidación de estos compuestos, ya que están relacionados con su estructura molecular y sus propiedades fisicoquímicas.

2.1.2. Emulsificantes.

Como ya se ha indicado anteriormente, para mantener la estabilidad de una emulsión es necesaria la presencia de agentes emulsificantes, también denominados emulgentes o surfactantes.

Para que una molécula sea efectiva como agente emulsionante debe poseer actividad interfacial. Es decir, debe tener la capacidad de disminuir la tensión en la interfase agua-fase oleosa, de manera sustancial a la vez que rápida. Por lo tanto, cuanto menor es la tensión interfacial, mayor es la extensión sobre la cual las gotas pueden ser dispersadas durante una agitación intensa.

Dentro de las propiedades físicas que caracterizan a una emulsión como el tamaño, concentración y estado físico de la gota, la naturaleza del emulsificante (estructura química, carga eléctrica, concentración, ...) juega un papel muy importante en las características de la interfase (Dickinson, 1992; McClements, D. J., 1999).

2.1.2.1. Características de los emulsificantes.

Por definición, un emulgente es una molécula anfifílica que posee un grupo polar (hidrofílico) el cual presenta una gran afinidad por el agua, y un grupo lipofílico (hidrofóbico) el cual presenta una gran afinidad por el aceite. Las propiedades del surfactante van a venir definidas por la naturaleza de sus grupos hidrofílico e hidrofóbico.

Las características que debe tener un emulgente son:

- Ser soluble en, al menos, una de las fases del sistema.
- La concentración en la interfase debe ser mayor que la disuelta en el líquido.
- Formar una capa monomolecular en la fase interna.
- Formar micelas a una determinada concentración.

- Poseer al menos alguna de las siguientes propiedades: detergencia, poder espumógeno, ser humectante, emulgente, solubilizante o dispersante.

2.1.2.2. Clasificación.

Los emulsificantes pueden clasificarse en base a:

- Su afinidad hacia los grupos hidrofílicos o lipofílicos en función del balance o equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB). Es un método semiempírico que da una idea de la afinidad relativa de una molécula de emulsificante por la fase acuosa o por la fase aceitosa. Griffin (Griffin, W. C. , 1949; Griffin, W. C. 5 1954) y Davies (Davies, 1957) establecieron métodos para poder determinar el HLB (**Tab. 1**).

Tensioactivo	Marca registrada	HLB
Alcohol cetílico		1,0
Sorbitán triesterato	Span 65	2,1
Sorbitán, monolaurato	Span 20	8,6
Lecitina hidroxilada		~ 9
Polioxietileno, lauriléter	Brij 30	9,5
Sorbitán polioxietileno monolaurato	Tween 20	16,7
Laurilsulfato sódico (SDS)		40

Tab. 1 Valores HLB de algunos emulgentes.

A cada emulsificante se le asigna un valor HLB acorde con su estructura química. Si una molécula tiene un valor HLB elevado, significa que tiene una proporción mayor de grupos hidrofílicos en relación a los grupos lipofílicos, y viceversa. Uno de los inconvenientes que presenta este concepto es que la temperatura o las condiciones de la disolución pueden modificar las propiedades funcionales de un emulsificante.

En función de este valor, los emulgentes se pueden clasificar en función de sus propiedades químico-físicas en:

- Antiespumante: Valores de HLB comprendidos entre 1,5 y 3.
- Emulsionante (agua en aceite): Valores de HLB comprendidos entre 3 y 6.
- Humectante y agente de extensión: Valores de HLB comprendidos entre 7 y 9.
- Emulsionante (aceite en agua): Valores de HLB comprendidos entre 8 y 16.
- Detergente: Valores de HLB comprendidos entre 13 y 15.
- Solubilizante o hidrótripo: Valores de HLB comprendidos entre 15 y 18.

Esta clasificación no tiene en cuenta el ambiente físico-químico en el seno de la emulsión, y éste puede afectar al comportamiento del emulsificante.

b) Su estructura química que permite realizar una clasificación en emulgentes aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos.

- Los emulgentes aniónicos son aquellos que poseen un grupo polar capaz de ionizarse en solución acuosa, adquiriendo carga eléctrica negativa. Tienen a perder estabilidad a pH bajo y en presencia de cationes polivalentes o de tensioactivos catiónicos (carboxilatos como el laurato de potasio, sulfatos como el lauril sulfato de sodio, o sulfonados como el dioctilsulfosuccinato de sodio).

- Los emulgentes catiónicos son aquellos que contienen una carga positiva y si bien, no son muy empleados. Tienen acción antimicrobiana y son de uso externo. Pueden ser sales de amonio cuaternario (bromuro de cetil trimetil amonio, cloruro de lauril trimetil amonio).

- Los emulgentes anfóteros son aquellos que poseen un grupo polar hidrofílico de carácter aniónico conjuntamente con uno de carácter catiónico. La actividad depende del pH de la solución. El grupo aniónico puede ser un grupo carboxilato o fosfato (proteínas, polipéptidos y alquilobetainas), y el catiónico un grupo amino o amonio cuaternario. (lecitinas y cefalinas).

- Los emulgentes no iónicos son los más utilizados en la formulación farmacéutica por su compatibilidad, estabilidad y baja toxicidad. Son aquellos que no contienen carga iónica. Pueden ser alcoholes de cadena larga (alcohol láurico), ésteres de glicerol (moni, di y triésteres de glicerol con ácidos grasos de cadena larga), ésteres de ácidos grasos con otros polioles (ésteres de sorbitol y polietilenglicol, span y tween, respectivamente), alcaloaminas alifáticas y derivados de óxido de etileno.

c) Otros emulsionantes son:

- Materiales naturales como los derivados del esteroles (cera de abeja), coloides hidrófilos que forman una barrera hidrofílica entre las dos fases útiles para espesar y aumentar la viscosidad del sistema (goma arábiga, agar, carragenatos, gelatina) y polisacáridos semisintéticos como la metilcelulosa.

- Sólidos finos como el $\text{Al}(\text{OH})_3$ o el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ que se adsorben en la interfase y estabilizan la emulsión. O arcillas (bentonita, silicato de Al y Mg, etc.).

Un emulsificante no deja de ser una barrera física entre las gotas de aceite y la fase continua acuosa, que evita que la coalescencia tenga lugar. En el caso de los emulsificantes cargados, cuando éstos recubren las gotas de aceite, las cargas positivas o negativas que se distribuyen en la interfase, se repelen electrostáticamente, y mantienen las gotas separadas. En el caso de los emulsificantes no cargados, suelen contener grupos voluminosos y, en este caso, las gotas se mantienen separadas por impedimento estérico debido a la presencia de estos grupos.

No existe el emulsificante perfecto y en la industria es bastante habitual la combinación de varios de ellos al mismo tiempo para incrementar la estabilidad de la emulsión en función de las necesidades.

2.1.2.3. Emulsificantes empleados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

En la industria alimentaria sólo pueden emplearse aquellos emulsificantes que estén considerados como aditivos alimentarios según la legislación vigente (Madrid & Cenzano, 2000).

Los emulgentes de naturaleza iónica son los empleados para estabilizar las emulsiones de aceite en agua. Se orientan en la interfase con los residuos alquilo solubilizados en las gotas de aceite y los grupos hidrofílicos cargados orientados hacia la fase acuosa. Los emulgentes de naturaleza no iónica se orientan en la superficie de las gotas de aceite disponiendo la cabeza polar hacia la fase acuosa. De esta manera se origina una capa hidratada alrededor de los grupos polares que estabiliza las gotas de aceite. Los emulsificantes no iónicos son los que se emplean en mayor medida en las emulsiones alimentarias ya que no pierden su actividad superficial al entrar en contacto con la sal que contienen los alimentos.

Los tipos de emulsificantes empleados en la industria alimentaria pueden ser sintéticos o de origen natural. La gran mayoría de los emulsificantes no iónicos sintéticos son ésteres de ácidos orgánicos de longitud de cadena media o larga con polialcoholes como el glicerol, el propileno alcohol, la sucrosa o derivados del sorbitol. Las propiedades de los monoglicéridos pueden modificarse por esterificación con ácidos como el acético, el láctico, el tartárico o el cítrico.

Dentro de los emulsificantes de origen natural, uno de los grupos más importantes por su efectividad es el de las proteínas como (por ejemplo, las caseínas, presentes en el suero de la leche). Se ha demostrado que las proteínas son muy efectivas en la prevención de la coalescencia (Dickinson, et al., 1992). Ello es debido a que son capaces de producir emulsiones con un tamaño de gota muy pequeño, con importantes fuerzas de repulsión entre las gotas (debido a una combinación de interacciones electrostáticas y de tipo estérico), la tensión interfacial es relativamente elevada y forman membranas con características viscoelásticas. Los hidrolizados de proteínas son menos efectivos ya que tienden a formar capas interfaciales más finas, menos viscoelásticas y cuya ruptura es más fácil.

Otras sustancias de origen natural empleadas ampliamente como emulsificantes son los fosfolípidos, moléculas formadas por ésteres de ácidos grasos y la molécula del glicerol y una cabeza polar formada por un grupo fosfato esterificado con diferentes sustituyentes de naturaleza de tipo amino o glucosídica. La fosfatidilcolina, se conoce de forma general por lecitina y es ampliamente empleada en la formulación de emulsiones alimentarias. Las lecitinas más empleadas son las que provienen de la yema de huevo y de la soja. Las modificaciones en su estructura mediante acilaciones o hidroxilaciones, incrementan sus propiedades hidrofílicas.

En la industria farmacéutica y cosmética, los emulgentes más empleados son:

- Surfactantes aniónicos: Como el estearato de potasio (jabones) o el dodecil sulfato de sodio (SDS) (champús).
- Surfactantes catiónicos: Los más usados son los derivados de amonio cuaternario y las sales de aminas y se emplean principalmente como bactericidas (bromuro de alquil trimetil amonio) o antisépticos.
- Surfactantes anfóteros: Se emplean a la vez como agentes detergentes y bactericidas (aminoácidos propiónicos, derivados de la betaína).
- Surfactantes no iónicos: Son compatibles con otros tipos de surfactantes, y entre sus propiedades puede mencionarse que son pocos sensibles a los cambios de pH. Se emplean como detergentes y emulsificantes (éteres de polioxietilén glicol, ésteres de glicerol, etc.)
- Surfactantes naturales: Su acción es muy limitada en comparación con los surfactantes sintetizados debido a su débil eficacia físicoquímica, como, por ejemplo, los fosfolípidos (lecitina).

En la **Fig. 2** se representan las estructuras de algunos de los emulsificantes empleados en la industria.

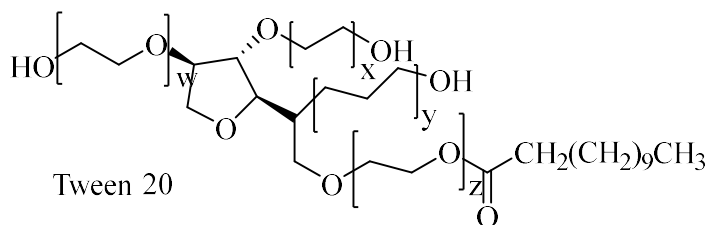
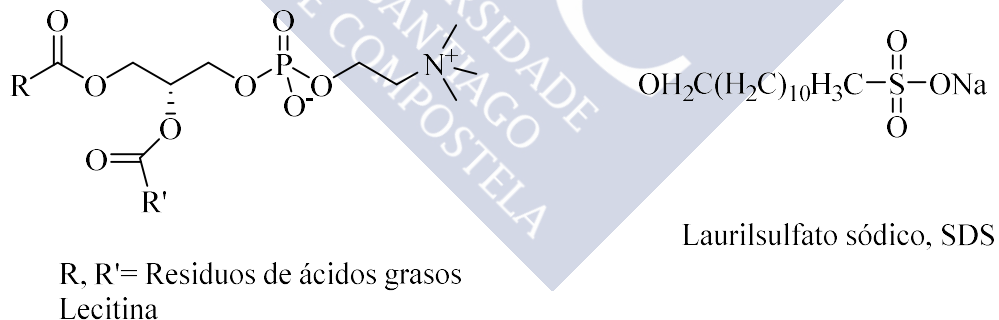


Fig. 2 Emulgentes empleados en la industria.

2.1.3. Preparación de emulsiones. Estabilidad.

Desde el punto de vista práctico, el procedimiento elegido para obtener la emulsión va a determinar la estabilidad y las características físicas de la misma (Horn, et al., 2012).

Otros factores a tener en cuenta son la escala de la producción, las propiedades del material de partida, la distribución del tamaño de gota, las propiedades físico-químicas de la emulsión final y, obviamente, desde el punto de vista de la industria los costes derivados de la producción.

De manera general, los métodos de preparación de emulsiones se pueden clasificar en:

- Métodos mecánicos o de dispersión, también denominados de alta energía: Son aquellos en los que se emplean dispositivos de agitación mecánica como pueden ser agitadores u homogeneizadores de hélices u homogeneización por ultrasonidos. En estos sistemas, parte de la energía suministrada al sistema se pierde por disipación debido a la viscosidad de los distintos componentes que conforman la emulsión. Otro inconveniente que pueden presentar estos métodos es que las turbulencias que se originan durante la agitación pueden dar lugar a emulsiones con un tamaño de gota variable. El desarrollo de membranas de filtración disminuye esta variabilidad (Joscelyne & Trägårdh, 2000; Vladislavljević, et al., 2004; Matos, et al., 2013).
- Métodos físico-químicos o de condensación, también denominados de baja energía: Se caracterizan porque la energía que es necesario aportar para originar la emulsión proviene de los propios componentes de la emulsión. Generalmente conducen a emulsiones monodispersas, con una variación menor en el tamaño de gota (Solans & Solé, 2012). Dentro de ellos se encuentran los métodos de inversión de fase (Solè, et al., 2010) o los de emulsificación espontánea (Komaiko, et al., 2015).

Los distintos equipos para llevar a cabo la homogeneización incluyen:

- Molinos coloidales: Un molino coloidal tiene una superficie fija (estator) y otra superficie rotativa (rotor) posicionadas de tal forma que entre ellas haya una separación de milímetros la cual es ajustable por medio de un volante regulador para la separación de las piedras de corindón (sistema de molienda). Al pasar a alta velocidad fricciona todas las partículas del producto realizando una mezcla homogénea y perfecta evitando que haya separación de las distintas componentes como agua, aceite, grasas, etc. Trabajan por lo general desde 3,000 rpm. hasta 15,000 rpm. Estos molinos son los más indicados para manipular líquidos, semi-líquidos, pastas, cremas, emulsiones, viscosos y grumosos y se emplean ampliamente en la industria alimentaria (mermeladas, helados, patés, quesos, etc.), farmacéutica (maquillajes, jarabes, cremas, etc.) o química (detergentes, adhesivos, ceras, etc.).
- Mezcladores de alta velocidad: Se utilizan ampliamente para preparar emulsiones de aceite en agua (Brennan, et al., 1990). El líquido (aceite y agua) se

dispone en un recipiente y se remueve con un agitador a una velocidad muy elevada (entre cientos y miles de rpm) dando lugar a un campo de velocidades con gradientes de velocidad longitudinal, rotacional y radial. En este caso, la presencia de turbulencias favorece la separación de la gota. Estos gradientes de velocidad ejercen una tensión de cizallamiento sobre el fluido, rompiendo la interfase existente entre el aceite y la fase líquida, formando, finalmente, las gotas. Debido a que este campo de velocidades depende fuertemente de la geometría del agitador, la eficiencia en la formación de la emulsión va a estar afectada por el diseño del agitador. Un aspecto a tener en cuenta es que la energía disipada provoca un incremento en la temperatura de la emulsión. Por lo tanto, si el proceso de agitación es muy largo, es necesario incluir un sistema de enfriamiento para controlar la temperatura.

- Homogeneizadores de alta presión: El empleo de estos equipos permite disminuir el tamaño de partícula. Por otro lado, su coste es mucho más elevado. El flujo dinámico y la alta velocidad en el espacio entre el cabezal de impacto y el cabezal de paso generan la micronización de las partículas por medio de turbulencia, cavitación, fuerza de corte e impacto. Después de pasar por un canal estrecho, la mezcla sale a una elevada velocidad debido a la pérdida de presión produciendo la ruptura de la gota en otras más pequeñas (Phipps, 1985). En este caso, el incremento de temperatura es pequeño a no ser que las emulsiones se sometan varias veces al proceso o que la presión del homogeneizador sea excesivamente elevada.
- Homogeneizadores ultrasónicos: Estos homogeneizadores utilizan ondas ultrasónicas de alta intensidad para generar tensión de cizallamiento intensa y un gradiente de presión. Ambos procesos son los responsables de la ruptura de las gotas (Gopal, 1968; McCarthy, 1984). Las ondas ultrasónicas son generadas fundamentalmente por transductores piezoeléctricos o por generadores de chorro líquido.
- Homogeneizadores de membrana: Estos homogeneizadores utilizan una membrana de vidrio para crear gotitas (Kandori, 1995). Estas gotitas son forzadas a penetrar en la fase continua a través de la membrana. Debido a que el tamaño de gota depende en gran medida del tamaño de poro de la membrana además de la tensión interfacial entre la fase continua y la dispersa, la distribución del tamaño de las distintas gotas es muy estrecho. El tamaño de gota puede controlarse con el tamaño de poro de la membrana. Además, la eficiencia energética es elevada ya que la energía de disipación producida en el proceso es menor que la que se produce en otros equipos de homogeneización.
- La microfluidización se emplea para obtener emulsiones con un tamaño de gota extremadamente pequeño (puede ser menor que $0,1 \mu\text{m}$) (Dickinson & Stainsby, 1988). En este caso, las dos fases se aceleran por separado a una alta velocidad y luego simultáneamente golpean en una superficie. Como resultado, la fase dispersa se divide en pequeñas gotas. Repeticiones sucesivas del proceso da lugar a una disminución del tamaño de gota.

La estabilidad de una emulsión depende de los siguientes factores: el tamaño de partícula, la diferencia de densidad de ambas fases, la viscosidad de la fase continua y de la emulsión final, las cargas de las distintas partículas que forman parte de la emulsión, la naturaleza, la eficacia y cantidad del emulsificante, y las circunstancias de almacenamiento, es decir, las temperaturas altas y bajas, la agitación y vibración, la dilución o evaporación durante el almacenamiento o el uso.

La pérdida de la estabilidad de las emulsiones puede tener lugar mediante cuatro mecanismos diferentes:

- La floculación es la adhesión de las gotas sin fusionarse sin existencia de variación en la distribución de tamaño de las gotas. Este proceso está controlado por un equilibrio entre las fuerzas de atracción electrostáticas de Van der Waals, y las fuerzas repulsivas de tipo estéricas y de hidratación.
- La coalescencia es la fusión de gotas para crear gotas más grandes con la eliminación de parte de la interfase líquido-líquido. Se cree que este fenómeno está relacionado con la curvatura preferida y con la rigidez de la capa de emulsificante que estabiliza la emulsión.
- El “creaming” o sedimentación se trata de un proceso debido a la acción de gravedad y que produce un gradiente vertical de concentración de las gotas sin variar su tamaño.
- El engrosamiento de gotas se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas, hasta que éstas desaparecen. Este proceso tiene lugar a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas es mayor en las gotas de menor tamaño.

2.2. LÍPIDOS DE ORIGEN MARINO Y EMULSIONES.

En los últimos años se ha avanzado significativamente en el estudio de las propiedades beneficiosas para la salud de los lípidos marinos. Ello ha conllevado un interés por parte de la industria tanto farmacéutica y cosmética y la industria alimentaria a incorporarlos en múltiples formulaciones para enriquecer el producto. Un campo muy importante que incorpora este tipo de compuestos son los sistemas multifásicos o emulsiones

Los beneficios de los lípidos marinos en la salud se atribuyen, mayoritariamente, a su elevada composición en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (ω -3-PUFA). El consumo y el desarrollo de productos alimenticios enriquecidos con ácidos grasos ω -3 son de gran interés dentro del contexto de las dietas occidentales. Ello es debido a la existencia de un gran número de efectos beneficiosos para la salud, principalmente relacionados con enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Ruxton, et al., 2004; Simopoulos, 2006).

Es importante distinguir entre los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de cadena larga procedentes de los organismos marinos como el ácido eicosapentaenoico (EPA) o el ácido

docosahexanoico (DHA), y los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 de corta o media cadena como el ácido ALA, o α -linolénico (18:3 ω -3) presentes, fundamentalmente, en el mundo vegetal.

En la **Fig. 3** se muestran las estructuras de algunos de estos compuestos. En estos ácidos grasos, el grupo $-\text{CH}_3$ terminal se denomina carbono ω , empezando a contabilizar desde aquí la posición 1. Todos los dobles enlaces están separados por un grupo metileno y en conformación cis.

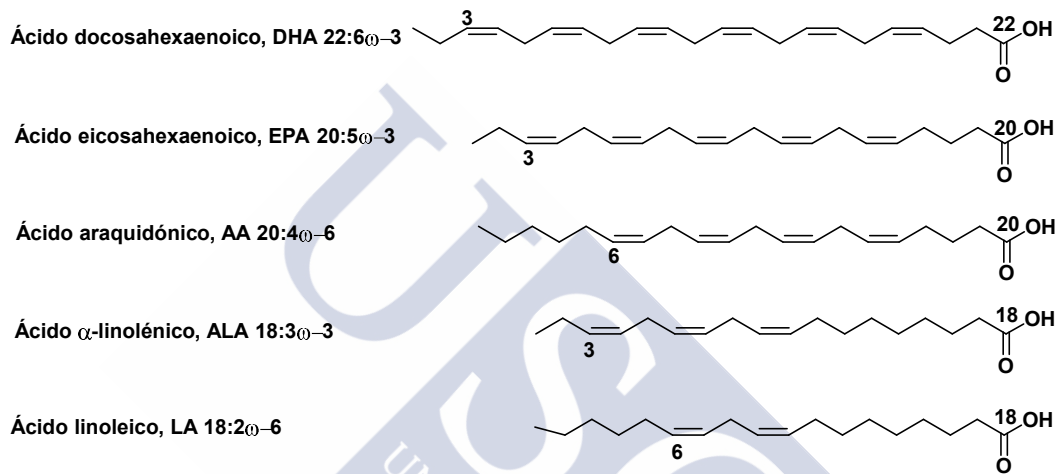


Fig. 3 Estructura de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6.

Los ácidos linoleico (C18:2 ω -6) y α -linolénico (C18:3 ω -3), se consideran ácidos grasos esenciales (AGE), por cuanto no pueden ser sintetizados en el organismo y deben ser incorporados en la dieta. Esto es debido a la baja capacidad de los tejidos animales para introducir dobles enlaces en posiciones anteriores al carbono 9 contando a partir del carbono ω terminal. Ambos ácidos son los precursores de las series de ácidos grasos ω -6 y ω -3, respectivamente. Después de la absorción intestinal, pasan a formar parte de quilomicrones (lipoproteínas) y se dirigen al hígado en donde, por un lado, pueden sufrir modificaciones en la longitud de la cadena (elongación) o, por otro lado, puede ocurrir la introducción de dobles enlaces en la cadena (desaturación). Ambos procesos están catalizados por el mismo sistema enzimático compuesto por elongasas y desaturasas. En la **Fig. 4** se muestra un esquema de la ruta metabólica que siguen estos ácidos para la síntesis de los distintos ácidos grasos de las series ω -3 y ω -6.

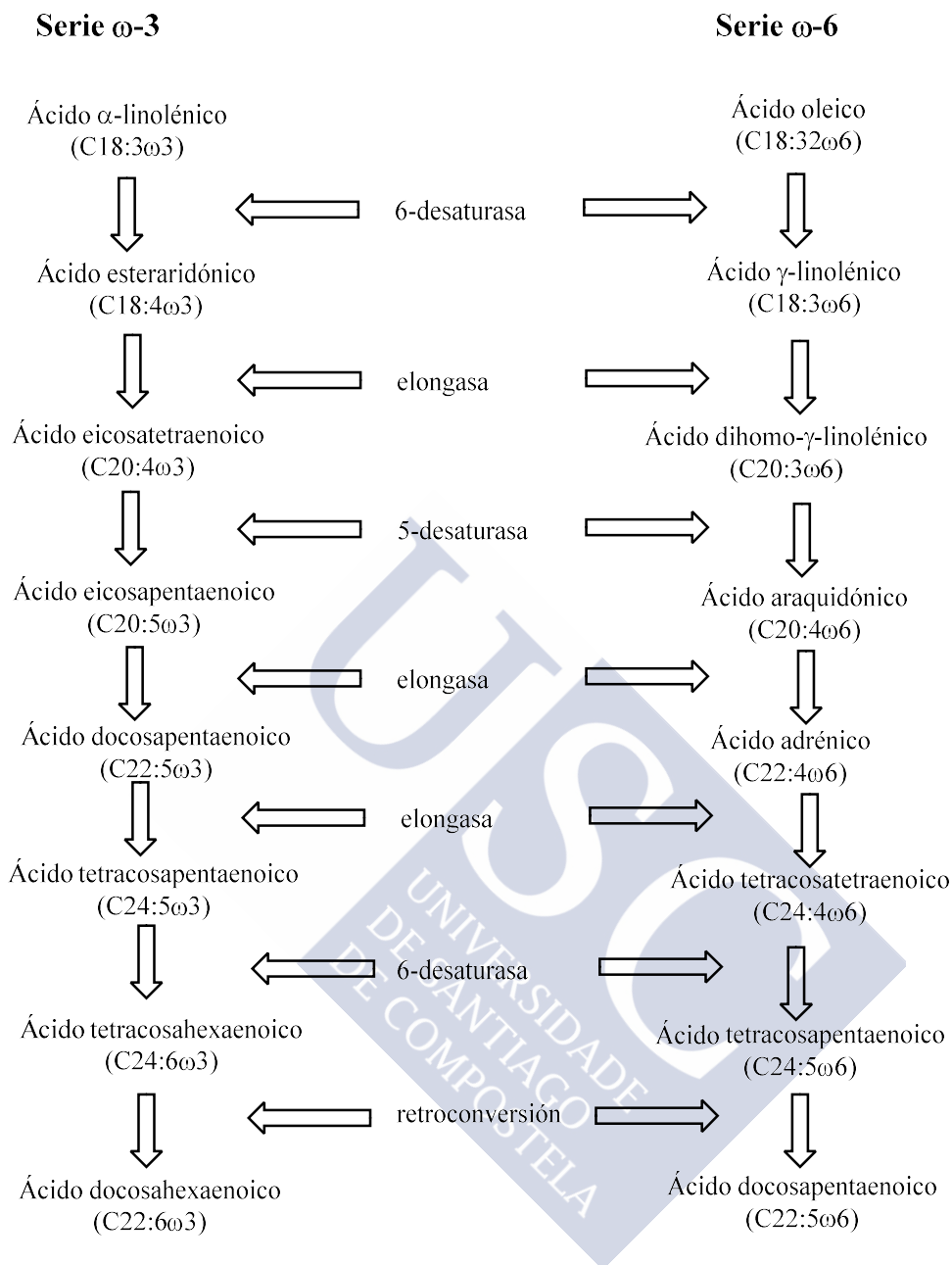


Fig. 4 Rutas metabólicas de los ácidos grasos de la serie ω -3 y ω -6.

Los beneficios del consumo de aceites de pescado tienen sus orígenes en los estudios pioneros llevados a cabo por Bang y col. cuando observando las costumbres alimenticias de los esquimales, con una dieta rica en grasas, se observó que la población mostraba una baja incidencia en enfermedades coronarias y aparición de tumores (Bang, et al., 1971). Las grasas ingeridas por los esquimales procedían principalmente del consumo de pescado y mamíferos marinos, es decir, grasas ricas en ácidos grasos ω -3-PUFA.

Estos resultados condujeron a establecer una relación directa entre el consumo de las mismas y la baja aparición de estas enfermedades en esta comunidad. Además, la sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos grasos poliinsaturados ω -6, como el ácido linoleico,

18:2 ω -6, o el ácido araquidónico, 20:4 ω -6, disminuyen la mortalidad debida a enfermedades coronarias (Simopoulos, 2006, 2008).

Los ácidos grasos ω -3 se encuentran principalmente en los pescados grasos de aguas frías y/o profundas, denominados popularmente pescados azules como el atún, el jurel, la caballa, la sardina, o el salmón. También se encuentran en moluscos como por ejemplo mejillones y ostras. Como alternativa para los vegetarianos o aquellos individuos que no pueden consumir pescado o sus aceites, se incluyen las nueces, semillas y aceites vegetales como lino, soja, aceite de germen de trigo, aceite de colza, aceite de canola, algas marinas, vegetales de hojas verdes como espinaca, coliflor y brócoli. El principal componente de las semillas de lino y nueces es el ácido α -linolénico (ALA, 18:3 ω -3).

El ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω -3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 ω -3) son los ácidos ω -3 mayoritarios en productos pesqueros (Morris & Culkin, 1989). Estos ácidos grasos han mostrado ser efectivos en el tratamiento de la hipertensión y la artritis (Shahidi, F. & Cadwallader, 1997), y en el retraso del desarrollo de ciertos tumores (Cave, 1996). Las dietas suplementadas con dosis superiores a 130 mg/kg al día con estos ácidos grasos poliinsaturados han mostrado efectos hipolipidémicos (Dyerberg & Bang, 1979; Phillipson, et al., 1985), disminución de la agregación plaquetaria, actividad antitrombótica y un incremento en el efecto trombolítico (Engler, 1994), así como un efecto antiinflamatorio (Dyerberg, 1989).

En relación a su mecanismo de acción, se sabe que los ácidos poliinsaturados ω -3 modulan numerosas rutas metabólicas debido a que actúan como sustratos de diferentes enzimas dentro del metabolismo lipídico. Adicionalmente pueden modificar la actividad de otros enzimas al producir cambios en la membrana lipídica o producir modificaciones en la expresión genética en la síntesis de proteínas.

Además, ambas familias de ácidos grasos, ω -3 y ω -6 están implicadas en la síntesis de mediadores oxigenados lipídicos como los eicosanoides, directamente relacionados con la resolución del proceso inflamatorio de los tejidos. ω -6 and ω -3 PUFAs son el principal sustrato de las cicloxigenasas, las lipoxigenasas y el citocromo P450 que producen una amplia gama de mediadores lipídicos oxigenados, los cuales, se han sugerido como moléculas diana que pueden influir en la inflamación en un proceso activo altamente coordinado (Serhan, et al., 2008; Massey & Nicolaou, 2013). Ejemplos específicos de ello incluyen los eicosanoides provenientes del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) (Massey & Nicolaou, 2013) e isoprostanos (Ferreiro-Vera, et al., 2011) los cuales parecen ser sustancias potencialmente inflamatorias. Los más estudiados: PGE₂, PGF₁ α , PGF₂ α , TXA₂ e 8isoPGF₂- α se han asociado con estadios inflamatorios en estudios relacionados con la hipercolesterolemia, cirrosis hepática, reperfusión miocárdica, diabetes del tipo 2, obesidad, aterosclerosis, cáncer y desórdenes cardiovasculares (Massaro, et al., 2008; Ferreiro-Vera, et al., 2011; Greene, et al., 2011; Sears & Ricordi, 2012). Por otro lado, se ha sugerido que muchos derivados de EPA y DHA pueden ser moléculas diana menos nocivas que sus correspondientes metabolitos ω -6 (Waddington, et al., 2001; Kelly, et al., 2011). Por último, la elevada actividad antiinflamatoria de EPA y DHA y de su actividad de protección celular ha sido descrita en estudios relacionados con desórdenes cardiovasculares, síndrome del ojo seco o Alzheimer (Serhan, et al., 2006; Lee, C. H., 2012).

Los numerosos efectos beneficiosos de los ácidos grasos poliinsaturados disminuyendo los riesgos en enfermedades cardiovasculares (Arkhipenko & Sazontova, 1995), enfermedades autoinmunes como la artritis (Cleland, et al., 2003), el lupus o modificando la sensibilidad de células tumorales frente a la radiación o agentes quimioterapéuticos, han promovido un incremento en su consumo mediante la incorporación de aceite de pescado rico en ω 3 en diferentes productos como panes, yogures o sistemas emulsionados como mayonesas o diferentes salsas para ensaladas (Bucher, et al., 2002).

En relación al uso de los lípidos marinos en cosmética y el cuidado de la piel, son muchos los estudios que avalan los beneficios cosméticos de los ácidos grasos ω -3-PUFA, lo cual ha provocado un creciente interés de la industria en este tipo de compuestos y en su incorporación en fórmulas emulsificadas. Las series ω 3 y ω 6 de estos ácidos grasos están implicados en muchas funciones biológicas que incluyen la prevención en la pérdida de agua transepidérmica, el mantenimiento de la barrera epidérmica del corneum stratum o la interrupción de la melanogénesis en melanocitos epidérmicos. Los más importantes para la industria cosmética son el ácido linoleico (18:2 ω -6) y el ácido α -linolénico (18:3 ω -3). Ambos, así como sus metabolitos se han empleado en el tratamiento de numerosas enfermedades cutáneas (Ando, et al., 1999). Nuevos estudios avalan que la suplementación oral con ácidos grasos omega-6 y omega-3 (provenientes de aceite de pescado) combinados con luteína, zeaxantina y vitamina D puede reducir el riesgo de quemaduras solares (Morse, et al., 2018).

2.3. EL PROBLEMA DE LA OXIDACIÓN EN LÍPIDOS MARINOS. MECANISMOS Y EFECTOS.

Los beneficios positivos en la salud de los ácidos grasos ω -3 han estimulado el interés industrial en explotarlos para la producción de suplementos dietéticos, alimentos funcionales o productos cosméticos y, por ello, los volúmenes de ventas de ácidos grasos ω -3 de origen marino han experimentado un crecimiento de dos dígitos durante los últimos 6-8 años.

Si bien la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados de origen marino contribuye notablemente a las propiedades beneficiosas para la salud de los alimentos o formulaciones que los contienen de forma natural o a los que se les han añadido, al mismo tiempo, por su estructura, son uno de los componentes más susceptibles de degradación del alimento, debido a la presencia de numerosos dobles enlaces (June, et al., 2002). Una de las reacciones de mayor trascendencia que ocurre en los lípidos es la oxidación. La oxidación lipídica es una de las reacciones químicas más básicas y que provocan una pérdida en las características sensoriales (con la aparición de olores) así como una pérdida en la calidad nutricional del alimento. En este sentido, y debido al contenido de gran número de dobles enlaces en su estructura, EPA y DHA son muy susceptibles a sufrir la oxidación lipídica, lo cual conduce a la formación de aromas y sabores desagradables asociados a la rancidez. La aparición de estos aromas puede conducir al rechazo, por parte del consumidor, de estos alimentos enriquecidos con ácidos grasos ω -3. Además, la aparición de estos productos procedentes de la oxidación lipídica presenta efectos negativos en la salud.

La oxidación lipídica es esencialmente una reacción radicalaria en cadena que implica tres etapas (Frankel, E. N. , 2007) (**Fig. 5**).

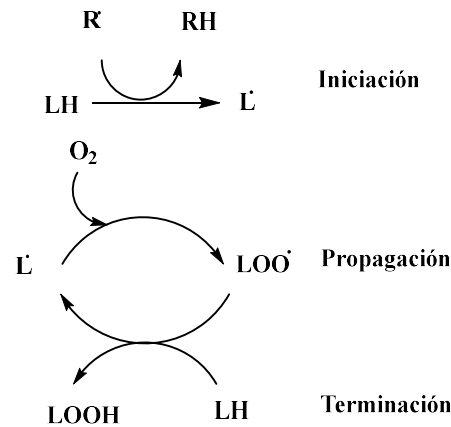


Fig. 5 Etapas de la oxidación lipídica.

- A. Proceso de iniciación: Entre las reacciones de iniciación se distinguen, principalmente, tres tipos:
- i. **Reacciones de autooxidación:** Implican la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso (RH), dando lugar a un radical alquilo ($\text{R}\cdot$) (Halliwell & Gutteridge, 1985). El radical alquilo reacciona fácilmente con el oxígeno molecular en su estado fundamental, oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), produciéndose un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). $\text{ROO}\cdot$ puede sustraer un átomo de hidrógeno de un nuevo ácido graso para formar un peróxido lipídico (ROOH) y un nuevo radical alquilo ($\text{R}\cdot$). Éste es el proceso más común por el cual los ácidos grasos son oxidados (Erickson, 2002a).
 - ii. **Reacciones de fotooxidación:** La formación de los peróxidos lipídicos, también denominados hidroperóxidos, se produce por adición directa del oxígeno molecular en estado excitado, oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), sobre un doble enlace del ácido graso. El oxígeno singlete se forma principalmente por acción de la luz, por ello la oxidación iniciada por este proceso suele denominarse fotooxidación (Frankel, E.N., 1998).
 - iii. **Reacciones enzimáticas:** Las enzimas facilitan que el oxígeno triplete reaccione con el ácido graso para formar un hidroperóxido. Los principales grupos de enzimas implicados en este proceso son las enzimas microsomiales, las peroxidasas y las dioxigenasas. Las lipoxigenasas y las ciclooxigenasas, son dioxigenasas que producen hidroperóxidos por este mecanismo (Erickson, 2002b).
- B. En las reacciones de propagación, los radicales alquilo formados ($\text{R}\cdot$) en la etapa de iniciación, reaccionan rápidamente con oxígeno triplete para dar lugar a radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) los cuales, generan nuevos radicales alquilo ($\text{R}\cdot$), por sustracción de un átomo de hidrógeno a un ácido graso insaturado, y un hidroperóxido lipídico. Los hidroperóxidos generados también pueden fragmentarse por acción térmica, o descomponerse por la catálisis de metales de transición, lo que genera nuevos radicales que autocatalizan el proceso de oxidación (Frankel, E.N., 1998).

La descomposición de los hidroperóxidos, (productos primarios de la oxidación lipídica), formados en la primera etapa de oxidación lipídica da lugar a compuestos volátiles

(principalmente aldehídos y cetonas) que influyen directamente en el aroma y que son los responsables de la aparición de sabores y olores desagradables típicos de la rancidez. Constituyen los productos secundarios de la oxidación. Además, estos aldehídos y cetonas insaturados pueden sufrir procesos de autooxidación dando lugar a otros compuestos volátiles o pueden reaccionar con componentes nitrogenados dando lugar a la formación de compuestos fluorescentes que constituyen los productos terciarios del proceso de oxidación.

Los mecanismos de autooxidación y de fotooxidación dan lugar a distintos hidroperóxidos. De este modo, con el estudio de los hidroperóxidos formados puede conocerse el proceso que controla la oxidación del sistema. La autooxidación da lugar principalmente a hidroperóxidos con un sistema de dobles enlaces conjugados, mientras que la fotooxidación origina similares proporciones de hidroperóxidos conjugados y no conjugados. En la **Fig. 6** se muestra los mecanismos de los procesos de autooxidación y fotooxidación del ácido linoleico (18:2 ω -6) y los hidroperóxidos formados (Frankel, E.N., 1998).

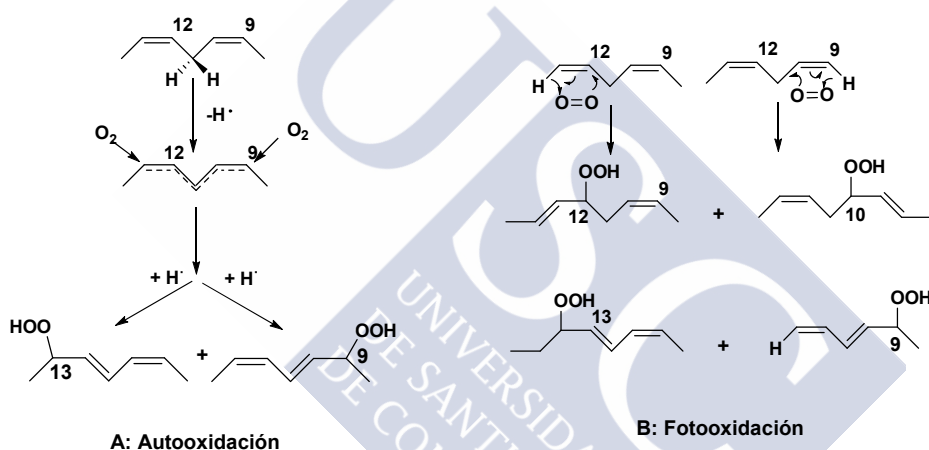


Fig. 6 Mecanismo de autooxidación (A) y fotooxidación (B) del ácido linoleico (18: 2 ω -6) y los posibles hidroperóxidos que se pueden formar.

Generalmente, en el inicio de la oxidación se observa el denominado período de inducción, que se caracteriza por un lento desarrollo de la oxidación, seguido por un periodo de propagación, en el que aumenta exponencialmente la velocidad de la oxidación y la formación de los productos de oxidación de los lípidos (Frankel, E.N., 1998). En la **Fig. 7** se muestra una curva típica con ambos períodos.

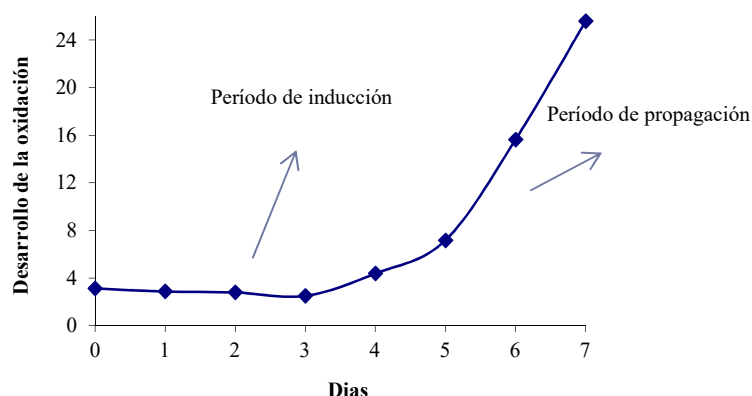


Fig. 7. Curva típica de desarrollo de la oxidación lipídica en un sistema modelo de emulsión de aceite de pescado en agua.

C) Terminación: En las últimas etapas de la oxidación, los radicales reaccionan entre ellos para formar especies de naturaleza no radicalaria. Estas reacciones se denominan reacciones de terminación (Erickson, 2002a). La combinación entre radicales depende de las condiciones específicas en que se desenvuelve el proceso oxidativo.

Los hidroperóxidos formados durante la oxidación (compuestos sin sabor y olor) se descomponen inducidos por los mismos factores que han favorecido la iniciación de la reacción en cadena. Cuando la concentración de hidroperóxidos es baja, la descomposición se lleva a cabo por una reacción mononuclear,



siendo ésta la vía más usual en muchos productos. De forma habitual se hace referencia a los hidroperóxidos como productos primarios de la oxidación. A medida que avanza la oxidación y aumenta la velocidad de formación de hidroperóxidos, aumenta también su concentración y por tanto, su velocidad de descomposición, hasta tal punto que el mecanismo de degradación de estos compuestos pasa de ser mononuclear a bimolecular, disminuyendo la velocidad neta de aparición de hidroperóxidos. Esta velocidad llega a anularse en el máximo e incluso se hace negativa (mayor velocidad de descomposición que de formación).

Los hidroperóxidos además de descomponerse originando radicales libres, pueden sufrir otros tipos de transformaciones, dando lugar a cetonas, epóxidos y alcoholes. Por otra parte, los radicales libres como el alcóxido (RO^{\cdot}), el peróxido (ROO^{\cdot}) y el alquilo (R^{\cdot}) pueden sufrir, a su vez, varias transformaciones en las que se originan además de nuevos radicales, compuestos como ácidos, cetonas, aldehídos, alcoholes, alcóxidos, epóxidos, peróxidos, alcanos, alquenos, alquinos, etc. Se origina un número importante de compuestos volátiles de bajo peso molecular que son los responsables de la detección organoléptica de la rancidez. Son los productos secundarios de la oxidación.

Posteriormente estos aldehídos pueden reaccionar con compuestos que contienen grupos aminos libres, para dar lugar a compuestos de interacción y que se conocen comúnmente como compuestos terciarios de la oxidación. Entre estos compuestos destacan las bases de

Schiff, las cuales, bajo ciertas condiciones pueden polimerizar dando lugar a pigmentos de color parduzco. La aparición de estos productos terciarios, también puede afectar al sabor y a la textura del alimento (Aubourg, 1999).

2.4. OXIDACIÓN EN SISTEMAS MULTIFÁSICOS.

La propia estructura de las emulsiones hace que los lípidos presentes en la misma sean muy susceptibles a sufrir procesos de oxidación en los que se generan radicales libres, así como compuestos volátiles que afectan a las propiedades organolépticas de la emulsión y a su estabilidad. Esto es debido a la gran superficie de contacto entre las gotas de los lípidos, sustrato oxidable, y compuestos solubles en agua (oxígeno y prooxidantes) que pueden contribuir a la iniciación y a la propagación de las reacciones que tienen lugar durante la oxidación lipídica (Frankel, E.N., 1998).

Por todo lo dicho anteriormente, la interfase representa una zona crítica dentro de la estructura de la emulsión ya que es la zona donde se encuentran en contacto todos los sustratos susceptibles de sufrir oxidación y es donde se van a disponer sustancias con actividad superficial como moléculas de oxígeno, los hidroperóxidos lipídicos (Nuchi, et al., 2002), etc.

El control de las distintas características físico-químicas de la interfase es un mecanismo que permite modular la extensión de la oxidación lipídica de estos sistemas (Decker, et al., 2005). Entre estas características tenemos:

- i. Área interfacial de la gota: Como ya se ha mencionado previamente, el área interfacial viene determinada por la concentración de la gota y el tamaño de partícula. En la actualidad, la importancia de esta característica no está del todo clarificada ya que, cuando se ha estudiado la influencia de este parámetro los resultados obtenidos han sido diversos. En algunos estudios obtuvieron un incremento de la oxidación lipídica cuando se incrementa el área superficial (Gohtani, et al., 1999). En otros, concluyeron que se produjo un incremento en la velocidad de la oxidación lipídica al disminuir el área superficial (Nakaya, et al., 2005; Imai, et al., 2008). Otros autores reportaron que la oxidación lipídica no estaba muy influenciada por el área superficial (Kiokias, et al., 2007; Sun & Gunasekaran, 2009). Esta variabilidad en los resultados sugiere que, probablemente, el área interfacial de la gota no sea el parámetro más importante que influye en la cinética de la oxidación lipídica.
- ii. La carga eléctrica de la gota en la membrana superficial: esta carga superficial va a determinar las posibles interacciones electrostáticas que puedan tener en la interfase tanto con el emulsificante como con los antioxidantes o con compuestos prooxidantes. Si la carga de la gota es de naturaleza aniónica, la concentración de metales se puede incrementar debido a las atracciones electrostáticas provocando un incremento en la cinética de la oxidación (Mancuso, et al., 1999; Hu, et al., 2003).

La naturaleza cargada o no de la interfase también puede influir en la distribución de los antioxidantes (por interacciones electrostáticas) afectando a su comportamiento desde el punto de vista de la inhibición de la oxidación lipídica. Pryor y col,

concluyeron que los antioxidantes aniónicos como el ácido ascórbico eran más efectivos frente a la oxidación lipídica en presencia de una interfase cargada positivamente (Pryor, et al., 1993). Otros autores han mencionado el impacto de la superficie cargada negativamente en la cinética de la oxidación lipídica en emulsiones estabilizadas con proteínas (Villiere, et al., 2005). Estos autores estudiaron la relación entre la disponibilidad de iones metálicos y la estabilidad oxidativa de emulsiones de aceite de girasol en agua estabilizadas con albúmina de suero bovino (BSA) o caseinato de sodio a un pH de 6,5. La presencia del caseinato de sodio confiere a la interfase una carga negativa y probablemente esto produzca una atracción de los metales hacia la interfase. La presencia de EDTA produce una disminución en la cinética de la oxidación lipídica, debido, probablemente a su capacidad de enmascarar metales.

La presencia o no de carga en el emulsificante también tiene gran influencia en la estabilidad de la emulsión desde el punto de vista de la oxidación lipídica. Algunos estudios muestran que surfactantes aniónicos como el SDS pueden promover un aumento en la oxidación lipídica (González, et al., 2015). Esto es debido a las interacciones electrostáticas que tienen lugar entre la interfase cargada negativamente, y los iones metálicos presentes incrementando su reactividad con los hidroperóxidos y los radicales solubles en agua.

Por lo tanto, la ausencia de carga negativa en la superficie de la gota produce una disminución en la velocidad en la oxidación lipídica ya que impide la interacción con metales catiónicos, los cuales actúan como catalizadores de estas reacciones.

- iii. El espesor de la interfase es otra característica que puede afectar a la oxidación lipídica. Esta característica puede ser modulada con la elección de un emulsificante u otro (en función de su tamaño molecular) o por la introducción de distintas capas de biopolímeros alrededor de las gotas (emulsiones multicapas).

La elección de emulsificantes de gran tamaño da lugar a interfases gruesas, impidiendo o disminuyendo las interacciones entre los lípidos y los prooxidantes presentes en la fase acuosa, o entre los hidroperóxidos y los lípidos, y, por lo tanto, se produce una disminución en la velocidad de la reacción (Chaiyasit, et al., 2000; Silvestre, et al., 2000). Silvestre y col. (Silvestre, et al., 2000) estudiaron la influencia del tamaño del grupo de cabeza surfactante del emulsificante en emulsiones de aceite de salmón en agua estabilizadas con Brij 76 y Brij 700. Sus resultados mostraron que Brij 700 disminuyó la producción de hexanal a partir del linoleato de metilo y la formación de hidroperóxidos lipídicos y propanal en emulsiones de aceite de salmón en comparación con aquellas estabilizadas con Brij 76. Este efecto también fue observado por Chaiyasit y col. (Chaiyasit, et al., 2000) al llevar a cabo el estudio empleando polioxietilen 10 lauril éter y polioxietilen 10 estearil éter. Sus resultados sugirieron que el tamaño del surfactante jugó un pequeño papel en la oxidación lipídica en emulsiones de aceite en agua al observar que un incremento en la cola del grupo surfactante incrementó ligeramente la estabilidad oxidativa.

Charoen y col. evaluaron la influencia del pH y del tipo de biopolímero empleado como emulsificante (aislado de proteína procedente del suero de la leche, almidón

modificado y goma arábica) en emulsiones de aceite de salvado de arroz en agua. Obtuvieron que las emulsiones en presencia de goma arábica fueron altamente inestables frente a la oxidación lipídica, mientras que aquellas mientras que las emulsiones estabilizadas con el aislado de proteína y el almidón modificado, resultaron ser más estables en términos de oxidación lipídica (Charoen, et al., 2012).

- iv. Permeabilidad de la interfase: La permeabilidad de la interfase debida al distinto empaquetamiento que pueden producir distintos surfactantes puede favorecer la difusión de diversos compuestos como el oxígeno molecular, radicales libre o prooxidantes (metales) hacia la interfase, favoreciendo su interacción con los lípidos y provocando su oxidación (Villiere, et al., 2005).
- v. Composición química de la interfase: La composición química de la interfase puede jugar un papel muy importante en la estabilidad oxidativa de una emulsión debido a que los distintos compuestos que forman parte de ella pueden participar de forma directa o indirecta en las distintas reacciones que pueden tener lugar enmascarando radicales libres, quelatando metales de transición o interfiriendo en las distintas interacciones que pueden tener lugar entre los metales de transición y los hidroperóxidos lipídicos (Villiere, et al., 2005; Haahr & Jacobsen, 2008).

El conocimiento y el control de todos estos factores pueden contribuir a mejorar notablemente la estabilidad de la emulsión.

2.5. MECANISMOS PARA INHIBIR LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LOS SISTEMAS DE EMULSIONES.

La alta susceptibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados a sufrir la oxidación lipídica ha restringido en mayor o menor medida su incorporación tanto en distintas formulaciones alimentarias, como formulaciones médicas o cosméticas. Son numerosas las estrategias empleadas para inhibir la oxidación lipídica. Los principales puntos de atención son la optimización de las condiciones de procesado, la utilización de distintos sistemas de administración de los ω 3-PUFA y la adición de antioxidantes.

Entre las condiciones de almacenamiento o procesado, el envasado al vacío o bajo atmósfera controlada y el almacenamiento a baja temperatura etc. juegan un papel muy importante en la estabilización oxidativa de estos sistemas.

El empleo de atmósferas controladas en el envasado para extender la vida útil de los alimentos refrigerados se lleva empleando desde hace muchos años. El CO₂ es un gas ampliamente utilizado en los envasados bajo atmósferas modificadas, bien sólo, bien conjuntamente con otros gases. En los años 70 Kosikowski y col. llevaron a cabo una serie de estudios relacionados con el almacenamiento de queso y crema agria de queso bajo una atmósfera controlada de CO₂ (Kosikowski & Brown, 1973). Estos autores encontraron que el cuerpo y la textura de la crema agria se mantuvieron en excelentes condiciones durante su almacenamiento a 4 °C durante en presencia de CO₂. Años después, Buick y col. demostraron que el envasado de una ensalada vegetal con mayonesa bajo una atmósfera controlada compuesta de dióxido de carbono/nitrógeno en una composición 20%/80% respectivamente extendía la vida útil del producto a una temperatura de 4, 10 y 15 °C de almacenamiento al

retrasar el desarrollo de microorganismos que afectan a la calidad del alimento (Buick & Damoglou, 1989). Posteriormente Ma y col. estudiaron el efecto que producía la adición de CO₂ en la conservación de leche (Ma, et al., 2003). Estos autores encontraron que la adición de CO₂ disminuía el crecimiento microbiano y permitía el almacenamiento de la leche, al menos durante 14 días a 4°C. Recientemente, Let y col. encontraron que era posible producir leche pasteurizada enriquecida con aceite de pescado rico en ω3-PUFA con características sensoriales aceptables si la temperatura de almacenamiento estaba comprendida entre de 2 y 9 °C (Let, et al., 2005).

En la **Tab. 2** se muestra un resumen de los distintos factores que afectan a la estabilidad oxidativa en productos alimenticios basados en emulsiones enriquecidas con ω3-PUFA (Jacobsen, 2015).



Factor	Emulsion simple O/W	Leche	Mayonesa
Microfluidizador versus homogeneizador de válvula	El microfluidizador reduce la oxidación	NI	NI
Condiciones de homogeneización/tamaño de la gota	Efecto del tamaño de la gota y de la presión depende del tipo de emulsificante	Pequeñas gotas y presión elevada produce disminución en la oxidación	Pequeñas gotas incrementan la oxidación
10% emulsión de aceite en agua	NI	Emulsiones con proteínas de suero de la leche, caseína o β -lactoglobulinas de la leche incrementan la oxidación	NI
50% emulsión de aceite en agua	NI	Emulsiones basadas en proteínas de suero de la leche disminuyen la oxidación	NI
70% emulsión de aceite en agua	NI	NI	NI

Tab. 2 Factores que afectan a la estabilidad oxidativa en productos alimenticios basados en emulsiones enriquecidas con ω 3-PUFA. NI, no investigado.

Factor	Queso crema	Yogurt	Salsas
Microfluidizador versus homogeneizador de válvula	NI	NI	NI
Condiciones de homogeneización/tamaño de la gota	NI	NI	NI
10% emulsión de aceite en agua	NI	NI	NI
50% emulsión de aceite en agua	NI	Emulsiones basadas en proteínas del suero de la leche incrementan la oxidación	Emulsiones basadas en proteínas del suero de la leche incrementan la oxidación
70% emulsión de aceite en agua	Emulsiones basadas en fosfolípidos de la leche, disminuyen la oxidación. Emulsiones basadas en proteínas del suero de la leche y en caseínas, incrementan la oxidación.	NI	NI

Tab. 2 (Continuación) Factores que afectan a la estabilidad oxidativa en productos alimenticios basados en emulsiones enriquecidas con ω 3-PUFA. NI, no investigado.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen diversos equipos para la obtención de emulsiones (Jafari, et al., 2008). El dispositivo empleado va a influir en las características de la emulsión como por ejemplo el tamaño de gota y ya se ha explicado anteriormente que esto puede influir en la estabilidad oxidativa de la emulsión. Horn y col. (Horn, et al., 2012) estudiaron la influencia de los equipos de homogeneización como un microfluidizador y un

homogeneizador de válvula en dos etapas, en la estabilidad oxidativa de emulsiones de aceite de pescado en agua (10% aceite) preparadas con proteínas lácteas, caseinato de sodio y proteínas procedentes del suero de la leche como emulsificantes. Ambas emulsiones fueron preparadas a $\text{pH} = 7$ y con tamaños de gota similares. Sus resultados mostraron que la estabilidad oxidativa de las emulsiones preparadas con caseinato de sodio no se vio influenciada por el tipo de homogeneizador utilizado. Mientras que, el tipo de equipo de homogeneización influyó significativamente en la oxidación de lípidos cuando se utilizó la proteína de suero como emulsionante, con el microfluidizador dando como resultado menores niveles de oxidación. Sugirieron que estos resultados están relacionados con la distinta distribución de los componentes proteicos entre la interfase y la fase acuosa debido a los distintos patrones de ruptura de las gotas en las cámaras de interacción de ambos dispositivos para dar lugar a las microgotas. La homogeneización con el microfluidizador produjo un cambio en la composición proteica de la interfase comparada con la obtenida cuando se empleó el homogeneizador de válvula. Resultados similares fueron obtenidos por Dalglish y col. (Dalglish, et al., 1996) que estudiaron la composición de la membrana proteica que rodeaba las gotas lipídicas de la grasa láctea. Encontraron que el empleo del microfluidizador provocaba un cambio en las membranas de la proteína alrededor de las gotas de lípido en las leches microfluidizadas y había menos micelas intactas o parcialmente intactas formando la superficie del glóbulo de grasa.

El desarrollo tecnológico ha permitido diseñar nuevos mecanismos para obtener sistemas multifásicos que contribuyen favorablemente a la estabilización lipídica desde el punto de vista del desarrollo de la oxidación, como por ejemplo el encapsulamiento de aquellos compuestos susceptibles de sufrir oxidación (Matalanis, et al., 2012; Carneiro, et al., 2013). Otros ejemplos son la obtención de sistemas multicapa, partículas de hidrogel rellenas, partículas lipídicas sólidas o la obtención de micro y nanoemulsiones (Lee, S. J., et al., 2011).

Tal y como ya se ha mencionado, las emulsiones multicapa son emulsiones convencionales en las que la superficie de la gota está protegida por una o varias capas de biopolímeros (McClements, D. J., et al., 2007) dando lugar a una interfase muy fina la cual produce una mayor estabilidad física y puede evitar las interacciones entre los componentes de la fase continua y las gotas de lípidos.

Las emulsiones basadas en partículas de hidrogel rellenas se conocen habitualmente como emulsiones de aceite-en agua-en agua. Estas partículas están rellenas de las gotas de aceite dispersas en el gel (producido a partir de biopolímeros). Su principal ventaja es la proximidad entre el biopolímero que actúa como antioxidante y las gotas emulsionadas (Wu & Xiao, 2005).

La obtención de micro y nanoemulsiones está directamente relacionada con el incremento de la superficie interfacial entre las fases aceitosa y acuosa. Mientras que las macroemulsiones son termodinámicamente estables bajo ciertas condiciones ambientales (Spernath & Aserin, 2006), las nanoemulsiones son cinéticamente estables. Las nanoemulsiones son emulsiones convencionales que están formadas por gotas con un tamaño contenido entre 1-800 nm (Mason, et al., 2006). No existen muchos estudios relacionados con la inhibición de la oxidación lipídica en nanoemulsiones (Lee, S. J., et al., 2011).

Las emulsiones con partículas lipídicas sólidas son aquellas en las que la fase aceitosa esta parcial o completamente solidificada y embebida en el emulsificante. Para su obtención, las partículas lipídicas sólidas se preparan a temperaturas superiores al punto de solidificación y luego se enfrían para que tenga lugar la cristalización de la gota en la emulsión (Wissing, et al., 2004).

Sin lugar a dudas, la adición de antioxidantes es el método más extendido para inhibir o retardar el desarrollo de la oxidación lipídica en emulsiones. La habilidad de los antioxidantes para inhibir este proceso en estos sistemas multifásicos depende de múltiples factores como la concentración del antioxidante, su reactividad, el coeficiente de partición entre las distintas fases que conforman la emulsión y otros factores ambientales como puede ser el pH o la temperatura (Frankel, E.N., 1998).

Los antioxidantes generalmente funcionan enmascarando radicales libres y/o inactivando sustancias prooxidantes como los metales de transición.

Una clasificación muy útil de los compuestos con actividad antioxidante se basa en su mecanismo de acción. Según esto se clasificarían en:

- antioxidantes primarios (“chain-breaking”): son aquellos que son capaces de captar radicales libres retrasando la iniciación o interrumpiendo la propagación en el proceso de autooxidación (Reische, et al., 1998). La efectividad de estos compuestos va a depender de sus propiedades químicas, del tipo de sistema (el mismo compuesto puede comportarse de distinta manera según sea en sistemas multifásicos o en aceite puro) y de cómo se distribuyen en el sistema (Frankel, E.N., 1998). Porter estableció que, de forma general, los antioxidantes lipofílicos presentan una menor efectividad en sistemas de aceite puro que los antioxidantes hidrofílicos. De la misma manera, los antioxidantes hidrofílicos presentan menor capacidad antioxidante en emulsiones que en aceite puro. Es lo que se conoce como “paradoja polar” (Porter, W. L., 1980). Estudios previos en los que se estudiaba la capacidad antioxidante de Trolox, ácido ascórbico, o compuestos polifenólicos apoyaban esta hipótesis (Frankel, Edwin N., et al., 1994; Medina, et al., 2003). Sin embargo, investigaciones más recientes en las que se empleaban como antioxidantes compuestos derivados de compuestos fenólicos, generalmente ésteres con ácidos grasos u alcoholes de cadena larga, compuestos con una mayor lipofilia con respecto a los fenoles de los que derivan, contradicen esta teoría (Stöckmann, et al., 2000; Laguerre, et al., 2010; Panya, et al., 2010) debido , entre otras causas, a la existencia de posibles impedimentos estéricos debidos al incremento de la longitud de la cadena y que imposibilita una correcta disposición del antioxidante en la interfase.
- Antioxidantes secundarios: Son aquellos cuyo modo de acción en la inhibición de la oxidación lipídica incluye numerosos mecanismos como quelación de metales (como el Fe), captación de oxígeno o desactivación de especies reactivas. En el caso de sistemas multifásicos, los más interesantes son aquellos que presentan actividad quelatante de metales como el hierro o el cobre, los cuales pueden estar presentes en la fase acuosa de la emulsión. La mayoría de los agentes quelatantes (como el AEDT) empleados en la industria son sintéticos (Reische, et al., 1998).

Sin embargo, otros agentes quelatantes naturales como el ácido cítrico, a pesar de ser menos efectivo, resultan más atractivos para el consumidor.

La elección del antioxidante es clave para asegurar que se distribuye en la zona más reactiva desde el punto de vista de la oxidación lipídica. Djordjevic y col. (Djordjevic, et al., 2004) demostraron que una combinación de antioxidantes naturales que se disponen en la superficie de la gota como el tocoferol y el empleo de un agente quelatante metálico de metales como el AEDT, resulta muy efectiva en la prevención de la oxidación ω 3-PUFA en emulsiones simples de aceite en agua.

2.5.1. Sustancias antioxidantes de uso alimentario.

Los antioxidantes son sustancias ampliamente utilizadas por la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética en gran cantidad de productos y pueden ser de origen natural o de origen sintético. Asimismo, los sistemas biológicos poseen una cierta protección natural contra la oxidación aunque en la mayoría de las ocasiones es insuficiente, como en el caso de los alimentos conservados o procesados. En los productos que sufren transformaciones o están almacenados se originan pérdidas de antioxidantes endógenos y con frecuencia, para mantener su estabilidad oxidativa, es preciso añadir antioxidantes exógenos. Antioxidantes endógenos presentes en la naturaleza son el tocoferol (vitamina E) o el ácido ascórbico (vitamina C) (**Fig. 8**). Desde el punto de vista nutricional, la vitamina E se considera uno de los antioxidantes primarios de naturaleza lipídica más importante para inhibir la peroxidación lipídica *in vivo*.

Los antioxidantes endógenos juegan un papel primordial en la aparición de los primeros productos de oxidación cuando el tejido se almacena *post mortem*. Pazos y col. (Pazos, et al., 2005) sugieren que el α -tocoferol es la última defensa frente a la oxidación lipídica del músculo de pescado almacenado *post mortem* en estado congelado. El descenso en la concentración de este compuesto coincide con el desarrollo de la oxidación lipídica. El ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble además de presentar un elevado poder reductor así como un buen agente quelatante de especies reactivas de oxígeno. En algunos sistemas se ha comprobado la existencia de un fuerte sinergismo con el tocoferol el cual se explica por la capacidad del ascorbato a regenerar el tocoferol a partir del radical tocoferoxilo, el cual se produce durante la oxidación (Iglesias, et al., 2009).

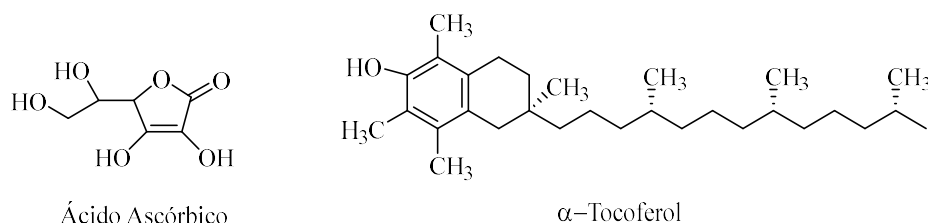


Fig. 8 Estructuras del ácido ascórbico y del α -tocoferol.

Asimismo, entre los antioxidantes exógenos que pueden adicionarse a los sistemas lipídicos se encuentran los compuestos sintéticos que no tienen análogos en la naturaleza. Los

más empleados en la industria son el terbutilhidroxianisol (BHA) (Griffin, S. P. & Bhagooli), el terbutilhidroxitolueno (BHT), la terbutilhidroquinona (TBHQ) y el propilgalato (PG). Todos estos compuestos se caracterizan por presentar un anillo fenólico con distintos sustituyentes. Su estructura se representa en la **Fig. 9**.

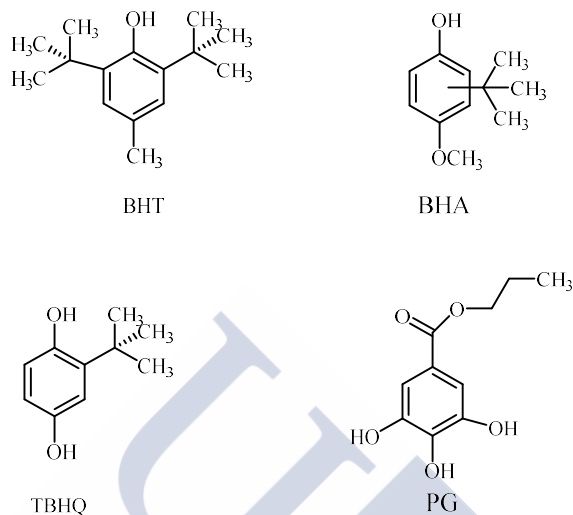


Fig. 9 Estructuras de los antioxidantes sintéticos más empleados en la industria alimentaria.

El empleo de antioxidantes como aditivos está regulado por normativas europeas y españolas (Madrid & Cenzano, 2000) las cuales indican la cantidad máxima que se puede añadir. El BHA es insoluble en medio acuoso. La dosis recomendada es de 0,3 mg/Kg al día. El BHT se utiliza siempre mezclado con el BHA y su dosis recomendada es de 0,125 mg/Kg de peso al día. Ambos compuestos se han empleado ampliamente para inhibir el desarrollo de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite en agua (Erickson, 2002b).

2.5.2. Compuestos antioxidantes de origen natural.

Tal y como se ha indicado, el problema de la oxidación lipídica lleva siendo objeto de estudio desde hace muchos años. Sin embargo, la inhibición de la misma en muchos alimentos y nuevas presentaciones continúa siendo objeto de estudio debido a una serie de factores que pueden ser (Frankel, E. N. , 2007):

- El intento a incrementar el grado de insaturación de los aceites añadidos en las formulaciones como una forma de prevención de las enfermedades coronarias. Estos aceites provienen principalmente de los lípidos del pescado y de las algas, ricos en ácidos grasos poliinsaturados- ω 3.
- El intento de disminuir el uso de antioxidantes sintéticos.

- La preocupación por las consecuencias del empleo de la hidrogenación parcial de los aceites como estrategia para disminuir su susceptibilidad frente a la oxidación lipídica.
- El incremento en el uso de la concentración de hierro en alimentos infantiles como cereales o potitos.

En las últimas décadas se ha producido un gran interés en la sustitución de los antioxidantes sintéticos por antioxidantes de origen natural, bien empleados como compuestos puros, bien empleados como un extracto natural que contiene múltiples componentes. Uno de los posibles motivos que se aduce para ello es la posible toxicidad de estos antioxidantes sintéticos. Sin embargo, muchos de los estudios encaminados a examinar la potencial toxicidad se han realizado a concentraciones muy superiores a la dosis recomendada según la legislación vigente y, en consecuencia no son un buen modelo predictivo para observar las implicaciones a largo plazo que conlleva el uso de estos compuestos (Lanigan & Yamarik, 2002; Jeong, et al., 2005; Labrador, et al., 2007). Por lo tanto, la sustitución de estos compuestos puede no estar justificada en algunos casos.

De cara al consumidor siempre resulta más atractivo el término “antioxidante natural” que “antioxidante sintético”. Ello ha provocado que durante los últimos 30-40 años se hayan llevado a cabo numerosos estudios relacionados con el empleo de extractos naturales como antioxidantes. En muchos de estos casos no siempre se conoce la composición exacta de estas mezclas y no se han evaluado de una manera clara y concisa los posibles riesgos que puede conllevar su uso. Si bien es cierto que en el caso de los antioxidantes sintéticos está perfectamente definida la concentración máxima de ingesta diaria, también es cierto, que existe una laguna legal desde el punto de vista de las concentraciones permitidas en el caso del empleo de los extractos naturales como aditivos antioxidantes.

Otro de los hándicaps que también ha promovido el empleo de antioxidantes naturales es que numerosos estudios han demostrado su potencial beneficio para la salud. Dentro de los antioxidantes naturales el grupo más numeroso y que ha sido de los más estudiados en las últimas décadas es el de los polifenoles. (Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2008; Pandey & Rizvi, 2009). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo vegetal.

En base a su estructura química, los polifenoles se pueden clasificar en (Manach, et al., 2004):

- Ácidos fenólicos simples que incluyen a derivados de los ácidos hidroxibenzoico y cinámico.
- Flavonoides.
- Lignanos.
- Taninos hidrolizables.

2.5.2.1. Ácidos fenólicos simples.

Los ácidos fenólicos simples estructuralmente se caracterizan por tener un esqueleto fenólico (anillo aromático con un hidroxilo). Los derivados del ácido benzoico presentan un esqueleto C6-C1, mientras que los derivados del ácido cinámico presentan una estructura C6-C3. Muchos de estos ácidos forman parte de manera habitual de la dieta formando parte de cereales (ácido cafeico), de uvas blancas y derivados (ácido cafeico, ácido p-cumárico), de las olivas y derivados (ácido p-cumárico) o de vegetales como las espinacas (ácido cafeico, ácido p-cumárico) o el repollo (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido p-cumárico), etc.

En la **Fig. 10** se representan las estructuras de los fenoles simples.

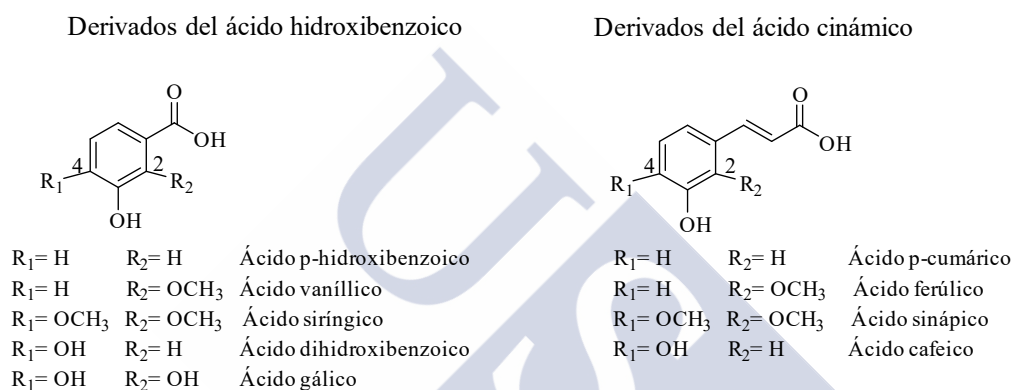


Fig. 10 Estructura química de los distintos ácidos fenólicos simples.

Los ácidos fenólicos se encuentran de manera habitual conjugados (frecuentemente como ésteres). Un ejemplo es el ácido clorogénico, éster derivado del ácido cafeico y que después del proceso de tostación del café se descompone en ácido cafeico o el ácido rosmarínico.

El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o como sus dímeros (ácido elágico), trímeros (ácido tergálico) o tetrameros (ácido galágico), los dos últimos menos frecuentes (**Fig. 11**)

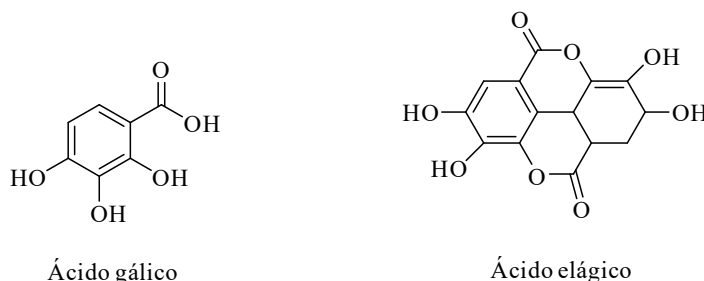


Fig. 11 Estructura química del ácido gálico y del ácido elágico.

Otros derivados del ácido hidroxibenzoico son los alcoholes fenólicos y los estilbenos. (**Fig. 12**). Dentro de los alcoholes más estudiados se encuentran el tirosol y el hidroxitirosol,

muy abundantes en la aceituna. Los estilbenos presentan un esqueleto de 14 carbonos con la distribución C6-C2-C6. Dentro de los más conocidos se encuentran el resveratrol y su derivado glicosilado, el piceido, ambos aparecen de forma natural en el vino.

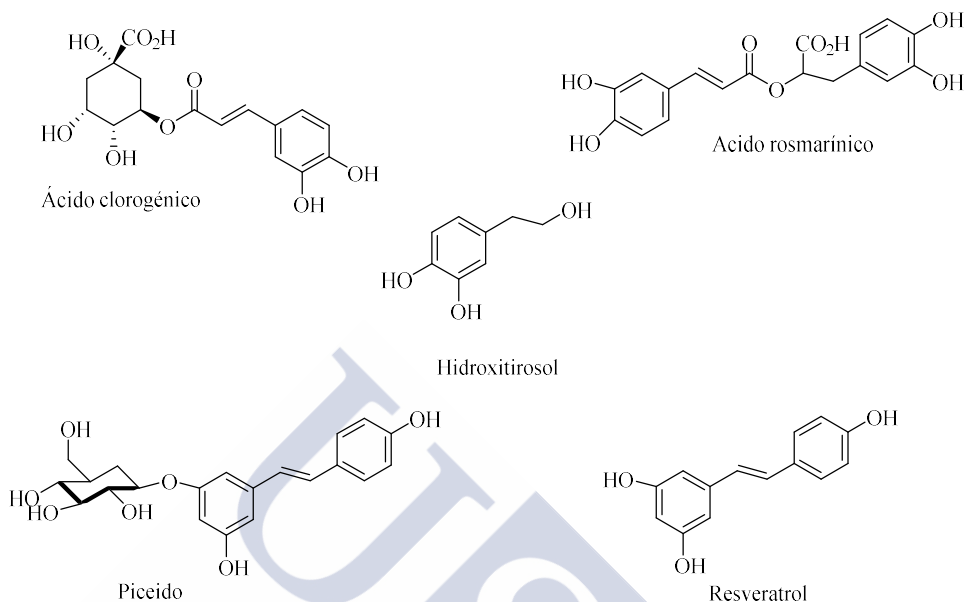


Fig. 12 Estructuras química de derivados del ácido hidroxibenzoico.

La reactividad de los compuestos fenólicos viene marcada por los distintos sustituyentes que presenta el anillo aromático en función de los efectos inductivos (en función del sustituyente estabilizarán más o menos la carga deslocalizada en el intermedio radicalario) y de los efectos estéricos. Por lo tanto:

- Los grupos donadores de electrones como el grupo metilo o metoxilo en las posiciones 2 y 4 producen un incremento importante en la reactividad. Esto es debido a que producen una disminución del potencial redox del fenol disminuyendo la energía en el estado de transición. Sin embargo, si en estas posiciones tenemos grupos electrón-atrayentes, se produce una disminución en la actividad antioxidante.
- Los grupos arilo en las posiciones 2 y 4 que producen una deslocalización de la carga en el intermedio radicalario originado en la reacción, incrementa la actividad antioxidante.
- Los grupos alquilo voluminosos como el grupo tert-butilo en las posiciones 2 y 6 incrementan la actividad antioxidante mientras que, si estos grupos se encuentran en la posición 4, la disminuyen.

2.5.2.2. Flavonoides.

Los flavonoides presentan un esqueleto común C₆-C₃-C₆, compuesto por dos anillos fenilo (denominados A y B) unidos a través de un anillo pirano heterocíclico denominado C. Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos (, aunque también pueden aparecer de forma libre o formando dímeros o polímeros.

Los flavonoides se pueden dividir en varios subgrupos atendiendo al estado de oxidación del anillo C y de la posición del anillo B. Dentro de cada subgrupo aparecen numerosos compuestos que se diferencian entre sí por los distintos grupos funcionales y el número de grupos hidroxilo que presentan (**Fig. 13**). Estos subgrupos son:

- Flavonoles: Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C₄ y un doble enlace entre los carbonos C₂ y C₃. En C₃ presentan, también, un grupo hidroxilo adicional. El componente más representativo es la quercetina. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas. En menos cantidad también aparecen en el té y en el vino.
- Flavonas: Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C₄ y un doble enlace entre los carbonos C₂ y C₃. Son los menos abundantes en los alimentos. Se pueden encontrar en el apio o en el perejil.
- Flavanonas: Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C₄. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C₇. Aparecen en grandes concentraciones en cítricos y tomates.
- Isoflavonas: El anillo B se encuentra en el carbono C₃ a diferencia de todos los demás. Presentan también grupos hidroxilo en los carbonos C₇ y C₄. A menudo aparecen glicosiladas pero se hidrolizan fácilmente en los procesos industriales. Se presentan en las plantas leguminosas, principalmente en la soja.
- Antocianidinas: Constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se presentan habitualmente glucosilados principalmente en el carbono C₃ del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. La glicosilación en el anillo C es menos abundante. Se encuentran mayoritariamente en la fruta aunque también se pueden encontrar en ciertos vegetales y cereales y en el vino tinto.
- Flavanoles: Estos compuestos se caracterizan por presentar el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C₃. Los más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol y pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados, oligómeros (procianidinas) o polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). La catequina y la epicatequina con compuestos mayoritarios en las frutas aunque también pueden aparecer en el chocolate o en el vino. Otros compuestos presentan un hidroxilo en la posición C₃' del anillo B y es habitual encontrar compuestos esterificando a un ácido gálico en la posición C₃ del anillo C. Estos últimos se encuentran mayoritariamente en el té.

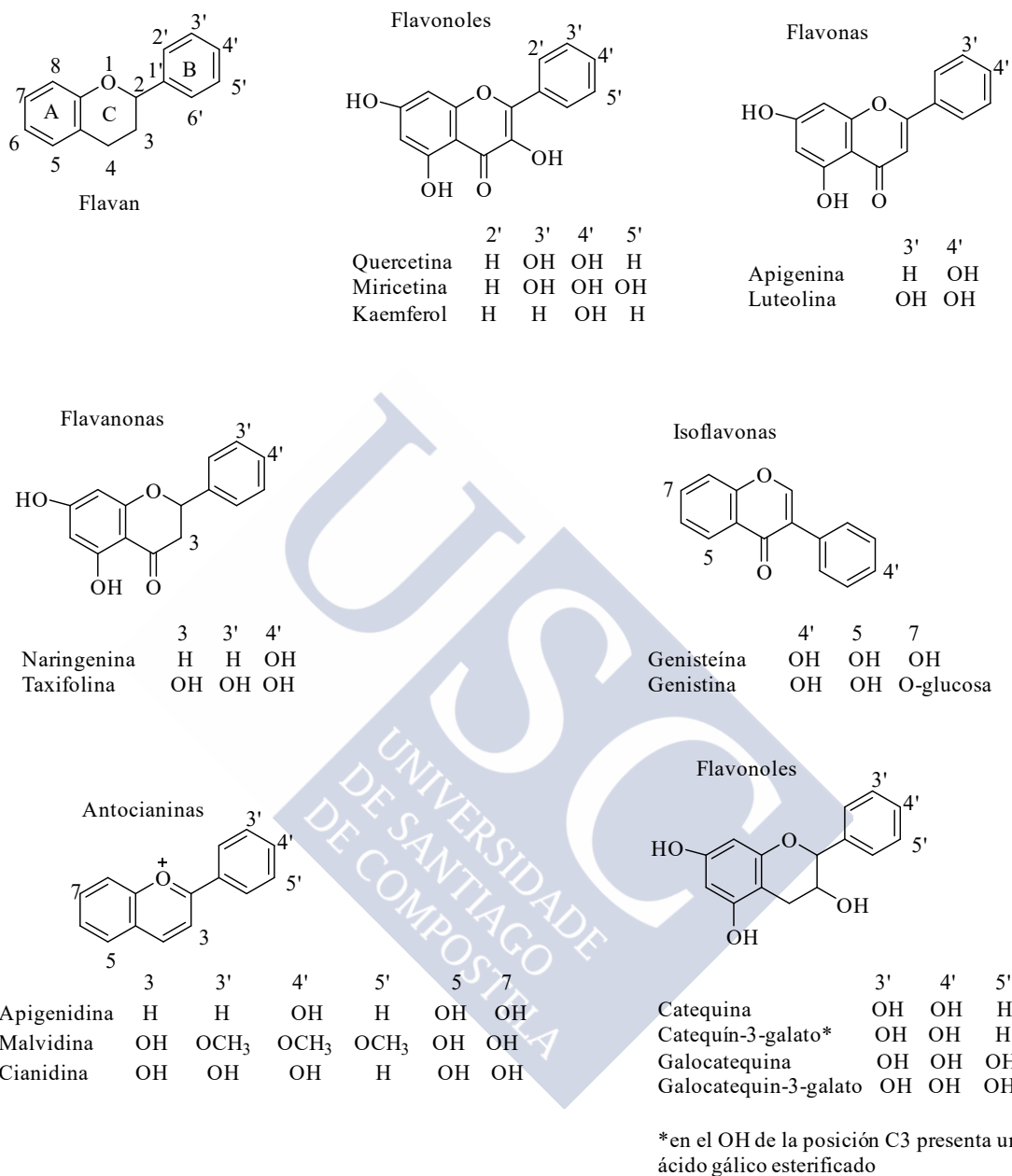


Fig. 13 Estructura química de algunos flavonoides.

2.5.2.3. Lignanos

Los lignanos son metabolitos secundarios de las plantas ampliamente distribuidos en el mundo vegetal (aunque en bajas concentraciones) como las semillas de lino o de calabaza, brócoli y en algunas bayas.

La estructura básica de estas sustancias son dos unidades C6-C3 unidas por enlaces β - β' utilizadas para la nomenclatura de los lignanos. Estos compuestos están relacionados con la ruta metabólica de la fenilalanina a través de la dimerización de alcoholes derivados de ácidos cinámicos sustituidos a un esqueleto de dibencilbutano (**Fig. 14**).

Aunque quizás sean los menos conocidos, diversos estudios epidemiológicos muestran sus efectos beneficiosos para la salud (Bylund, et al., 2005; Peterson, et al., 2010; Charu Katare, et al., 2012) . Hosseinian y col. (Hosseinian, et al., 2006) llegaron a la conclusión de que lignanos procedentes de semillas de lino pueden ser una buena alternativa para frenar la oxidación lipídica en aceites.

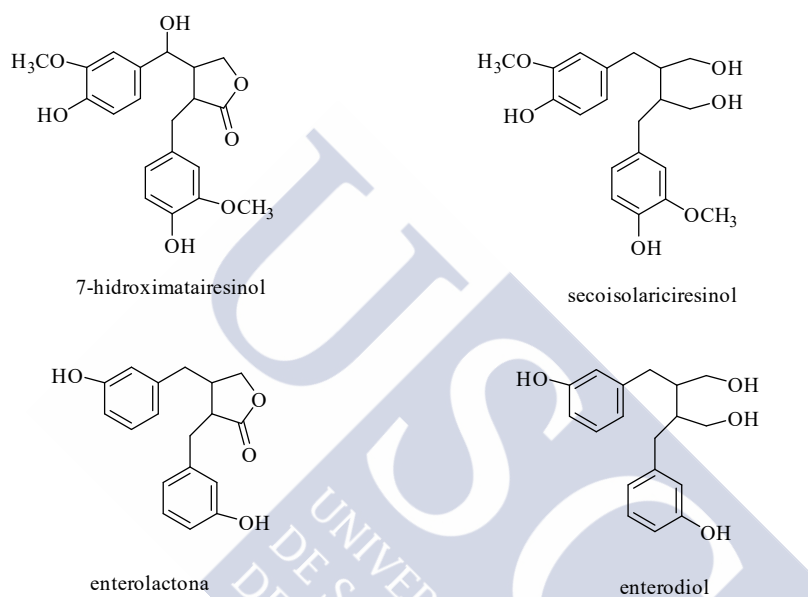


Fig. 14 Estructura química de algunos lignanos.

2.5.2.4. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, principalmente ácido gálico con azúcares simples. El hamamelitanino o la pentagalailglucosa (**Fig. 15**) son ejemplos de taninos hidrolizables que están presentes en la *Hamamelis virginiana* (González, et al., 2010)

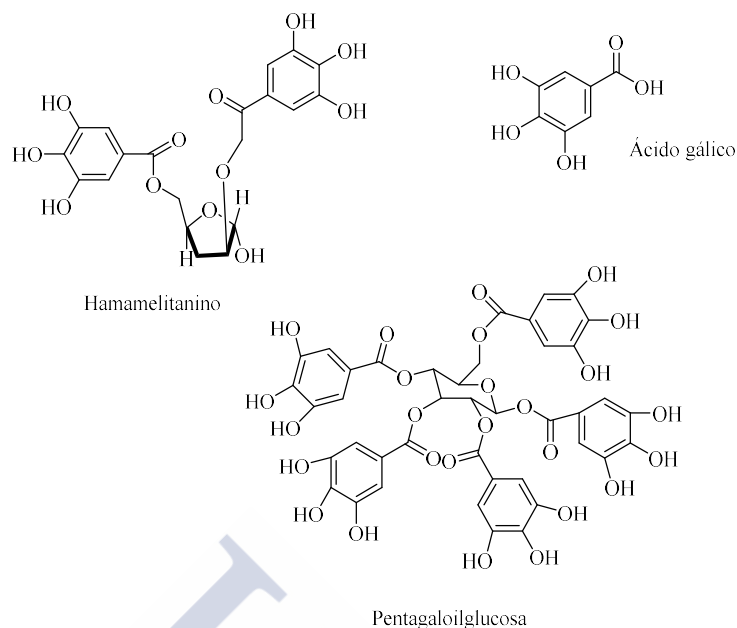


Fig. 15 Estructura química de hamamelitanino y pentasgaoilglucosa.

En relación a los mecanismos de acción antioxidante por cesión de un electrón o un hidrógeno, depende directamente del potencial de reducción y de la reactividad de los grupos hidroxilo (Pokorny, et al., 2001). Generalmente se distinguen tres estructuras que determinan las propiedades antirradicales y reductoras de los flavonoides:

- el *orto*-dihidroxilo, también denominado resto catecol, del anillo B.
- el doble enlace de las posiciones 2 y 3, conjugado con el grupo carbonilo del carbono 4 del anillo C. Las flavonas, los flavonoles y las isoflavonas poseen esta estructura conjugada.
- la presencia de hidroxilos en las posiciones 3 y 5. La quercetina contiene estas tres estructuras y ello le confiere mayor potencial antioxidante que el kaemferol, que no contiene una estructura catecol en el anillo B (Shahidi, F. & Naczk, 1995; Pokorny, et al., 2001).

Al igual que en los fenoles simples, la actividad antioxidante de los flavonoides depende de la parte de la molécula con más eficiencia donadora de electrones. Estudios espectrales han puesto de manifiesto que la oxidación tiene lugar en el anillo B, cuando la estructura catecol está presente, dando lugar a un radical *orto*-semiquinona que facilita la deslocalización electrónica. Las estructuras (b) y (c) estabilizan el radical flavonoide generado en el anillo B (Pokorny, et al., 2001; Heim, et al., 2002).

Además:

- la presencia de una estructura con tres hidroxilos en *orto*, denominado grupo pirogaloilo, mejora la capacidad donadora de electrones.

- los glicósidos presentan menor actividad reductora que las correspondientes agliconas (Packer, et al., 1999; Heim, et al., 2002).
- los restos de ácido gálico mejoran las propiedades de los monómeros y dímeros para atrapar radicales libres, debido a la presencia de un grupo pirogalol en el residuo de ácido gálico (Rice-Evans, et al., 1996; de Gaulejac, et al., 1999). Sin embargo, la incorporación de residuos galato en las procianidinas de tres o más unidades puede restar efectividad antirradicalaria, posiblemente debido al aumento de las repulsiones estéricas (de Gaulejac, et al., 1999).

En relación a la actividad quelatante de los flavonoides, algunos estudios han sugerido que los grupos funcionales más determinantes son el grupo 3',4'-catecol del anillo B, la agrupación 3-hidroxi, 4- ceto del anillo C y la estructura 5-hidroxi, 4-ceto, formada entre los ciclos A y C (Packer, et al., 1999). El resto catecol del anillo B se ha mostrado más efectivo en la complejación de Cu(II) que las agrupaciones formadas por el grupo 4-ceto y los grupos hidroxilo adyacentes de las posiciones 3 y 5 (Brown, et al., 1998). Los restos de ácido gálico en taninos y catequinas monoméricas, son los responsables en cierta medida de las propiedades quelatantes de estos compuestos (Heim, et al., 2002).

2.5.3. Antioxidantes naturales para la inhibición de la rancidez en sistemas multifásicos.

Como ya se ha mencionado previamente, los sistemas multifásicos, por su propia naturaleza son muy susceptibles de sufrir oxidación lipídica. Especialmente aquellos que incluyen en su formulación lípidos muy insaturados.

El empleo de antioxidantes naturales, bien como compuestos puros o como mezcla en un extracto natural experimentó un gran desarrollo en la década de los 90 con la aparición de múltiples trabajos relacionados con la adición de estos compuestos a distintas matrices que incorporaban lípidos con un alto grado de insaturación.

El grupo de Frankel llevó a cabo los primeros estudios en los que se observaba la eficacia de extractos de romero en la inhibición de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite en agua comparándolos con el sistema de aceite puro.(Frankel, Edwin N., et al., 1996; Huang, et al., 1996). En ellos ya se apuntaba que la baja capacidad antioxidante de estos extractos naturales de carácter hidrofílico se debía a su reparto en la fase acuosa, lejos de la zona donde realmente tiene lugar el proceso oxidativo. Medina y col. obtuvieron resultados similares comparando un extracto natural de romero frente a un extracto fenólico proveniente del aceite de oliva (Medina, et al., 2003). Aunque ambos extractos resultaron efectivos en una baja concentración (0,01%), el extracto de romero presentó mejores resultados en el aceite que en el sistema emulsionado.

El tocoferol se emplea de una forma generalizada como antioxidante natural ya que, además, es uno de los componentes del aceite. Este compuesto presenta mayor actividad antioxidante en sistemas emulsionados de aceite en agua que en un sistema monofásico de aceite, debido a su carácter lipofílico y a la denominada “*paradoja polar*”. El tocoferol es más efectivo en emulsiones al situarse en los sitios más susceptibles a sufrir la oxidación: las

interfases aceite-agua y las gotas de aceite, tal y como ya se ha indicado. En un sistema homogéneo de aceite, el tocoferol se distribuye por toda la fase oleosa, lo cual origina una baja concentración de antioxidante en la interfase activa aceite-aire, donde la oxidación tiene lugar. El Trolox, un análogo sintético del α -tocoferol que contiene un grupo ácido carboxílico en sustitución de la cadena alifática, es más efectivo en un sistema homogéneo de aceite que en aceite emulsionado (Frankel, E.N., 1998).

Otro extracto natural muy empleado desde hace décadas en la inhibición de la oxidación lipídica es el constituido por los polifenoles provenientes del té verde. Estos extractos presentan una composición muy variable dependiente de la variedad de la planta y de los factores ambientales. Los polifenoles más abundantes son las distintas catequinas, principalmente la (-)- epigallocatequilgalato que puede representar el 50% del contenido polifenólico. (Ho, et al., 1997). Sin embargo, el uso de estos extractos sin purificar, pueden producir un efecto pro-oxidante debido a la presencia de las clorofilas (Wanasundara & Shahidi, 1998).

Iglesias y col. estudiaron diferentes extractos naturales obtenidos de los residuos generados en la industria maderera, vinícola, de la sidra y provenientes del arbusto *Hamamelis virginiana* (Iglesias, et al.). Los extractos contenían monómeros de catequina y dímeros presentando un diferente grado de polimerización (número de unidades monoméricas) y de galoilación (presencia de unidades de ácido gálico esterificados). Establecieron una relación entre estos dos parámetros y su efectividad antioxidante en sistemas emulsionados. El grado de galoilación constituyó un factor determinante en la efectividad existiendo un valor óptimo en el que la efectividad es máxima y asociado a una elevada capacidad para ceder electrones. Los valores óptimos que obtuvieron para estos parámetros fueron, para la galoilación, de 0,25 mol of galato/mol de polifenol, y para la polimerización de 2,7.

Los compuestos fenólicos contenidos en el aceite de oliva también se han empleado en gran medida en la estabilización de productos que contienen lípidos muy insaturados. Dentro de estos extractos pueden mencionarse el hidroxitirosol, tocoferoles o ácido siríngico. Estos compuestos, debido a su diferente lipofilia se van a comportar de manera diferente en función del sistema objeto de estudio (Montedoro, et al., 1993). Han sido testados en distintos sistemas con resultados favorables (Medina, et al., 2009). Los trabajos de Sacchi y col. (Sacchi, et al., 2002), indicaron que los compuestos fenólicos complejos derivados del tirosol e hidroxitirosol, solubles mayoritariamente en fases oleosas, se hidrolizan durante el procesado térmico de un producto enlatado. Esta descomposición de los fenoles complejos induce un aumento del contenido de fenoles simples, los cuales son más solubles en fases acuosas, y pueden por tanto situarse en la interfase agua-músculo donde tiene lugar la oxidación. Ambos fenómenos, la hidrólisis y la migración hacia la fase acuosa, pueden explicar la pérdida de los compuestos fenólicos del aceite de oliva empleado como medio de cobertura y la protección de los ácidos ω 3- PUFA del producto pesquero enlatado.

Comprobaba la eficacia de estos compuestos asociado a los potenciales beneficios que se han descrito para la salud, los retos actuales van orientados a mejorar su incorporación en el sistema para inducir un incremento en su capacidad antioxidante.

El desarrollo tecnológico ha permitido obtener emulsiones contenidas en cápsulas que mejoran su estabilidad y la obtención de emulsiones con tamaño de gota mucho más pequeño que resultan, a priori, más estables. Estas estrategias incluyen, por ejemplo, la encapsulación de la emulsión para proteger el sistema frente a la oxidación. (Wu & Xiao, 2005; Polavarapu, et al.; Carneiro, et al., 2013; Jiménez-Martín, et al., 2016; Lu, W., et al., 2016).

Otras estrategias van encaminadas a la encapsulación del antioxidante para favorecer su incorporación al sistema (Lu, W., et al., 2016) o al desarrollo de envases que contienen compuestos bioactivos, como antioxidantes, y que, con distintos mecanismos de acción pueden retardar la oxidación lipídica. Estos compuestos pueden ser incorporados en el embalaje de distintas maneras: bien en compartimentos independientes o como etiquetas adhesivas, o embebidos en el polímero que conforma la matriz del embalaje, multifilms o inmovilizados covalentemente en la superficie del embalaje que está en contacto con el alimento (Tian, et al., 2013).

Uno de los campos que ha sufrido mayores avances en los últimos años ha sido el diseño de antioxidantes a la carta a partir de compuestos naturales, especialmente a partir de polifenoles (ampliamente distribuidos en el reino vegetal), bien fenoles simples como el hidroxitirosol (**Hyd**) o el ácido gálico (**Gal**), bien más complejos como el resveratrol (**Res**) epicatequín galato o quercetina (**Q**). El interés en estos compuestos está justificado por su alto valor biológico, farmacológico y propiedades medicinales.

Ya se ha explicado previamente que la capacidad antioxidante de estos compuestos radica en la presencia de grupos donadores de hidrógeno (Ph-OH, OH, SH), así como la presencia de estructuras moleculares (presencia de dobles enlaces conjugados) que extienden la conjugación de los hidroxilos fenólicos favoreciendo la deslocalización electrónica. Pero su eficiencia antioxidante no sólo depende de la reactividad debida a su estructura química, sino también de la posibilidad del antioxidante de situarse en el lugar adecuado donde tiene lugar la reacción.

Tal y como ya se ha indicado, en sistemas compartimentalizados como las emulsiones, la oxidación tiene lugar en la interfase. Por lo tanto, es crucial para que el antioxidante pueda ser efectivo, que pueda localizarse de forma apropiada en la zona de reacción. Esta difusión hacia la zona de acción, así como la posibilidad de situarse de forma apropiada está relacionada con su hidrofobicidad. La polaridad de los distintos compuestos fenólicos debido a la presencia de los grupos hidroxilo puede imposibilitar la localización compuesta del compuesto para que sea efectivo.

Uno de los métodos más útiles para mejorar esta hidrofobicidad es la incorporación de grupos lipofílicos en la posición adecuada, ya que la modificación del grupo polar es difícil y, además, en ella radican las propiedades antioxidantes de estos compuestos (Lipinski, et al., 2001).

La lipofilización consiste, básicamente, en la introducción de un residuo lipofílico para mejorar la superficie activa de la molécula original. Además, esta modificación permite un aumento en su miscibilidad y facilita su incorporación en matrices lipídicas ofreciendo un gran abanico de posibilidades para introducir estos compuestos en diversas matrices de interés

tanto en la industria alimentaria, como cosmética o farmacológica. Los compuestos lipofilizados obtenidos se denominan fenolípidos.

Estas rutas sintéticas incluyen desde reacciones de esterificación clásica a acilaciones enzimáticas mucho más selectivas. Estas reacciones se han aplicado para la obtención de derivados **Hyd** (Torres de Pinedo, et al., 2005; Grasso, et al., 2007), **Gal** (Maldonado, et al., 2011), **IQ** (Salem, et al., 2010), ésteres de ácido clorogénico (López Giraldo, et al., 2007) o ésteres de ácido rosmarínico (Lecomte, et al., 2010).

Estudios recientes han demostrado el potencial antioxidante de estos compuestos. Sasaki y col. estudiaron la capacidad antioxidante de ésteres de ácido clorogénico (C4 a C12) en emulsiones de aceite de Menhaden en agua estabilizada con Brij 35 y buffer fosfato a pH=7 (Sasaki, et al., 2010). Estos autores concluyeron que la esterificación del ácido clorogénico produjo un aumento de la solubilidad en sistemas lipídicos y de la actividad superficial a medida que aumentaba el número de carbonos e la cadena hidrocarbonada. Sin embargo, no observaron un incremento en la efectividad antioxidante con respecto a la molécula original. Si observaron diferencias entre los distintos ésteres obteniendo los peores resultados para el clorogenato de dodecilo. Laguerre y col. evaluaron la actividad antioxidante de ésteres de ácido rosmarínico desde una longitud de cadena C1 hasta C20 en emulsiones de aceite de girasol estabilizadas con Brij 35 (Laguerre, et al., 2010). Sus resultados mostraron la existencia de una longitud de cadena óptima para la que se obtenían la mejor actividad antioxidante (C8) y a partir de la cual, la actividad antioxidante disminuía con el incremento de la longitud de la cadena, debido a la menor accesibilidad del antioxidante en la interfase debido a posibles efectos estéricos debido al tamaño de la longitud de cadena.

Por lo tanto, el diseño de compuestos a la carta con un potencial uso como antioxidantes y que, por su estructura, facilite su incorporación a nuevas formulaciones alimentarias, farmacológicas, etc., constituye un gran reto dentro de este campo.





3. OBJETIVOS



En los últimos años se ha avanzado significativamente en el estudio de las propiedades beneficiosas para la salud de los lípidos marinos. Ello ha conllevado un interés por parte de la industria tanto farmacéutica y cosmética o de tecnología de alimentos a incorporarlos en múltiples formulaciones para enriquecer el producto. Una gran variedad de productos que incorporan este tipo de compuestos son sistemas multifásicos o emulsiones. Dada la labilidad de estos compuestos a sufrir oxidación, la incorporación de compuestos antioxidantes que retrasen o inhiban la oxidación constituye una alternativa asequible. Uno de los principales problemas que se pueden presentar a la hora de adicionar estos compuestos en estas formulaciones es su escasa solubilidad en la matriz. Algo similar sucede cuando la adición se realiza en aceites. Recientemente se han desarrollado el diseño de antioxidantes conjugados formados por la modificación del antioxidante original mediante la incorporación de grupos funcionales, como pueden ser ácidos grasos de distinta longitud de cadena o unidades de azúcar, que, modificando la polaridad, del compuesto original, permitan su incorporación a estos sistemas multifásicos o de naturaleza grasa, manteniendo sus propiedades antioxidantes o, incrementándolas en algunos casos.

Bajo este contexto, este trabajo de investigación se planteó con dos objetivos generales:

- El diseño de compuestos conjugados obtenidos por modificación de compuestos naturales de reconocida actividad antioxidante que permitan su fácil incorporación a matrices empleadas en la industria alimentaria, médica o cosmética sin pérdida de esta propiedad o incrementando la misma.
- La explicación del mecanismo de acción como antioxidante en función de su estructura en los sistemas modelo de emulsión de aceite en agua y aceite.

Para abordar estos objetivos generales, se llevaron a cabo los siguientes objetivos parciales:

1. Síntesis de compuestos derivados de fenoles naturales, hidroxitirosol, resveratrol, ácido gálico e isoquercitrin, mediante la incorporación de unidades de glucosa y ácidos grasos con distinta longitud de cadena.
2. Estudio de las propiedades antioxidantes in vitro de los diferentes compuestos obtenidos.
3. Determinación del coeficiente de partición, $\log P$, de los distintos compuestos.
4. Estudio del efecto de la adición de los distintos derivados a sistemas modelo (aceite y emulsión de aceite) y estudio de las distintas variables que puedan afectar a su comportamiento.
5. Determinación del efecto de distintos agentes emulsificantes en la actividad de los antioxidantes en emulsiones.
6. Establecimiento de los posibles mecanismos de acción en relación a la estructura/actividad de los distintos compuestos.





4. MATERIAL Y MÉTODOS



4.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE HIDROXITIRO SOL

La síntesis de estos compuestos fue llevada a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Juan Carlos Morales (Instituto de Investigaciones Químicas-CSIC, Sevilla).

Se han estudiado dos series de derivados de **Hyd**.

- La primera serie incluyó ésteres de **Hyd** mediante la adición de grupos acilo de distinta longitud de cadena. Las estructuras de dichos compuestos se representan en la **Fig. 16**.

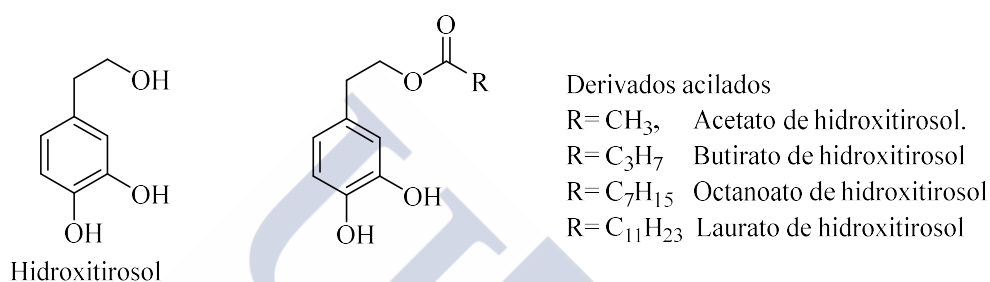


Fig. 16 Derivados acilados de hidroxitiro sol objeto de estudio.

- La segunda serie incluyó éteres de **Hyd** mediante la introducción de una molécula de glucosa en cada uno de los grupos hidroxilo del **Hyd**. Las estructuras de los derivados glucosilados se representan en la **Fig. 17**.

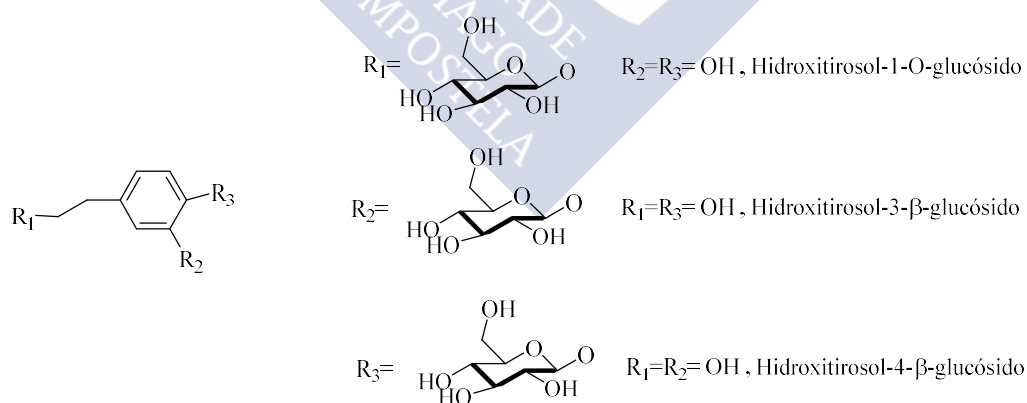


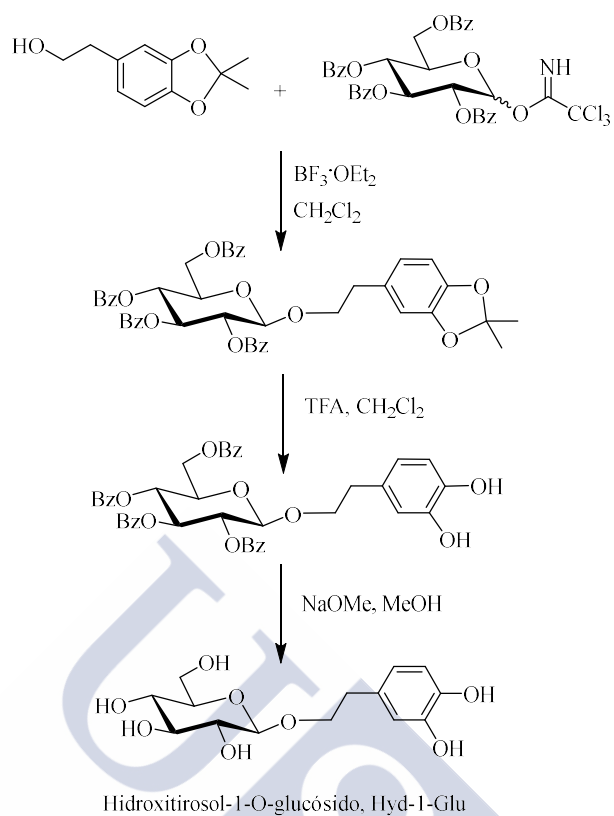
Fig. 17 Derivados glucosilados de **Hyd** objeto de estudio.

4.1.1. Reactivos.

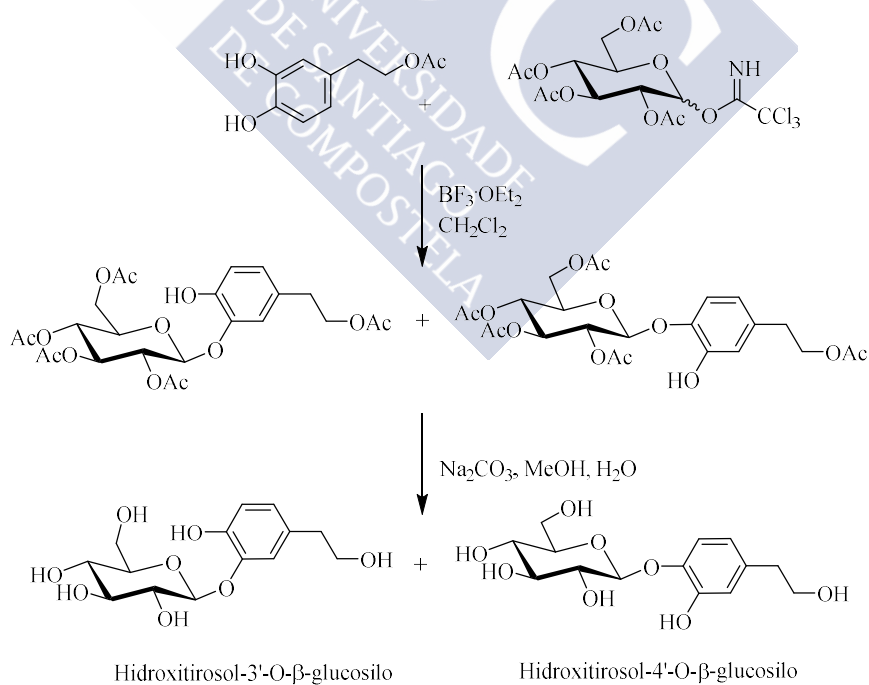
Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y suministrados por Ridel –Haën (Ridel-Haën, Seelze, Germany). Además, butirato de vinilo, octanoato de vinilo, laurato de vinilo fueron suministrados por TCI Europe N. V (Boerenveldseweg, Zwijndrecht, Belgium); la lipasa *Candida antártica* (Novozym 435) fue cedida por Novozymes A/S.

4.1.2. Procedimiento experimental.

- El **Hyd** se preparó por reducción con hidruro de litio y aluminio en THF (reflujo 2 horas) del ácido 3,4-dihidrofénil acético siguiendo el procedimiento descrito por Capasso y col. (Capasso, et al., 1999).
- Los derivados lipofílicos de **Hyd** se obtuvieron a partir del mismo mediante acilación química según los procedimientos descritos por Torres de Pinedo y col. (Torres de Pinedo, et al., 2005) y Grasso y col. (Grasso, et al., 2007). En un balón de reacción se añadieron **Hyd** (200mg, 1,298 mmol, 1 equiv) y un exceso de agente acilante (20 equiv), acetato de vinilo, butirato de vinilo, octanoato de vinilo, laurato de vinilo, según el derivado empleando *tert*-butil metil éter como disolvente de reacción. Se añadió la lipasa *Candida antártica* (180 mg) y la mezcla se agitó a 40°C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, el enzima se decantó y se separó. El disolvente se evaporó y el producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna.
- El hidroxitirosol-1-O- β -glucósido, se preparó por glicosilación del **Hyd** con los grupos hidroxilo ortofenólicos protegidos como dimetilacetal. La glicosilación se llevó a cabo usando 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosil tricloroacetimidato como donador del grupo glucosilo (Schmidt, et al., 1984) y catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. La hidrólisis del acetal se llevó a cabo con TFA puro en CH_2Cl_2 . La hidrólisis de los grupos benzoilo realizó mediante hidrólisis básica usando NaOMe en metanol dando lugar al hidroxitirosol-1-O- β -glucósido (**Esq. 1**).
- Los derivados de **Hyd** con β -glucosa en las posiciones fenólicas 4 y 5 se sintetizaron como una mezcla de regioisómeros a partir del acetato de hidroxitirosol y empleando el tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosilo, más reactivo, como el donador del grupo glucosilo. La desprotección se llevó a cabo en condiciones básicas estándar (Na_2CO_3 , MeOH) dando lugar a una mezcla de regioisómeros de hidroxitirosol-3- β -glucosa e hidroxitirosol-4- β -glucosa (**Esq. 2**).



Esq. 1 Ruta sintética para la obtención de hidroxitirosol-1'-O- β -glucósido.



Esq. 2 Ruta sintética para la obtención de hidroxitirosol-3'-O- β -glucósido y hidroxitirosol-4'-O- β -glucósido.

4.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE RESVERATROL.

La síntesis de estos compuestos fue llevada a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Juan Carlos Morales (Instituto de Investigaciones Químicas-CSIC, Sevilla).

Las modificaciones llevadas a cabo en el esqueleto del resveratrol (**Res**) incluyeron:

- la introducción de grupos acilo (acetato y estearato) en los distintos grupos hidroxilo del esqueleto del **Res**.
- la introducción de una o dos unidades de glucosa en los distintos grupos hidroxilo del esqueleto del **Res**.
- la adición de grupos acilo de distinta longitud de cadena sobre el residuo de glucosa (hidroxilo en la posición C6) en la posición 4' del **Res**.

Las estructuras de los distintos compuestos sintetizados se muestran en la **Fig. 18**.



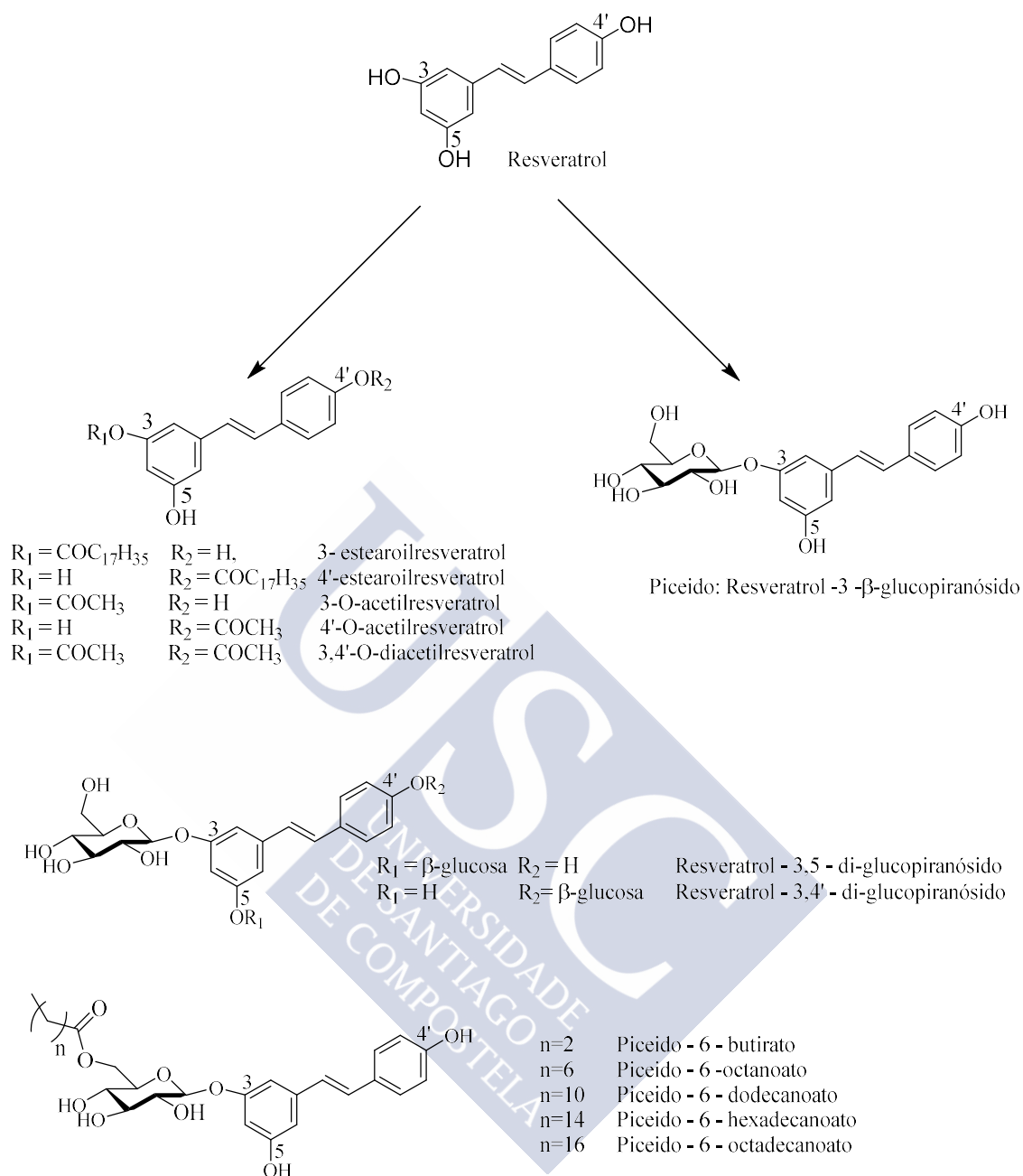


Fig. 18 Estructuras de derivados de Res objeto de estudio.

4.2.1. Reactivos.

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de grado analítico o de grado HPLC (Ridel-Haën, Seelze, Germany). El **Res** fue cedido por el Profesor. J. C. Espín (CEBAS, CSIC, Murcia). La lipasas *Candida antártica B* (Novozyme 435) y *Thermomyces lanuginosus* y fueron cedidas por Novozymes A/S y *Alcaligenes sp.* (Lipasa QLG) fue cedida por Meito Sangyo Co. (Japón). Acetato de vinilo, piceido y 2-metil-2-butanol fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Butirato de vinilo, octanoato de

vinilo, laurato de vinilo, palmitato de vinilo y estearato de vinilo fueron adquiridos en TCI Europe N. V (Boerenveldseweg, Zwijndrecht, Belgium). Los disolventes se secaron sobre moléculas de sieves de tamaño 3 Å.

4.2.2. Procedimiento experimental.

- Los derivados glucosilados del **Res** fueron sintetizados químicamente según el procedimiento descrito por Zhang y col. con algunas modificaciones (Zhang, et al., 2006). En un primer paso, los grupos hidroxilo del **Res** se protegieron de forma no selectiva como *tert.*-butildimetilsilil derivados en presencia de imidazol anhidro en DMF y a temperatura ambiente. Los distintos compuestos se separaron cromatográficamente y cada silil derivado de **Res** se glucosiló empleando como donante de la unidad de glucosilo, el tricloroacetimidato de 2,3,4,6 -tetra-*O*-benzoil- glucopiranosilo. La reacción se llevó a cabo en diclorometano y empleando triflato de trimetilsililo como promotor. Por último, la hidrólisis con MeONa 3N en MeOH/THF (5:1) dio lugar a los distintos derivados glucosilados.
- La síntesis de los derivados acilados de piceido se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Larrosa y col. (Larrosa, et al., 2010). La síntesis se llevó a cabo en un único paso mediante acilación enzimática del piceido empleando la lipasa *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada en sílica granulada. La reacción se llevó a cabo en alcohol *tert*-butílico y los agentes acilantes empleados fueron butirato de vinilo, octanoato de vinilo, laurato de vinilo, palmitato de vinilo y estearato de vinilo.

4.3. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO.

La síntesis de estos compuestos fue llevada a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Juan Carlos Morales (Instituto de Investigaciones Químicas-CSIC, Sevilla).

La serie de compuestos estudiados incluyó la introducción de una unidad de glucosa en el hidroxilo del carbono 3 del anillo aromático a partir del correspondiente galato de alquilo comercial a excepción del galato de decilo (que fue sintetizado) (**Fig. 19**).

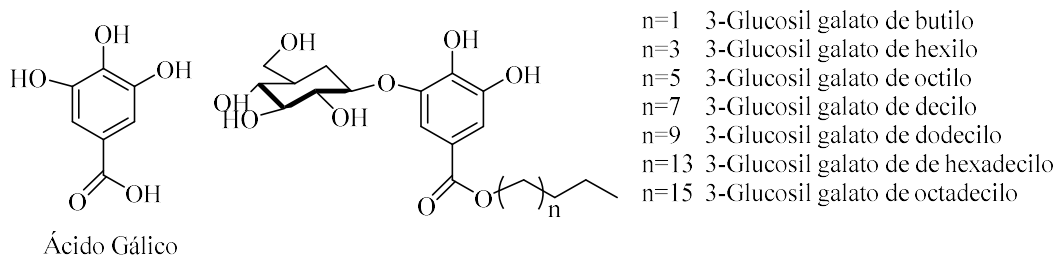


Fig. 19 Estructuras de los derivados glucosilados de ésteres de Gal estudiados.

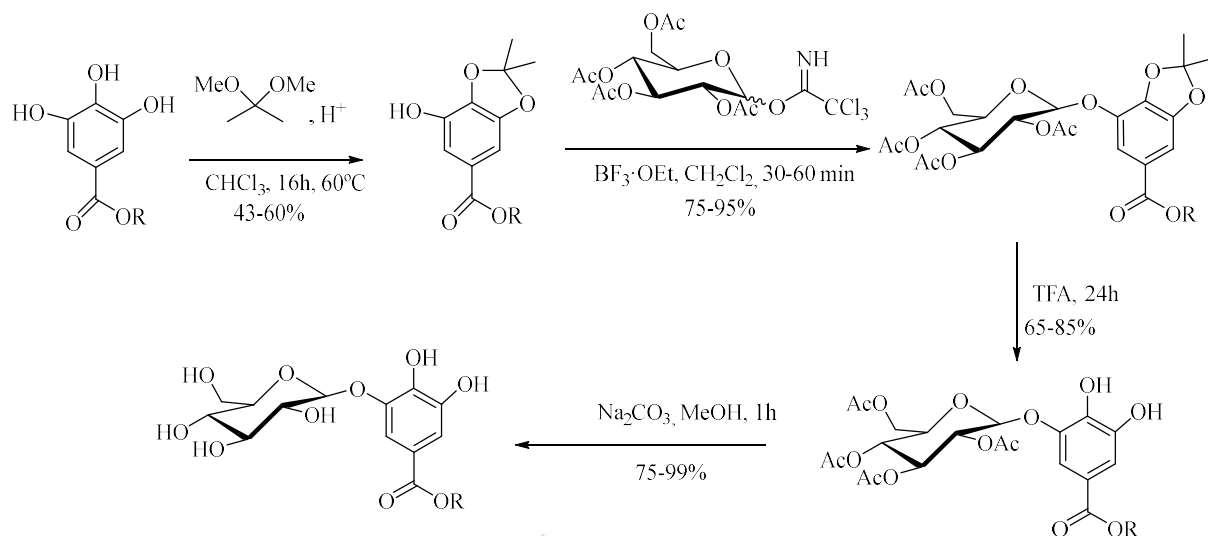
4.3.1. Reactivos.

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de grado analítico o de grado HPLC (Ridel-Haën, Seelze, Germany). Además, **Gal** fue suministrado por Sigma (St. Louis, MO, USA). Galato de butilo, galato de hexilo, galato de octilo, galato de dodecilo, galato de hexadecilo y galato de octadecilo fueron adquiridos en TCI Europe N. V (Boerenveldseweg, Zwijndrecht, Belgium).

4.3.2. Procedimiento experimental.

Todas las reacciones fueron monotorizadas por cromatografía en café fina Silica-Gel 60 F₂₅₄ (Merck). Como revalador se empleó Mostain (500 mL, 10% H₂SO₄, 25 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1 g de Ce(SO₄)₂·4H₂O). Los productos de reacción se purificaron por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria Silicagel 60 (200-400 mesh) de Merck y como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo en distinta proporción en función del galato de alquilo.

- La síntesis de galato de decilo se llevó a cabo por la reacción de ácido gálico con decanol en THF empleando N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como catalizador (Yuji, et al., 2007).
- La síntesis de los derivados glucosilados se llevó a cabo a partir de los derivados acilados correspondientes según el procedimiento descrito por Maldonado y col. (Maldonado, et al., 2011). En un primer paso, los hidroxilos de las posiciones 4 y 5 se protegieron como acetales tratando los alquil derivados con 2,2-dimetoxipropano, en presencia de ácido sulfónico, en cloroformo con rendimientos moderados. A continuación se llevó a cabo la reacción de glicosilación siguiendo el protocolo clásico de Schmidt's (Schmidt & Michel, 1982; Schmidt & Kinzy, 1994; Nicolaou & Mitchell, 2001) empleando tricloroacetimidato de glucosilo en presencia BF₃·OEt₂ como promotor, en CH₂Cl₂ y a temperatura ambiente. Estas condiciones de reacción dieron lugar a los productos β-glicosilados de forma estereoselectiva y con los grupos hidroxilo de la unidad de la glucosa protegidos como ésteres acetato. A continuación, los compuestos obtenidos se sometieron a distintas condiciones para liberar todos los grupos hidroxilo. En un primer paso, la hidrólisis del acetal se llevó a cabo en presencia de TFA seguido de hidrólisis con Na₂CO₃, en metanol para obtener los glucosil derivados. En el **Esq. 3** se representa de forma general los pasos seguidos en la síntesis de los derivados glucosilo a partir de los alquil galatos correspondientes.



Esq. 3 Ruta sintética para la obtención de los derivados glucosilo de los alquil galato. R se corresponde con cada una de las cadenas alquilo de los ésteres de gálico de partida, butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo y octildecilo.

4.4. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ISOQUERCITRIN.

La síntesis de estos compuestos fue llevada a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Juan Carlos Morales (Instituto de Investigaciones Químicas-CSIC, Sevilla).

El isoquercitrin (**IQ**) es un polifenol que pertenece a la familia de los flavonoides. Es el derivado glucosilado de la quercetina en la posición 3 y se encuentra de forma natural en algunas especies de ruibarbo y en el mango. Los compuestos estudiados incluyeron la adición de un grupo acilo en el hidroxilo de la posición 6 del resto de glucosa (**Fig. 20**).

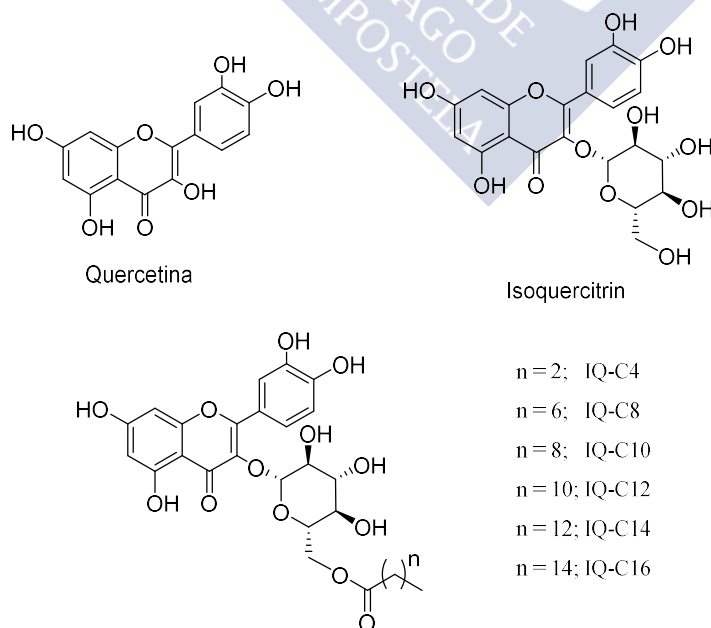


Fig. 20 Estructura de quercetina, isoquercitrin y derivados acilados de isoquercitrin.

4.4.1. Reactivos.

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de grado analítico o de grado HPLC (Ridel-Haën, Seelze, Germany). Además, la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (Lypozyme® TL IM) fue cedida por Novozyme S/A. Quercetina (**Q**) e **IQ** fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). Butirato de vinilo, octanoato de vinilo, laurato de vinilo, decanoato de vinilo, palmitato de vinilo y miristato de vinilo fueron adquiridos en TCI Europe N. V (Boerenveldseweg, Zwijndrecht, Belgium).

4.4.2. Procedimiento experimental.

La síntesis se llevó a cabo mediante acilación enzimática según el procedimiento descrito por Salem y col. (Salem, et al., 2010) con algunas modificaciones. El procedimiento general consistió en la adición de la lipasa *Thermomyces lanuginosus* (Lypozyme® TL IM) (100 mg) a una mezcla de **IQ** (100 mg, 0.215 mmol, 1 equiv) y el correspondiente agente acilante (5 equiv) en 15 mL de *tert*-butanol en un balón de reacción seco. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 55 °C y con agitación durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, el enzima se decantó y se separó. El disolvente se evaporó y el producto se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephadex LH20 y empleando metanol como eluyente.

Los agentes acilantes empleados fueron: butirato de vinilo, octanoato de vinilo, laurato de vinilo, decanoato de vinilo, palmitato de vinilo y miristato de vinilo en función del producto deseado.

4.5. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC) DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

Todos los compuestos estudiados en el presente trabajo se analizaron por HPLC en fase reversa. El equipo estaba provisto de una bomba cuaternaria Alliance 2695 de Waters acoplada a un detector de diodos array (DAD) 2996 de Waters.

El **Hyd**, los derivados de **Hyd**, **Res** y todos los derivados de **Res** se analizaron siguiendo la siguiente metodología:

Se empleó una columna Symmetry C18, 3,5 µm (2,1x150 mm) de Waters trabajando a un flujo de 0,2 mL/min y a temperatura ambiente. Los eluyentes fueron: [A]= AcOH, 0,05% y [B]= ACN. Se empleó un gradiente que fue del 2% de B al 100% de B en 25 min y se mantuvo en estas condiciones durante 25 min.

El ácido gálico y sus alquil derivados se analizaron bajo las siguientes condiciones:

Se empleó una columna Symmetry C18 Column, 100Å, 5 µm, 4.6 mm X 250 mm de Waters trabajando a un flujo de 1mL/min y a una temperatura de 35°C. Los eluyentes fueron [A]= 0,01% Fórmico y [B]= ACN:IPA 50:50. Se empleó un gradiente del 40% de B al 100% de B durante 25 min y se mantuvo en estas condiciones durante 5 min.

El isoquercitrin, los alquil derivados de isoquercitrin y los glucosil alquil derivados de ácido gálico, se analizaron bajo las siguientes condiciones:

Se empleó una columna Symmetry C18 Column, 100Å, 5 µm, 4.6 mm X 250 mm de Waters trabajando a un flujo de 1mL/min y a una temperatura de 35°C. Los eluyentes fueron [A]= 0,01M AcONH₄ pH=4,5y [B]= ACN:IPA 50:50. Se empleó un gradiente del 40% de B al 100% de B durante 25 min y se mantuvo en estas condiciones durante 5 min.

4.6. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN AGUA/1-OCTANOL, LOG *P*.

La determinación del coeficiente de partición en agua/1-octanol como log *P* se llevó a cabo siguiendo dos procedimientos.

4.6.1. Derivados de hidroxitirosol y resveratrol.

Estos análisis fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de Dr. Juan Carlos Morales (Instituto de Investigaciones Químicas-CSIC, Sevilla).

Se preparó una dispersión de cada compuesto en 1-octanol en una concentración 0,3 mM. Se calentó a 60 °C para favorecer la solubilización de los distintos compuestos. Se obtuvo el espectro de UV y se determinó el valor máximo de la absorbancia (A_0). A continuación se tomaron volúmenes iguales de la disolución orgánica (2 mL) y buffer fosfato (0,1 M, pH=7,4) y se agitaron vigorosamente en Vortex durante 1 min. Se dejó estabilizar la mezcla hasta separación de las fases (30 min) y se midió la absorbancia máxima de la fase orgánica (A_x).

EL coeficiente de partición (log *P*) se determinó a partir de la ecuación:

$$P = \frac{A_x}{(A_0 - A_x)}$$

Si los valores experimentales no resultaban consistentes, log *P* se calculó usando la fragmentación de Crippen incluida en el Software ChemBrioDraw Ultra 11.0 (Ghose & Crippen, 1987).

4.6.2. Derivados de ácido gálico e isoquercitrin.

La evaluación del coeficiente de partición de los derivados de **Gal** e **IQ**, se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia según el procedimiento descrito por Rothwell y col. con ligeras modificaciones (Rothwell, et al., 2005).

Para ello se preparó una dispersión de 0,15 mg/mL de cada compuesto en 1-octanol (1 mL). Se calentó a 45 °C para favorecer la solubilización de los distintos compuestos. Se añadió 1 mL buffer Tris-HCl 50 mM, pH=7,4. y se volvió a agitar vigorosamente durante 1

min. Se centrifugó durante 15 min a 3500 rpm y a temperatura ambiente, para favorecer la separación de las fases.

La fase acuosa se analizó directamente por HPLC según las condiciones descritas previamente para cada tipo de familia de compuestos. La fase oleosa se extrajo con etanol absoluto (2 x 1 mL), se juntaron las fases etanólicas extraídas, se llevaron a sequedad, se resuspendió en 1 mL de etanol y analizó por HPLC según las condiciones descritas previamente.

La cuantificación de los distintos compuestos se llevó a cabo mediante HPLC según las condiciones descritas previamente para cada tipo de familia de compuestos. Se realizó una calibración externa para cada uno de los compuestos estudiados ($R^2 > 0,9998$). La λ a la que se llevó a cabo el análisis cuantitativo fue de 280 nm.

El coeficiente de partición ($\log P$) se determinó a partir de la ecuación:

$$P = \frac{C_{buffer}}{C_{1-octanol}}$$

siendo C_{buffer} la concentración del compuesto en la fase acuosa (buffer) y $C_{1-octanol}$ la concentración en 1-octanol después de la mezcla.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA.

La capacidad de los compuestos fenólicos para atrapar radicales se evaluó mediante dos métodos:

- Capacidad de eliminación del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH \cdot).
- Ensayo TEAC (*Total Equivalent Antioxidant Capacity*) Capacidad de eliminación del radical catiónico libre 2,2 azinobis (ácido 3-etilbenzotiolin-6-sulfónico) ABTS $^{•+}$ comparando con la capacidad de un antioxidante estándar, Trolox (análogo de la vitamina E).

4.7.1. DPPH.

La capacidad antirradicalaria de captación del radical DPPH se evaluó según el método de von Gadow y col. (von Gadow, et al., 1997). El seguimiento de la reacción se realizó por la medida de la absorbancia a 515 nm transcurridos 16 minutos en un espectrofotómetro Uv-vis Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA).

4.7.1.1. Reactivos.

DPPH fue suministrado por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los disolventes empleados fueron de grado analítico (Merck, Hohenbrunn, Germany).

4.7.1.2. Procedimiento experimental.

Se añadieron 3 mL de una disolución de DPPH $6 \cdot 10^{-5}$ M (se pesaron 0,01478 g de DPPH y se llevaron a 25 mL de MeOH; 1 mL de esta disolución se llevó a un volumen de 25 mL de MeOH constituyendo la disolución de trabajo). a 75 μ L de la disolución fenólica. Transcurridos 16 min se procedió a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Uv-vis Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA). Se definió el porcentaje de captación del radical DPPH como:

$$\% \text{ CAPTACIÓN} = \left(\frac{Abs_{t=0 \text{ min}} - Abs_{t=16 \text{ min}}}{Abs_{t=0 \text{ min}}} \right) * 100$$

Se prepararon distintas concentraciones de disolución fenólica y con las lecturas obtenidas se representó el % CAPTACIÓN de radical DPPH frente a la concentración para cada compuesto. Se definió la EC₅₀ como la concentración del extracto que presentó un porcentaje de captación del radical DPPH del 50%.

4.7.2. ABTS^{•+} (TEAC).

Este ensayo analizó la capacidad de captación del radical radical catiónico, sal de diamonio del 2,2 azinobis (ácido 3-etilbenzotiolin-6-sulfónico) ABTS^{•+} y Se expresa la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} como equivalentes a la capacidad antioxidante del Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2 carboxílico). El ensayo se determinó acorde con el método descrito por Miller y col. (Miller & Rice-Evans, 1995).

4.7.2.1. Reactivos.

Los reactivos ABTS^{•+}, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, NaN₃, K₂S₂O₈ fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). El agua empleada en el análisis fue de grado Milli Q. Los disolventes empleados fueron de grado analítico (Merck, Hohenbrunn, Germany).

4.7.2.2. Procedimiento experimental.

Se preparó una disolución de ABTS 7 mM en tampón fosfato alcalino (PBS) pH=7,4 como sigue: 384 mg de ABTS⁺ y 66,2 mg de K₂S₂O₈ se disolvieron en 100 mL de tampón PBS (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 1,15 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KCl y 0,2 g de NaN₃ en un litro de agua Milli Q). Se mantuvo en agitación constante durante 16 horas y protegido de la luz (reactivo TEAC).

Se diluyó el reactivo TEAC con tampón fosfato salino, PBS, hasta que presentó una absorbancia próxima a 0,7 unidades de absorbancia. El ajuste de la absorbancia del espectrofotómetro se realizó con un blanco con PBS.

A 30 µL de disolución fenólica se le añadieron 3 mL de reactivo TEAC. Se incubó la muestra a 30 °C y transcurridos 6 minutos se procedió a la lectura en un espectrofotómetro Uv-vis Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA) a 734 nm. Se realizó un control de la muestra con el disolvente de la disolución fenólica (agua, MeOH o EtOH).

Se prepararon distintas concentraciones de los compuestos objeto de estudio y se representó la curva correspondiente de concentración frente a absorbancia. Se realizó un calibrado con disoluciones acuosas de Trolox en un intervalo de 0,1 a 2 mM. Se estableció el porcentaje de captación de radical equivalente al que tiene una disolución 1 mM de Trolox o de 0,5 mM de Trolox si el compuesto presentaba una actividad muy baja.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD REDUCTORA.

El poder reductor de los fenoles se determinó por el método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), basado en el potencial de los compuestos para reducir los iones férricos. Este método mide el aumento en la absorbancia a 593 nm, que se produce cuando el complejo Fe(III)-tripiridiltriazina (TPTZ) se reduce a Fe(II)-TPTZ. Éste complejo presenta un intenso color azul. El protocolo seguido fue una adaptación del procedimiento indicado por Benzie y Strain (Benzie & Strain, 1996).

4.8.1.1. Reactivos.

2,5,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), FeCl₃·6H₂O, AcONa·3H₂O, AcOH, HCl, FeSO₄·3H₂O. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los disolventes empleados fueron de grado analítico (Merck, Hohenbrunn, Germany).

4.8.1.2. Procedimiento experimental.

El reactivo FRAP se preparó diariamente a partir de una mezcla de una disolución de tampón acetato 300mM a pH=3,6, de una disolución 10mM de TPTZ en 40 mM de HCl y de una disolución acuosa de FeCl₃·6H₂O 20 mM en una relación volumétrica 10:1:1. El tampón acetato se preparó mezclando 3,1 g de AcONa·3H₂O con 16 mL de HCl y llevado a un volumen de 1 L de agua Milli Q. La disolución de TPTZ se preparó disolviendo 0,0312 g del

mismo en 10 mL de agua Milli Q y 35,2 µL de HCl comercial. La disolución de, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se preparó disolviendo 0,054 g del cloruro en 10 mL de agua Milli Q.

En tubos de ensayo conteniendo 0,1 mL de la disolución fenólica, se añadieron 3 mL de reactivo FRAP. Transcurridos 6 minutos se realizó la lectura a 593 nm en un espectrofotómetro Uv-vis Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA). El blanco se sustituyó por agua. La capacidad reductora de los compuestos fenólicos se estudió a varios niveles de concentración.

La recta de calibrado se construyó con patrones acuosos de $\text{FeSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. La capacidad de donación de electrones se corresponde con la pendiente del ajuste lineal entre la concentración fenólica y la reactividad al reactivo FRAP.

4.9. ANÁLISIS SENSORIAL.

Para llevar a cabo el análisis sensorial de los aceites y emulsiones de aceite en agua, los matraces Erlenmeyer que contenían las muestras se agitaron y se dejaron atemperar 10 minutos. Posteriormente un panel entrenado formado por cuatro especialistas evaluó el desarrollo de los aromas asociados a la rancidez. Se establecieron tres niveles de aroma relacionados con la rancidez: sin olor, rancidez incipiente y rancio.

4.10. SISTEMA MODELO. ACEITES.

4.10.1. Descripción del sistema modelo. Caracterización.

El aceite de pescado empleado fue un aceite de bacalao (*Gadus morhua*) proporcionado por Fluka (New-Ulm, Swizerland). Su contenido en ácidos grasos se caracterizó mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama, siguiendo el procedimiento descrito por Christie (Christie, 1982).

4.10.1.1. Reactivos.

Los disolventes empleados (diclorometano, metanol, tolueno) fueron de grado analítico. Todos los disolventes y reactivos (ácido nonadecanoico, cloruro sódico y H_2SO_4) fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.10.1.2. Procedimiento experimental de determinación de composición en ácidos grasos del aceite.

Un volumen de disolución de aceite en diclorometano conteniendo 0,6 mg de aceite se llevó a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 400 µl de tolueno y 2 mL 0,6 mg de ceite se disolvieron en 400 µL de tolueno. Se añadieron 2 mL de una disolución metanólica de H_2SO_4 al 1% y 100 µL de una disolución 0,4 mg/mL en tolueno de ácido nonadecanoico, y

se incubó la mezcla a 50 °C durante 15 h. Transcurrido este tiempo, se dejó atemperar y se añadieron 5 mL de una disolución de cloruro sódico al 5% en agua. Se tomaron 100 µL de la fase toluénica y se trasvasaron a un vial para inyectar en el cromatógrafo de gases. La identificación se llevó a cabo por comparación con una mezcla de ácidos grasos comercial (Fame Mix 37 de Supelco). La cuantificación se llevó a cabo empleando ácido nonadecanoico como patrón interno.

4.10.2. Preparación de los antioxidantes. Adición al sistema modelo.

Inicialmente se prepararon disoluciones stock de 1mg/mL (p/v) de los distintos compuestos en agua, metanol o etanol según el grupo de compuestos estudiados.

La muestra de aceite (3 g) se dispuso en un matraz erlenmeyer de 50 mL provisto de tapa. Previamente a la incorporación del aceite, se añadió el compuesto fenólico objeto de estudio en un pequeño volumen de disolvente el cual se evaporó en corriente de nitrógeno y, rápidamente, se añadieron 3 g de aceite de pescado. A continuación se agitó durante 30 s en vortex para favorecer la disolución del compuesto fenólico en el sistema. Las muestras control contenían sólo aceite de pescado.

4.10.3. Estudio del desarrollo de la oxidación.

La oxidación de las muestras de aceite se activó térmicamente en una estufa. El rango de temperaturas utilizado varió en función de las familias de compuestos y estuvo comprendido en un intervalo de 40-50 °C. Los sistemas se muestrearon diariamente y la extensión de la oxidación se evaluó mediante el análisis de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados.

El contenido de hidroperóxidos conjugados se analizó según el método descrito en la AOCS (AOCS, 1989). Este método consiste en la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 234 y a 268 nm, longitudes de onda que se corresponden con los máximos de absorción de los hidroperóxidos con dobles y triples enlaces.

Los sistemas con los aditivos correspondientes y los sistemas control se prepararon por triplicado.

4.10.3.1. Reactivos.

El hexano empleado fue de grado analítico y suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.10.3.2. Procedimiento experimental.

Se tomaron alícuotas del aceite (5 µL), después de agitar vigorosamente la muestra, y se disolvieron en 10 mL de hexano. Las disoluciones resultantes se agitaron durante 30 s en un

vortex y se midió su absorbancia a 234 y a 268 nm en un espectrofotómetro Uv-vis Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA).

El contenido en hidroperóxidos con dobles y triples enlaces conjugados se expresó en mmoles de Hidroperóxidos por Kg de aceite a partir de la siguiente ecuación derivada de la Ley de Beer:

$$\text{mmol Hidroperóxidos/Kg aceite} = (A \cdot V \cdot 10^3) / (\epsilon \cdot b \cdot V' \cdot d)$$

donde A representa la absorbancia a 234, o 268 nm, V el volumen final en mL, ϵ es el coeficiente de absortividad molar de los hidroperóxidos conjugados (considerándose el valor correspondiente al ácido linoleico: $29000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Chan, 1987), b es el recorrido óptico de la cubeta (1 cm), V' son los mL de muestra empleados y d es la densidad del aceite de hígado de bacalao (0,920 g/mL).

La evaluación de la efectividad antioxidante se llevó a cabo analizando las cinéticas de formación de los hidroperóxidos conjugados de las distintas muestras y se determinó la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en base a los períodos de inducción, a los porcentajes de inhibición y a la cantidad máxima de los productos de oxidación formados.

El período de inducción es el tiempo a partir del cual, se produce un cambio brusco en la velocidad de la oxidación. Se calculó como el punto de corte de las tangentes correspondientes a las zonas de iniciación y propagación de la curva cinética de oxidación (Frankel, E.N., 1998).

El porcentaje de inhibición se calculó en la fase de propagación de la oxidación, por modificación de la fórmula propuesta por Frankel (Frankel, E.N., 1998):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{C - S}{C - C_0} \cdot 100$$

donde C representa el valor del índice de oxidación en el control, C_0 el valor del índice de oxidación en el control a tiempo cero y S el valor de oxidación en las muestras con antioxidante. La fórmula anteriormente citada incorpora en el denominador el término C_0 , si se compara con la ecuación original de Frankel, con la finalidad de tomar como referencia los índices de oxidación iniciales de la muestra.

4.11. SISTEMA MODELO: EMULSIONES DE ACEITE EN AGUA.

4.11.1. Descripción del sistema. Preparación.

Las emulsiones de aceite en agua se prepararon con un contenido de un 10 % de aceite de hígado de bacalao y un agente emulsificante (1% lecitina, 1%, SDS y 2% de Tween-20). La preparación de la emulsión de aceite se realizó por adaptación del procedimiento descrito por Huang y col. (Huang, et al., 1996).

4.11.2. Reactivos.

El aceite empleado fue aceite de bacalao (*Gadus morhua*) proporcionado por Fluka (New-Ulm, Swizerland). La lecitina, el SDS y el Tween-20 fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.11.3. Procedimiento experimental.

En un vaso de precipitados, previamente tarado, se dispuso el aceite y el emulgente. El agua se añadió sobre el aceite poco a poco mientras se emulsionaba por la acción de un homogeneizador-triturador Ultra-Turrax T-25 (Ika-Werke GMBH&Co. KG, Staufen, Germany). Se evitó el calentamiento generado en el proceso de homogeneización manteniendo el vaso de precipitados en contacto con una mezcla agua-hielo.

4.11.4. Preparación de los antioxidantes. Adición.

Inicialmente se prepararon disoluciones stock de 1mg/mL (p/v) de los distintos compuestos en agua, metanol o etanol según el grupo de compuestos estudiados.

5 g de emulsión de aceite se dispusieron en un matraz erlenmeyer de 50 mL provisto de tapa. Previamente a la incorporación de la emulsión, se añadió el compuesto fenólico objeto de estudio, en un pequeño volumen de disolvente el cual se evaporó en corriente de nitrógeno y, rápidamente, se añadieron 3 g de aceite de pescado. A continuación se agitó durante 30 s en vortex para favorecer la disolución del compuesto fenólico en el sistema. Las muestras control no contenían compuestos fenólicos.

4.11.5. Estudio del desarrollo de la oxidación.

La oxidación de la emulsión se activó térmicamente en una estufa a 30-50°C. Los sistemas se muestrearon diariamente y la extensión de la oxidación se evaluó mediante el análisis de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y la formación de compuestos fluorescentes en aquellos casos en los que el emulgente empleado fue la lecitina.

El contenido de hidroperóxidos conjugados se analizó según el método descrito en la AOCS (AOCS, 1989). Este método consiste en la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 234 y a 268 nm, longitudes de onda que se corresponden con los máximos de absorción de los hidroperóxidos con dobles y triples.

Los compuestos fluorescentes de interacción surgen de la reacción de los carbonilos, mayoritariamente aldehídos, que son productos secundarios de la oxidación que se generan en la rotura de los hidroperóxidos, con los grupos aminos de la lecitina. Por tanto, estos compuestos de interacción, también denominados productos terciarios de la oxidación, se generan en las últimas etapas del proceso oxidativo. Para determinar el contenido de los compuestos fluorescentes de interacción, se determinó la fluorescencia a los pares de

longitudes de onda: 345 nm (λ_{exc})/416 nm (λ_{em}) y 393 nm (λ_{exc})/463 nm (λ_{em}), de acuerdo con el método propuesto por Nielsen y col. (Nielsen HK, et al., 1985).

Los sistemas con los aditivos correspondientes y los sistemas control se prepararon por triplicado.

4.11.5.1. Reactivos.

Los disolventes empleados fueron de grado analítico. El agua empleada fue de grado Milli Q. El etanol, sulfato de quinina, H₂SO₄ fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.11.5.2. Procedimiento experimental.

Se tomaron alícuotas de la emulsión (100 μ L), después de agitar vigorosamente la muestra, y se disolvieron en 5 mL de etanol. Las disoluciones resultantes se agitaron durante 30 s. en un vortex.

Para la determinación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados, se midió su absorbancia a 234 y a 268 nm en un espectrofotómetro Uv-vis Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA).

El contenido en hidroperóxidos con dobles y triples enlaces conjugados se expresó en mmoles de Hidroperóxidos por Kg de aceite a partir de la siguiente ecuación derivada de la Ley de Beer:

$$\text{mmol Hidroperóxidos/Kg aceite} = (A \cdot V \cdot 10^4) / (\epsilon \cdot b \cdot V' \cdot d \cdot c')$$

donde A representa la absorbancia a 234, o 268 nm, V el volumen de disolución de la muestra para el análisis en mL, ϵ es el coeficiente de absortividad molar de los hidroperóxidos conjugados (considerándose el valor correspondiente al ácido linoleico: 29000 L mol⁻¹ cm⁻¹) (Chan, 1987), b es el recorrido óptico de la cubeta (1 cm), V' son los mL de emulsión empleados, d es la densidad de la emulsión y c' , la proporción de aceite en 100 g de emulsión.

Los compuestos fluorescentes se determinaron en las disoluciones etanólicas de las emulsiones empleadas para medir los hidroperóxidos conjugados. La fluorescencia, a los pares de longitudes de onda antes indicados, se registró con un Fluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-3B (Perkin-Elmer, Wilesley, MA, USA). El blanco se realizó con etanol absoluto. La fluorescencia de los compuestos de interacción de las muestras (F^m), se calculó mediante la siguiente relación de las intensidades de fluorescencia de los dos pares de longitud de onda:

$$F^m = \frac{F_{393/363}^m}{F_{345/416}^m}$$

Como referencia se empleó una disolución de sulfato de quinina de 1 µg/mL, en ácido sulfúrico 0,05 M. El factor de fluorescencia relativo (δF) se obtuvo del cociente entre la fluorescencia correspondiente a la muestra (F^m) y la fluorescencia del sulfato de quinina (F^{sq}):

$$\text{Fluorescencia } (\delta F) = \frac{F_{393/363}^m}{F_{345/416}^m} \cdot \frac{F_{345/416}^{sq}}{F_{393/363}^{sq}}$$

La evaluación de la efectividad antioxidante se llevó a cabo analizando las cinéticas de formación de los hidroperóxidos conjugados y de formación de compuestos fluorescentes de las distintas muestras y se determinó la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en base a los períodos de inducción, a los porcentajes de inhibición y a la cantidad máxima de los productos de oxidación formados tal y como se ha explicado anteriormente para el sistema modelo de aceite de pescado.

4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

De cada muestra se prepararon 3 réplicas y los análisis se realizaron por duplicado. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar. A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía, o ANOVA (Sokal y Rohlf, 1981), ($p < 0,01$) y las medias se compararon con el método de la diferencia de los mínimos cuadrados (LSD, least-squares difference).







5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.1. DERIVADOS DE HIDROXITIRO SOL.

Se muestra el efecto de una serie de modificaciones estructurales de la molécula de **Hyd** en su capacidad antioxidante. Las modificaciones incluyeron:

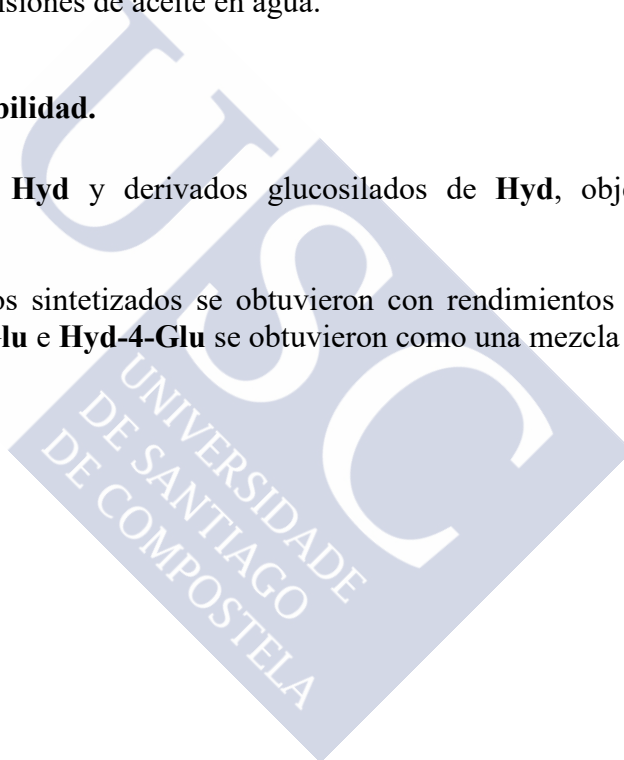
- La introducción de residuos acilados de distinta longitud de cadena en la molécula de **Hyd**.
- La introducción de una molécula de glucosa en cada uno de los grupos hidroxilo del **Hyd**.

Este apartado se estructura en dos partes, una primera en la que se describen los parámetros físico-químicos de los compuestos a estudiar, y una segunda parte centrada en el estudio de las capacidades de los compuestos para inhibir la oxidación de los sistemas lipídicos en aceites y emulsiones de aceite en agua.

5.1.1. Síntesis y estabilidad.

El **Hyd**, ésteres de **Hyd** y derivados glucosilados de **Hyd**, objeto de estudio, se representan en la **Tab. 3**.

Todos los compuestos sintetizados se obtuvieron con rendimientos superiores al 90%. Los compuestos **Hyd-3-Glu** e **Hyd-4-Glu** se obtuvieron como una mezcla de regioisómeros.



Fenol	Abreviatura	Peso molecular	Estructura
Hidroxitirosol	Hyd	154,17	
Acetato de hidroxitirosol	Hyd-Ac	196,20	
Butirato de hidroxitirosol	Hyd-C4	224,26	
Octanoato de hidroxitirosol	Hyd-C8	280,36	
Laurato de hidroxitirosol	Hyd-C12	336,47	
Hidroxitirosol -1-O-glucósido	Hyd-1-Glu	316,31	
Hidroxitirosol -3-β-glucósido	Hyd-3-Glu	316,31	
Hidroxitirosol -4-β-glucósido	Hyd-4-Glu	316,31	

Tab. 3 Hyd, ésteres de Hyd y derivados glucosilados de Hyd sintetizados.

Para llevar a cabo el estudio de estabilidad de estos compuestos se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa con detector de diodos (Tab. 4) durante el almacenamiento a 4°C.

Los distintos derivados acilados muestran espectros de absorción similares, con máximos de absorción semejantes al Hyd. Los resultados relacionados con la estabilidad indicaron que los derivados acilados de Hyd son estables tanto en estado puro como en disolución (EtOH) durante un período mínimo de un año.

Los derivados glucosilados muestran una menor estabilidad en disolución etanólica que los derivados acilados. El análisis por cromatografía líquida demuestra que ambos compuestos habían sufrido hidrólisis después de 6 meses de almacenamiento, obteniéndose en el cromatograma el pico correspondiente al **Hyd** junto con el pico correspondiente al compuesto glucosilado.

Fenol	Tiempo de retención (min)	λ (nm)
Hyd	2,407	279,2
Hyd-Ac	13,747	280,0
Hyd-C4	24,496	281,6
Hyd-C8	23,669	281,6
Hyd-C12	17,398	281,4
Hyd-1-Glu	1,7785	279,2
Hyd-3-Glu+Hyd 4-Glu	2,1280	276,9

Tab. 4 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV de **Hyd**, ésteres de **Hyd** y derivados glucosilados de **Hyd**.

Todos los derivados de **Hyd** presentaron un espectro de absorción similar al **Hyd** con un máximo alrededor de 280 nm.

5.1.2. Coeficiente de partición: $\log P$.

Los coeficientes de reparto, $\log P$, de **Hyd** y sus derivados se representan en la Tab. 5.

Fenol	$\log P$
Hyd	-0,08 \pm 0,09
Hyd-Ac	0,78 \pm 0,21
Hyd-C4	2,03 \pm 0,44
Hyd-C8	3,93*
Hyd-C12	5,60*
Hyd-1-Glu	-0,78*
Hyd-3-Glu+Hyd 4-Glu	-0,88*

Tab. 5 Coeficientes de partición expresados como $\log P$ para **Hyd**, ésteres de **Hyd** y derivados glucosilados de **Hyd**. Para los compuestos señalados con (*), el $\log P$ se calculó usando la fragmentación de Crippen incluida en el Software ChemBrioDraw Ultra 11.0 (Ghose & Crippen, 1987) (media \pm sd).

Los valores obtenidos muestran una dependencia aproximadamente lineal del coeficiente de partición con la longitud de la cadena en los derivados acilados y, en consecuencia, su lipofilia. Los resultados obtenidos para los derivados glucosilados muestran que, la introducción de un resto de glucosa produce como resultado un incremento en la polaridad y, en consecuencia, valores más negativos para $\log P$ con respecto al **Hyd**. Los resultados obtenidos concuerdan con las modificaciones introducidas en la molécula original.

5.1.3. Capacidad antirradicalaria: ensayos DPPH y TEAC (ABTS⁺).

La capacidad antirradicalaria de los distintos compuestos se evaluó por dos metodologías diferentes: el ensayo DPPH y el ensayo TEAC. Estos resultados se muestran en la **Tab. 6**.

Fenol	DPPH EC ₅₀ (mM)	TEAC
Hyd	0,7198 ± 0,0003	0,3171 ± 0,0175
Hyd-Ac	0,5709 ± 0,0177	0,2195 ± 0,0052
Hyd-C4	0,5899 ± 0,0335	0,2558 ± 0,0126
Hyd-C8	0,6861 ± 0,0335	0,3017 ± 0,0039
Hyd-C12	0,9216 ± 0,0411	0,4848 ± 0,0018
Hyd-1-Glu	0,6606 ± 0,0165	0,4550 ± 0,0106
Hyd-3-Glu+Hyd 4-Glu	12,7074 ± 0,5035	0,6729 ± 0,0122

Tab. 6 Capacidad de captación de radicales de Hyd y derivados (media ± sd).

Tal y como se ha indicado previamente, en el ensayo DPPH se determina la concentración de compuesto que es capaz de captar el 50% del radical DPPH. En consecuencia, las concentraciones más bajas corresponderán a los compuestos con mayor poder de captación de radical.

En base a esto, los ésteres de hidroxitirosol de cadena corta, **Hyd-Ac** e **Hyd-C4** mostraron una capacidad de captación del radical DPPH superior al **Hyd**. **Hyd-C8** mostró valores similares al **Hyd** y el **Hyd-C12** mostró el poder de captación menor de la serie.

Hyd-1-Glu mostró una capacidad de captación de radical DPPH similar al **Hyd**, mientras que el otro derivado glucosilado, constituido por la mezcla de regioisómeros (**Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu**), mostró una disminución significativa de dicha capacidad.

En el ensayo TEAC, en el que se mide el poder de captación del radical catiónico ABTS⁺, los resultados fueron similares como puede apreciarse en los valores recogidos en la **Tab. 6**.

5.1.4. Capacidad reductora: FRAP.

El poder reductor de los distintos compuestos se evaluó mediante el método FRAP, que estima la capacidad reductora basándose en la habilidad del compuesto para reducir el hierro férrico a ferroso.

En la **Fig. 21** se muestra el poder reductor por mol del **Hyd** y de sus derivados. En base a los resultados obtenidos se observa que **Hyd-3-Glu + Hyd-4-Glu**, **Hyd-C12** e **Hyd-C8** fueron los compuestos menos efectivos para reducir el hierro férrico. Por otro lado, el **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-1-Glu** presentaron el mayor poder reductor e **Hyd-C4** presentó un poder reductor intermedio

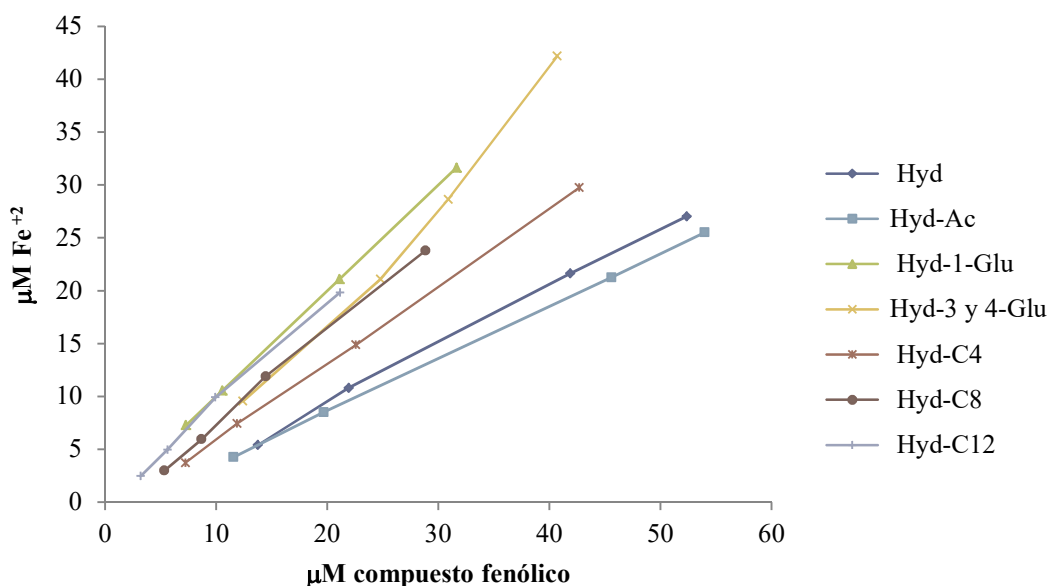


Fig. 21 Capacidad reductora por mol de Fe^{+2} de **Hyd**, ésteres de **Hyd** y derivados glucosilados de **Hyd**.

Una información importante que puede extraerse de los datos de la capacidad reductora es el número de moles de hierro férrico reducidos por mol de compuesto. Para ello, se expresó la capacidad reductora de los compuestos fenólicos en función de la concentración molar, y las gráficas se ajustaron a la ecuación de una recta ($R^2 > 0,9888$). La pendiente de las ecuaciones lineales indica el número de moles de hierro férrico reducidos por un mol de compuesto reductor.

Los compuestos **Hyd-Ac** e **Hyd-1-Glu** fueron capaces de ceder el mayor número de moles de electrones alcanzando los valores de 2,0058 y 2,2125, respectivamente. El **Hyd** fue capaz de ceder 1,7984 moles mientras que **Hyd-C4** e **Hyd-C8** donaron 1,3692 y 1,1279. **Hyd-C12** y la mezcla de isómeros glucosilados, **Hyd-3-Glu** e **Hyd-4-Glu**, presentaron la menor capacidad para ceder electrones siendo 1,1279 y 0,8604 los moles de electrones cedidos por cada uno de estos compuestos.

Estos resultados concuerdan con los observados en los ensayos de captación de radicales. La presencia del acetato y del residuo de glucosa en el grupo hidroxilo primario mejora ligeramente el poder reductor que presenta la molécula de **Hyd** original. De nuevo, el derivado con la cadena más larga mostró un bajo poder reductor y, la mezcla de isómeros que presentan el residuo de glucosa en cada uno de los grupos hidroxilo del anillo aromático presentó el menor poder reductor de todos los compuestos estudiados.

5.1.5. Actividad de los compuestos derivados de Hyd en sistemas basados en aceite de pescado.

5.1.5.1. Caracterización del aceite.

En la **Tab. 7** se muestra el contenido en ácidos grasos mayoritarios en el aceite de hígado de bacalao empleado y su concentración relativa, expresada en porcentaje.

AG	% AG
14:0	4,94 ± 0,01
16:0	11,38 ± 0,08
16:1 ω 7	7,48 ± 0,12
18:0	2,44 ± 0,01
18:1 ω 9c	16,46 ± 0,05
18:1 ω 7c	4,64 ± 0,03
18:2 ω 6c	1,59 ± 0,04
18:3 ω 3	0,86 ± 0,01
20:1 ω 11	2,26 ± 0,04
20:1 ω 9	11,04 ± 0,04
18:4 ω 3	2,56 ± 0,01
20:4 ω 6	0,54 ± 0,01
22:1 ω 11	9,04 ± 0,05
22:1 ω 9	0,88 ± 0,00
20:4 ω 3	0,80 ± 0,01
20:5 ω 3	8,23 ± 0,04
24:1 ω 9	0,48 ± 0,02
22:5 ω 3	1,51 ± 0,00
22:6 ω 3	12,88 ± 0,11

Tab. 7 Contenido en ácidos grasos en el aceite de hígado de bacalao (media ± sd).

5.1.5.2. Estudio de la inhibición de los derivados acilados de Hyd en aceites de pescado.

Los estudios se iniciaron testando la eficacia del compuesto derivado más sencillo, el acetato de hidroxitirosol: **Hyd-Ac** que en los estudios de capacidad antioxidante in vitro demostró una capacidad similar al **Hyd**. Para comprobar si esta situación se repetía en un sistema real basado en aceite de pescado activado térmicamente, se diseñó un experimento estudiando el efecto de estos compuestos en un sistema de aceite de pescado térmicamente a 40 °C y en una concentración de 0,65 mM. El estudio se extendió durante 7 días.

La **Fig. 22 (A y B)** muestra la oxidación de los aceites de pescado. Las muestras control, que no contenían ningún compuesto polifenólico, experimentaron un importante incremento

en el contenido de hidroperóxidos con dienos conjugados a partir del día 4 de almacenamiento a 40 °C (**Fig. 22A**). Los hidroperóxidos con trienos conjugados presentaron una cinética más lenta, experimentando el incremento en su contenido en el día 4 (**Fig. 22B**).

Los hidroperóxidos conjugados mostraron la cinética clásica de los productos de oxidación lipídica, al presentar durante los primeros estadios del experimento, un desarrollo lento de la oxidación caracterizado por unos niveles de hidroperóxidos sin apenas variación o periodo de inducción, pero llegado a un punto, el contenido aumentó exponencialmente con el tiempo. Esta fase de inducción de 2 días fue seguida de una fase de propagación con el consiguiente desarrollo de la oxidación lipídica.

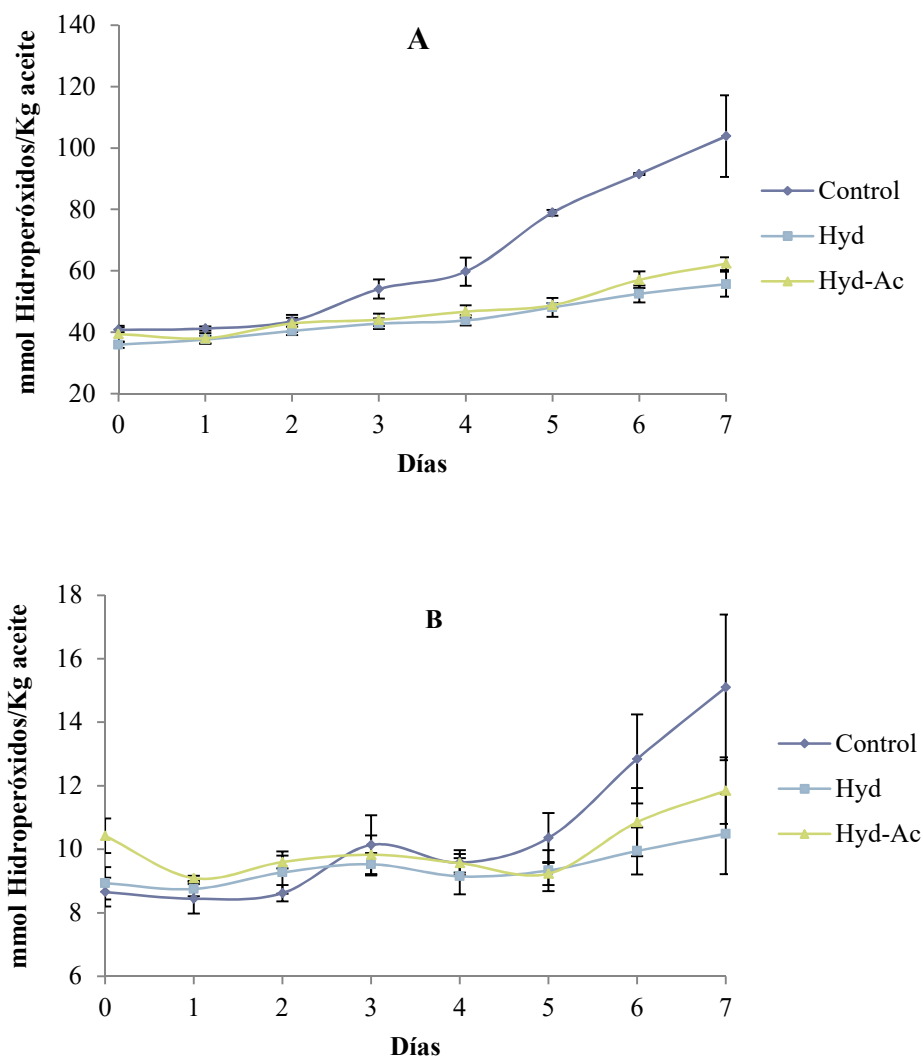


Fig. 22 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con 0,65 mM ppm de Hyd e Hyd-Ac, durante su almacenamiento a 40 °C.

Tanto **Hyd** como su derivado acilado, **Hyd-Ac**, mostraron una importante efectividad antioxidante en la formación de productos derivados de la oxidación lipídica. En ambos casos, sus períodos de inducción se prolongaron a lo largo de todo el experimento. La **Tab. 8** recoge los porcentajes de inhibición de ambos compuestos en la fase de propagación de las muestras control. Ambos muestran una inhibición significativa de la formación de hidroperóxidos conjugados.

Fenol	% I (día 6)	
	Dienos conjugados	Trienos conjugados
Hyd	74,38 ± 5,22	69,15 ± 17,71
Hyd-Ac	65,67 ± 5,16	47,49 ± 25,73

Tab. 8 Inhibición en la formación de hidroperóxidos de dienos y trienos conjugados durante la oxidación de aceite de pescado a 40 °C suplementados con 100 ppm de compuesto fenólico (media ± sd).

Los resultados obtenidos coincidieron con los resultados sensoriales. El análisis sensorial mostró que las muestras control no suplementadas desarrollaron rancidez en el día 4 de almacenamiento. Las muestras suplementadas con **Hyd** e **Hyd-Ac** no desarrollaron rancidez a lo largo de todo el experimento. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos previamente en aceite de oliva (Gordon, et al., 2001).

A continuación se llevó a cabo un estudio destinado a seleccionar la concentración óptima del **Hyd-Ac** para desarrollar los estudios de oxidación con los ésteres de hidroxitirosol. Para ello, se estudió la influencia de la adición de diferentes concentraciones comprendidas en un rango de 10 a 200 ppm en la inhibición de la oxidación de aceite de pescado almacenado a 40°C durante 9 días.

El estudio previo sensorial mostró que las muestras control desarrollaron la rancidez en el día 5 del estudio, mientras que las muestras suplementadas con 10 y 25 ppm de **Hyd-Ac** retrasaron un día la aparición de dicha rancidez. Las muestras con un contenido de 50 ppm, mostraron un período de inducción superior, retrasando la aparición de rancidez dos días. Para las muestras tratadas con 100, 150 y 200 ppm no se detectó el desarrollo de rancidez a lo largo de todo el experimento. Estos resultados están en concordancia con el análisis de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 23 A y B**).

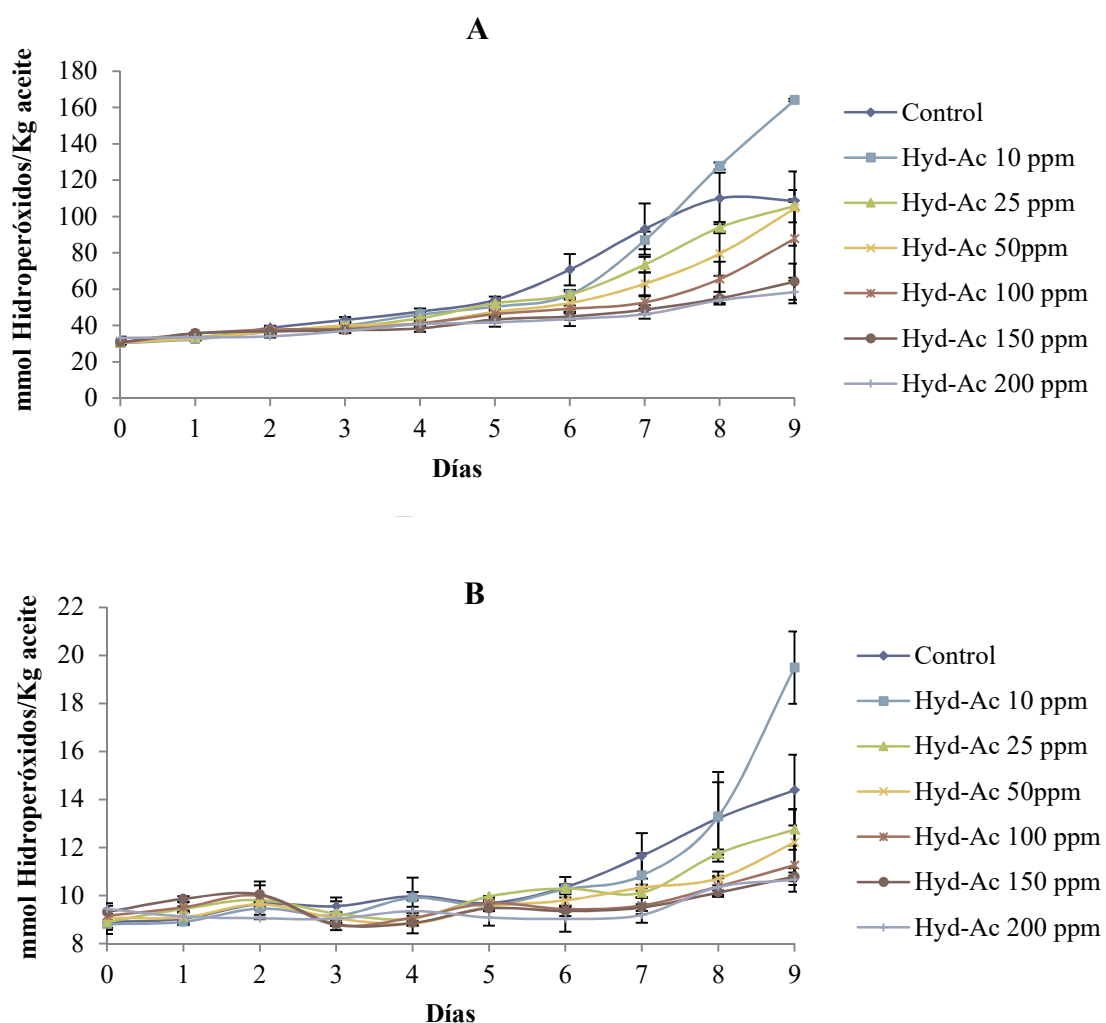


Fig. 23 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con distintas concentraciones de Hyd-Ac (10-200 ppm), durante su almacenamiento a 40 °C.

La formación de dienos y trienos conjugados indicó que el desarrollo de la oxidación en las muestras control experimentó un incremento significativo de la formación de hidroperóxidos entre el día 5 y 6 de incubación (**Fig. 23A**). Para las muestras suplementadas con 10 y 25 ppm de Hyd-Ac, este incremento se retrasó 1 día y para las muestras suplementadas con 50 ppm, se retrasó 2 días. Los demás sistemas mostraron un ligero incremento a partir del día 9.

Se obtuvieron resultados similares para la formación de los hidroperóxidos con trienos conjugados (**Fig. 23B**).

En la **Tab. 9** se muestran los porcentajes de inhibición de las distintas concentraciones calculados en el día 8.

Concentración	% I (día 8)	
	Dienos conjugados	Trienos conjugados
10 ppm	-5,26 ± 13,12	-1,5 ± 3,2
25 ppm	20,23 ± 3,93	34,1 ± 4,26
50 ppm	38,47 ± 15,30	57,9 ± 6,58
100 ppm	56,13 ± 12,08	65,6 ± 9,95
150 ppm	69,50 ± 4,45	71,5 ± 2,17
200 ppm	70,94 ± 1,86	66,3 ± 8,58

Tab. 9 Inhibición en la formación de hidroperóxidos de dienos y trienos conjugados durante la oxidación de aceite de pescado a 40 °C suplementados con distintas concentraciones de **Hyd-Ac** (media ± sd).

Tal y como se había deducido del estudio previo, la concentración de 100 ppm mostró una elevada capacidad de inhibición de la oxidación. Las concentraciones superiores a 100 ppm no mostraron diferencias significativas con respecto a la concentración de 100 ppm. Por lo tanto, para llevar a cabo los experimentos con los derivados acilados y glucosilados, se escogió como concentración de trabajo 100 ppm de **Hyd-Ac** (0,65 mM).

Posteriormente, se evaluó la actividad antioxidante del **Hyd** y de sus derivados acilados en experimentos llevados a 50 °C (temperatura superior a la utilizada en los experimentos preliminares para acelerar la cinética de la reacción) y ensayando una concentración de antioxidantes de 0,65 mM (equivalente a 100 ppm de **Hyd**) durante 7 días. El octil galato (**Gal-C8**), ampliamente empleado en la industria alimentaria para inhibir la oxidación lipídica, se incluyó como control antioxidante.

El desarrollo de la rancidez se detectó primeramente en los controles en el día 4 de incubación, conjuntamente con las muestras suplementadas con **Hyd-C12** e **Hyd-C8**. Finalmente, una rancidez incipiente se desarrolló en el día 5 para las muestras tratadas con **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-C4**.

Estos resultados están corroborados por la determinación química de los hidroperóxidos con dienos conjugados (**Figura 24A**).

De acuerdo con la formación de dienos conjugados el período de inducción para las muestras control y para las muestras suplementadas con **Hyd-C8** e **Hyd-C12** fue de 2 días. Los períodos de inducción correspondientes a las muestras con **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-C4** fueron de 3 días.

La formación de trienos conjugados transcurrió a una velocidad más lenta (**Fig. 24B**) y sólo al final del experimento se observó un incremento moderado en el contenido de trienos conjugados para las muestras control y aquellas suplementadas con **Hyc-C4**, **Hyd-C8** e **Hyd-C12**. Las muestras tratadas con **Hyd**, **Hyd-Ac** y **Gal-C8** mantuvieron niveles menores de trienos conjugados que las muestras control.

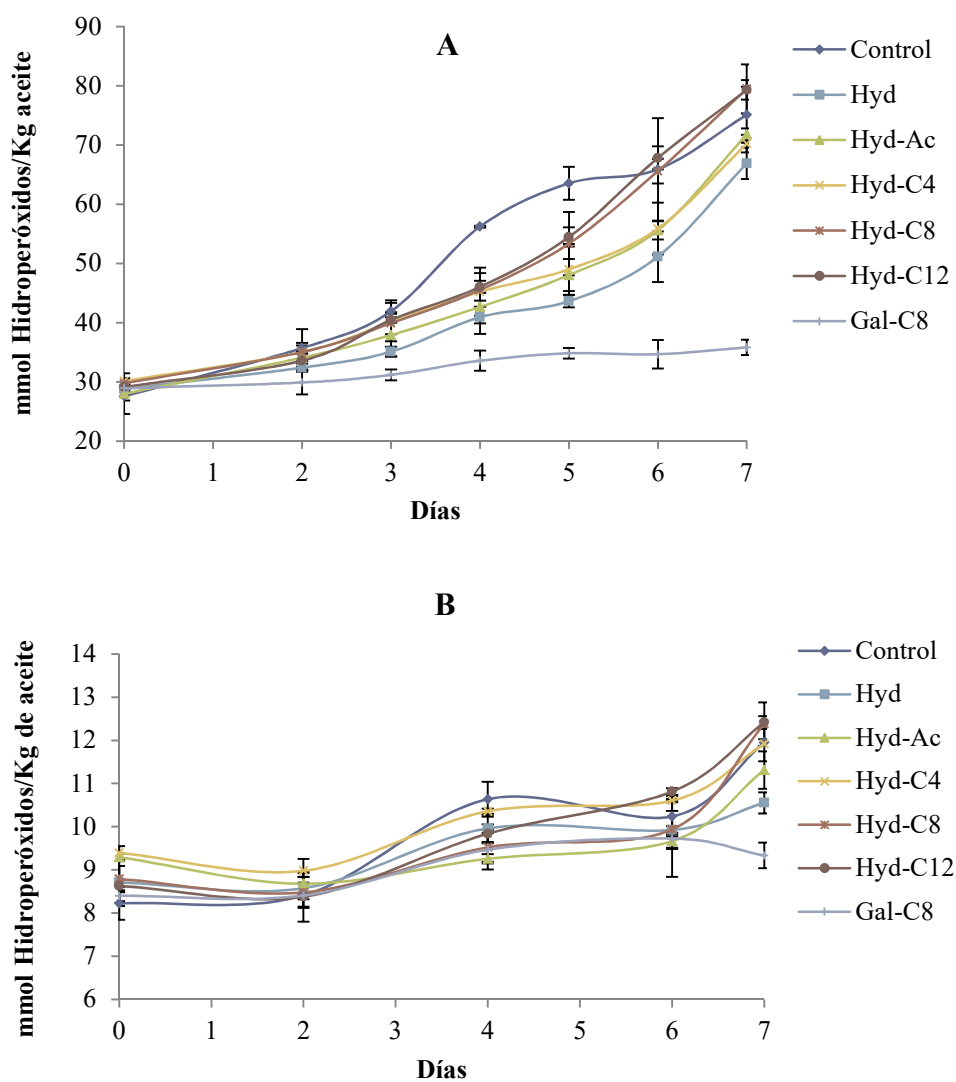


Fig. 24 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con Hyd y sus derivados acilados (0,65 mM), durante su almacenamiento a 50 °C.

Los porcentajes de inhibición Hyd y sus derivados acilados en la formación de dienos conjugados se evaluaron en los días 6 y 7 del estudio, mientras que la inhibición en la formación de trienos conjugados se determinó en el día 7 (Tab. 10).

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conconjugados
	% I (día 5)	% I (día 6)	% I (día 7)
Hyd	55,35 ± 2,92	38,45 ± 11,15	60,32 ± 5,48
Hyd-Ac	43,09 ± 7,52	26,81 ± 4,02	37,26 ± 4,87
Hyd-C4	40,38 ± 11,96	26,11 ± 11,46	30,09 ± 7,33
Hyd-C8	28,30 ± 14,90	0,77 ± 5,39	0,23 ± 4,75
Hyd-C12	25,24 ± 4,51	-5,06 ± 5,12	-6,11 ± 8,49
Gal-C8	79,80 ± 2,44	81,47 ± 6,33	72,93 ± 3,62

Tab. 10 Inhibición de **Hyd** y diversos derivados acilados de **Hyd** en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en aceite de pescado a 50 °C en una concentración de 0,65 mM (media ± sd).

De acuerdo con los resultados expuestos, **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-C4** mostraron elevada capacidad de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. Por el contrario, **Hyd-C8** e **Hyd-C12** mostraron un bajo poder de inhibición en la formación de dienos y trienos conjugados.

5.1.5.3. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de **Hyd** en aceites de pescado.

De acuerdo con las condiciones experimentales fijadas en el estudio de los derivados acilados, la actividad antioxidante de los derivados glucosilados (**Hyd**, **Hyd-1-Glu** y la mezcla de isómeros, **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu**) se llevó a cabo en muestras de aceites de pescado almacenadas a 50 °C y que fueron suplementadas con 0,61 mM de los compuestos objeto de estudio durante 5 días.

Los resultados obtenidos para los derivados glucosilados de **Hyd**, **Hyd-1-Glu** y la mezcla de isómeros, **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu** se muestran en la Fig. 25. Para comparar la efectividad antioxidante del **Hyd** glucosilado, se empleó el **Hyd-Ac**, el derivado más efectivo.

El análisis sensorial mostró un desarrollo de la rancidez para los controles y para la muestra suplementada con la mezcla de regioisómeros en el día 1. Por otro lado, las muestras que contenían **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-1-Glu** no desarrollaron rancidez a lo largo de todo el estudio.

Estos resultados fueron corroborados con el análisis de formación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (Fig. 25A y 25B, respectivamente). Los valores obtenidos mostraron que **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-1-Glu** fueron capaces de inhibir de una manera altamente eficaz la formación de estos compuestos de oxidación, mientras que la capacidad antioxidante de la mezcla de regioisómeros glucosilados fue inapreciable. El período de inducción para el control e **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu** fue de 1 día para la formación de los hidroperóxidos con dienos conjugados y retrasó hasta el día 2 la formación de los hidroperóxidos con trienos conjugados.

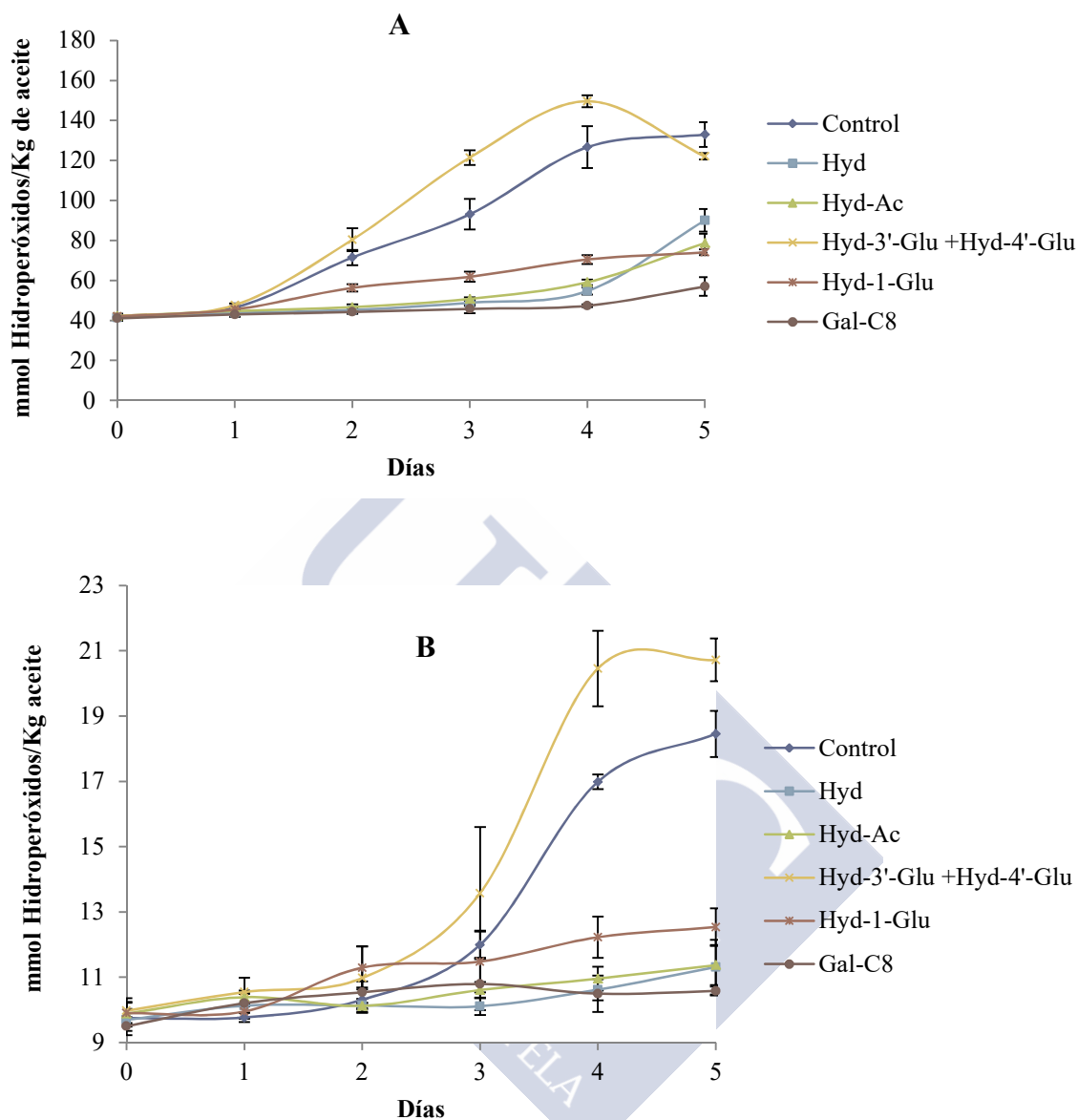


Fig. 25 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con Hyd y sus derivados glucosilados e Hyd-Ac (0,61 mM), durante su almacenamiento a 50 °C.

Los porcentajes de inhibición para hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en los días 4 y 5 del estudio, se representan en la **Tab. 11**.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 4)	% I (día 5)	% I (día 4)	% I (día 5)
Hyd	85,39 ± 3,12	50,26 ± 7,01	86,81 ± 4,67	76,52 ± 7,11
Hyd-Ac	81,48 ± 1,02	72,50 ± 3,61	84,71 ± 5,67	87,81 ± 9,85
Hyd-1-Glu	68,74 ± 2,16	67,68 ± 0,66	68,81 ± 8,98	88,59 ± 2,23
Hyd-3-Glu+	-18,44 ± 4,24	-3,67 ± 0,72	-48,13 ± 13,01	-12,43 ± 4,37
Hyd-4-Glu				
Gal-C8	93,04 ± 2,16	83,88 ± 3,45	88,60 ± 2,23	88,60 ± 2,23

Tab. 11 Inhibición de Hyd y derivados glucosilados en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en aceite de pescado a 50 °C en una concentración de 0,61 mM (media ± sd).

Hyd-1-Glu mostró un elevado poder de inhibición de la formación de productos de oxidación, pero inferior al observado para el **Hyd** y su derivado acilado. El derivado glucosilado constituido por la mezcla de isómeros presentó una cierta actividad prooxidante dando lugar a una cinética en la oxidación más rápida que las muestras control no suplementadas con los compuestos fenólicos.

5.1.6. Actividad de los compuestos derivados de Hyd en sistemas basados en emulsiones de aceite de pescado.

Para llevar a cabo los distintos estudios en el sistema emulsión de aceite de pescado se procedió de la misma manera que se ha expuesto anteriormente para el sistema de aceite de pescado. Se llevó a cabo un experimento previo estudiando el efecto de **Hyd** e **Hyd-Ac** en un sistema de emulsión de aceite de pescado (1% de aceite, 10% de lecitina) activado térmicamente a 35 °C y en una concentración de 0,65mM. La extensión de la oxidación se estudió durante 7 días.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial mostraron que las muestras control empezaron a desarrollar rancidez a partir del día 4, mientras que las suplementadas con **Hyd** e **Hyd-Ac** no desarrollaron rancidez a lo largo de todo el experimento. Estos resultados están en concordancia con los datos correspondientes al análisis de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y la formación de compuestos fluorescentes (Fig. 26 A, B y C).

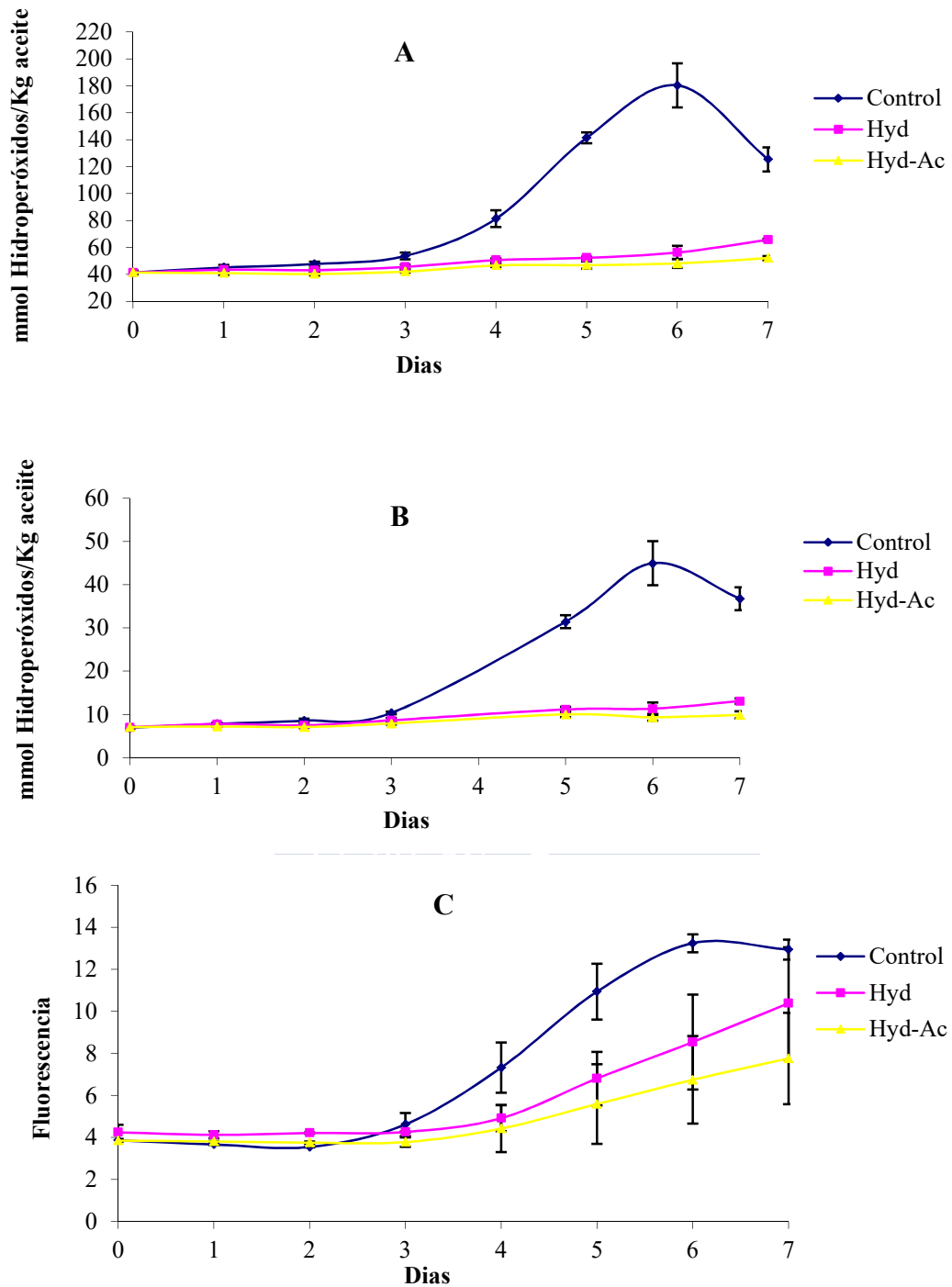


Fig. 26 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, y formación de compuestos fluorescentes (C) en emulsión de aceite de pescado tratado con Hyd e Hyd-Ac (0,65 mM), durante su almacenamiento a 35 °C.

El período de inducción para las muestras control sin aditivos fue de 3 días. En las muestras suplementadas, el período de inducción relativo a la formación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados se extendió durante todo el experimento. Los resultados correspondientes a la formación de compuestos fluorescentes mostraron un incremento de los mismos a partir del día 4, siendo este incremento ligeramente superior para el **Hyd** con respecto al **Hyd-Ac**.

Los datos correspondientes al porcentaje de inhibición calculados para el día 6 se representan en la **Tab. 12**.

Fenol	% I (día 6)		
	Dienos conjugados	Trienos conjugados	Compuestos fluorescentes
Hyd	89,35 ± 3,58	88,32 ± 3,67	63,49 ± 14,65
Hyd-Ac	95,22 ± 2,31	93,53 ± 2,02	81,72 ± 4,67

Tab. 12 Inhibición de **Hyd** e **Hyd-Ac** en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y la formación de compuestos fluorescentes en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 1% lecitina) almacenada a 35 °C (media ± sd).

Como puede apreciarse, tanto **Hyd** como su derivado acilado fueron capaces de inhibir la formación de los productos de oxidación siendo, la eficacia de la inhibición, ligeramente superior para el **Hyd-Ac**.

Para seleccionar la concentración óptima de los ésteres de **Hyd** se llevó a cabo un estudio a distintas concentraciones de **Hyd-Ac**. Las concentraciones testadas fueron, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 ppm y los experimentos se realizaron en las mismas condiciones anteriormente descritas. El estudio del desarrollo de la oxidación se llevó a cabo durante 10 días.

El análisis sensorial mostró que las muestras control y las suplementadas con 10 ppm de **Hyd-Ac** desarrollaron rancidez en los días 8 y 7 de análisis. Las muestras que contenían 25 y 50 ppm del fenol retardaron la aparición de rancidez hasta el día nueve y las muestras tratadas con las concentraciones superiores a 50 ppm inhibieron completamente el desarrollo de la rancidez.

Los datos obtenidos en el análisis de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 27**) corroboran los resultados observados en el análisis sensorial. Las muestras suplementadas con 10 ppm de fenol mostraron un período de inducción de 6 días, mientras que para las muestras control y aquellas suplementadas con 25 ppm, el período de inducción fue de 8 días. Las muestras tratadas con 50 ppm tuvieron un período de inducción de 9 días, y en las muestras tratadas con las concentraciones comprendidas entre 100 y 200 ppm no se produjo un incremento significativo en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados durante todo el experimento de oxidación.

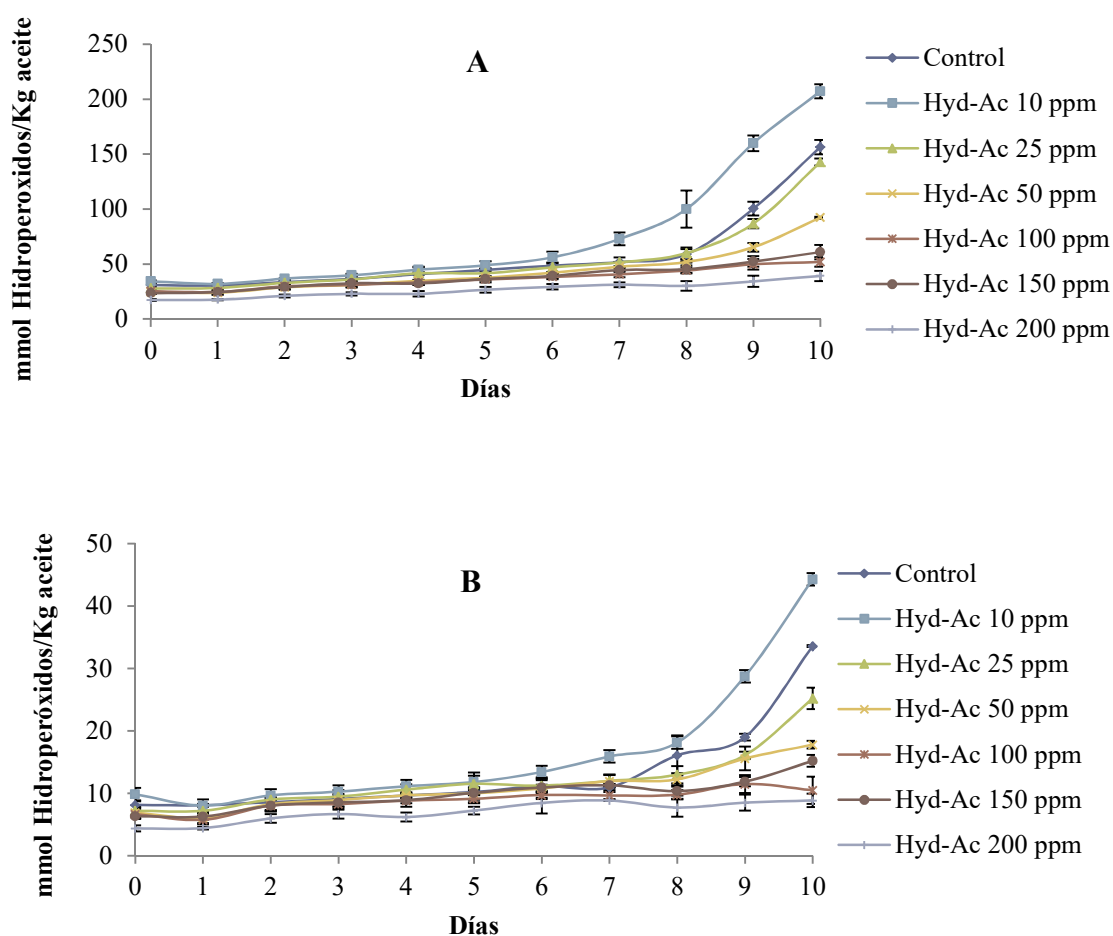


Fig. 27 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en emulsión de aceite de pescado tratado con distintas concentraciones de Hyd-Ac (10-200 ppm), durante su almacenamiento a 35 °C.

Los porcentajes de inhibición en el día 10 para la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados se muestran en la Tab. 13.

Concentración	% I (día 10)	
	Dienos conjugados	Trienos conjugados
10 ppm	-8,01 ± 32,09	-27,02 ± 4,03
25 ppm	19,72 ± 2,35	46,43 ± 5,36
50 ppm	56,72 ± 1,36	69,71 ± 1,97
100 ppm	84,91 ± 3,19	92,62 ± 6,82
150 ppm	78,52 ± 4,62	77,89 ± 2,99
200 ppm	94,05 ± 3,41	93,32 ± 8,05

Tab. 13 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Hyd-Ac (10, 25, 50, 100, 150, 200 ppm) en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 1% lecitina) almacenada a 35 °C (media ± sd).

De manera similar al caso del aceite de pescado, concentraciones superiores a 100 ppm de **Hyd-Ac** no suponen un incremento significativo en la inhibición de los productos de oxidación lipídica. En consecuencia, se eligió esta concentración para llevar a cabo los ensayos con los derivados acilados y glucosilados de **Hyd**.

5.1.6.1. Estudio de la inhibición de los derivados acilados de **Hyd**.

Los estudios de oxidación de los derivados acilados en emulsiones se llevaron a cabo a una temperatura superior para acelerar la cinética de la reacción (50 °C). Las muestras fueron suplementadas con 0,65 mM de cada uno de los compuestos objeto de estudio. Las muestras control no contenían ningún aditivo. De nuevo, se incluyó el **Gal-C8** como control de inhibición total. La extensión de la oxidación se evaluó durante 7 días.

Las muestras control y aquellas que contenían **Hyd** mostraron rancidez en el día 5. **Hyd-Ac** e **Hyd-C4** mostraron una rancidez incipiente en el día 7. Las muestras suplementadas con **Hyd-C8** e **Hyd-C12**, inhibieron el desarrollo de la rancidez a lo largo de todo el experimento. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en la determinación química de los hidroperóxidos conjugados con dienos y trienos conjugados, así como, el análisis de la formación de compuestos fluorescentes (**Fig. 28**).

Los periodos de inducción para las muestras control y aquellas suplementadas con **Hyd** presentaron un valor de 4 días. Las muestras que contenían como aditivos los derivados acilados de **Hyd** mostraron elevada eficacia en inhibición de la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados (**Fig. 28A**) y trienos conjugados (**Fig. 28B**).

La formación de compuestos fluorescentes (**Fig. 28C**), corroboró los resultados obtenidos en el análisis sensorial y en la formación de hidroperóxidos conjugados. En este caso y de acuerdo con su formación en un estado más tardío de la oxidación, los periodos de inducción tanto para las muestras control como las suplementadas con **Hyd** se retrasaron un día.

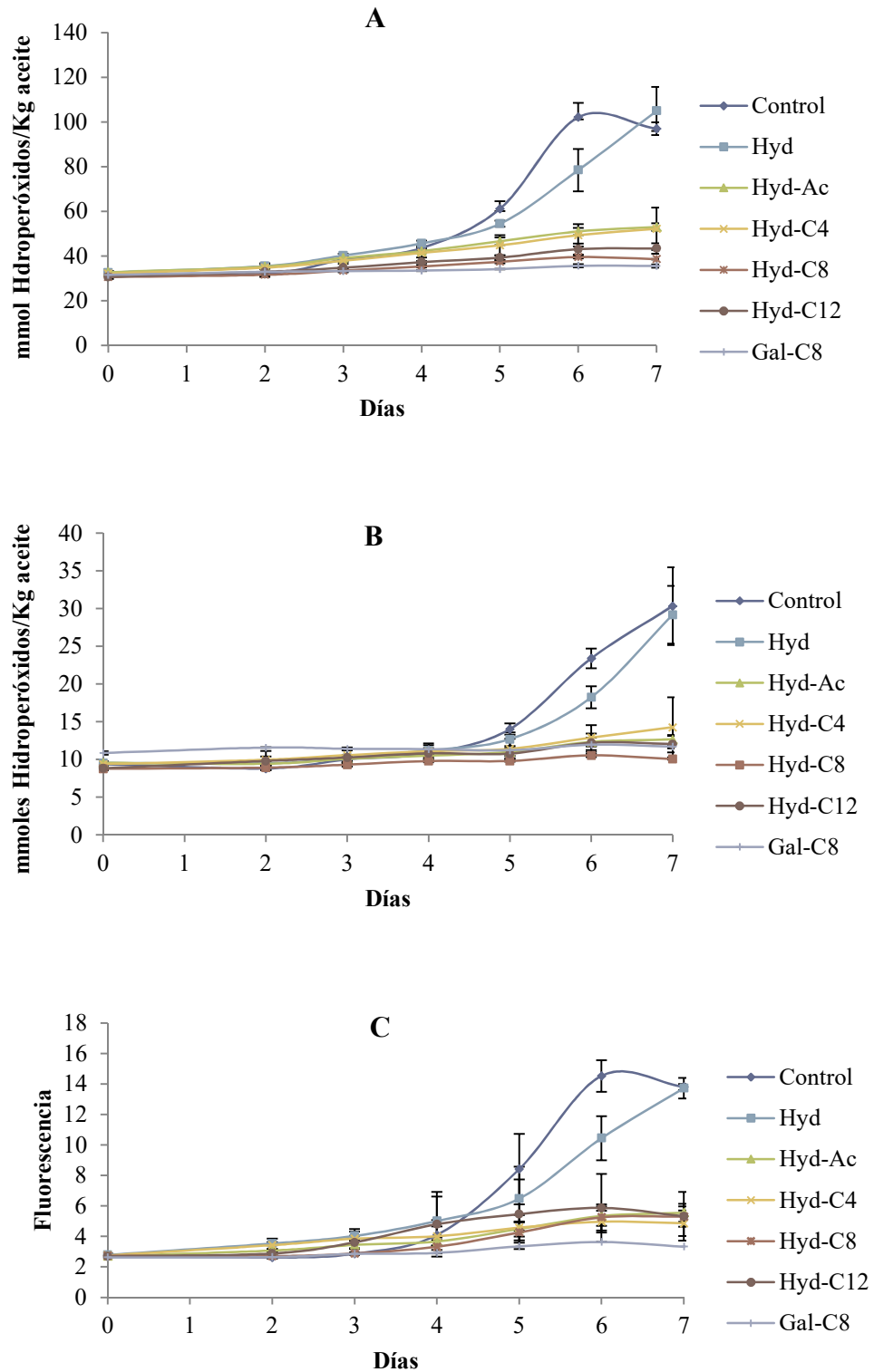


Fig. 28 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, y de compuestos fluorescentes (C) en emulsión de aceite de pescado suplementada con ésteres de Hyd (0,65 mM) almacenadas a 50 °C.

Los porcentajes de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y la formación de compuestos fluorescentes calculados para los días 6 y 7 se muestran en la **Tab. 14** y **Tab. 15** respectivamente.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 6)	% I (día7)	% I (día 6)	% I (día 7)
Hyd	33,80±13,56	-4,64 ± 21,78	36,79 ± 3,85	5,46 ± 18,20
Hyd-Ac	72,99 ± 2,31	73,21 ± 2,16	78,88 ± 3,85	84,34 ± 2,86
Hyd-C4	75,38± 7,14	74,23 ± 12,12	74,88 ± 11,87	76,67 ± 18,92
Hyd-C8	89,36± 0,88	91,66 ± 2,99	91,71 ±1,53	96,75 ± 0,45
Hyd-C12	84,30 ± 3,54	85,51 ± 2,99	79,71 ± 8,58	87,28 ± 5,18
Gal-C8	95,00 ± 1,03	95,55 ± 0,91	81,58 ± 1,50	88,67 ± 1,18

Tab. 14 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite suplementada con Hyd y distintos ésteres de Hyd (0,65 mM) en emulsión de aceite almacenada a 50 °C (media ± sd).

Fenol	Compuestos fluorescentes	
	% I (día 6)	% I (día7)
Hyd	34,99 ± 12,78	0,93 ± 6,27
Hyd-Ac	77,63 ± 5,82	74,21 ± 5,90
Hyd-C4	81,21 ± 6,60	80,93 ± 8,24
Hyd-C8	78,65 ± 6,64	76,77 ± 5,40
Hyd-C12	72,97 ± 18,77	76,23 ± 14,29
Gal-C8	91,41 ± 0,79	93,58 ± 0,78

Tab. 15 Inhibición en la formación de compuestos fluorescentes en emulsión de aceite suplementada con Hyd y distintos ésteres de Hyd (0,65 mM) en emulsión de aceite almacenada a 50 °C (media ± sd).

Hyd mostró un porcentaje de inhibición moderado tanto para la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados como en la formación de compuestos fluorescentes. Por otro lado, todos los derivados de **Hyd** mostraron un alto poder de inhibición comparable al del **Gal-C8** empleado como control en la inhibición.

5.1.6.2. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de Hyd

Los estudios realizados para comprobar la influencia de un residuo de glucosa en cada uno de los grupos hidroxilo del **Hyd** se llevaron a cabo en las mismas condiciones que las empleadas para los derivados acilados. Las muestras se suplementaron con 0,65 mM de compuesto fenólico y la extensión de la oxidación se estudió a lo largo de 5 días almacenadas a 50 °C. De nuevo se empleó el **Gal-C8** como control de inhibición, así como el **Hyd-Ac**.

Las muestras control y las suplementadas con los derivados glucosilados desarrollaron rancidez en el día 1. Las muestras tratadas con **Hyd** retrasaron la aparición de rancidez hasta el día 2 y, tal y como se había obtenido previamente, las muestras a las que se les había adicionado **Hyd-Ac** y **Gal-C8** no desarrollaron rancidez en todo el experimento.

Los análisis químicos efectuados corroboran lo observado en el análisis sensorial. En la **Figura 29** se representan las cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (**Fig. 29A**) y trienos conjugados (**Fig. 29B**) y la formación de compuestos fluorescentes (**Fig. 29C**). El período de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados fue de 1 día para las muestras control y las suplementadas con el derivado glucosilado constituido por una mezcla de isómeros, **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu**, y de 1,25 días para el **Hyd-1-Glu**. Las muestras que contenían **Hyd** tuvieron un período de inducción de 2,5 días y las muestras tratadas con **Hyd-Ac** y **Gal-C8**, inhibieron totalmente la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados.

La formación de hidroperóxidos con trienos conjugados mostró unas cinéticas más lentas, siendo los períodos de inducción de 2 días para las muestras control y las suplementadas con los derivados glucosilados, y de 3 días para el **Hyd**. De nuevo, las muestras tratadas con **Hyd-Ac** y **Gal-C8** inhibieron totalmente la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados.

La cinética de formación de compuestos fluorescentes mostró resultados similares a los obtenidos para la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados.



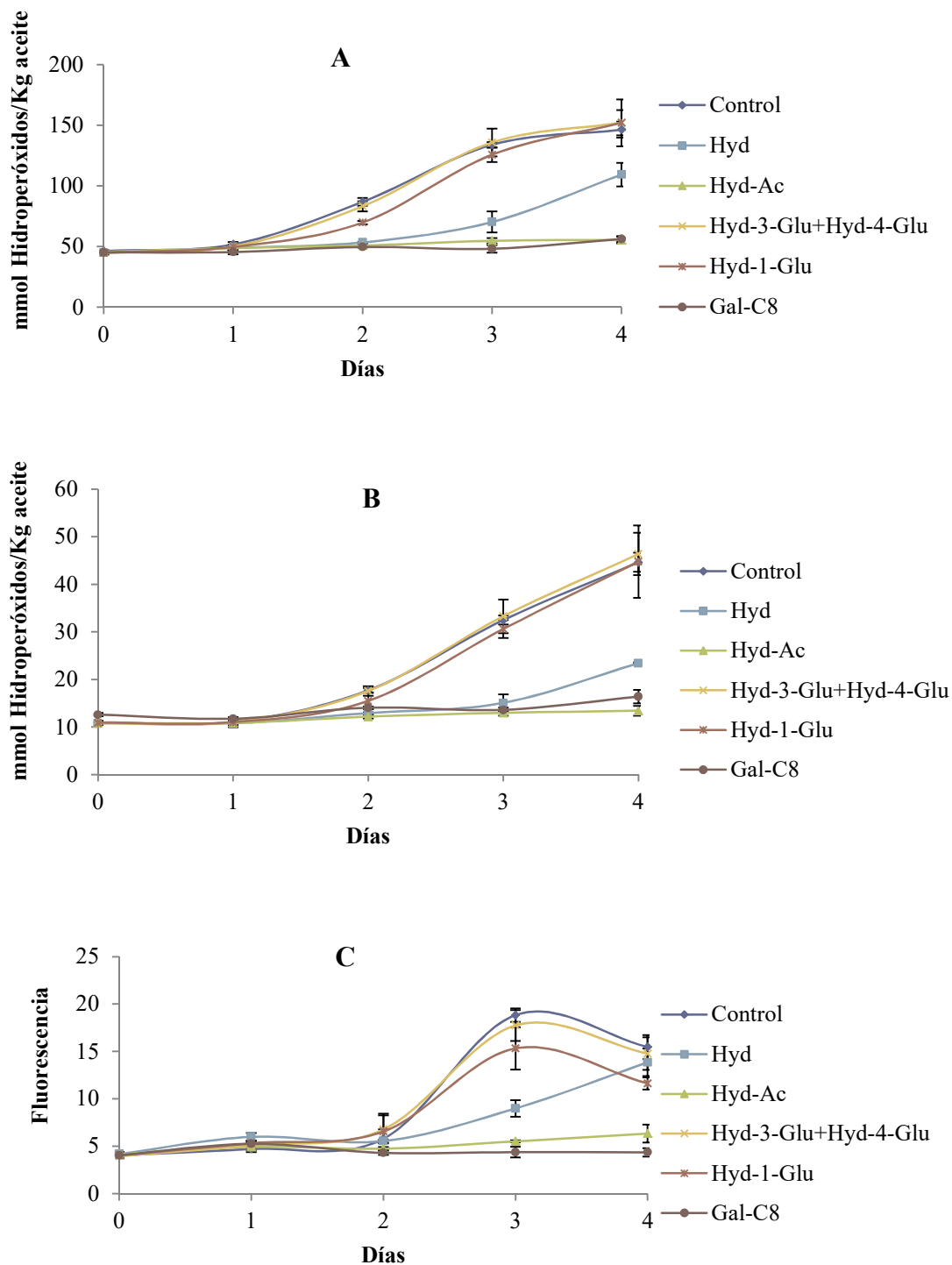


Fig. 29 Cinética de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos conjugados (B) y formación de compuestos fluorescentes de emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Hyd y derivados glucosilados de Hyd (0,65 mM) almacenadas a 50 °C.

Los porcentajes de inhibición calculados en el día 4 se muestran en la **Tab. 16**.

Fenol	% I (día 4)		
	Dienos conjugados	Trienos conjugados	Compuestos fluorescentes
Hyd	42,59 ± 1,05	61,08 ± 0,18	61,82 ± 0,84
Hyd-Ac	89,90 ± 3,20	92,10 ± 2,79	90,18 ± 1,56
Hyd-3-Glu + Hyd-4-Glu	-17,17 ± 1,00	-16,70 ± 5,18	-6,80 ± 5,66
Hyd-1-Glu	-23,05 ± 1,41	-18,57 ± 0,54	8,39 ± 0,75
Gal-C8	89,43 ± 1,71	90,15 ± 3,39	94,88 ± 0,64

Tab. 16 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y compuestos fluorescentes en emulsión de aceite suplementada con **Hyd** y derivados glucosilados de **Hyd** (0,65 mM) almacenada a 50 °C (media ± sd).

Los derivados glucosilados no fueron capaces de inhibir la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. El **Hyd-1-Glu** mostró una ligera capacidad de inhibición en la formación de compuestos fluorescentes.

5.1.7. Discusión de resultados.

Los resultados obtenidos relativos a la capacidad y efectividad de los derivados ensayados in vitro relativos a la captación de radicales (DPPH y TEAC) y de poder reductor del hierro (FRAP), mostraron el siguiente orden de efectividad de mayor a menor:

Hyd-Ac ~ Hyd-C4 > Hyd-1-Glu ~ Hyd-C8 ~ Hyd >> Hyd-C12 >> Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu

Esto es, siendo el **Hyd-Ac** y **Hyd-C4** los compuestos con mejores valores y la mezcla constituida **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu**, la que presentó los valores más reducidos. Este orden coincide con el efecto de los hidroxilos. Está demostrado que en los compuestos fenólicos, el factor que más afecta al poder de captación de radicales es el número de grupos -OH en el anillo fenólico (residuo catecol libre). Ello explicaría que la mezcla de isómeros glucosilados, **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu**, presenten un poder de captación de radical DPPH tan baja ya que la presencia del residuo de glucosa en las posiciones 3 y 4 anula el efecto antioxidante debido al residuo catecol libre.

En el caso de los demás compuestos, que presentan el residuo de catecol libre, Pereira-Caro y col. (Pereira-Caro, et al., 2009) sugieren que para éteres derivados de **Hyd** con sustituyentes alquilo de cadena corta se incrementa la actividad de captación de radicales. Sin embargo, cuando la longitud de cadena es de 7 carbonos o superior, esta capacidad de captación disminuye. Esta observación coincide con el orden observado, puesto que a partir del **Hyd-C8** se produce una disminución en la efectividad. Lu y col. (Lu, Z., et al., 2006) han sugerido la importancia del impedimento estérico que se puede producir debido a la longitud de la cadena en la actividad en liposomas. Otros autores también han sugerido que los enlaces de hidrogeno intra- o intermolecular también podrían enmascarar el efecto antioxidante en los grupos hidroxilo (Gordon, et al., 2001).

Los resultados obtenidos en aceites y emulsiones de aceite en agua concordaron con los resultados observados en los ensayos *in vitro*. Y así, los experimentos de oxidación llevados a cabo en aceites con los diferentes ésteres de **Hyd** mostraron el siguiente orden de actividad en la inhibición de la oxidación lipídica (de mayor a menor).



Pudo observarse claramente una pérdida de la capacidad antioxidante a medida que se incrementó la longitud de la cadena (y, por lo tanto, con el incremento de la lipofilicidad, **Tab. 5 log P**). La presencia de un tercer grupo hidroxilo en la estructura fenólica parece influir positivamente en la capacidad antioxidante del **Gal-C8** frente al **Hyd**. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Gordon y col. (Gordon, et al., 2001). Según estos autores, el **Hyd** presenta una mejor actividad antioxidante que el **Hyd-Ac** tras analizar el valor de peróxidos y el valor de la p-anisidina en aceite de oliva.

El orden de eficacia en la inhibición antioxidante encontrado en aceites se ajusta a la hipótesis general de la “*paradoja polar*” según la cual, los antioxidantes polares son más eficientes en grasa y aceites. Los estudios de Mateos y col. (Mateos, et al., 2003) y Trujillo y col. (Trujillo, et al., 2006) corroboraron las diferencias escasas entre la efectividad antioxidante del **Hyd** y diversos ésteres de **Hyd** de naturaleza más lipofílica en aceite de oliva empleando el método de Rancimat. El Rancimat es un método de medida de estabilidad oxidativa de aceites y grasas en condiciones aceleradas, basado en la inducción de la oxidación de la muestra por exposición a elevadas temperaturas y flujo de aire. De esta manera permite estimar el tiempo de inducción o tiempo de estabilidad oxidativa, siendo este el momento a partir del cual la muestra ha superado el tiempo en el que permanece estable, y siendo por tanto indicativo de una pérdida de calidad y vida útil. Estas ligeras diferencias obtenidas por estos estudios, los valores aportados por Gordon y col. (Gordon, et al., 2001) y las obtenidas en este trabajo, pueden explicarse en base a las diferencias en los experimentos llevados a cabo, así como a los métodos empleados para determinar la extensión de la oxidación. Las condiciones experimentales empleadas por Gordon y col. (Gordon, et al., 2001) y las empleadas en este trabajo con condiciones de activación de la oxidación suaves y la medida de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados ofrece información de los primeros estadios de la oxidación lipídica. Los estudios llevados a cabo por Mateos y col. y los llevados a cabo por Trujillo y col. se realizaron en condiciones más severas y las medidas obtenidas por el método de Rancimat dan información de la oxidación en estadios más avanzados de la oxidación. A la vista de todos estos estudios, puede concluirse que los resultados obtenidos en relación a la capacidad antioxidante del **Hyd** y sus derivados más lipofílicos en aceites de pescado son robustos y no dependen ni de las condiciones experimentales ni de los métodos empleados para medir la inhibición.

Una revisión relativamente reciente sobre la obtención de ésteres de ácidos fenólicos mediante lipofilización enzimática incluyó una discusión de la actividad antioxidante de estos compuestos (Figuerola-Espinoza & Villeneuve, 2005). La capacidad antioxidante del ácido ferúlico se comparó con diversos ésteres de ácido ferúlico, más lipofílicos. Nenadis y col. (Nenadis, et al., 2003) comprobaron que no existían diferencias en la actividad antioxidante del ácido ferúlico y el ferulato de etilo en trioleína. De la misma forma Kikuzaki y col. (Kikuzaki, et al., 2002) obtuvieron períodos de inducción similares para el ácido ferúlico y sus derivados acilados y diversos ésteres derivados del ácido ferúlico (desde el ferulato de metilo

hasta el ferulato de dodecilo) empleando oleato de metilo como matriz oleosa y midiendo la extensión de la oxidación por el método de Rancimat. Asimismo, los mismos autores observaron que, en las similares condiciones, existe una gran variabilidad cuando se comparan los períodos de inducción de ácido gálico con alquil galatos. En estos compuestos el orden de capacidad antioxidante fue galato de metilo >> galato de propilo ~ galato de laurilo > ácido gálico ~ galato de estearilo.

En relación a los derivados glucosilados, sólo el **Hyd-1-Glu** presentó actividad antioxidante. La pérdida del residuo de catecol en **Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu** provocó una disminución clara de la capacidad antioxidante.

Al contrario de los resultados obtenidos para el aceite de pescado, el orden de eficacia obtenido para los distintos ésteres de **Hyd** en emulsión de aceite fue:

Gal-C8 ~ Hyd-C8 > Hyd-C12 > Hyd-Ac ~ Hyd-C4 > Hyd > Hyd-1-Glu > Hyd-3-Glu+Hyd-4-Glu

Los antioxidantes más lipofílicos, **Hyd-C8** e **Hyd-12** son los que presentaron una inhibición mayor al desarrollo de la oxidación lipídica frente a los menos lipofílicos, **Hyd**, **Hyd-Ac** e **Hyd-C4**. Cabe destacar que **Hyd-C8** e **Hyd-12** mostraron una capacidad antioxidante similar al **Gal-C8** a pesar de que en el anillo fenólico contienen dos grupos hidroxilo en lugar de los tres como ocurre con el **Gal-C8**. Nenadis y col. (Nenadis, et al., 2003) describieron que, en una emulsión de aceite en agua empleando trioleína como aceite, el ferulato de etilo presentaba una capacidad antioxidante mayor que para el ácido ferúlico, compuesto más polar que el primero, en las fases iniciales de la oxidación lipídica (medida como índice de peróxidos). Esta tendencia general parece ajustarse bastante bien a la “*paradoja polar*”. En contraposición a estos resultados, Yuji y col. (Yuji, et al., 2007) encontraron que el ácido p-hidroxifenilacético presentó mejor capacidad antioxidante que sus derivados más apolares en una emulsión de aceite en agua empleando aceite de Menhaden (arenque americano) como fuente oleosa. Estos autores atribuyen estas diferencias a la distinta localización de los antioxidantes en el seno de la emulsión. Los ésteres de p-hidroxifenilacético parece que se solubilizan mejor en las micelas surfactantes, produciendo una disminución de su concentración efectiva en la interfase de la gota en el seno de la emulsión.

Sin embargo, cabe destacar que el máximo de la eficacia antioxidante, en la emulsión de aceite en agua, parece tener lugar cuando la longitud de cadena de los ésteres de **Hyd** es de 8 carbonos. La localización física del antioxidante va a depender de la distribución del mismo en ambas fases (oleosa y acuosa). Por lo tanto, los ésteres de **Hyd** más lipofílicos incrementarán la extensión de la oxidación en la interfase de la gota y, en consecuencia, contribuirán a la protección de los ácidos grasos dispuestos en el interior de las micelas. Al mismo tiempo, el aumento en la longitud de la cadena puede reducir la rotación aleatoria del oxidante en la interfase de la emulsión, y este efecto puede provocar que el antioxidante se disponga en la interfase con el residuo ortofenólico orientado hacia la fase acuosa de forma preferencial. Finalmente, si la cadena alquilo es demasiado larga, esto podría provocar que la disposición del antioxidante sea más interna en la micela, siendo menos efectiva que cuando se dispone en la interfase. Esta influencia de la longitud de la cadena ha sido también reportada por Yu y col para derivados de ubiquinona (Yu, et al., 1985).

En el caso de los derivados glucosilados, la pérdida de la estructura catecol en **Hyd-3-Glu** e **Hyd-4-Glu**, explicaría su ineficacia a la hora de inhibir la oxidación lipídica en la emulsión de aceite en agua. La baja actividad antioxidante de **Hyd-1-Glu**, concordante con la teoría de la “*paradoja polar*”, parece que viene influenciada mayoritariamente por la localización del antioxidante en la interfase. Éste compuesto, más polar que el **Hyd**, se solubilizaría mejor en las micelas del surfactante, dando lugar a una disminución de su concentración efectiva en el seno de la emulsión (Yuji, et al., 2007).

Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que los ésteres de **Hyd** presentan actividad antioxidante en ambos sistemas, aceite y emulsión de aceite. La introducción de una cadena lipofílica en el hidroxilo de la cadena lateral provoca una disminución de la efectividad del **Hyd**. Los resultados sugieren que existe una dependencia entre la longitud de la cadena y la disminución de la capacidad antioxidante tal y como predice la “*paradoja polar*”. En sistemas emulsificados, la presencia de una cadena carbonada corta o medianamente corta incrementa la capacidad antioxidante del **Hyd** debido a la disposición física del compuesto en la interfase. Sin embargo, la presencia de cadenas carbonadas más largas no provoca un incremento significativo en la capacidad antioxidante. Esto parece indicar que la lipofilia tiene un rol importante en la distribución geométrica del antioxidante en la interfase aceite-agua lo cual incide directamente en la capacidad antioxidante del compuesto. Los resultados obtenidos se ajustan al comportamiento predicho por la “*paradoja polar*” según la cual los compuestos más lipofílicos mostraron mejor capacidad antioxidante en emulsiones aceite-agua que en aceite en comparación con el **Hyd**.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la alta eficacia de fenolípidos derivados de **Hyd** y de derivados glucosilados de **Hyd** en emulsiones de aceite en agua, muy superior, incluso al **Hyd**. Las diferentes características lipofílicas de estos derivados con respecto a la molécula original **Hyd** pueden favorecer su incorporación en nuevas formulaciones alimenticias y destinadas a cosmética basadas en sistemas emulsionados de aceite en agua enriquecidos con lípidos marinos con elevado contenido en ω 3-PUFA.

5.2. DERIVADOS DE RESVERATROL.

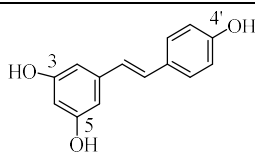
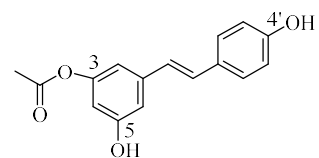
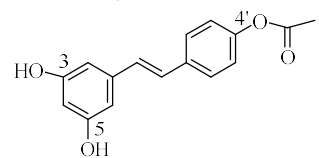
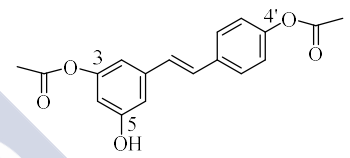
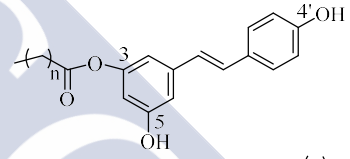
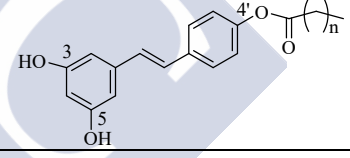
Se presenta el efecto de las siguientes modificaciones estructurales de la molécula de **Res** en su capacidad antioxidante.

- La introducción de grupos alquilo de distinta longitud de cadena: DERIVADOS ACILADOS.
- La introducción de residuos de glucosa en distintas posiciones: DERIVADOS GLUCOSILADOS.
- La introducción de cadenas alquilo de distinta longitud en el residuo de glucosa introducido previamente en la molécula de **Res**. DERIVADOS ACIL GLUCOSILADOS.

De forma similar al capítulo anterior, capítulo presenta dos partes, una primera destinada a la descripción de los parámetros físico-químicos de los compuestos a estudiar, y una segunda parte centrada en el estudio de las capacidades de estos compuestos para inhibir la oxidación de los sistemas lipídicos en aceite y emulsiones.

5.2.1. Síntesis y estabilidad.

El resveratrol y sus derivados acilados y glucosilados objeto de estudio, se representan en las tablas 17 y 18 respectivamente (**Tab. 17** y **Tab. 18**). Todos los derivados acilados y glucosilados se obtuvieron con buenos rendimientos y con la configuración deseada.

Fenol	Abreviatura	Peso molecular	n	Estructura
Resveratrol	Res	228,25		
3- <i>O</i> -Acetil Resveratrol	Res-3-C2	270,28		
4'- <i>O</i> -Acetil Resveratrol	Res-4'-C2	270,28		
3,4'- <i>O</i> -diacetil Resveratrol	Res-3,4'-C2	313,32		
3- <i>O</i> -estearoil Resveratrol	Res-3C18	494,34	16	
4'- <i>O</i> -estearoil Resveratrol	Res-4'C18	494,34	16	

Tab. 17 Derivados acilados del Res.

Fenol	Abreviatura	Peso molecular	n	Estructura
Resveratrol-3-β-glucopiranosido (Piceido)	Res-3-Glu (Pic)	390,39		
Resveratrol-3, 4'-β-di-glucopiranosido	Res-3,4'-Glu	552,53		
Resveratrol-3, 5-β-di-glucopiranosido	Res-3,5-Glu	552,53		
Piceido-6-butilato	Pic-C4	460,17	2	
Piceido-6-octanoato	Pic-C8	516,24	6	
Piceido-6-laurato	Pic-C12	572,31	10	
Piceido-6-palmitato	Pic-C16	628,35	14	
Piceido-6-estearato	Pic-C18	656,39	16	

Tab. 18 Derivados glucosilados del Res.

Los resultados de los estudios de estabilidad de los derivados acilados y glucosilados a través del análisis por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa con detector de diodos (Tab. 19) durante el almacenamiento a 4 °C, mostraron una elevada estabilidad en disolución etanólica. Todos los compuestos fueron estables al menos durante 10 meses a excepción del **Pic-C12** que se degradó a los 8 meses.

El nombre común del compuesto resveratrol-3-β-glucopiranosido, **Res-3-Glu**, es ácido piceido, **Pic**. Para facilitar la comprensión de los resultados:

- En los estudios enfocados al estudio de la influencia de la posición en la glucosilación en la molécula de **Res**, el compuesto resveratrol-3-β-glucopiranosido se identificó como **Res-3-Glu**.
- En los estudios enfocados a estudiar la influencia de la acilación con la longitud de cadena en el compuesto resveratrol-3-β-glucopiranosido, éste se identificó como **Pic**.

Fenol	Tiempo de retención (min)	λ (nm)
Res	15,022	304
Res-3-C2		
Res-4'-C2		
Res-3,4'-C2		
Res-3C18	39,199	319
Res-4'C18	38,831	305
Res-3-Glu (Pic)	2,024	302,9
Res-3,4'-Glu	11,895	305
Res-3,5-Glu	2,021	316
Pic-C4	15,488	317
Pic-C8	18,867	320,8
Pic-C12	23,047	317
Pic-C16	28,281	307,7
Pic-C18	30,789	305

Tab. 19 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV de Res, derivados acilados de Res y derivados glucosilados de Res.

Los estudios de estabilidad no se llevaron a cabo para los acetil derivados de Res, Res-3-C2, Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2, por no disponer de muestra suficiente.

Los espectros de absorción de todos los derivados de Res fueron similares a los de la molécula original con ligeros desplazamientos del máximo de absorción.

5.2.2. Coeficientes de partición: log *P*.

Los coeficientes de partición obtenidos como log *P* se muestran en Tab. 20. Los datos para las muestras aciladas de Res, así como para los derivados acil glucosilo del Res, se obtuvieron empleando la fragmentación de Crippen incluida dentro del Software ChemDraw Ultra 11.0 (Ghose & Crippen, 1987). Los resultados experimentales obtenidos para los estearol derivados presentaron mucha variabilidad y en el caso de los acetil derivados y de los acil glucosil derivados, no se dispuso de muestra suficiente para llevar a cabo el análisis.

Fenol	log <i>P</i>
Res	1,85 ± 0,46
Res-3-C2	3,02*
Res-4'-C2	3,02*
Res-3,4'-C2	3,05*
Res-3C18	9,94*
Res-4'C18	9,94*
Res-3-Glu (Pic)	0,89 ± 0,06
Res-3,4'-Glu	-0.73 ± 0,12
Res-3,5-Glu	-0.72 ± 0,02
Pic-C4	2,52*
Pic-C8	4,19*
Pic-C12	5,86*
Pic-C16	7,52*
Pic-C18	9,04**

Tab. 20 Coeficientes de partición expresados como log *P* para **Res**, derivados acilados de **Res** y derivados acil glucosilo de **Res**. Para los compuestos señalados con (*), el log *P* se calculó usando la fragmentación de Crippen incluida en el Software ChemBrioDraw Ultra 11.0. (**), el log *P* se determinó empleando el software informático desarrollado por Molinspiration Cheminformatics (media ± sd).

Los valores determinados experimentalmente mostraron que la introducción de una unidad de glucosa o dos provocó una disminución en la lipofilia de los distintos compuestos.

Los derivados acilados, cuyo coeficiente de reparto fue determinado teóricamente, mostraron que un incremento en la longitud de la cadena acilo, produjo un incremento en la lipofilia. Similares resultados se observaron en los derivados acil glucosilo del **Res**.

No se pudo determinar el coeficiente de partición teórico para **Pic-C18** a través de la fragmentación de Crippen incluida en el Software ChemBrioDraw Ultra 11.0. Para poder tener una estimación de este valor, se empleó el software on-line desarrollado por Molinspiration Cheminformatics (Molinspiration Cheminformatics, Nova ulica, SK-900 26 Slovensky Grob, Slovak Republic), según el cual log *P* se determinó siguiendo una metodología desarrollada por Molinspiration, basándose en una suma de contribuciones de los distintos grupos que forman parte de la molécula y de una serie de factores de corrección.

5.2.3. Capacidad antirradicalaria: DPPH y TEAC (ABTS⁺).

La capacidad antirradicalaria de los distintos compuestos se evaluó por dos metodologías diferentes. Por un lado, la capacidad de captación de radical DPPH y, por otro lado, el poder de captación del radical ABTS⁺ expresado como TEAC. Estos resultados se muestran en la **Tab. 21**). Los valores correspondientes a **Pic-C12** no pudieron calcularse por un problema de degradación de la molécula.

Fenol	DPPH (EC ₅₀ mM)	TEAC (mM equiv a 0,5 mM Trolox)
Res	3,1673 ± 0,0518	0,1027 ± 0,0164
Res-3-C2	4,0364 ± 0,1574	0,3182 ± 0,0014
Res-4'-C2	24,5220 ± 0,6813	0,1502 ± 0,0037
Res-3,4'-C2	>25,6148	0,4261 ± 0,0221
Res-3-C18	7,3755 ± 0,2194	1,2649 ± 0,1354
Res-4'-C18	20,0081 ± 1,16	1,0748 ± 0,0131
Res-3-Glu (Pic)	3,3693 ± 0,1307	0,2925 ± 0,0217
Res-3,4'-Glu	n.d.	0,5162 ± 0,0379
Res-3,5-Glu	5,1142 ± 0,07506	0,5402 ± 0,0456
Pic-C4	3,7817 ± 0,4586	0,2869 ± 0,0419
Pic-C8	3,4961 ± 0,1533	0,1973 ± 0,0523
Pic-C12	-	-
Pic-C16	4,5378 ± 0,3690	0,7304 ± 0,0195
Pic-C18	5,0435 ± 0,5131	0,8518 ± 0,0442

Tab. 21 Capacidad antirradicalaria de **Res**, derivados acilados de **Res** y derivados acil glucosilo de **Res**. DPPH se expresó como EC₅₀, concentración necesaria para captar el 50% del radical DPPH presente en la disolución. El TEAC se expresó como la concentración que produjo la misma capacidad de captación de radical ABTS⁺ que 0,5 mM de Trolox (media ± sd). n.d., no determinado.

Los derivados acilados del **Res** mostraron una capacidad de captación del radical DPPH menor que el **Res**. Claramente se observó que la acilación en la posición 4', provocó una disminución drástica en el poder de captación de DPPH, independientemente de la longitud de la cadena. Además, en relación a la acilación en el hidroxilo de la posición 3, el incremento de la longitud de la cadena afectó negativamente al poder de captación del DPPH.

La introducción de un anillo de glucosa en el hidroxilo de la posición 3 (**Pic**) no afectó al poder de captación del DPPH en relación a la molécula original. Sin embargo, la introducción de otra unidad de glucosa en el esqueleto carbonado provocó una disminución en la capacidad de enmascarar el DPPH, siendo más significativa cuando la adición se produjo en el hidroxilo de la posición 4'. No se pudo determinar la capacidad de captación para el **Res-3,4'-Glu** debido a que todas las concentraciones ensayadas mostraron una captación de radical muy baja y no se pudo establecer la curva para determinar la EC₅₀. La concentración máxima ensayada, 25,60 mM, presentó un porcentaje de inhibición al radical DPPH de 30 % y no se pudo realizar la extrapolación para determinar la EC₅₀.

La capacidad de captación de DPPH obtenida para el estudio de la acilación con distintos ácidos grasos en el hidroxilo del carbono de la posición 6 del residuo de glucosa de **Res-3-Glu** mostró una fuerte dependencia con la longitud de cadena, viéndose disminuida para los derivados de mayor longitud de cadena (C16 y C18), y siendo similar al **Res** para los compuestos **Pic-C4** y **Pic-C8**.

Los resultados obtenidos en la capacidad de captación del radical ABTS⁺ para los derivados acilados de **Res** mostraron la misma tendencia que los observados en el DPPH. Todos los derivados acilados de **Res** presentaron una menor capacidad de captación al radical

ABTS⁺ que la molécula original. La acilación en la posición 4' resultó ser más efectiva que la sustitución en la posición 3, independientemente de la longitud de cadena.

La adición de un residuo de glucosa en el **Res-3-Glu (Pic)**, provocó un descenso de la capacidad de captación al ABTS⁺ con respecto al **Res**. Además, y de acuerdo con los resultados obtenidos para el DPPH, la introducción de una segunda unidad de glucosa, independientemente de la posición, provocó una disminución en el poder de captación del radical ABTS⁺ con respecto al **Pic**.

La acilación en la posición 6 del residuo de glucosa en el **Pic**, afectó de forma importante al poder de captación del ABTS⁺ en función de la longitud de la cadena. De forma general, los resultados coinciden con los obtenidos a través del ensayo de DPPH, siendo los derivados **Pic-C8** y **Pic-C4**, aquellos con valores mejores y próximos a los obtenidos para el **Pic**. **Pic-C8** fue ligeramente mejor que **Pic-C4**, el cual tuvo un comportamiento similar al **Pic**. Por otro lado, los derivados con mayor longitud de cadena (C16 y C18), mostraron una capacidad de captación del orden de 3 veces menor que **Pic** y los derivados con longitud de cadena corta.

Estos resultados indicaron que el hidroxilo de la posición 4' juega un papel muy importante en los mecanismos implicados en la captación de radicales.

5.2.4. Capacidad reductora. FRAP.

El poder reductor de los distintos compuestos se evaluó mediante el método FRAP calculándose la capacidad reductora en función de la habilidad del compuesto para reducir el hierro férrico a ferroso (**Fig. 30**).

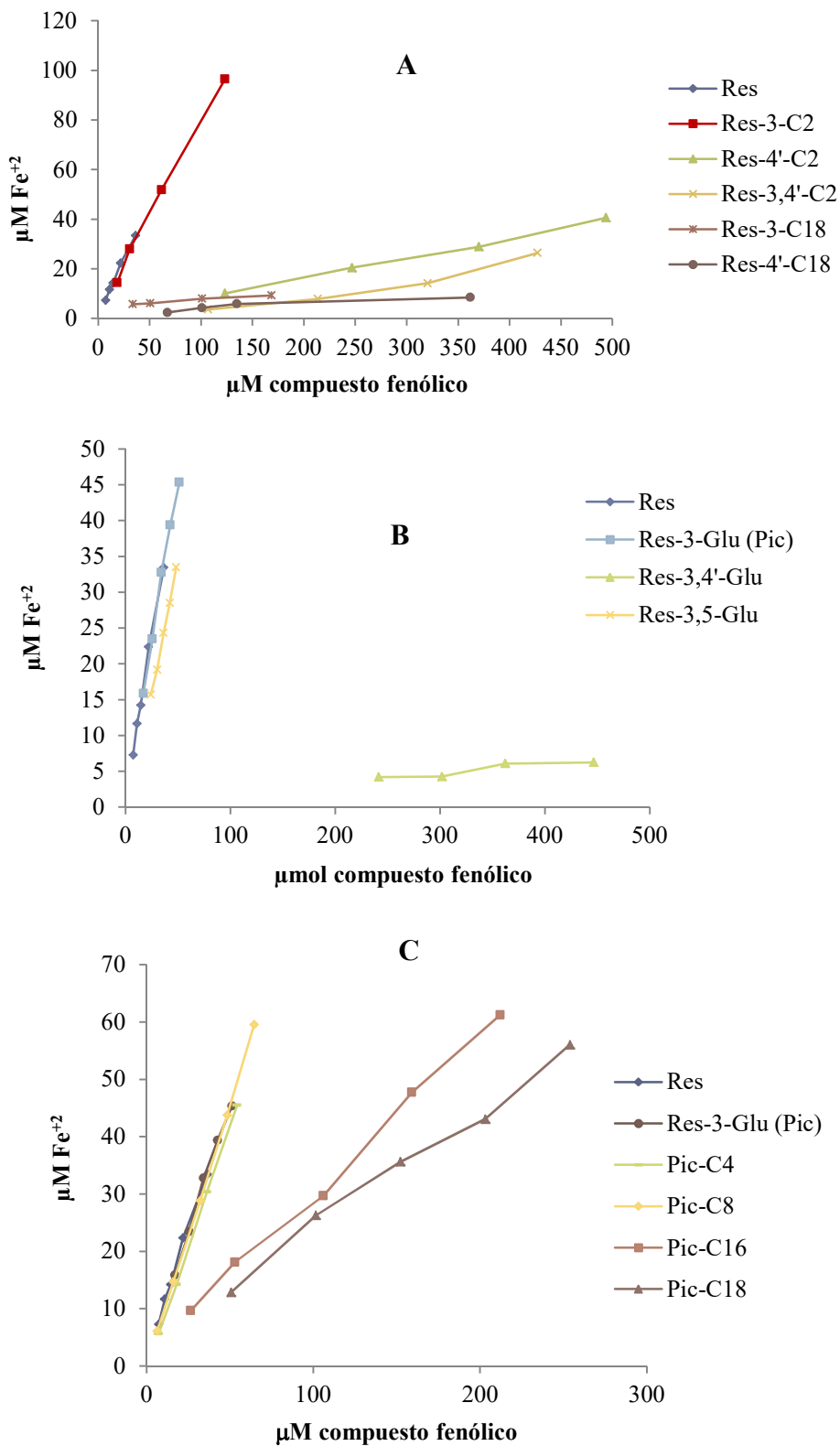


Fig. 30 Capacidad reductora por mol de Fe²⁺ de derivados acilados de Res (A), derivados glucosilados de Res (B) y derivados acil glucosilados de Res (C).

La acilación del **Res** produjo notables modificaciones en su poder reductor (**Fig. 30A**). **Res-3-C2** mostró una capacidad reductora similar a **Res** mientras que **Res-4'-C2**, **Res-3,4'-C2**, **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** presentaron un poder reductor significativamente menor que la molécula original. Claramente, el incremento de la longitud de cadena de los derivados acilados, influyó negativamente en el poder reductor de **Res**. Asimismo, considerando la serie de los derivados de **Res** con igual longitud de cadena, la posición de acilación jugó un papel importante en el poder reductor. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia o ausencia del hidroxilo en la posición 4' afecta de manera importante al poder reductor de la molécula.

La adición de un residuo de glucosa al **Res** en el hidroxilo de la posición 3 (**Res-3-Glu**, **Pic**) no produjo ningún efecto en el poder reductor del **Res**. Similares resultados se obtuvieron con la introducción de un segundo residuo de glucosa en el carbono de la posición 5. Sin embargo, la introducción de una segunda unidad de glucosa en el carbono 4', produjo una drástica disminución en el poder reductor del hierro calculado para el compuesto **Res-3,4'-Glu** (**Fig. 30 B**). Estos resultados sugieren, de nuevo, que el hidroxilo en 4', juega un papel importante en el poder reductor de este tipo de compuestos.

La acilación en el carbono de la posición 6 del residuo de glucosa, provocó diferencias en el poder reductor con respecto al **Pic** dependiendo de la longitud de la cadena. Para derivados con longitud de cadena corta o media (C4 y C8), el poder reductor fue similar al **Pic**. Sin embargo, al incrementarse la longitud de cadena a C16 y C18, se produjo una importante disminución en el poder reductor con respecto al **Pic** (**Fig. 30 C**).

Tal y como se indicó previamente, se calculó el número de moles de hierro férrico reducidos por mol de compuesto, expresándose la capacidad reductora de los derivados en función de la concentración molar, y ajustando las gráficas a la ecuación de una recta ($R^2 > 0,9655$). La pendiente de las ecuaciones lineales indica el número de moles de hierro férrico reducidos por un mol de compuesto reductor (**Tab. 22**). No fue posible determinar los moles de e^- cedidos por **Res-3,4'-C2**, **Res-4'-C18** y **Res-3,4'-Glu** por no presentar una correlación lineal entre la capacidad reductora y la concentración en los intervalos estudiados.

Fenol	moles e ⁻
Res	1,0252±0,0031
Res-3-C2	0,7671 ± 0,0104
Res-4'-C2	0,0808 ± 0,0008
Res-3,4'-C2	n.d.
Res-3-C18	0,0274±0,0019
Res-4'-C18	n.d.
Res-3-Glu (Pic)	0,8762±0,0129
Res-3,4'-Glu	n.d.
Res-3,5-Glu	0,7446±0,0973
Pic-C4	0,8526±0,0262
Pic-C8	0,9170±0,0702
Pic-C12	n.d.
Pic-C16	0,2781±0,0078
Pic-C18	0,2031±0,0095

Tab. 22 Moles de electrones que pueden ceder **Res**, derivados acilados de **Res** y derivados acil glucosilados de **Res** (media ± sd).

Todos los derivados acilados de **Res** presentaron una escasa capacidad para donar electrones salvo **Res-2-C2** que pudo donar 0,77 moles de e⁻ frente 1,03 moles de e⁻ que fue capaz de ceder el **Res**.

La introducción de una unidad de glucosa en C3 (**Pic**) produjo una pequeña disminución, aproximadamente del 25 %, en el número de moles de electrones que pueden ser donados. La inclusión de un segundo residuo de glucosa en la posición 5, apenas modificó la capacidad de donar electrones, mientras que si la introducción de esta segunda unidad de glucosa se producía en la posición 4', se perdía la capacidad de cesión de electrones.

5.2.5. Actividad de los compuestos derivados de resveratrol en sistemas basados en aceite de pescado.

El estudio de la inhibición de la oxidación por parte de **Res**, los derivados acilados de **Res**, los glucosil derivados de **Res** y los derivados acil glucosilo de **Res**, en sistemas basados en aceite se llevó a cabo empleando el aceite de hígado de bacalao previamente caracterizado y mencionado en el capítulo anterior.

5.2.5.1. Estudio de la inhibición de derivados acilados de resveratrol en aceites de pescado.

Este estudio se realizó empleando dos derivados acilados de longitud de cadena significativamente diferente. Se examinó, por tanto, el efecto de la introducción de un grupo estearilo (C18) y, por otro lado, de la introducción de un grupo acetilo (C2), en las posiciones 3 y 4' del **Res**.

Dado que en bibliografía ya existían numerosas referencias sobre la efectividad de **Res** para inhibir la oxidación en aceite, en una primera aproximación se llevó a cabo un estudio de la eficacia de **Res-4'-C18** en aceite de pescado a diferentes concentraciones para seleccionar una concentración óptima de trabajo. Para ello, muestras de aceite de pescado se suplementaron con distintas concentraciones de **Res-4'-C18** (10, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm). Las muestras control no contenían ningún compuesto fenólico. Los sistemas se activaron térmicamente a una temperatura de 40 °C y se estudió la evolución de la oxidación lipídica durante 9 días.

Los resultados obtenidos a través del análisis sensorial demostraron que todas las concentraciones ensayadas inhibieron el desarrollo de aromas asociados a la rancidez de forma moderada salvo las muestras que contenían una concentración de 10 ppm. Las muestras control sin aditivos desarrollaron rancidez en el día 8 mientras que las muestras suplementadas con concentraciones superiores a 10 ppm de **Res-4'-C18** mostraron rancidez incipiente hasta el día 7.

Los resultados observados en el análisis sensorial se corroboraron con los parámetros químicos de determinación de la concentración de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 31 A y B**).



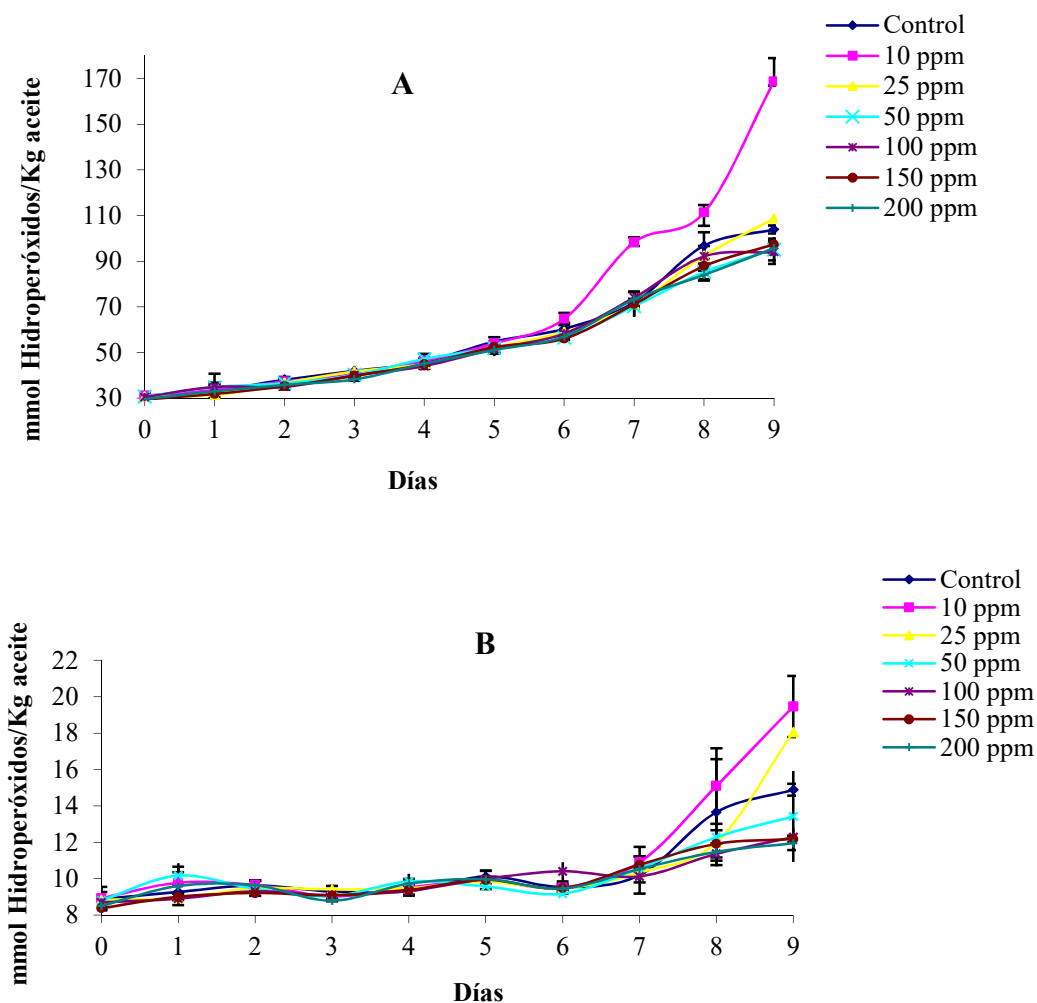


Fig. 31 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 10, 25, 50, 100 y 200 ppm de Res-4'-C18 y almacenadas a 40 °C.

Todas las concentraciones estudiadas, excepto la de 10 ppm que presentó un comportamiento prooxidante, mantuvieron niveles de hidroperóxidos con dienos conjugados, ligeramente inferiores a los mostrados por las muestras control sin suplementación a lo largo de todo el estudio. En el caso de la formación de trienos conjugados, la cinética de la oxidación transcurrió más lenta, observándose un comportamiento pro oxidante para las concentraciones de 10 y 25 ppm. Los períodos de inducción en la formación de dienos conjugados fueron de 6 días para las muestras suplementadas con 10 ppm de Res-4'-C18 y de 6,75 días para las muestras control sin aditivos y para todas las muestras suplementadas con concentraciones superiores a 10 ppm. En el caso de los trienos conjugados, los períodos de inducción fueron de 7 días para las muestras suplementadas con 10 ppm de Res-4'-C18, de 8 días para las muestras suplementadas con 25 ppm y no se observó período de inducción para los demás casos.

Los porcentajes de inhibición calculados para las distintas concentraciones ensayadas de **Res-4-C18** a día 9 se muestran en la **Tab. 23**. Todas las concentraciones ensayadas presentaron un porcentaje de inhibición moderado salvo la concentración más baja (10 ppm) que, como se ha señalado previamente, resultó ser prooxidante y 25 ppm que presentó un bajo poder de inhibición en la formación de dienos conjugados. Resultados similares se obtuvieron para el caso de los trienos conjugados. No se observaron diferencias significativas en la capacidad de inhibición entre las concentraciones superiores a 25 ppm.

	Dienos conjugados	Trienos conjugados
Concentración	% I (día 9)	% I (día 9)
10 ppm	-53,6 ± 2,54	-82,94 ± 7,93
25 ppm	20,1 ± 0,05	-52,87 ± 0,01
50 ppm	33,7 ± 4,65	47,16 ± 2,24
100 ppm	34,5 ± 4,99	44,31 ± 1,27
150 ppm	29,9 ± 2,99	35,55 ± 4,06
200 ppm	32,0 ± 2,66	42,62 ± 6,39

Tab. 23 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 10, 25, 50, 100 y 200 ppm de **Res-4'-C18** y almacenadas a 40°C.

En función de los resultados obtenidos se seleccionó la concentración de 100 ppm para evaluar la actividad antioxidante de los distintos fenolípidos derivados de **Res** en emulsiones de aceite de pescado en agua.

El estudio de la inhibición de los derivados estearilo de **Res** en aceite de pescado (**Res-3-C18** y **Res-4'-C18**), se llevó a cabo durante 7 días en muestras de aceite de pescado suplementadas con 100 ppm de antioxidante (0,44 mM para **Res** y 0,20 mM para los derivados estearilo) y activadas térmicamente a 40°C. Las muestras control no contenían ningún aditivo.

El análisis sensorial mostró que tanto **Res** como sus estearil derivados presentaron una baja inhibición al desarrollo de aromas asociados a la rancidez.

Estos resultados se corroboraron con las determinaciones químicas de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. (**Fig. 32A** y **Fig. 32B**, respectivamente). Todos los compuestos ensayados mostraron poca capacidad de inhibir la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados. El período de inducción fue de 2 días para las muestras control que no contenían ningún aditivo y para las muestras suplementadas con **Res**. El período de inducción se extendió hasta 3,5 días para los derivados acilados. La capacidad inhibitoria de estos compuestos, fue mayor para el caso de formación de hidroperóxidos con trienos conjugados. La formación de hidroperóxidos con trienos conjugados siguió la cinética clásica y presentó una evolución más lenta. En este caso, no se llegó a observar claramente la etapa de propagación de la oxidación durante el tiempo que se desarrolló el experimento. El período de inducción fue de 5 días para las muestras control sin aditivos y se retrasó un día para todas las muestras suplementadas con los derivados estearilo del **Res**. A continuación, sólo el **Res** fue capaz de mantener niveles bajos de hidroperóxidos con trienos conjugados.

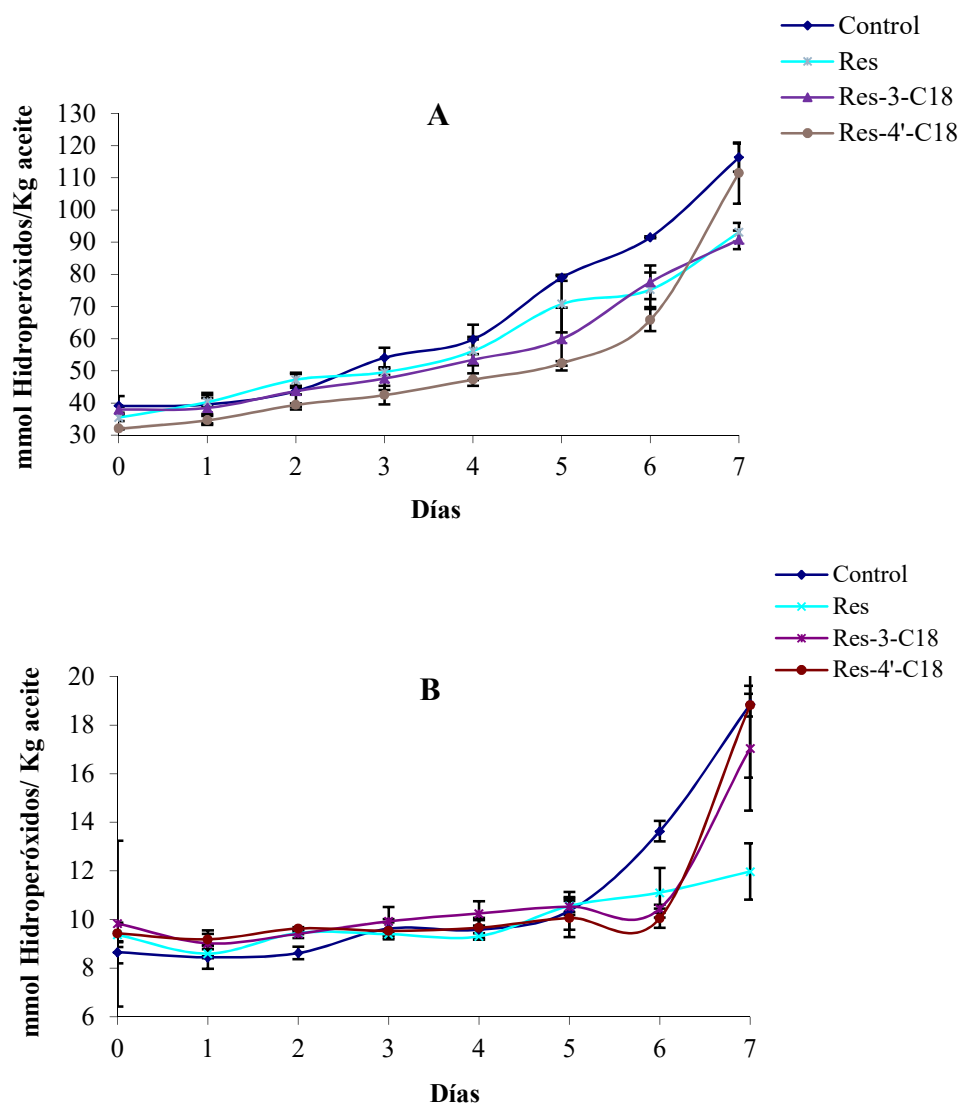


Fig. 32 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 100 ppm de Res, Res-3-C18 y Res-4'-C18 y almacenadas a 40 °C.

Los porcentajes de inhibición calculados en los días 6 y 7 de la etapa de propagación de las muestras control para la formación de hidroperóxidos con dienos y en el día 7 en el caso de trienos conjugados, se muestran en la **Tab. 24**.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados
	% I (día 6)	% I (día 7)	% I (día 7)
Res	34,40 ± 7,53	28,02 ± 2,43	69,01 ± 7,84
Res-3-C18	31,96 ± 10,54	32,20 ± 2,64	29,92 ± 8,35
Res-4'-C18	42,94 ± 6,96	-16,68 ± 6,91	-6,90 ± 5,57

Tab. 24 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res, Res-3-C18 y Res-4'-C18 (100 ppm) en aceite de hígado de bacalao almacenado 40 °C (media ± sd).

Res, **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** presentaron un poder de inhibición moderado a la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados. No se apreciaron diferencias significativas entre los distintos compuestos ensayados. Es preciso tener en cuenta que, aunque se añadieron 100 ppm de cada compuesto, su concentración molar fue distinta, siendo de 0,44 mM para **Res** y de 0,20 mM para los derivados acilados. En consecuencia, estos fenolípidos mostraron el mismo porcentaje de inhibición que **Res** pero a una concentración inferior y, por lo tanto, es de suponer mayor eficacia que **Res**. En el caso de trienos conjugados, **Res-3-C18** mostró un poder de inhibición, menor que **Res**, y **Res-4'-C18** no fue capaz de inhibir la formación de trienos conjugados.

Con el fin de incrementar la cinética de la reacción de oxidación, el estudio de la inhibición de los derivados acetilo de **Res** en aceite de pescado (**Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2**), se llevó a cabo a 50 °C. Inicialmente, los compuestos se adicionaron en una concentración de 100 ppm (0,37 mM para **Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y 0,32 mM para **Res-3,4'-C2**) pero no resultó efectiva. Por ello, se incrementó la concentración de los potenciales antioxidantes hasta 0,65 mM. El control de la extensión de la oxidación se llevó a cabo durante 6 días.

La evaluación sensorial mostró que las muestras control sin aditivos y aquellas suplementadas con **Res-3-C2** desarrollaron aromas asociados a la rancidez a partir del día 4. Las muestras suplementadas con **Res**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** mostraron rancidez incipiente a partir del día 5 sin mostrar una rancidez significativa durante el estudio.

La determinación de la concentración de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados durante el proceso de oxidación confirmó los resultados observados en la evaluación sensorial (**Fig. 33 A y B**). **Res**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** inhibieron la formación de dienos y trienos conjugados, manteniendo los niveles de hidroperóxidos más bajos que los controles. **Res-3-C2** presentó una inhibición más baja en comparación con los demás acetil derivados de **Res** estudiados. Los períodos de inducción calculados para la formación de dienos conjugados fueron de 4 días para las muestras control y aquellas suplementadas con **Res-3-C2** y de 5 días para **Res**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2**.

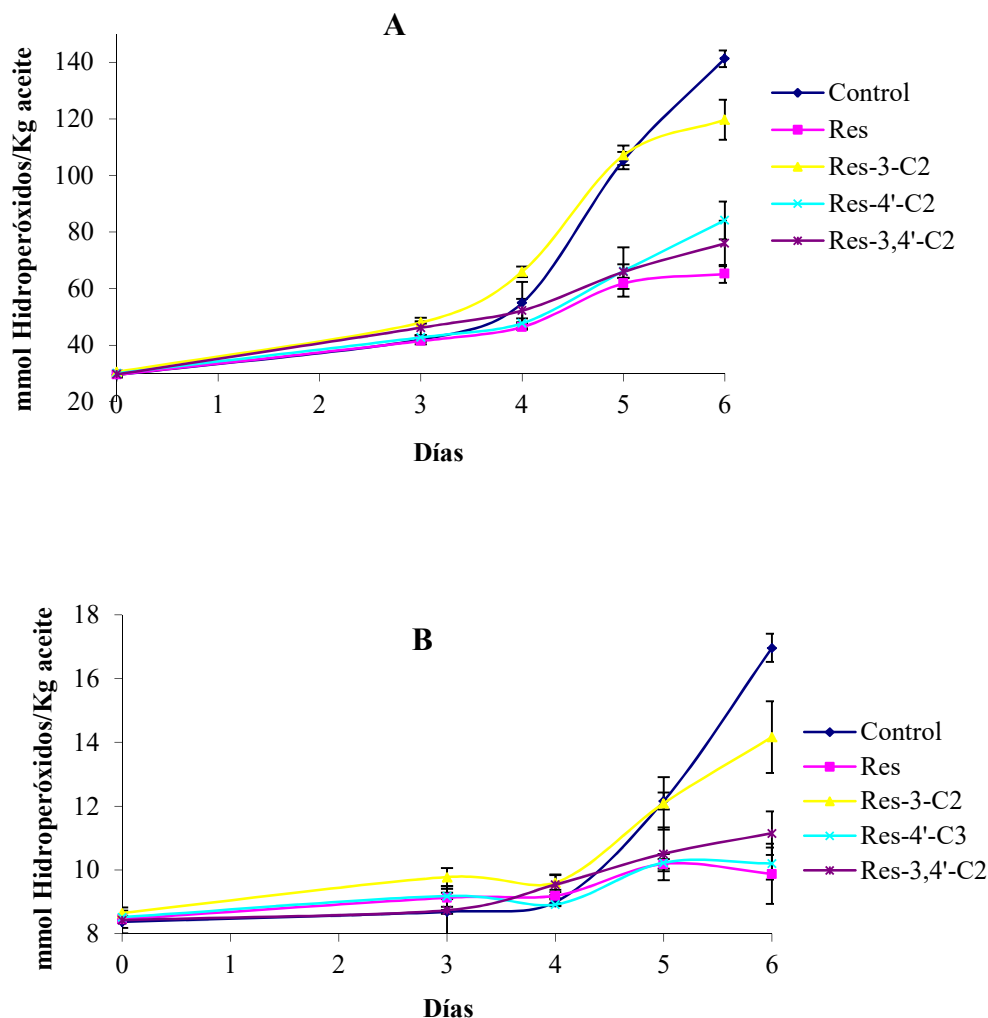


Fig. 33 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con **Res**, **Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** en una concentración de 0,65 mM y almacenadas a 50 °C.

En el caso de la formación de trienos conjugados, los períodos de inducción para las muestras control y para aquellas suplementadas con **Res-3-C2** fueron de 4 días, mientras que para **Res**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** no se observó un significativo período de propagación, y por tanto, no se apreciaron los períodos de inducción durante todo el experimento.

Los porcentajes de inhibición de los dienos y trienos conjugados se calcularon en el día 6 durante la etapa de propagación de las muestras control (**Tab. 25**). Los resultados obtenidos confirmaron la efectividad de los derivados acetilados de **Res** en la inhibición de la oxidación lipídica en aceite de pescado. **Res-3-C2** presentó el menor porcentaje de inhibición (23,43%) mientras que **Res**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** presentaron una capacidad de inhibición mayor y semejante al **Res**, alrededor del 60%, sin diferencias significativas entre ellos para la formación de dienos conjugados. Se detectaron mayores diferencias en el porcentaje de inhibición para la formación de los trienos conjugados, siendo **Res** y **Res-4'-C2** los

compuestos que presentaron mayor efectividad, alrededor del 80%, seguidos por **Res-3,4'-C2** y **Res-3-C2**.

Fenol	Dienos conjugados	Trienos conjugados
	% I (día 9)	% I (día 9)
Res	67,99 ± 2,70	83,50 ± 7,83
Res-3-C2	23,43 ± 3,75	46,83 ± 4,60
Res-4'-C2	61,01 ± 7,32	80,45 ± 3,90
Res-3,4'-C2	58,16 ± 6,95	68,26 ± 5,12

Tab. 25 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con **Res**, **Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** (0,65 mM) y almacenadas a 40 °C (media ± sd).

5.2.5.2. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de Res en aceites de pescado.

Tal y como ya se ha indicado previamente, se evaluó la influencia de la presencia de una o dos unidades de glucosa en las posiciones 3, 5 y 4' del **Res** (Fig. 34) en la capacidad antioxidante del **Res** en aceite de pescado.

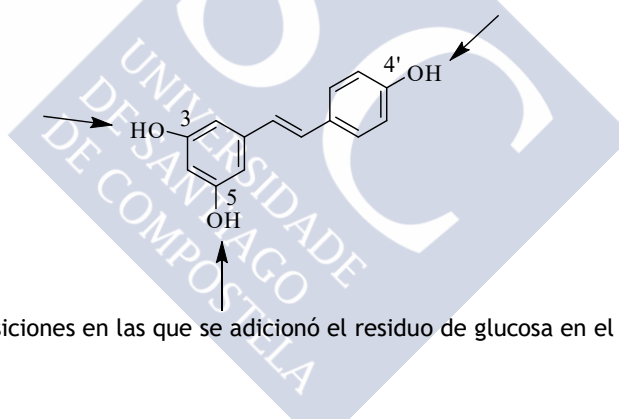


Fig. 34 Posiciones en las que se adicionó el residuo de glucosa en el **Res**.

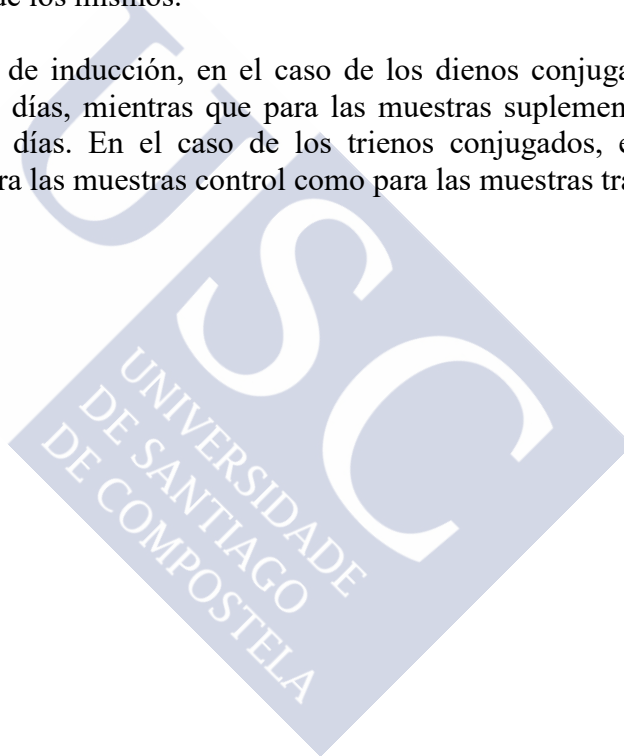
Para ello se estudiaron los siguientes derivados glucosilados: el monoglucósido **Res-3-Glu (Pic)**, y los diglucósidos, **Res-3,4'-Glu** y **Res-3,5-Glu**. Las muestras de aceite de pescado se suplementaron con 100 ppm de cada uno de los compuestos y los sistemas se almacenaron a 40 °C y la extensión de la oxidación se estudió durante 10 días.

La evaluación sensorial mostró que las muestras control no suplementadas comenzaron a desarrollar una rancidez incipiente a partir del día 6 evolucionando a rancidez notable al día siguiente. Las muestras suplementadas con **Res**, **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu** mantuvieron los sistemas con buenas propiedades sensoriales hasta el día 6, a continuación mostraron una rancidez incipiente que se mantuvo durante todo el experimento salvo para el **Res** para el que se percibió el desarrollo de rancidez significativa a día 8. Las muestras que contenían **Res-3,4'-Glu** mantuvieron el sistema en buenas condiciones sensoriales hasta el día 6 mostrando rancidez en el día 7.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial se corroboraron con la determinación química del contenido en hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados a lo largo de todo el experimento (**Fig. 35 A y B**).

Las muestras control sin aditivos y las muestras suplementadas con **Res-3,4'-Glu**, experimentaron un fuerte incremento en el contenido de hidroperóxidos con dienos conjugados a partir del día 6. Las muestras suplementadas con **Res**, **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu** mantuvieron los niveles de dienos conjugados más bajos que las muestras control durante todo el experimento. Resultados similares se observaron en el caso de la determinación de hidroperóxidos con trienos conjugados. En este caso, la cinética fue más lenta y las muestras control experimentaron un aumento en la concentración de trienos conjugados a partir del día 9, mientras que las muestras tratadas con **Res-3,4'-Glu** experimentaron un fuerte incremento en la concentración de trienos a partir del día 7. Las muestras que contenían **Res**, **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu** mantuvieron niveles bajos de trienos conjugados hasta el día 7, a partir del cual, experimentaron un incremento de los mismos.

En relación a los períodos de inducción, en el caso de los dienos conjugados, para las muestras control, éste fue de 5 días, mientras que para las muestras suplementadas con los distintos compuestos fue de 6 días. En el caso de los trienos conjugados, el período de inducción fue de 7 días tanto para las muestras control como para las muestras tratadas.



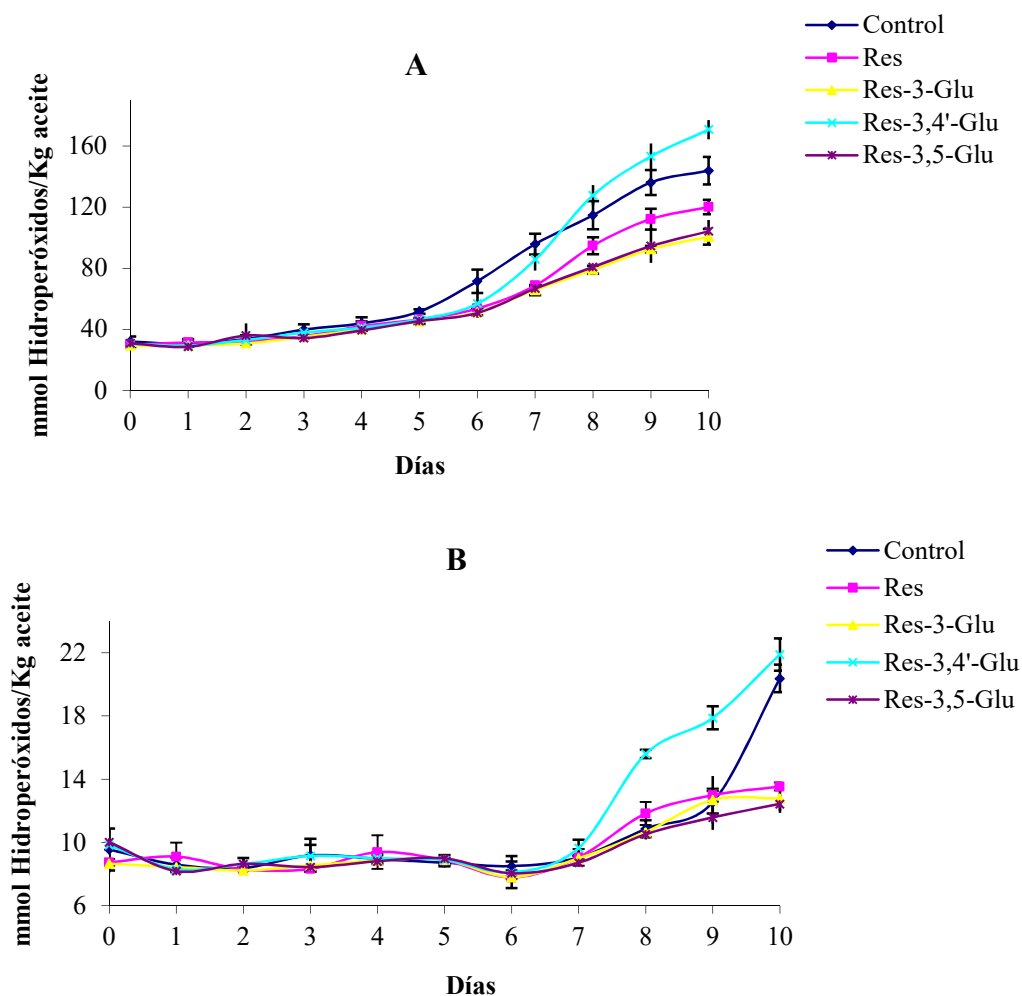


Fig. 35 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Res, Res-3-Glu, Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.

Los porcentajes de inhibición se calcularon en los días 8 y 10 de la etapa de propagación de las muestras control para los dienos conjugados y en el día 10 para trienos conjugados. Estos resultados se muestran en la **Tab. 26**.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados
	% I (día 8)	% I (día 10)	% I (día 10)
Res	15,28 ± 6,87	13,80 ± 2,32	43,8 ± 0,70
Res-3-Glu	35,28 ± 1,85	30,52 ± 4,35	44,5 ± 3,68
Res-3,4'-Glu	-32,42 ± 0,28	-40,11 ± 0,60	-56,6 ± 8,75
Res-3,5-Glu	35,85 ± 1,84	28,62 ± 3,82	62,6 ± 2,31

Tab. 26 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Res, Res-3-Glu, Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) y almacenadas a 40 °C (media ± sd).

Los resultados obtenidos confirmaron la efectividad moderada de **Res**, **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu** inhibiendo la oxidación en aceite de pescado presentando el **Res** menor efectividad que **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu**. **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu**, presentaron capacidades de inhibición similares. Sin embargo, si tenemos en cuenta las concentraciones molares respectivas los distintos compuestos, 0,26 mM y 1,10 mM para **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu**, respectivamente, **Res-3,5-Glu** parece ser más eficaz que **Res-3-Glu** al estar en menor concentración. En el caso de la formación de trienos conjugados, **Res-3,5-Glu** mostró de nuevo mayor capacidad de inhibición que los compuestos **Res** y **Res-3-Glu** siendo altamente eficaz en la. **Res-3,4'-Glu** no resultó eficaz para inhibir la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. Estos resultados sugieren la importancia del hidroxilo en la posición 4' en la inhibición de la oxidación lipídica.

Las modificaciones llevadas a cabo en el esqueleto básico del **Res** con la introducción de cadenas alquilo de distinta longitud de cadena con el fin de incrementar la lipofilia de la molécula original, y la introducción de unidades de glucosa destinada a incrementar la hidrofiliía de la molécula original, no provocaron un incremento significativo en la capacidad antioxidante del **Res** en el aceite de pescado. Debido a ello, se realizaron modificaciones sobre el **Res-3-Glu**, que presentó una capacidad antioxidante moderada y superior al **Res**, introduciendo cadenas alquilo con distinta longitud de cadena con objeto de variar la lipofilia de esta molécula. Se estudió el efecto de esta modificación en la capacidad antioxidante de **Res-3-Glu**. Tal y como ya se ha indicado al inicio de este capítulo, para facilitar la nomenclatura, en estos experimentos **Res-3-Glu** se identificó como **Pic**. En la **Fig. 36** se indica la posición donde se llevaron a cabo la introducción de las cadenas alquilo con distinta longitud de cadena.

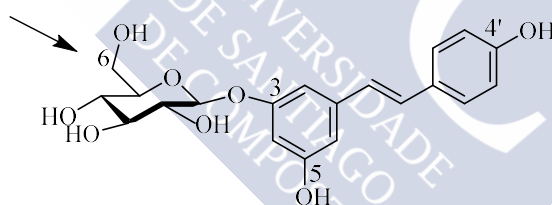


Fig. 36 Posición donde tuvo lugar la acilación de **Res-3-Glu (Pic)** con grupos alquilo de distinta longitud de cadena.

Para llevar a cabo el estudio sobre la influencia que la acilación en **Pic**, puede tener en la inhibición de la oxidación en muestras de aceite de pescado, se plantearon una serie de experimentos en los que se ensayó la capacidad de los compuestos **Pic**, **Pic-C4**, **Pic-C8**, **Pic-C12**, **Pic-C16** y **Pic-C18** cuando eran añadidos en concentración de 100 ppm en aceites sometidos a oxidación térmica a 40 °C. La extensión de la oxidación fue de 9 días.

El análisis sensorial mostró que tanto los controles sin aditivos, como las muestras que contenían los fenoles desarrollaron una rancidez incipiente alrededor del día 6 de experimentación. Las muestras control y aquellas suplementadas con **Pic-C4** y **Pic-C8** desarrollaron rancidez en el día 7, mientras que las muestras que contenían **Pic**, **Pic-C12**, **Pic-C16** y **Pic-C18** no desarrollaron rancidez hasta el día 9.

La **Fig. 37 (A y B)** muestra la evolución de la oxidación lipídica de aceite de pescado en presencia de los distintos derivados acilados de **Pic** en términos de la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. A partir del día 6, las muestras control y las suplementadas con **Pic** y los distintos fenolípidos derivados del **Pic** experimentaron un incremento en la concentración de dienos conjugados. Las muestras que contenían **Pic** y los derivados de mayor longitud de cadena mantuvieron los niveles de hidroperóxidos con dienos conjugados por debajo de los niveles mostrados por las muestras control. Los derivados de **Pic** de longitud de cadena corta (C4 y C8), presentaron mayores niveles de dienos conjugados que las muestras control.

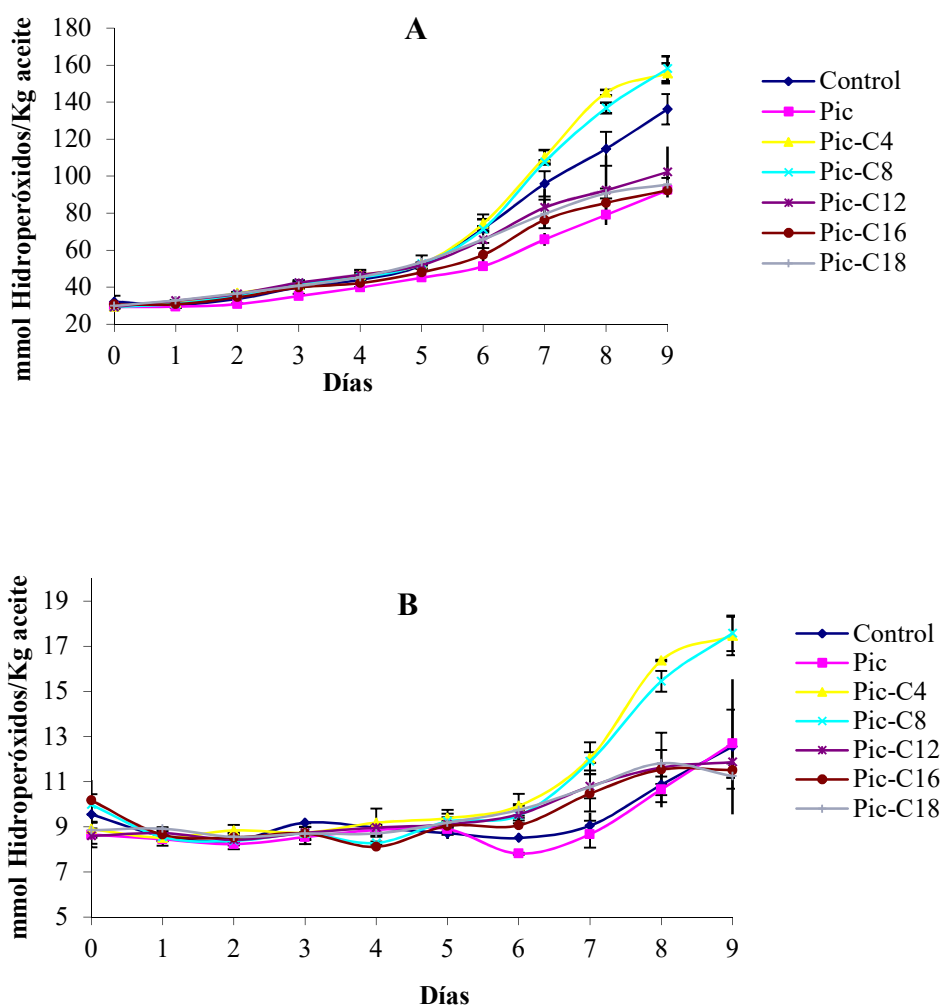


Fig. 37 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con **Pic**, **Pic-C4**, **Pic-C8**, **Pic-C12**, **Pic-C16** y **Pic-C18** (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.

Durante todo el período de estudio, las muestras control no experimentaron un incremento significativo en el contenido de trienos conjugados. Sólo las muestras que contenían **Pic-C4** y **Pic-C8** mostraron niveles de trienos conjugados superiores al control a partir del día 6.

Se determinaron los porcentajes de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados en el día 9 del período de propagación de las muestras control. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tab. 27**.

Fenol	mM (100 ppm)	% I (día 9)
		Dienos conjugados
Pic	0,26	39,62 ± 3,31
Pic-C4	0,22	-21,18 ± 4,92
Pic-C8	0,19	-23,68 ± 7,25
Pic-C12	0,17	30,54 ± 0,16
Pic-C16	0,16	39,59 ± 1,67
Pic-C18	0,15	37,06 ± 4,48

Tab. 27 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con **Pic**, **Pic-C4**, **Pic-C8**, **Pic-C12**, **Pic-C16** y **Pic-C18** (100 ppm) y almacenadas a 40 °C (media ± st).

Los porcentajes de inhibición obtenidos confirmaron la efectividad moderada de **Pic**, **Pic-C12**, **Pic-C16** y **Pic-C18** en la inhibición del desarrollo de la oxidación lipídica en aceite de pescado. El porcentaje de inhibición de **Pic-C12** fue ligeramente inferior a los calculados para **Pic**, **Pic-C16** y **Pic-C18**. Asimismo, **Pic-C4** y **Pic-C8** mostraron un comportamiento significativamente prooxidante. Las concentraciones molares en las que se adicionaron los distintos compuestos se muestran en la **Tab. 27**. Consecuentemente, los derivados de mayor longitud de cadena (C12-C18) resultaron ser claramente más efectivos a la hora de inhibir el desarrollo de la oxidación lipídica en aceite de pescado a pesar de que se encontraban en una concentración molar más baja que los derivados de menor longitud de cadena (C4-C8).

No se determinaron los porcentajes de inhibición en la formación de trienos conjugados debido a que las muestras control no experimentaron un incremento importante en la concentración de los mismos durante todo el experimento.

En consecuencia, puede decirse que existe una influencia evidente de la longitud de cadena de los derivados acilados de **Pic** en la inhibición del desarrollo de la oxidación lipídica en sistemas de aceite de pescado.

5.2.6. Actividad de los compuestos derivados de resveratrol en sistemas basados en emulsiones de aceite de pescado.

El estudio de la inhibición de la oxidación lipídica de **Res**, derivados acilados de **Res** y derivados glucosilados de **Res** fue evaluada en emulsiones de aceite de pescado en agua. Tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, el aceite de pescado empleado fue aceite de hígado de bacalao, *Gadus morhua*. La proporción de aceite en la emulsión fue de un 10% y el emulsificante empleado en todos los experimentos fue lecitina en una concentración del 1%. La activación térmica de los distintos ensayos estuvo comprendida entre 35 y 50 °C.

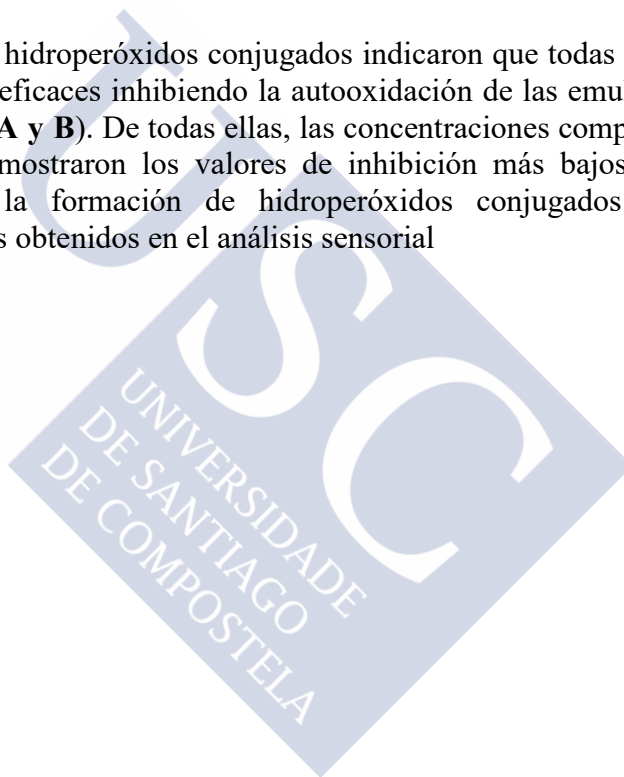
Con objeto de fijar las concentraciones objeto de estudio través de ensayos preliminares, se estudió la actividad antioxidante de **Res** en emulsiones de aceite en agua a distintas

concentraciones. Las muestras fueron suplementadas con 10, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm de **Res** y los experimentos de oxidación se realizaron a 35 °C. Las muestras control no contenían aditivos.

La extensión de la oxidación se estudió a lo largo de 11 días mediante el análisis sensorial y la determinación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados.

La evaluación sensorial mostró que todas las muestras suplementadas con concentraciones de **Res** superiores a 50 ppm inhibieron el desarrollo de aromas asociados a la rancidez derivada de la oxidación lipídica. Los controles sin aditivos desarrollaron una rancidez incipiente en el día 9, evolucionando a rancidez significativa a partir del día 10. Las muestras suplementadas con las concentraciones más bajas, 10 y 25 ppm, presentaron rancidez incipiente a y desarrollaron una rancidez clara en el día 11. Las muestras tratadas con 50 ppm de **Res** comenzaron a desarrollar una rancidez incipiente a partir del día 11.

Los resultados de los hidroperóxidos conjugados indicaron que todas las concentraciones de **Res** ensayadas fueron eficaces inhibiendo la autooxidación de las emulsiones de aceite de pescado a 35 °C (**Fig. 38 A y B**). De todas ellas, las concentraciones comprendidas entre 10 y 50 ppm fueron las que mostraron los valores de inhibición más bajos siendo las menos efectivas para impedir la formación de hidroperóxidos conjugados. Estos resultados confirmaron los resultados obtenidos en el análisis sensorial



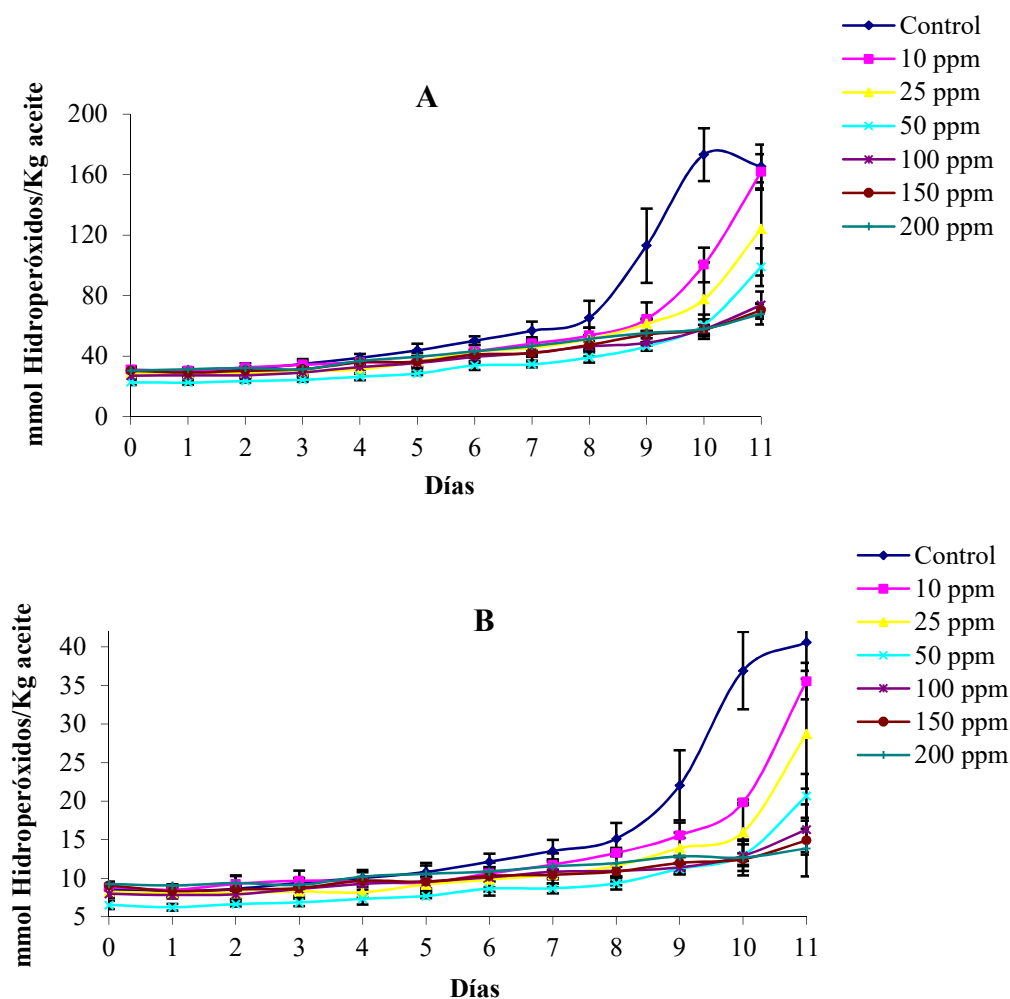


Fig. 38 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Res** (10, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm) y almacenadas a 35 °C.

A la vista de las gráficas, los períodos de inducción fueron de 8 días para las muestras control, 9,5 días para las muestras tratadas con 10 ppm de **Res**, 10 días para las muestras suplementadas con 25 y 50 ppm. No se observó período de inducción para aquellas muestras que contenían **Res** en una concentración superior a 50 ppm.

Los porcentajes de inhibición de la oxidación se evaluaron a día 10 durante la etapa de propagación de las muestras control. Los resultados se muestran en la **Tab. 27**.

Fenol	% I (día 10)	
	Dienos conjugados	Trienos conjugados
10 ppm	51,01 ± 7,97	60,22 ± 1,29
25 ppm	66,59 ± 12,15	73,78 ± 13,33
50 ppm	78,75 ± 4,80	84,39 ± 5,01
100 ppm	80,73 ± 4,51	84,66 ± 6,87
150 ppm	80,86 ± 2,06	86,18 ± 2,63
200 ppm	80,61 ± 0,05	85,40 ± 1,06

Tab. 28 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Res** (10, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm) y almacenadas a 35 °C (media ± st).

Los porcentajes de inhibición de las distintas concentraciones de **Res** ensayadas estuvieron en el rango del 51,01- 86,18 %. Por lo tanto, todas las concentraciones fueron marcadamente efectivas en la inhibición del desarrollo de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite en agua. Destacan las concentraciones superiores a 50 ppm ya que presentaron un poder de inhibición superior al 80 % en las etapas finales del experimento.

En resumen, todas las concentraciones ensayadas de **Res** fueron eficaces a la hora de inhibir el desarrollo de la rancidez en emulsiones de aceite de pescado en agua al retrasar y reducir la formación de los productos de oxidación. Para llevar a cabo los experimentos de oxidación con los distintos derivados de **Res** se seleccionó, por tanto, la concentración de 100 ppm.

5.2.6.1. Estudio de la inhibición de derivados acilados de resveratrol en emulsiones de aceite de pescado en agua.

Al igual que los ensayos realizados en aceite de pescado, estos estudios se llevaron a cabo empleando dos derivados acilados de distinta longitud de cadena, C18 y C2 en las posiciones 3 y 4' del **Res**.

Los ensayos llevados a cabo con **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** incluyeron la suplementación de emulsiones de aceite en agua con 100 ppm de estos fenolípidos. Como ya se ha indicado, las muestras control no contenían ningún aditivo y se empleó **Hyd** como control positivo de inhibición de la oxidación. Los distintos sistemas se activaron térmicamente a 35 °C y los experimentos se extendieron durante 6 días.

El análisis sensorial mostró que tanto las muestras control como las muestras que incluían los derivados acilados desarrollaron rancidez a partir del día 3, mientras que las muestras tratadas con **Hyd** y **Res** mostraron rancidez incipiente sobre el día 6.

La determinación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 39 A y B**) confirmó los resultados obtenidos en el análisis sensorial. El **Res** mostró un comportamiento similar al **Hyd** siendo ambos eficaces para mantener niveles bajos los valores de dienos y trienos conjugados mientras que los compuestos **Res-3-C18** y **Res-4'-C18**, presentaron

concentraciones de dienos y trienos conjugados similares a los de las muestras control durante todo el experimento.

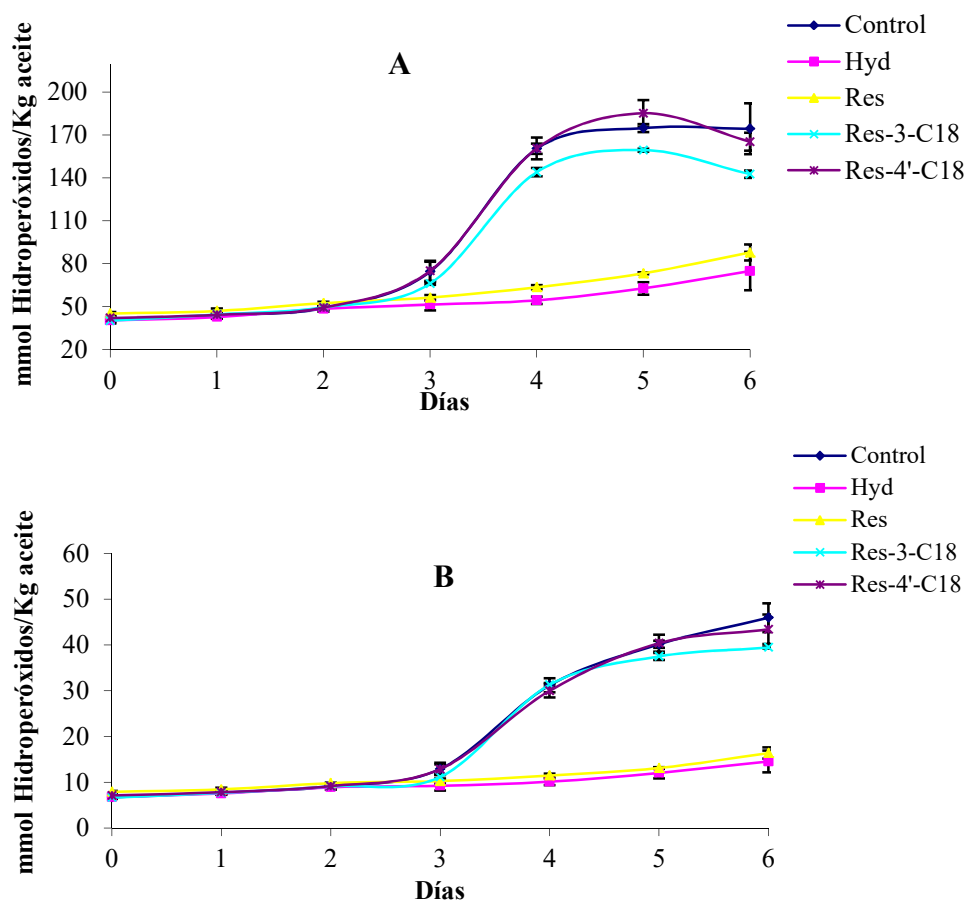


Fig. 39 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Hyd, Res, Res-3-C18 y Res-4'-C18 (100 ppm) y almacenadas a 35 °C.

Los porcentajes de inhibición de Res y sus estearil derivados se evaluaron a día 6 en la etapa de propagación de la oxidación de los controles (Tab. 29).

Fenol	% I (día 6)			
	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	Sin EtOH	Con EtOH	Sin EtOH	Con EtOH
Hyd	74,48 ± 10,09	89,35 ± 3,58	80,13 ± 6,11	88,32 ± 3,67
Res	64,77 ± 1,98	83,84 ± 3,29	75,41 ± 0,51	85,14 ± 3,80
Res-3-C18	18,39 ± 9,85	19,67 ± 14,69	12,23 ± 9,54	18,78 ± 10,68
Res-4'-C18	6,74 ± 8,02	-21,04 ± 6,99	6,51 ± 9,96	-15,55 ± 4,13

Tab. 29 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res, Res-3-C18 y Res-4'-C18 (100 ppm) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 35 °C (media ± sd).

El **Res** presentó una elevada actividad antioxidante en emulsiones de aceite de pescado en agua y similar a la del **Hyd** mientras que **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** apenas presentaron actividad. Dada la diferencia en concentración molar entre **Res** (0,44 mM) y sus derivados estearilo (0,20 mM), no se puede asegurar que la introducción de la cadena alquilo sea el factor determinante en la disminución de la capacidad antioxidante con respecto a la molécula original. Sin embargo, los datos obtenidos sí sugieren que la posición en la que se produce la acilación sí influye notablemente en la efectividad. Tal y como ya se había observado previamente en el estudio de la inhibición de la oxidación de estos compuestos en aceite de pescado, la presencia o no del hidroxilo libre en la posición 4', parece jugar un papel importante en la actividad antioxidante de este tipo de compuestos puesto que los valores calculados para **Res-4'-C18** fueron los peores de todos los compuestos fenólicos ensayados.

Debido a la disminución de la polaridad al introducir un grupo alquilo de cadena larga, se llevó a cabo el mismo experimento adicionando el antioxidante en disolución etanólica para facilitar su dispersión en el seno de la emulsión. Los antioxidantes se añadieron en un pequeño volumen de EtOH con respecto al volumen de emulsión (1:100). A las muestras control se les adicionó la misma cantidad de EtOH sin compuestos fenólicos (**Fig. 40 A y B**).



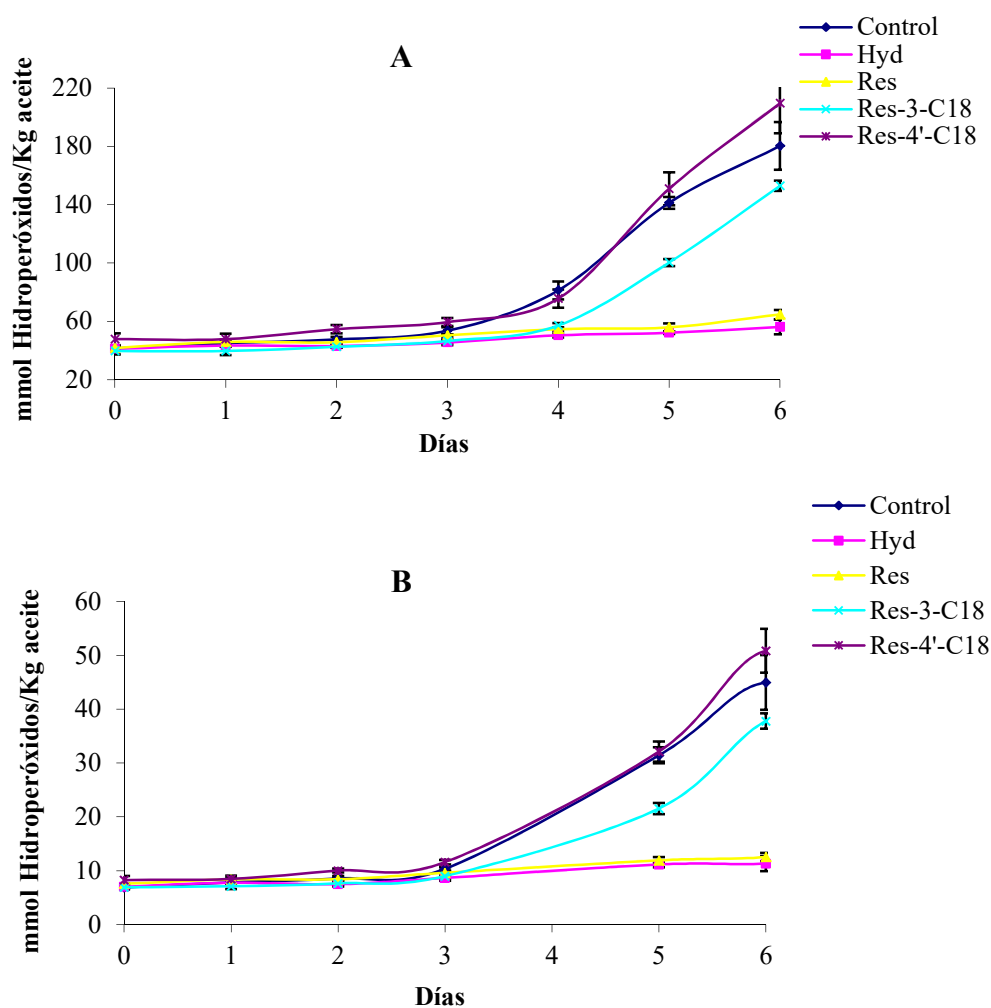


Fig. 40 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Hyd**, **Res**, **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** (100 ppm) y almacenadas a 35 °C en presencia de EtOH.

La adición de esta pequeña cantidad de EtOH provocó un ligero incremento en la efectividad antioxidante de **Hyd** y **Res**. Sin embargo, no se produjo ningún cambio en el comportamiento de los dos derivados estearilo desde el punto de vista de la oxidación lipídica.

Los porcentajes de inhibición (**Tab. 28**) obtenidos en presencia de EtOH para **Hyd** y **Res** aumentaron ligeramente, en comparación a los que se habían obtenido en ausencia de EtOH.

Dada la baja efectividad mostrada por los derivados estearilo, a la hora de evaluar la capacidad antioxidante de los acetyl derivados de **Res** (**Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2**), se incrementó la concentración del antioxidante en la emulsión a 0,75 mM. Las muestras se activaron térmicamente a 50 °C y se estudió el desarrollo de la oxidación durante 6 días. Los distintos compuestos fenólicos se añadieron en una disolución etanólica y a las muestras control se les añadió el mismo volumen de EtOH.

La oxidación se determinó mediante el análisis sensorial y las medidas de hidroperóxidos conjugados (**Fig 39 A y B**). Las cinéticas de formación de estos compuestos mostraron claramente el período de inducción y el período de propagación de la oxidación.

La evaluación sensorial de la oxidación mostró que las muestras control, sin compuestos fenólicos, mostraron una rancidez incipiente a partir del día 5, evolucionando a rancidez clara un día después. Las muestras suplementadas con **Res-3,4'-C2** presentaron una rancidez incipiente en el día 6 y evolucionaron a rancidez significativa en el día 7. Las muestras tratadas con **Res**, **Res-3-C2** y **Res-4'-C2** exhibieron una rancidez incipiente a día 7, en la etapa final del estudio.

La determinación de los niveles de hidroperóxidos conjugados durante el desarrollo de la oxidación lipídica se muestran en la **Fig. 41 (A y B)**. Las cinéticas de formación de los dienos y trienos conjugados fueron muy similares y los resultados cualitativos fueron semejantes. **Res** y sus monoacetil derivados fueron capaces de mantener los niveles de hidroperóxidos en niveles inferiores a los que contenían las muestras control durante todo el experimento. Las muestras suplementadas con **Res-3,4'-C2** experimentaron un fuerte incremento en la concentración de dienos y trienos conjugados a partir del día 5 y 6, respectivamente. Los resultados obtenidos confirmaron los observados en la evaluación sensorial del desarrollo de la oxidación lipídica.

Los períodos de inducción determinados a partir de las cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados se muestran en la **Tab. 30**.

Fenol	Período de inducción (días)	
	Dienos conjugados	Trienos conjugados
Control	4	4
Res	5,75	6
Res-3-C2	5,75	6
Res-4'-C2	5,75	6
Res-3,4'-C2	5	5,25

Tab. 30 Períodos de inducción de los dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite de pescado en agua tratada con 0,75 mM de **Res**, **Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2**, durante su almacenamiento a 50 °C.

A la vista de los resultados, **Res** y todos sus derivados acetilados consiguieron incrementar el período de inducción de los hidroperóxidos conjugados siendo los más efectivos, **Res**, **Res-3-C2** y **Res-4'-C2**.

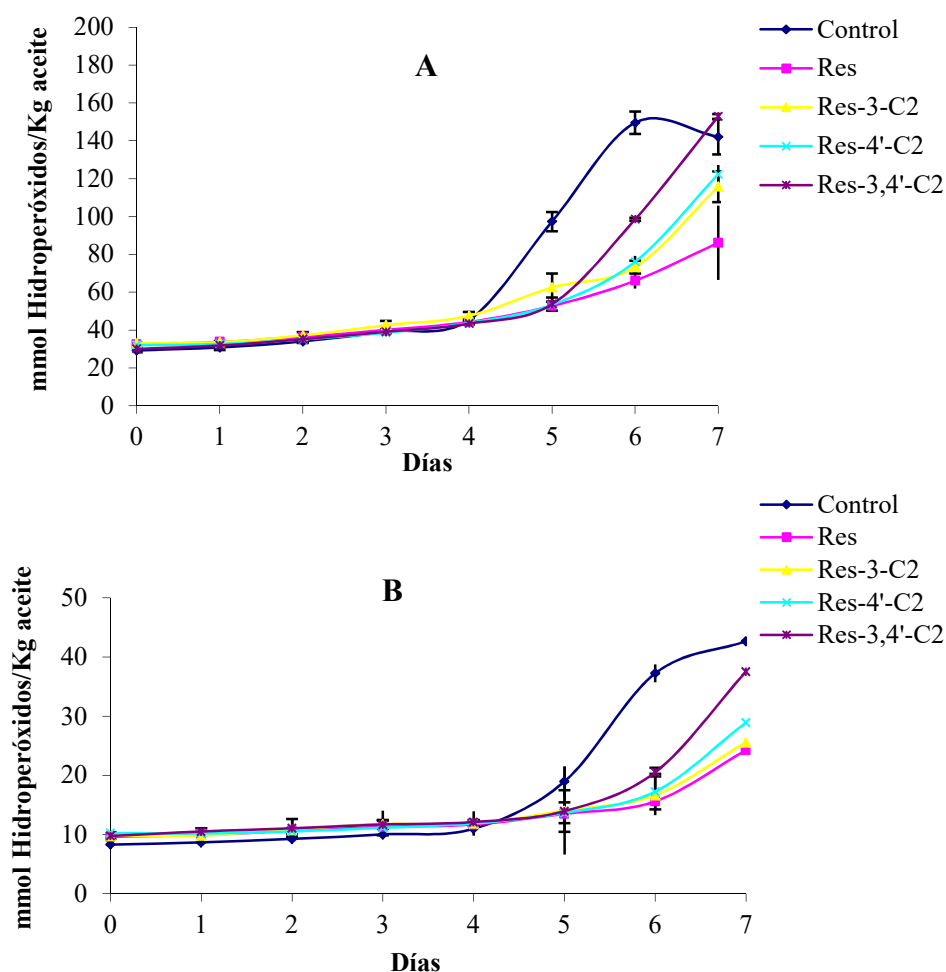


Fig. 41 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Res, Res-3-C2, Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2 (0,75 mM) y almacenadas a 50 °C.

Los porcentajes de inhibición para dienos y trienos conjugados se calcularon en los días 6 y 7, respectivamente (Tab. 31). Los porcentajes de inhibición en la formación de los dienos conjugados de Res, Res-3-C2 y Res-4'-C2 se mantuvieron en el rango 63,35-69,92%, por lo tanto, estos compuestos resultaron ser significativamente efectivos en las primeras etapas de oxidación. La efectividad disminuyó ligeramente para el caso de los trienos conjugados. Res-3,4'-C2 presentó una baja efectividad en la inhibición de ambos, dienos y trienos conjugados.

Fenol	Dienos conjugados	Trienos conjugados
	% I (día 6)	% I (día 7)
Res	69,92 ± 0,83	63,75 ± 1,92
Res-3-C2	66,61 ± 2,90	53,17 ± 5,36
Res-4'-C2	63,35 ± 2,61	57,33 ± 1,65
Res-3,4'-C2	39,78 ± 4,39	27,97 ± 5,23

Tab. 31 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res, Res-3-C2, Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2 (0,75 mM) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 50 °C (media ± sd).

5.2.6.2. Estudio de la inhibición de derivados glucosilados de resveratrol en emulsiones de aceite de pescado en agua.

Los derivados glucosilados de **Res** se ensayaron en las emulsiones de aceite de pescado en agua en una concentración de 100 ppm en una disolución etanólica. Los sistemas se activaron térmicamente a 40 °C y la evolución de la oxidación se estudió durante 10 días.

Los primeros experimentos consistieron, al igual que en el aceite de pescado, en el estudio de la influencia de la introducción de una o dos unidades de glucosa en el **Res**. Los derivados glucosilados estudiados fueron: **Res-3-Glu**, **Res-3,4'-Glu** y **Res-3,5-Glu**.

El análisis sensorial mostró que las muestras suplementadas con **Res**, **Res-3-Glu**, y **Res-3,5-Glu** fueron capaces de inhibir la formación de aromas asociados a la rancidez hasta el día 9 donde mostraron el desarrollo de una rancidez incipiente. Sin embargo, las muestras que contenían **Res-3,4'-Glu** desarrollaron una elevada rancidez a día 9 al igual que las muestras control sin compuestos fenólicos añadidos.

La determinación de la concentración de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados a lo largo del tiempo de incubación permitió confirmar los datos obtenidos en el análisis sensorial. Las cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados se muestran en la **Fig. 42 (A y B)**. Las muestras que contenían **Res**, **Res-3-Glu**, y **Res-3,5-Glu** presentaron concentraciones inferiores de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados que las muestras control y las muestras suplementadas con **Res-3,4'-Glu** durante todo el experimento. Las muestras control y las muestras tratadas con **Res-3,4'-Glu** experimentaron un fuerte incremento en la concentración de dienos y trienos conjugados en el día 9, mientras que para las muestras a las que se les había adicionado **Res-3,5-Glu**, este incremento fue moderado. **Res-3,4'-Glu** mostró un comportamiento prooxidante en las etapas finales de la oxidación.

Los períodos de inducción en la formación de dienos y trienos conjugados, obtenidos a partir del análisis de las cinéticas de oxidación correspondientes, fueron de 8 días para las muestras control y las tratadas con **Res-3,4'-Glu** y **Res-3,5-Glu** y se retrasó un día para las muestras que contenían **Res** y **Res-3-Glu**.

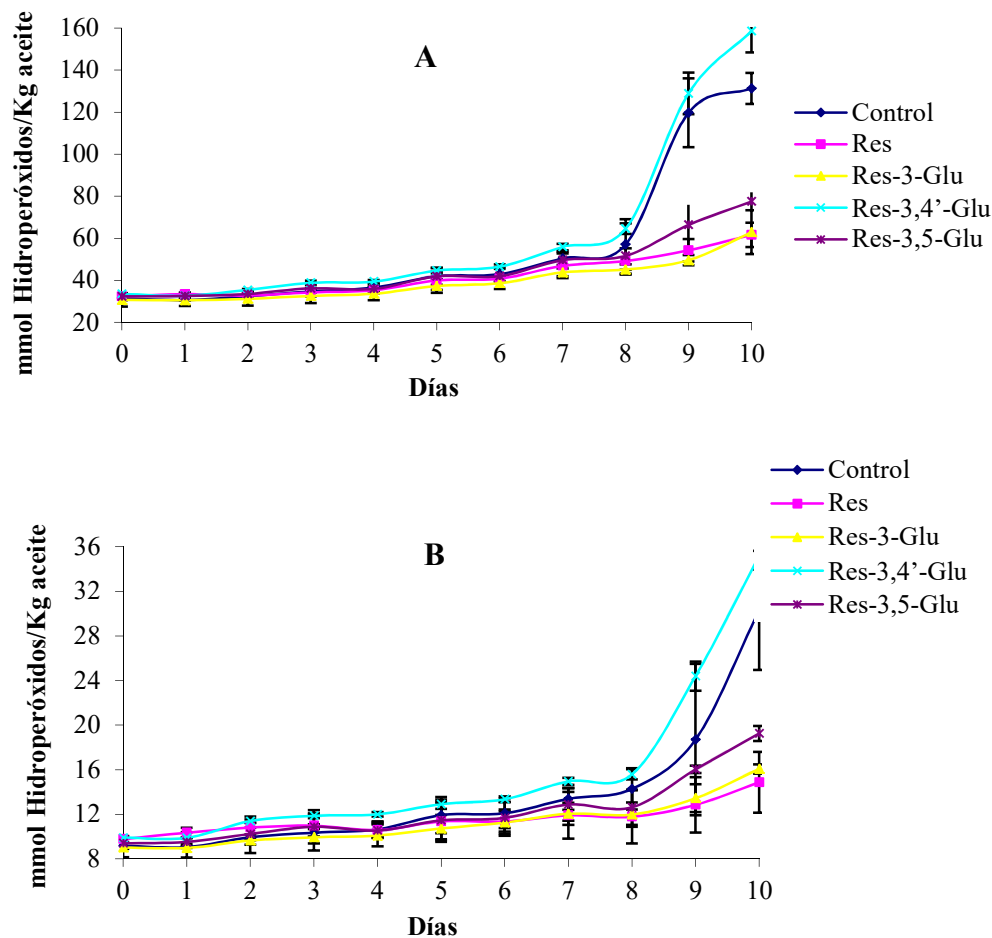


Fig. 42 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Res, Res-3-Glu, Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.

Los porcentajes de inhibición en la formación de dienos y trienos conjugados de Res, Res-3-Glu, Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu se evaluaron durante la etapa de propagación de la oxidación de las muestras control a día 10 (Tab. 32).

Fenol	Dienos conjugados	Trienos conjugados
	% I (día 6)	% I (día 7)
Res	70,45 ± 4,41	75,39 ± 11,33
Res-3-Glu	75,14 ± 5,04	69,65 ± 3,06
Res-3, 4'-Glu	-19,85 ± 2,68	-17,18 ± 3,12
Res-3,5-Glu	54,41 ± 6,40	52,79 ± 6,00

Tab. 32 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res, Res-3-Glu, Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 40 °C (media ± sd).

Res-3-Glu mostró una elevada capacidad de inhibición en la formación de dienos y trienos conjugados con un porcentaje de inhibición similar al calculado para el **Res**. Sin embargo, es preciso considerar que la concentración molar en el seno de la emulsión de **Res-3-Glu** (0,26 mM) es inferior que la del **Res** (0,44 mM), y por tanto, su grado de eficacia es potencialmente superior al **Res**. Por lo tanto, en emulsiones de aceite en agua, la adición de una unidad de glucosa a la molécula de **Res** se tradujo en un incremento en la efectividad antioxidante.

Asimismo, no se aprecia una gran diferencia entre los valores de los porcentajes de inhibición de **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu**. Ambos compuestos fueron añadidos en concentraciones molares de 0,26 mM y 0,18 mM, respectivamente y no a diferencias en el comportamiento antioxidante. Sin embargo, **Res-3,4'-Glu** y **Res-3,5-Glu**, que se adicionaron en la misma concentración molar (0,18 mM), exhibieron comportamientos desde el punto de vista de la inhibición a la oxidación lipídica, totalmente opuestos. Estos resultados sugieren que, de nuevo, el hidroxilo de la posición 4' es crítico para la efectividad antioxidante de los derivados de resveratrol.

A continuación se evaluó el efecto de la lipofilización en el hidroxilo de la posición 6 de la unidad de glucosa de **Res-3-Glu**. Tal y como ya se ha mencionado, el **Res-3-Glu**, se identificará como **Pic**. Los compuestos estudiados fueron: **Pic-C4**, **Pic-C8**, **Pic-C12**, **Pic-C16** y **Pic-C18**. Al igual que en los experimentos descritos previamente, los distintos fenolípidos se añadieron en disolución etanólica para facilitar la dispersión del antioxidante en el seno de la emulsión. El mismo volumen de etanol se añadió a las muestras control. La concentración de fenolípidos en la emulsión fue de 100 ppm y las muestras se almacenaron a 40 °C prolongándose el experimento de oxidación durante 10 días.

La evaluación sensorial manifestó que las muestras control sin aditivos y todas las muestras suplementadas con los distintos fenolípidos manifestaron una rancidez incipiente en el día 7. Sólo las muestras tratadas con **Pic** mantuvieron el sistema libre de aromas asociados a la rancidez hasta el día 9. A partir del día 8, las muestras control y las muestras suplementadas con **Pic-C8** y **Pic-C18** desarrollaron una rancidez evidente y en las emulsiones que contenían **Pic-C4**, **Pic-C12** y **Pic-C16**, el desarrollo claro de la rancidez ocurrió a partir del día 10.

Las cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados se muestran en la **Fig. 43 (A y B)**. **Pic** y todos sus derivados acilados fueron capaces de mantener los niveles de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados por debajo de los niveles de las muestras control. Claramente **Pic** fue el más eficaz inhibiendo la formación de los productos de oxidación. Asimismo, considerando la serie de los derivados acilados, los derivados **Pic-C12** y **Pic-C16** resultaron ser los compuestos que presentaron los valores de dienos más bajos a lo largo de todo el experimento. Estas diferencias fueron menores cuando se analizaron las cinéticas de los trienos conjugados.

Los períodos de inducción determinados a partir de las cinéticas de dienos y trienos conjugados fueron de 4 días para el **Pic** y de 3 días para los derivados acilados de **Pic**.

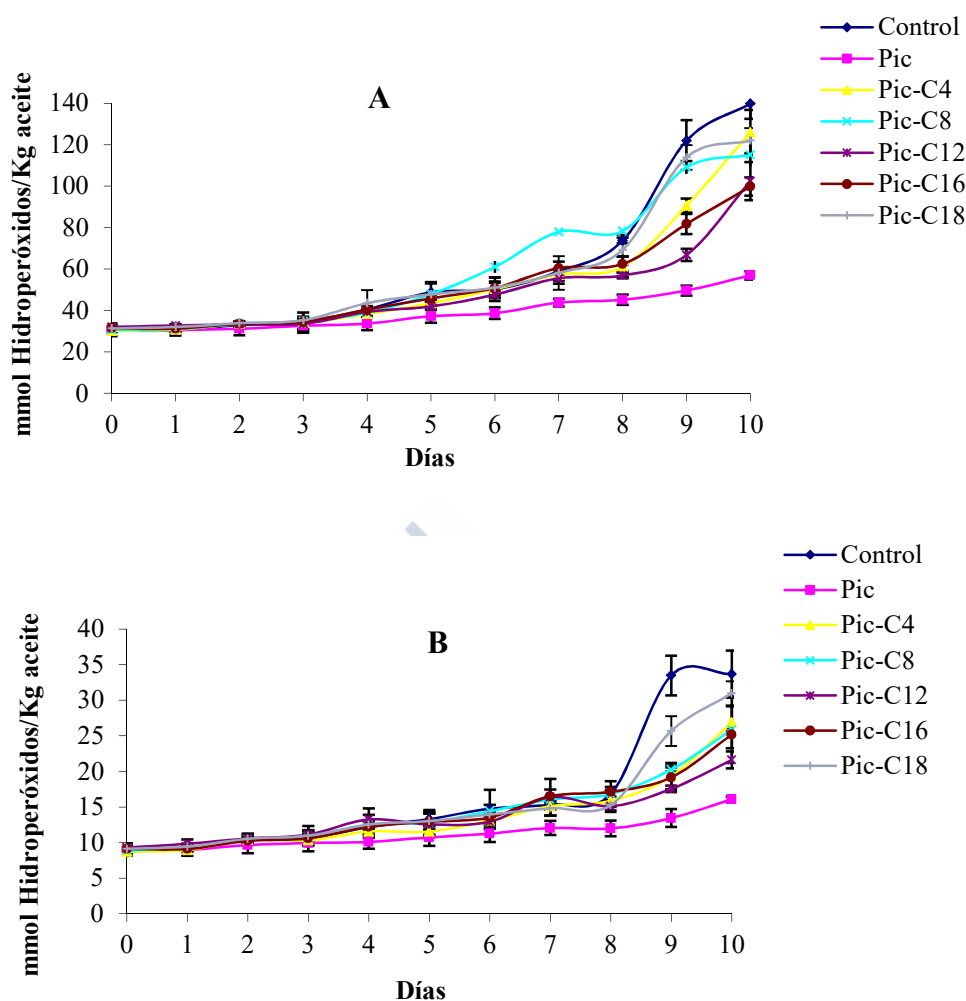


Fig. 43 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Pic, Pic-C4, Pic-C8, Pic-C12, Pic-C16 y Pic-C18 (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.

Los porcentajes de inhibición fueron determinados en el día 9 de la etapa de propagación de los controles (Tab. 33).

Fenol	mM (100 ppm)	% I (día 9)	
		Dienos conjugados	Trienos conjugados
Pic	0,26	80,81 ± 0,94	82,11 ± 1,57
Pic-C4	0,22	38,69 ± 4,00	64,28 ± 3,89
Pic-C8	0,19	47,13 ± 3,69	54,19 ± 0,57
Pic-C12	0,17	64,30 ± 2,84	66,16 ± 1,41
Pic-C16	0,16	48,99 ± 3,65	59,30 ± 7,81
Pic-C18	0,15	18,89 ± 3,48	32,99 ± 6,40

Tab. 33 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Pic, Pic-C4, Pic-C8, Pic-C12, Pic-C16 y Pic-C18 (100 ppm) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 40 °C (media ± sd).

Los derivados acilados con longitud de cadena media-larga (C8-C16) presentaron un mayor porcentaje de inhibición que **Pic-C4** a pesar de encontrarse en una menor concentración molar, en consecuencia, puede deducirse que presentaron mayor efectividad frente a la oxidación lipídica en emulsiones. Asimismo, la diferencia de actividad antioxidante observada entre **Pic-C18** y **Pic-C16** puede ser debida, no sólo a la diferencia de concentración (muy pequeña en este caso), si no a un diferente comportamiento frente a la oxidación debido a la estructura del propio fenolípido al incrementarse la longitud de cadena. Los mejores resultados se obtuvieron para el **Pic-C12**, considerando el nivel de hidroperóxidos formado así como el grado de inhibición de la formación de los mismos en relación a los controles.

5.2.7. Discusión de resultados.

Se ha descrito la influencia que distintas modificaciones estructurales efectuadas sobre la molécula de **Res** tienen en las propiedades antioxidantes in vitro, en su coeficiente de partición y en su efectividad para inhibir la oxidación lipídica en sistemas modelo de aceites de pescado y de emulsiones de aceite de pescado en agua. Estas modificaciones consistieron en:

- La introducción de grupos alquilo de distinta longitud de cadena en distintas posiciones del **Res** (3, 5 y 4').
- La introducción de residuos de glucosa de distinta longitud de cadena en distintas posiciones del **Res** (3, 4' y 5).
- La introducción de cadenas alquilo de distinta longitud en el residuo de glucosa introducido previamente en la molécula de **Res** (posición 6 del anillo de glucosa).

Los datos de log *P* mostraron que el incremento de la longitud de cadena del grupo alquilo introducido en la molécula produjo un incremento de la lipofilia con respecto a la molécula original. Por tanto, en la serie estudiada, los derivados C18 son los que muestran claramente una mayor lipofilia.

Asimismo, la adición de un residuo o dos de glucosa incrementó la polaridad de la molécula tal y como era esperado.

El relación a las propiedades antioxidantes in vitro, el estudio de la capacidad de captación de radicales de los derivados se llevó a cabo mediante la capacidad de captación del radical DPPH y la capacidad de captación del radical ABTS⁺. En ambos ensayos, el **Res** presentó una alta capacidad antirradicalaria y superior a todos los distintos fenolípidos derivados de **Res**. Los datos obtenidos están en concordancia con resultados recogidos en bibliografía en relación a la alta eficacia antioxidante de **Res** en comparación con otros antioxidantes naturales o artificiales como Trolox, BHT o propil galato en diversos ensayos in vitro (Soares, et al., 2003; Gülçin, 2010) o en comparación con su derivado glucosilado, **Pic** (Fauconneau, et al., 1997).

El estudio de la capacidad antirradicalaria de los derivados acilados mostró ciertas diferencias en función de la metodología empleada (**Tab. 34**). Todos los derivados acilados

mostraron una menor capacidad a la captación de radicales que el **Res**. La acilación en la posición 3 dio lugar a una mejor efectividad en la captación de DPPH que en la posición 4', mientras que, para el radical ABTS⁺, se obtuvieron mejores resultados cuando la acilación tenía lugar en la posición 4'. Stivala y col (Stivala, et al., 2001) obtuvieron que los 3-metil derivados de **Res** presentaron mejor capacidad antirradicalaria frente al DPPH, sin embargo, otros autores han obtenido mejores resultados para los 4'-acetil derivados de **Res** (Vlachogianni, et al., 2015) para DPPH. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los compuestos con mejor capacidad de captación de DPPH fueron **Res-3-C2** y **Res-3-C18**. En ambas series (C2 y C18), la acilación en 4' produjo una drástica disminución en la captación de DPPH. Estos resultados sugieren la importancia del grupo hidroxilo en la posición 4' desde el punto de vista de la captación del radical DPPH. Además, se observaron diferencias asociadas a la longitud de cadena del grupo alquilo, obteniéndose los mejores resultados para los compuestos con menor longitud de cadena. Lu y col. obtuvieron resultados similares para derivados de Gal (Lu, Z., et al., 2006) indicando que la presencia de grupos voluminosos pueden dar lugar a interacciones estéricas que pueden interferir en la adecuada disposición de los distintos compuestos para que tenga lugar la reacción. Además, resultados similares se han obtenido en esta tesis al evaluar la influencia de la longitud de cadena en la capacidad antioxidante de fenolípidos derivados de **Hyd** o de **Gal**.

Eficacia antirradicalaria	DPPH	TEAC	FRAP
MEJOR	Res	Res	Res
↓	Res-3-C2	Res-4'-C2	Res-3-C2
	Res-3-C18	Res-3-C2	Res-4'-C2
	Res-4'-C18	Res-4'-C18	Res-3-C18
	Res-4'-C2	Res-3,4'-C2	Res-4-C18
PEOR	Res-3,4'-C2	Res-3-C18	Res-3,4'-C2

Tab. 34 Orden de eficacia antirradicalaria en DPPH y TEAC y poder reductor (FRAP) para **Res** y derivados acilados de **Res**.

La abstracción del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo en 4' es más favorable que la abstracción de cualquiera de los hidrógenos de los hidroxilos de las posiciones 3 o 5 (Stojanović, et al., 2001; Sang, et al., 2002; Shang, et al., 2009; Szekeres, et al., 2010). Los cálculos teóricos sugieren que esta diferencia en las energías de los enlaces de los distintos hidrógenos es debida a la formación de 8 estructuras resonantes en el caso del hidrógeno de 4' y de sólo 4 en el caso de la abstracción de hidrógeno de los hidroxilos en 3 y 5 (Mikulski & Molski, 2010). Los mecanismos en la reacción de captación de radical DPPH implican un primer paso de abstracción del átomo de hidrógeno del antioxidante para dar lugar a difenil picril hidracina y un radical fenoxilo (Ancerewicz, et al., 1998) que posteriormente evoluciona a través de múltiples reacciones que incluyen dimerizaciones, formación de complejos o, incluso la donación de un segundo átomo de hidrógeno (Brand-Williams, et al., 1995).

Además la eficacia en la captación del radical DPPH de este tipo de compuestos es debida a la posibilidad de donar hidrógenos, de tal forma que cuanto mayor sea el número de

hidroxilos, mejor capacidad antirradicalaria frente al DPPH (Chen, C.-W. & Ho, 1995). Esto explicaría, además del efecto negativo de la acilación en la posición 4', la baja actividad de **Res-3,4'-C2**.

El orden de eficacia en el TEAC mostró que la acilación en la posición 4' fue más efectiva en la captación de radical ABTS⁺ que la acilación en la posición 3, corroborando también, la importancia del hidroxilo en la posición 3 en el caso de la efectividad en la captación del radical ABTS⁺. Además, el incremento de la longitud de cadena produjo una disminución en la capacidad de captación de ABTS⁺. Esta disminución en la capacidad de captación de este radical debida a la acilación en la posición 3 fue ya descrita previamente por Torres y col. en estos compuestos (Torres, et al., 2010).

La pérdida de la eficacia de captación de radicales de **Res-3-C18** con respecto al **Res** también fue observada por Oh y col. al estudiar el efecto de la lipofilización de **Res** en su actividad antioxidante (Oh & Shahidi, 2017).

Los datos referentes al poder reductor (determinados como FRAP) mostraron que el **Res** presentó la mayor capacidad de reducir el ion férrico y fue capaz de donar el mayor número de moles de electrones seguido de **Res-3-C2**. Los datos obtenidos sugirieron que la longitud de la cadena alquilo jugó un papel muy importante en la eficacia reductora de estos compuestos. El incremento de la longitud de cadena de C2 a C18, produjo una drástica disminución en el poder reductor. La posición de la acilación también resultó ser muy importante ya que, dentro de la serie de longitud de cadena corta, el bloqueo del hidroxilo de la posición 4' produjo una fuerte disminución en la capacidad reductora.

La introducción de un residuo de glucosa en la posición 3 (**Res-3-Glu**) produjo una ligera disminución en la capacidad de captación del radical DPPH y del poder reductor y que fue más acusada en el caso del TEAC. Estos datos concuerdan con los recogidos en estudios previos donde se confirma que los glucósidos presentan menor actividad reductora (Packer, et al., 1999; Heim, et al., 2002) y de captación de radicales (Fabris, et al., 2008) que las correspondientes agliconas.

Además, la introducción de una segunda unidad de glucosa en 4', provocó una drástica disminución en la capacidad antioxidante con respecto a **Res** y a **Res-3-Glu**. Asimismo, la adición de una segunda unidad de glucosa en la posición 5 provocó una disminución importante en la capacidad de captación de radicales mientras que el poder reductor disminuyó ligeramente en comparación con el derivado monoglucosilado. Estos resultados ya fueron observados por Sato y col. al estudiar la actividad antioxidante de distintos derivados glucosilados de **Res**, entre los que se incluían **Res-3-Glu** y **Res-3,4'-Glu** (Sato, et al., 2014).

La introducción de cadenas alquilo de distinta longitud de cadena en el hidroxilo de la posición 6 del residuo de glucosa de **Res-3-Glu (Pic)**, influyó en la capacidad antioxidante in vitro de **Pic**. Los derivados de menor longitud de cadena, **Pic-C4** y **Pic-C8**, presentaron mejores características antioxidantes que los derivados con mayor longitud de cadena, **Pic-C16** y **Pic-C18**. Estos últimos experimentaron una pérdida en la capacidad de captación de radicales y una importante disminución en el poder reductor en relación a **Pic**. Además, **Pic-C8** presentó mejor capacidad de captación de radical ABTS⁺ y mejor poder reductor que el **Pic**. Estos datos sugieren una longitud óptima de cadena para la que se obtienen los mejores

resultados relacionados con la capacidad antioxidante. La existencia de un óptimo ha sido también sugerida por Pereira-Caro y col. quienes concluyeron que la capacidad antioxidante de éteres lipofílicos de **Hyd** dependía de la longitud de cadena presentando mejores propiedades antioxidante in vitro, aquellos de longitud de cadena corta o media (Pereira-Caro, et al., 2009). Estos autores han atribuido el efecto encontrado a la ausencia de impedimentos estéricos para las cadenas más cortas en relación a las de mayor longitud, ya que las primeras poseen una estructura casi lineal.

La actividad antioxidante de **Res** y de los cinco derivados acilados se llevó a cabo en un sistema de aceite de pescado sometido a oxidación térmica. En una primera aproximación, **Res**, **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** se adicionaron en una concentración de 100 ppm que se corresponden a una concentración de 0,44 mM para el **Res** y de 0,20 mM para los estearil derivados de **Res**. En estas condiciones, **Res**, **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** presentaron una inhibición baja a la formación de productos procedentes de la oxidación lipídica. Teniendo en cuenta las concentraciones molares, **Res-3-C18** presentó mayor actividad antioxidante que el **Res** al encontrarse en menor concentración. Los datos obtenidos coinciden con los obtenidos por Oh y col. al evaluar el efecto de la lipofilización del **Res** (C3-C18) en la inhibición de la oxidación en aceite de maíz (Oh & Shahidi, 2018). El coeficiente de partición, $\log P$ obtenido para **Res**, y que coincide con datos publicados previamente (Privat, et al., 2002), y los calculados en este trabajo relativos a los dos derivados acilados de mayor cadena, indicaron que estos compuestos son relativamente hidrofóbicos y, en consecuencia, solubles en la matriz oleosa. Esto implica que tenderán a localizarse en el seno del aceite, lejos de la interfase aceite-aire donde tiene lugar la oxidación. Por lo tanto, el comportamiento antioxidante de estos compuestos es el predicho por la paradoja polar. Estos resultados coinciden con los descritos por Filip y col. que encontraron una baja actividad antioxidante de **Res** aceite de girasol y aceite de colza (Filip, et al., 2003).

Los experimentos con los derivados acetilados, **Res-3-C2**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2**, tal y como ya se explicó previamente, se llevaron a cabo a una concentración mayor (0,75 mM). **Res**, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** presentaron un elevado poder de inhibición al desarrollo de productos de oxidación lipídica sin diferencias significativas entre ellos. Sólo **Res-3-C2** presentó un bajo poder de inhibición. El incremento en la concentración de **Res** (de 0,44 mM a 0,75 mM) provocó un incremento en su actividad antioxidante (de 34,40% a 67,99%).

La posición de la acilación dio lugar a resultados diferentes en función de la longitud de la cadena introducida. Mientras que dentro de la serie de derivados con cadena corta, **Res-4'-C2** y **Res-3,4'-C2** mostraron la mejor efectividad, en el caso de los dos isómeros de cadena larga, fue **Res-3-C18** el que presentó mejor capacidad antioxidante. Hay que reseñar que la gran mayoría de los trabajos publicados que evalúan el efecto de la lipofilización de un compuesto en su capacidad de inhibir la oxidación lipídica, consideran una única posición de acilación. Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que es un factor muy importante a tener en cuenta.

La introducción de uno o dos residuos de glucosa no produjo un efecto significativamente positivo en la actividad antioxidante con respecto a la molécula original. Sólo **Pic** y **Res-3,5-Glu** presentaron una efectividad a las concentraciones ensayadas, si bien, el grado de inhibición fue limitado. De nuevo, al tener en cuenta las concentraciones molares, **Res-3,5-Glu** (0,18 mM) a encontrarse en menor concentración, presentó mejor capacidad antioxidante

que **Res** (0,44 mM) y que **Res-3-Glu** (0,256 mM). Por otro lado, **Res-3,4'-Glu** mostró un comportamiento prooxidante.

Estos resultados sugieren que un incremento de la polaridad de **Res** con la introducción de residuos de glucosa, incrementa la efectividad antioxidante en un sistema de aceite de pescado siempre y cuando el hidroxilo de la posición 4' no esté sustituido.

La acilación en el hidroxilo de la posición 6 del residuo de glucosa de **Pic** produjo diferencias importantes en la capacidad antioxidante de **Pic**. Los derivados acilados de mayor longitud de cadena (C12-C18) resultaron ser más efectivos frente al desarrollo de la oxidación lipídica en un sistema de aceite de pescado que **Pic**. Los derivados de menor longitud de cadena presentaron un comportamiento prooxidante. Estos resultados contradicen la paradoja polar ya que los compuestos más lipofílicos son los que presentaron una mejor actividad antioxidante en un sistema de aceite de pescado. Resultados similares contradiciendo la paradoja polar ya se han descrito previamente en bibliografía para diversas familias de compuestos fenólicos. Murata y col. (Murata, et al., 2004) estudiaron la relación entre la naturaleza hidrofóbica y la actividad antioxidante de diversos flavonoides (luteolina, fisetina, kaempferol, quercetina y rutina) y encontraron que la lipofilia era un factor importante a tener en cuenta cuando se estudiada la capacidad antioxidante estos compuestos en una matriz oleosa, ya que la efectividad de estos compuestos aumentaba con la lipofilia. Viskupicova y col (Viskupicova, et al., 2010) evaluaron la influencia de la lipofilia en derivados acilados de rutina (C4-C18) en aceite de girasol mediante el test de Rancimat y encontraron que los ésteres de rutina más lipofílicos presentaron mejores características antioxidantes en una matriz oleosa, resultados que coinciden con los obtenidos al estudiar la capacidad de inhibición de **IQ** y sus derivados acilados en aceite y que se describirá posteriormente en esta memoria.

Recientemente, Lue y col. (Lue, et al., 2017) estudiaron la eficacia antioxidante de rutina y ésteres de rutina en aceite (aceite de colza-aceite de bacalao al 50%) en diferentes concentraciones. Estos autores observaron que la rutina, con un carácter más hidrofílico que sus ésteres, presentó mayores características antioxidantes. Sin embargo, al comparar su comportamiento antioxidante con el laurato de rutina y el palmitato de rutina, sus resultados mostraron que el palmitato de rutina, más lipofílico, presentó mejor capacidad de inhibición que el laurato de rutina, menos lipofílico. Se han expuesto numerosas hipótesis en relación a este comportamiento. Los aceites comerciales pueden contener trazas de agua, esteroides, mono y diacilgliceroides etc. Estos compuestos minoritarios presentan actividad superficial y pueden agregarse dando lugar a la formación de una pequeñísima interfase aceite-agua. Estas estructuras principalmente son de tipo laminar o micelas reversas (núcleo de agua a nanoescala estabilizado por una monocapa de moléculas surfactantes con sus cabezas polares orientadas hacia el núcleo de agua y las cadenas alifáticas hacia el medio lipídico (Xenakis, et al., 2010). Estas micelas permiten nuevas interacciones entre todos los componentes que forman parte del sistema y pueden alterar, de forma significativa las velocidades de reacción entre los distintos componentes del sistema (Ghosh & Tiwary, 2001).

En relación a la inhibición de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite de pescado en agua, **Res** y sus distintos derivados mostraron un comportamiento antioxidante diferente al que fue observado en los sistemas de aceite de pescado. Todos los compuestos mostraron de manera general una eficacia moderada frente a la oxidación lipídica. Asimismo, la adición de

una pequeña cantidad de EtOH produjo un incremento en la efectividad de **Res**. Ello fue debido a una mejor localización del compuesto antioxidante en la interfase aceite-agua, lugar donde tiene lugar la oxidación. (Sigfusson & Hultin, 2002).

El estudio de la influencia de la acilación en la capacidad antioxidante de **Res** en su emulsiones de aceite en agua mostró una dependencia clara con la longitud de la cadena del grupo acilo. **Res** y sus mono acetil derivados (**Res-3-C2** y **Res-4'C2**) presentaron una elevada capacidad antioxidante. En contraposición, los derivados estearilo de mayor tamaño, **Res-3-C18** y **Res-4'-C18** apenas fueron capaces de inhibir la formación de los productos de oxidación lipídica. Estos resultados sugieren que el factor determinante de la efectividad fue la longitud de la cadena indistintamente de la posición donde estaba localizada. Recientemente, Oh y col. han obtenido resultados similares al estudiar el efecto de la lipofilización de **Res** en su capacidad de inhibición en emulsiones de aceite en agua empleando el test del β -caroteno (Oh & Shahidi, 2018).

La baja efectividad de los derivados acilados de cadena larga con respecto al **Res** no puede justificarse únicamente por encontrarse en una menor concentración molar (0,44 mM, **Res**, 0,20 mM, **C18**). Los resultados experimentales mostraron que los cambios en la polaridad de la molécula debido a la incorporación de un ácido graso de cadena larga, no favorecieron la incorporación de estos derivados a la interfase de la emulsión. Debido a su baja polaridad, estos compuestos estarán localizados en el interior de la gota de aceite, lejos de la interfase donde tiene lugar la oxidación lipídica en estos sistemas. Ya se ha comentado en el apartado anterior que la acilación de **Hyd** con ésteres de longitud de cadena media da lugar a compuestos con mejor efectividad antioxidante en emulsiones de aceite en agua que el propio **Hyd** o los ésteres de **Hyd** de cadena larga.

Laguerre y col. (Laguerre, et al., 2009, 2010) han observado un efecto parabólico o “cut-off” al estudiar el comportamiento antioxidante en ésteres del ácido clorogénico y del ácido rosmarínico en emulsiones de aceite en agua. Sus resultados muestran una longitud de cadena óptima (dodecil clorogenato y octil rosmarinato) en la que se obtienen la mayor capacidad antioxidante.

Se han propuestos diversas hipótesis que puedan explicar este comportamiento. Debido a que la localización del antioxidante en la interfase aceite-agua (Heins, et al., 2007) es de vital importancia para presentar una buena actividad antioxidante en emulsiones, parece lógico pensar que la distribución de los antioxidantes entre las distintas fases podría ser la clave para explicar este comportamiento parabólico. Sin embargo, Laguerre y col. (Laguerre, et al., 2009) no observaron una buena correlación con el coeficiente de partición y propusieron que los fenolípidos de cadena larga podrían estar implicados en la formación de micelas u otros agregados impidiendo (o entorpeciendo) su localización adecuada en la interfase de la emulsión. Otra posible razón que puede provocar este comportamiento puede ser debido a la disminución en la movilidad de estos compuestos debido al incremento en el tamaño molecular para los fenolípidos con mayor longitud de cadena (Fendler, 1982). De nuevo, la disminución en la difusión de los antioxidantes puede enmascarar la localización adecuada de estos compuestos en la interfase.

Además Lucas y col. (Lucas, et al., 2010) han encontrado una relación entre la capacidad antioxidante de ésteres de **Hyd** y su efectividad como surfactante en medios acuosos. Obtuvieron que los ésteres de ácidos grasos de **Hyd** con mayor actividad antioxidante, presentaban, al mismo tiempo, mejores propiedades surfactantes. Esto es debido a que la unidad fenólica, responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante, es común a todas estas series de compuestos, y un surfactante efectivo, ubicaría el antioxidante preferentemente en la interfase aceite-agua, que es el lugar donde tiene lugar la oxidación lipídica en las emulsiones de manera más eficiente.

Posteriormente Costa y col. demostraron que la fracción de antioxidantes en la región interfacial de las emulsiones no se correlaciona directamente con la hidrofobicidad del antioxidante al estudiar la eficacia antioxidante y la concentración en la región interfacial de ácido cafeico y sus alquil ésteres (C1-C16) en emulsiones de aceite de oliva (Costa, et al., 2015).

Los derivados glucosilados de **Res**, **Res-3-Glu** y **Res-3,5-Glu** inhibieron de forma bastante efectiva la formación de productos de oxidación lipídica. Tal y como se ha indicado, al tener en consideración las concentraciones molares de dichos compuestos, resultaros ser más efectivos que **Res**. La incapacidad de inhibición del derivado glucosilado, **Res-3,4'-Glu** mostrando incluso un comportamiento prooxidante, en contraposición al otro derivado diglucosilado, parece estar relacionado con la presencia o ausencia del hidroxilo en la posición 4' libre de acuerdo con los resultados de DPPH y TEAC.

Si tenemos en cuenta la polaridad de los compuestos diglucosilados, el valor negativo de $\log P$ indica que deben estar localizados preferentemente en el seno de la fase acuosa mientras que, **Pic** y **Res** con valores muy bajos para $\log P$, pero positivos se distribuirían mejor en la interfase aceite-agua. Estos resultados están en concordancia con la paradoja polar que indica que un incremento en la polaridad de los antioxidantes produce un decrecimiento en la efectividad antioxidante en emulsiones de aceite en agua. Sin embargo, la paradoja polar no es capaz de explicar los comportamientos opuestos de ambos derivados diglucosilados de **Res**. En consecuencia, tal y como ya se ha indicado previamente, esta pérdida de efectividad debe de estar relacionado con la pérdida del hidroxilo de la posición 4'.

Por último, los resultados de la acilación en la posición 6 de la unidad de glucosa de **Pic** sugieren una relación no lineal entre el incremento de la longitud de cadena y la efectividad antioxidante, al menos entre los ésteres de longitud de cadena comprendidos entre C4 y C16. **Pic-C4** que se adicionó en mayor concentración molar en relación a los demás componentes de la serie, presentó la menor efectividad antioxidante de todos los derivados acilados, contradiciendo, de nuevo, la paradoja polar. Los mejores resultados se obtuvieron para **Pic-C12**. En relación a **Pic-C18** parece que su baja efectividad además de ser debida a su concentración en el seno de la emulsión, también puede estar influenciada por la propia estructura de compuesto. Se trataría del efecto “cut off” ya mencionado anteriormente.

Puede concluirse que, en sistemas de aceite de pescado el **Res** mostró una baja actividad antioxidante y ninguna de las modificaciones introducidas mejoró su efectividad frente a la oxidación. En relación a sistemas emulsionados de aceite de pescado en agua, los resultados mostraron una alta eficacia antioxidante para **Res** y **Pic**. Asimismo, la lipofilización de **Res** con ácidos grasos de cadena larga (C18) y cadena corta (C2) mejora su efectividad en

emulsiones. La presencia del hidroxilo en la posición 4' ejerce un papel de significativa importancia para mantener la actividad antirradicalaria de estos compuestos.



5.3. DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO.

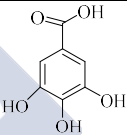
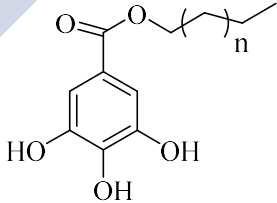
A continuación se presenta el efecto de una serie de modificaciones estructurales llevadas a cabo en la molécula de ácido gálico en su capacidad antioxidante. Estas modificaciones consistieron en:

- La introducción de grupos alquilo de distinta longitud de cadena.
- La introducción de una unidad de glucosa en C3 unido a la esterificación del ácido dando lugar a una serie homóloga de ésteres de ácido gálico glucosilado.

Siguiendo la estructura de los capítulos anteriores, el capítulo presenta dos partes, una primera destinada a la descripción de los parámetros físico-químicos de los compuestos a estudiar, y una segunda parte centrada en el estudio de las capacidades de estos compuestos para inhibir la oxidación de los sistemas lipídicos en aceite y emulsiones.

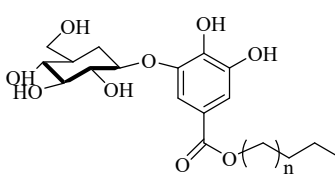
5.3.1. Síntesis y estabilidad.

El ácido gálico y sus derivados acilados, se representan en la **Tab. 35**.

Fenol	Abreviatura	Peso molecular	n	Estructura
Ácido Gálico	Gal-	170,12		
Galato de butilo	Gal-C4	226,08	1	
Galato de hexilo	Gal-C6	254,12	3	
Galato de octilo	Gal-C8	282,15	5	
Galato de decilo	Gal-C10	310,18	7	
Galato de dodecilo	Gal-C12	338,21	9	
Galato de hexadecilo	Gal-C16	394,27	13	
Galato de octildecilo	Gal-C18	422,30	15	

Tab. 35 Estructuras de ácido gálico y alquil derivados objeto de estudio.

Los derivados glucosilo de los alquil galatos (**Tab. 36**) se obtuvieron de forma estereoselectiva (configuración β) con buenos rendimientos (75-99%).

Fenol	Abreviatura	Peso molecular	n	Estructura
1-O-β-Glucosil galato de butilo	Glu-Gal-C4	388,14	1	
1-O-β-Glucosil galato de hexilo	Glu-Gal-C6	416,17	3	
1-O-β-Glucosil galato de octilo	Glu-Gal-C8	444,2	5	
1-O-β-Glucosil galato de decilo	Glu-Gal-C10	472,23	7	
1-O-β-Glucosil galato de dodecilo	Glu-Gal-C12	500,26	9	
1-O-β-Glucosil galato de hexadecilo	Glu-Gal-C16	556,32	13	
1-O-β-Glucosil galato de octadecilo	Glu-Gal-C18	584,36	15	

Tab. 36 Estructuras de los glucosil alquil galatos sintetizados.

Los resultados de los estudios de estabilidad de estos compuestos a través del análisis por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa con detector de diodos (Tab. 37) durante el almacenamiento a 4 °C, mostraron una elevada estabilidad de estos compuestos durante al menos cuatro meses en disolución alcohólica (etanol o metanol).

Fenol	Tiempo de retención (min)	λ (nm)
Gal	1,982	270,9
Gal-C4	5,230	273,3
Gal-C6	8,748	273,3
Gal-C8	12,670	273,3
Gal-C10	16,413	273,3
Gal-C12	19,725	273,3
Gal-C16	24,639	273,3
Gal-C18	26,311	273,3
Glu-Gal-C4	3,523	268,3
Glu-Gal-C6	6,0351	268,6
Glu-Gal-C8	9,621	268,6
Glu-Gal-C10	13,434	268,6
Glu-Gal-C12	17,091	268,6
Glu-Gal-C16	22,944	267,4
Glu-Gal-C18	25,020	267,4

Tab. 37 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV de Gal, alquil galatos y glucosil alquil galatos.

Todos los compuestos derivados de Gal presentaron un espectro de absorción muy similar al Gal con máximos de absorción alrededor de 268 nm para los glucosil alquil derivados y de 270 nm para los alquil derivados.

5.3.2. Coeficientes de partición: $\log P$.

Los coeficientes de reparto, $\log P$ de **Gal** y sus derivados se representan en la **Tab. 38**.

Fenol	$\log P$
Gal	$-2,3739 \pm 0,0142$
Gal-C4	$1,9115 \pm 0,0013$
Gal-C6	$1,7840 \pm 0,0237$
Gal-C8	$1,8079 \pm 0,0028$
Gal-C10	$2,0314 \pm 0,0085$
Gal-C12	$2,0334 \pm 0,0003$
Gal-C16	$1,8153 \pm 0,0018$
Gal-C18	$1,7136 \pm 0,1786$
Glu-Gal-C4	$0,4059 \pm 0,0047$
Glu-Gal-C6	$1,4524 \pm 0,0087$
Glu-Gal-C8	$1,7464 \pm 0,0067$
Glu-Gal-C10	$1,5915 \pm 0,0150$
Glu-Gal-C12	$1,2598 \pm 0,0082$
Glu-Gal-C16	$1,1864 \pm 0,0014$
Glu-Gal-C18	$1,1864 \pm 0,0015$

Tab. 38 Coeficientes de partición expresados como $\log P$ de **Gal**, alquil galatos y glucosil alquil galatos (media \pm sd).

Los valores obtenidos para $\log P$ muestran que, para ésteres con longitud de cadena comprendida entre C4 y C10, se produce un incremento $\log P$ a medida que se va incrementando la longitud de la cadena, y, en consecuencia, su hidrofobicidad. El **Gal-C12** mostró una lipofilia similar a **Gal-C10**. Sin embargo, el incremento de la longitud de cadena que se produce en los compuestos C16 y C18 tuvo como consecuencia una ligera disminución en la lipofilia en contraposición a lo esperado. Los resultados obtenidos para los derivados glucosilados muestran que, la introducción de un resto de glucosa, produjo un incremento en la polaridad y, en consecuencia, una disminución de $\log P$ en comparación con su correspondiente alquil derivado. De nuevo, se observa que para los glucosil derivados con longitud de cadena igual o superior a C10, se produce una disminución en la lipofilia dentro de su serie.

5.3.3. Capacidad antirradicalaria. DPPH

La capacidad de captación de radicales se evaluó por el método del DPPH. Los resultados obtenidos para todos los derivados de ácido gálico estudiados se muestran en la **Tab. 39**.

Fenol	DPPH (C ₅₀ , mM)	Fenol	DPPH (C ₅₀ , mM)
Gal	0,205 ± 0,001		
Gal-C4	0,227 ± 0,002	Glu-Gal-C4	0,479 ± 0,000
Gal-C6	0,253 ± 0,004	Glu-Gal-C6	0,458 ± 0,001
Gal-C8	0,264 ± 0,001	Glu-Gal-C8	0,614 ± 0,004
Gal-C10	0,255 ± 0,001	Glu-Gal-C10	0,496 ± 0,004
Gal-C12	0,238 ± 0,002	Glu-Gal-C12	0,490 ± 0,009
Gal-C16	0,261 ± 0,001	Glu-Gal-C16	0,674 ± 0,006
Gal-C18	0,258 ± 0,001	Glu-Gal-C18	0,500 ± 0,002

Tab. 39 Capacidad de captación de radical DPPH expresado como la concentración necesaria para captar el 50% de radical DPPH de **Gal**, alquil galatos y glucosil alquil galatos (media ± sd).

Todos los alquil galatos examinados presentaron una capacidad de captación de radical DPPH similar al ácido gálico. Si bien, las ligeras diferencias entre los distintos alquil galatos sugirieron una dependencia no lineal entre la capacidad antirradicalaria y el incremento de la longitud de la cadena.

La introducción de una unidad de glucosa provocó una disminución en la capacidad de captación de radical DPPH en relación al alquil galato correspondiente. De nuevo, los resultados indicaron una dependencia no lineal entre la actividad antirradicalaria y el incremento de la longitud de la cadena.

5.3.4. Capacidad reductora. FRAP

Tal y como se ha indicado anteriormente, el poder reductor de los distintos compuestos se evaluó mediante el método FRAP, que estima la capacidad reductora basándose en la habilidad del compuesto para reducir el hierro férrico a ferroso. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. 44 (A y B)**.

Todos los alquil derivados mostraron una capacidad reductora menor que el **Gal**. Esta reducción fue lineal según se iba incrementando la longitud de la cadena. Sin embargo **Gal-C10** mostró una capacidad reductora similar a **Gal-C12**.

Todos los derivados glucosilados mostraron una capacidad reductora inferior al **Gal**. Los compuestos con longitud de cadena corta o intermedia (C4 a C12) mostraron una capacidad reductora similar. Por otro lado, los derivados con longitud de cadena mayor (C16 y C18) mostraron los menores valores de da capacidad reductora.

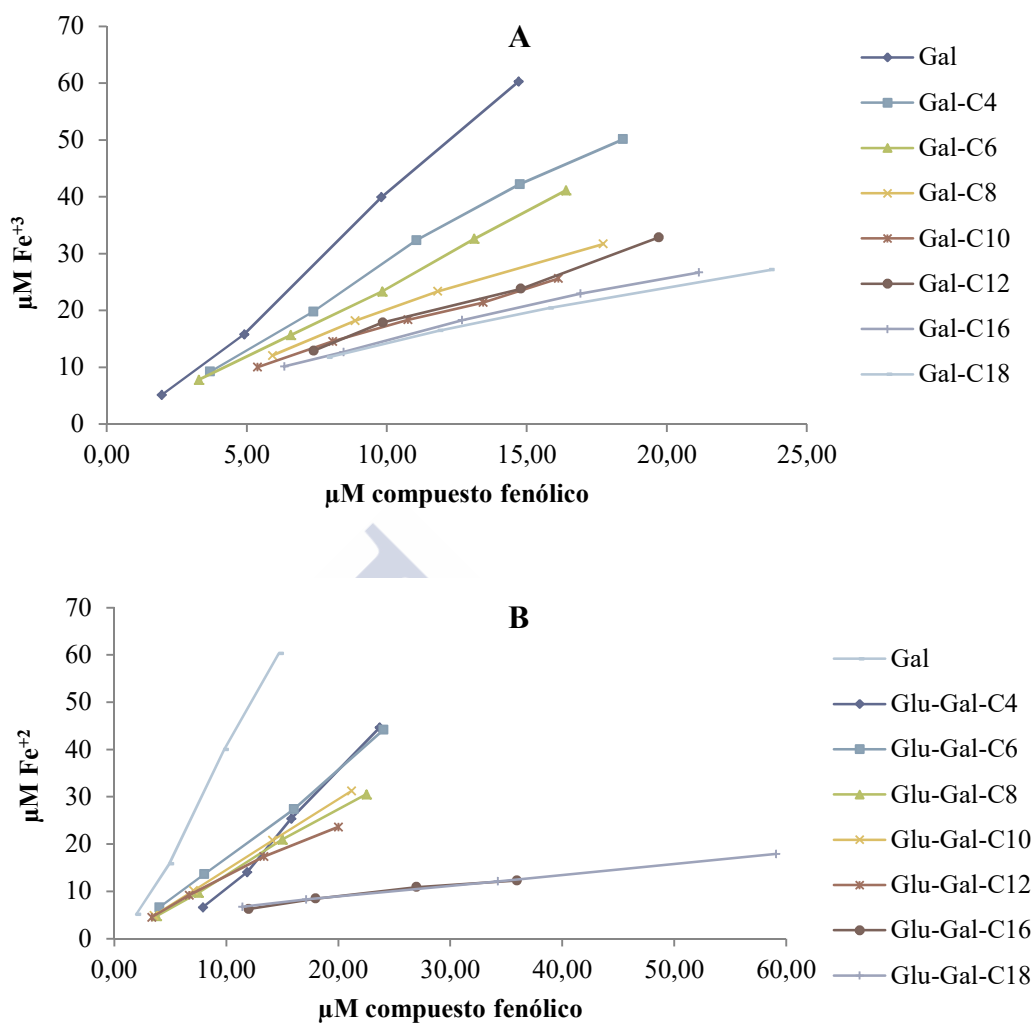


Fig. 44 Capacidad reductora por mol de Fe^{+2} de alquil (A) y glucosil alquil galatos (B).

Tal y como se indicó previamente, una información que se puede extraer es el número de moles de hierro férrico reducidos por mol de compuesto. Para ello, se expresó la capacidad reductora de los fenoles en función de la concentración molar, y las gráficas se ajustaron a la ecuación de una recta ($R^2 > 0,9936$). La pendiente de las ecuaciones lineales indica el número de moles de hierro férrico reducidos por un mol de compuesto reductor (**Tab. 40**).

Fenol	moles e ⁻ que pueden ceder	Fenol	moles e ⁻ que pueden ceder
Gal	4,411 ± 0,121	Glu-Gal-C4	2,436 ± 0,078
Gal-C4	2,827 ± 0,092	Glu-Gal-C6	1,863 ± 0,025
Gal-C6	2,552 ± 0,060	Glu-Gal-C8	1,388 ± 0,111
Gal-C8	1,643 ± 0,072	Glu-Gal-C10	1,496 ± 0,0837
Gal-C10	1,417 ± 0,089	Glu-Gal-C12	1,144 ± 0,063
Gal-C12	1,565 ± 0,025	Glu-Gal-C16	0,250 ± 0,056
Gal-C16	1,136 ± 0,053	Glu-Gal-C18	0,232 ± 0,048
Gal-C18	0,965 ± 0,082		

Tab. 40 Moles de electrones que pueden ceder Gal, alquil galatos y derivados glucosilados de alquil galatos (media ± sd).

Dentro de la serie de los alquil galatos la capacidad de donar electrones disminuyó de forma lineal con el incremento de la longitud de cadena. La introducción de un resto de glucosa produjo el mismo efecto siendo más drástica para los derivados glucosilo de mayor longitud de cadena (C16 y C18).

5.3.5. Actividad de compuestos derivados de ácido gálico en sistemas basados en aceites de pescado.

El estudio de la inhibición de alquil galatos y glucosil alquil galatos en un sistema de aceite se llevó a cabo empleando el aceite de hígado de bacalao previamente caracterizado y ya mencionado en capítulos anteriores. Las muestras se suplementaron con los compuestos objeto de estudio en una concentración de 0,1 mM y se almacenaron a 45 °C. A las muestras control no se les adicionó ningún aditivo. Los sistemas se muestrearon diariamente durante 7 días.

5.3.5.1. Estudio de la inhibición de ésteres de ácido gálico en un sistema de aceite de pescado.

El estudio de la inhibición de derivados acilados de ácido gálico se llevó a cabo a lo largo de 7 días. El análisis sensorial mostró que las muestras control, sin aditivos añadidos, desarrollaron rancidez en el día 4 de experimentación. Gal-C10 y Gal-C12 desarrollaron una rancidez incipiente en el día 6 mientras que Gal, Gal-C4, Gal-C6, Gal-C8, Gal-C16 y Gal-C18 inhibieron el desarrollo de rancidez a lo largo de todo el experimento.

Estos resultados se corroboraron con el análisis de formación de hidroperóxidos conjugados con dienos (**Figura 45A**) y trienos conjugados (**Figura 45B**).

Los derivados acilados de ácido gálico, empleados en una concentración de 0,1mM inhibieron la formación de hidroperóxidos conjugados, manteniendo los niveles de hidroperóxidos más bajos que los controles durante todo el experimento. Las muestras control presentaron un período de inducción de la formación de dienos y trienos conjugados de 3 días.

Este período se retrasó hasta el día 4 para los compuestos **Gal-C10** y **Gal-C12**. Los compuestos **Gal**, **Gal-C4**, **Gal-C8**, **Gal-C16** y **Gal-C18** tuvieron un período de inducción de 6 días y **Gal-C6** presentó un período de inducción de, al menos 7 días. La cinética correspondiente a la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados fue más lenta. El período de inducción para las muestras control fue de 4 días. Tanto **Gal** como todos sus ésteres ensayados, mostraron una alta efectividad en la formación de estos compuestos de degradación lipídica.

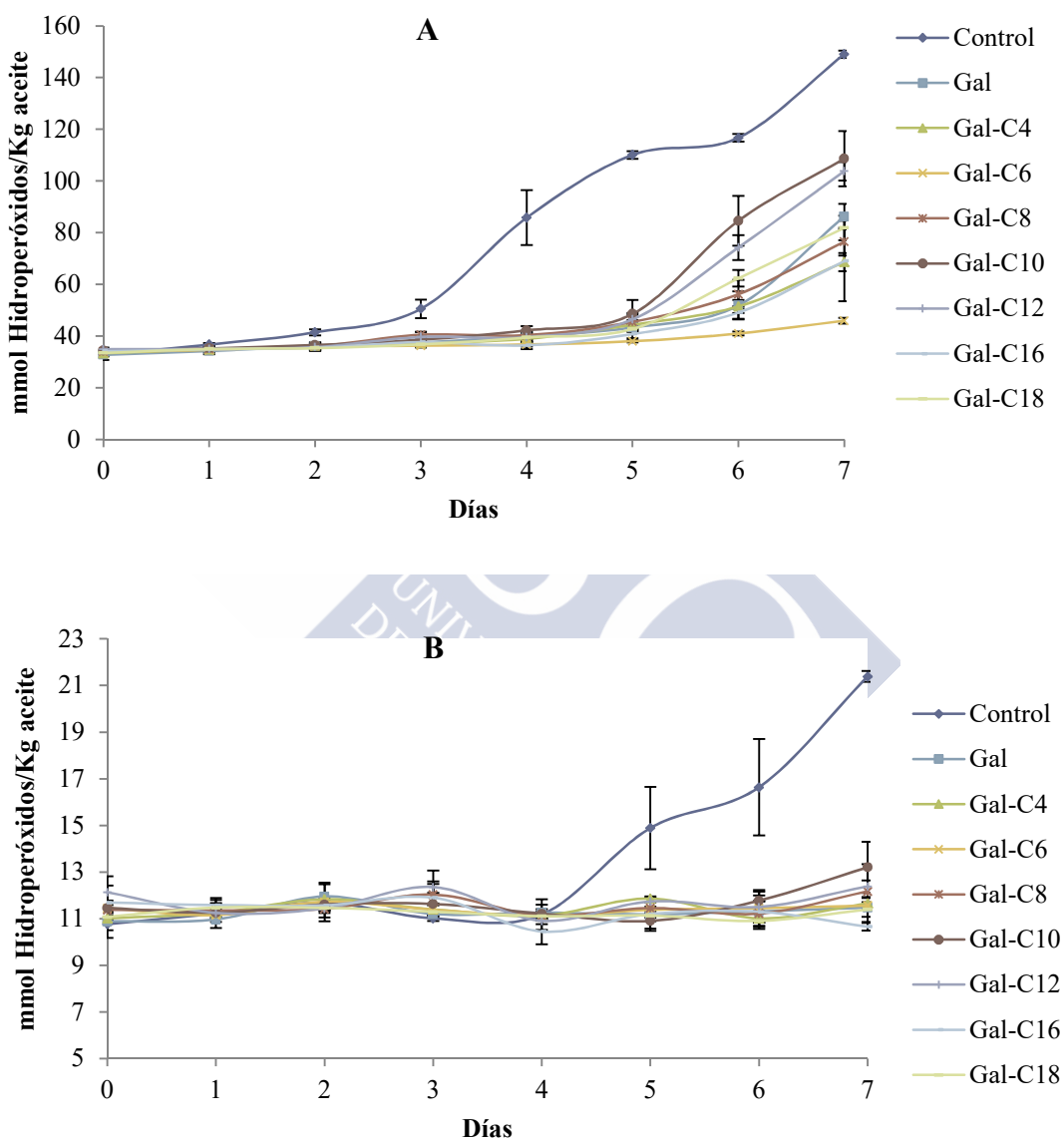


Fig. 45 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 0,1 mM de distintos ésteres de Gal y almacenadas a 45 °C.

Los porcentajes de inhibición a día 5 y a día 7 para la formación de dienos y trienos conjugados se representan en la **Tab. 41**.

A día 5, **Gal** y sus derivados acilados mostraron una altísima eficacia inhibiendo la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. El análisis de la inhibición a

día 7 mostró diferencias dentro de la serie estudiada. **Gal-C6** fue el compuesto que presentó la mayor capacidad antioxidante. A continuación y en orden decreciente de efectividad, **Gal-C4**, **Gal-C16** y **Gal-C18** mostraron una capacidad similar y mayor que el grupo compuesto por **Gal**, **Gal-C8** y **Gal-C10**. **Gal-C12** presentó el porcentaje de inhibición más bajo. Por el contrario, a día 7, todos los compuestos ensayados inhibieron de manera eficaz la formación de trienos conjugados. Por lo tanto, el orden de inhibición en dienos conjugados, de mayor a menor, fue:

Gal-C6 > Gal-C16 ~ Gal-C4 ~ Gal-C18 > Gal-C8 ~ Gal-C10 ~ Gal > Gal-C12.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 5)	% I (día 7)	% I (día 5)	% I (día 7)
Gal	86,27 ± 1,53	54,66 ± 5,96	92,57 ± 14,43	94,69 ± 5,42
Gal-C4	85,66 ± 1,63	69,38 ± 3,31	79,29 ± 7,67	96,49 ± 5,57
Gal-C6	94,75 ± 1,34	89,67 ± 1,28	101,69 ± 11,54	98,88 ± 6,16
Gal-C8	85,22 ± 4,20	63,37 ± 4,47	98,07 ± 6,24	94,73 ± 3,08
Gal-C10	85,08 ± 2,62	56,73 ± 1,51	107,97 ± 1,79	88,54 ± 0,30
Gal-C12	85,08 ± 2,18	40,68 ± 2,26	104,60 ± 12,21	92,76 ± 4,17
Gal-C16	91,36 ± 1,12	70,04 ± 12,38	101,89 ± 8,11	111,67 ± 6,86
Gal-C18	88,02 ± 1,17	67,26 ± 8,61	98,67 ± 8,69	98,56 ± 3,23

Tab. 41 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de **Gal** y alquil galatos (0,1 mM) en aceite de hígado de bacalao almacenado 45 °C (media ± sd).

5.3.5.2. Estudio de la inhibición de glucosil alquil galatos en aceite de pescado.

El estudio de la inhibición de los glucosil alquil derivados de ácido gálico se llevó a cabo a lo largo de 7 días en las mismas condiciones empleadas para los derivados acilados (concentración de ensayo, 0,1 mM y temperatura de almacenamiento de 45°C). Se empleó **Gal** como control efectivo frente a la oxidación lipídica y el estudio se desarrolló durante 7 días.

El análisis sensorial mostró en el día 4 de experimentación las muestras control desarrollaron rancidez mientras que los derivados glucosilados presentaron rancidez incipiente. El **Gal** desarrolló rancidez a día 7.

Los análisis químicos para la determinación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 46 A y B**) corroboraron los resultados obtenidos en las pruebas sensoriales.

El análisis de la cinética de formación de hidroperóxidos con dienos conjugados mostró que el período de inducción para las muestras control no suplementadas con compuestos fenólicos y aquellas tratadas con los diferentes derivados glucosilados objeto de estudio fue de 3 días mientras que, en las muestras que contenían **Gal**, el período de inducción se extendió a 6 días. La cinética de formación de los hidroperóxidos conjugados fue más lenta. El período de inducción fue de 6 días para las muestras control y para aquellas suplementadas con los

derivados glucosilados de mayor longitud de cadena (**Glu-Gal-C12**, **Glu-Gal-C16** y **Glu-Gal-C18**).

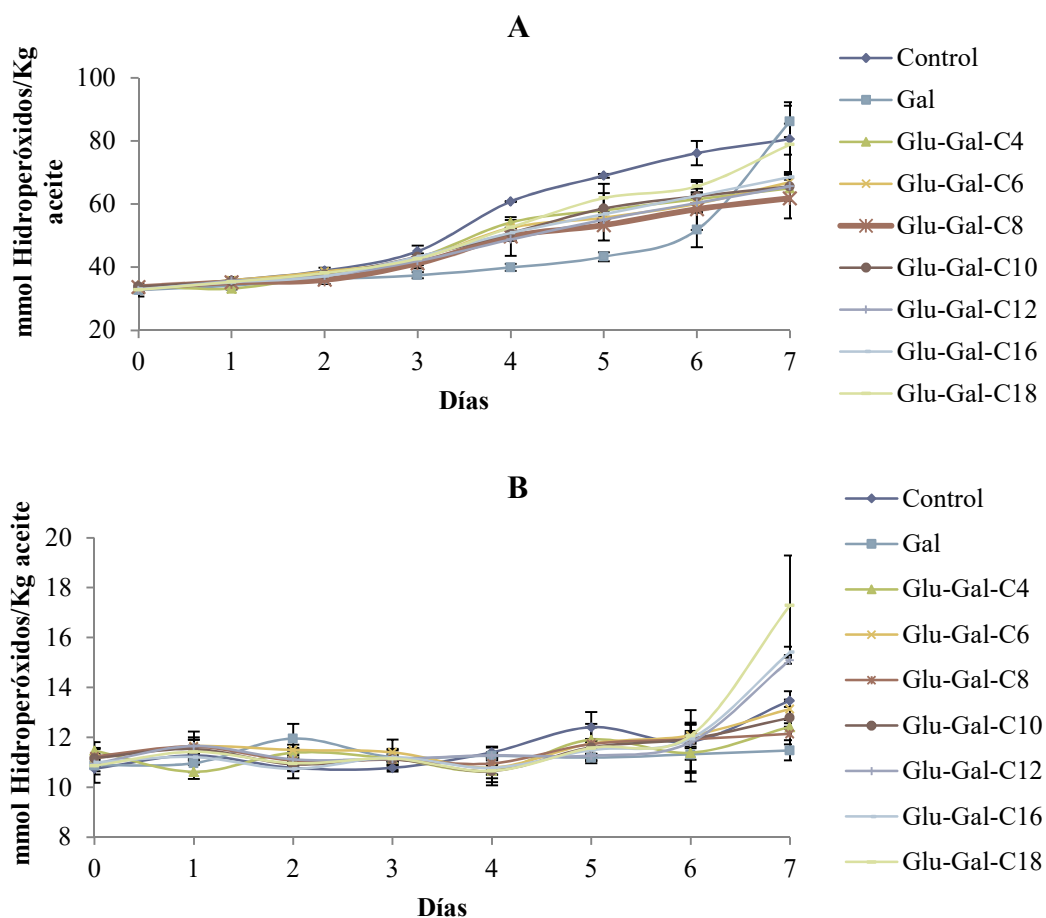


Fig. 46 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 0,1 mM de distintos glucosil alquil derivados de Gal y almacenadas a 45 °C.

Los porcentajes de inhibición de los dienos y trienos conjugados se calcularon en los días 5 y 7 del período de propagación de la oxidación de las muestras control. Los resultados se muestran en la **Tab. 42**.

El **Gal** fue capaz de inhibir de una manera altamente eficaz la formación de dienos (día 5) y trienos conjugados (días 5 y 7). Todos los derivados glucosilados mostraron un porcentaje de inhibición moderado en la formación de dienos salvo el **Glu-Gal-C18** que mostró valores relativamente bajos. Dentro de la serie, los compuestos con longitud de cadena corta o media (C4-C8) mostraron porcentajes de inhibición ligeramente superiores que aquellos con longitud de cadena mayor (C10-C18).

En el caso de la formación de trienos conjugados, a día 5, todos los derivados glucosilados mostraron una alta capacidad de inhibición, siendo el **Glu-Gal-C18**, el que presentó el porcentaje más bajo. A día 7, los derivados glucosilados de longitud de cadena corta o media (C4-C10) presentaron un porcentaje de inhibición moderado y los de mayor longitud de cadena, no fueron capaces de inhibir la formación de trienos conjugados.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 5)	% I (día 7)	% I (día 5)	% I (día 7)
Gal	86,27 ± 1,53	-2,25 ± 1,96	92,57 ± 14,43	94,69 ± 5,42
Glu Gal-C4	33,91 ± 7,98	35,47 ± 7,97	82,88 ± 12,74	60,91 ± 4,85
Glu Gal-C6	39,23 ± 10,87	30,39 ± 11,50	89,86 ± 6,69	49,66 ± 3,69
Glu Gal-C8	45,56 ± 10,74	40,98 ± 11,37	86,904 ± 4,46	66,26 ± 1,94
Glu Gal-C10	31,71 ± 14,76	28,68 ± 4,99	87,39 ± 7,64	45,95 ± 5,04
Glu-Gal-C12	38,16 ± 4,68	27,38 ± 5,61	65,47 ± 11,26	-51,44 ± 20,28
Glu-Gal-C16	33,75 ± 2,45	25,32 ± 0,01	80,18 ± 2,55	-63,37 ± 10,67
Glu-Gal-C18	19,56 ± 12,35	14,11 ± 13,40	56,53 ± 2,23	-55,01 ± 1,16

Tab. 42 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en aceite de hígado de bacalao almacenado 45 °C. El **Gal** se empleó como control positivo frente a la inhibición (media ± sd).

5.3.6. Actividad de los compuestos derivados de ácido gálico en emulsiones de aceite de pescado.

El estudio de la inhibición de la oxidación lipídica de **Gal**, ésteres de **Gal** y glucosil alquil galatos con distinta longitud de cadena fue evaluada en emulsiones de aceite de pescado en agua en muestras tratadas con 0,1 mM de dichos compuestos. La temperatura y el tiempo de experimentación dependieron de la eficiencia de los distintos compuestos. Además se ensayó la influencia del emulsificante empleado para estabilizar la emulsión. Para ello, se ensayaron tres emulsificantes de naturaleza química diferente: lecitina, de naturaleza anfótera, SDS, de naturaleza aniónica, y, por último, Tween 20, de naturaleza no iónica. Todos ellos son ampliamente usados, tanto en la industria alimentaria como en la industria farmacéutica.

5.3.6.1. Estudio de la inhibición de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite de pescado en agua, suplementada con ésteres de ácido gálico. Influencia del emulsificante.

Los primeros experimentos incluyeron el empleo de lecitina como emulsificante en una proporción del 10% en peso de la emulsión. Las muestras se almacenaron durante 10 días a 45 °C.

La evaluación sensorial mostró que las muestras control desarrollaron rancidez incipiente en el día 4. El compuesto **Gal-C6** fue capaz de mantener la emulsión estable durante todo el período de estudio. Las muestras tratadas con el resto de los ésteres de **Gal** mostraron buena calidad hasta, al menos, el día 6.

Estos resultados fueron corroborados por el análisis químico de la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 47 A y B**). Las cinéticas de formación de estos productos de oxidación en todas las muestras estudiadas, presentaron las dos zonas clásicas de las cinéticas, claramente diferenciadas. En los instantes iniciales, no se produce formación neta de los productos de oxidación, pero posteriormente se produce un aumento

exponencial de estos productos de oxidación con el tiempo. El período de inducción de las muestras control y de aquellas suplementadas con **Gal** fue de 4 días.

Las cinéticas de formación tanto de dienos como de trienos conjugados presentaron un perfil similar. El período de inducción de las muestras control y de aquellas suplementadas con **Gal** fue de 4 días. Aquellas muestras tratadas con **Gal-C18** fueron capaces de retrasar la formación de dienos conjugados hasta el día 5 y las muestras que tenían **Gal-C4** como aditivo retrasaron el desarrollo de formación de dienos conjugados hasta el día 7. Las muestras suplementadas con **Gal-C8**, **Gal-C10** y **Gal-C16** extendieron el período de inducción hasta 9 días. Las cinéticas de formación tanto de dienos como de trienos conjugados presentaron un perfil similar.

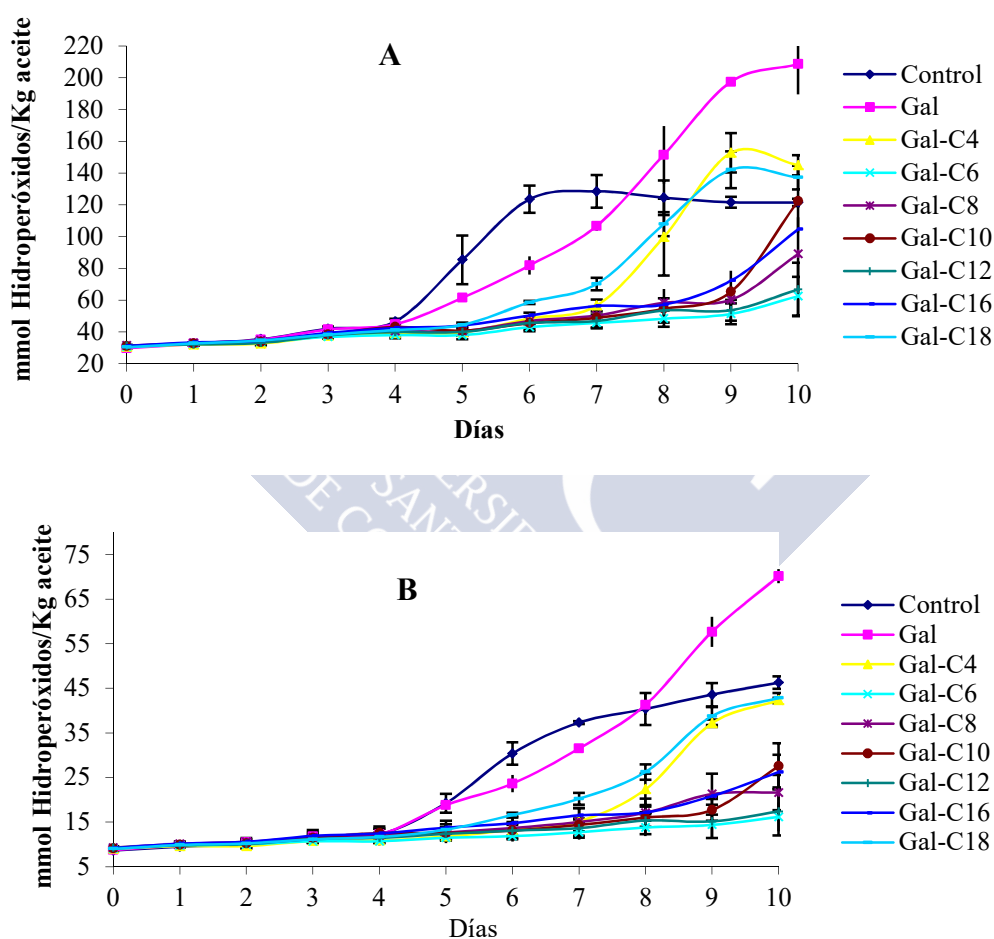
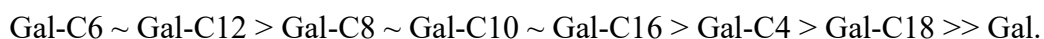


Fig. 47 Cinéticas de formación de los hidropéroxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en emulsiones de aceite de pescado en agua, tratadas con 0,1 mM de **Gal** y ésteres de **Gal**, durante su almacenamiento a 45 °C.

Los porcentajes de inhibición fueron evaluados en las etapas iniciales de la oxidación en dos puntos: a día 7 y a día 10 (**Tab. 43**). Todos los alquil derivados fueron, de forma general, altamente efectivos en la inhibición de la formación de hidropéroxidos con dienos y trienos conjugados. El orden de eficacia en la inhibición resultó ser:



Estos resultados parecen estar en desacuerdo con las reglas predichas por la “*paradoja polar*” ya que dos de los compuestos más hidrofóbicos (**Gal-C16** y **Gal-C18**), presentan una menor capacidad antioxidante que algunos derivados de tamaño medio y que presentan una lipofilia similar como el **Gal-C6** o el **Gal-C8**.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 7)	% I (día 10)	% I (día 7)	% I (día 10)
Gal	22,22 ± 3,08	-95,69 ± 21,23	21,12 ± 2,51	-62,72 ± 4,23
Gal-C4	73,13 ± 3,81	-25,3 ± 7,02	78,59 ± 1,53	11,52 ± 1,54
Gal-C6	84,28 ± 3,58	65,18 ± 12,86	87,23 ± 5,29	81,08 ± 8,33
Gal-C8	79,51 ± 8,20	37,0 ± 2,58	80,04 ± 10,89	67,24 ± 11,31
Gal-C10	80,99 ± 2,56	19,58 ± 3,76	81,71 ± 5,02	58,59 ± 1,60
Gal-C12	83,03 ± 4,16	69,92 ± 1,83	84,82 ± 10,58	78,01 ± 1,39
Gal-C16	73,45 ± 6,39	19,92 ± 2,63	74,32 ± 6,78	55,03 ± 9,28
Gal-C18	59,49 ± 4,19	-17,09 ± 8,02	60,82 ± 4,23	10,02 ± 3,11

Tab. 43 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de **Gal** y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua (10% de aceite, 1% lecitina) almacenada a 45 °C (media ± sd).

Posteriormente, se ensayó la influencia del emulsificante empleado para estabilizar la emulsión. Los estudios enfocados a estudiar la influencia de los emulsificantes, Tween 20 (2%) o SDS (1%), y realizados bajo las mismas condiciones de temperatura (45 °C) que se habían hecho los anteriores de lecitina, pusieron de manifiesto un incremento en la velocidad de la oxidación. Como consecuencia de este incremento, no se apreciaba el período de inducción impidiendo llevar a cabo el estudio del comportamiento antioxidante entre los distintos compuestos objeto de estudio.

Debido a que la temperatura es un parámetro que influye enormemente en la velocidad de reacción, se procedió a realizar estudios a temperaturas inferiores de cara a ralentizar la cinética de la reacción. Los resultados mostraron que a 30 °C era posible obtener cinéticas de oxidación adecuadas. Se fijó por tanto, una temperatura de 30 °C para desarrollar los experimentos.

En los experimentos llevados a cabo empleando lecitina como emulsificante (1%) y a una temperatura de 30 °C, el estudio de desarrollo de la oxidación se prolongó durante 8 días. El análisis sensorial mostró que las muestras control desarrollaron rancidez en el día 6 al igual que las muestras suplementadas con **Gal** y con **Gal-18** (dos compuestos con una lipofilia muy diferente). Todos los demás alquil galatos no desarrollaron rancidez a lo largo de todo el período de almacenamiento.

Cuando los experimentos de oxidación fueron llevados a cabo empleando Tween 20 como emulsificante (2%) y a 30 °C durante 5 días, la evaluación sensorial mostró que el **Gal** desarrolló una rancidez incipiente desde el primer día mientras que los compuestos **Gal-12**, **Gal-16**, y **Gal-18** inhibieron de manera efectiva el desarrollo de rancidez hasta el día 5.

En emulsiones preparadas con SDS (1%) como emulsificante y almacenadas a 30°C durante 3 días, tanto los controles como las muestras suplementadas con los distintos fenoles (0,1mM), desarrollaron rancidez en el primer o segundo día de almacenamiento.

En todos los casos, los datos obtenidos en la evaluación sensorial se confirmaron con la determinación analítica de la formación de los hidroperóxidos con dienos (**Fig. 48 A, B y C**) y trienos conjugados (**Fig. 49 A, B y C**). Las cinéticas de formación de estos compuestos presentaron curvas similares. Para el caso de los trienos conjugados, siguiendo el modelo clásico, la cinética fue ligeramente más lenta que la de los dienos conjugados.

El análisis de las curvas mostró los siguientes resultados:

- En los experimentos llevados a cabo con lecitina como emulsificante durante 8 días, el período de inducción para las muestras control y las muestras suplementadas con **Gal** y con **Gal-C18** fue de 6 días para los dienos conjugados y de 7 días para los trienos conjugados. Todos los demás ésteres de **Gal** inhibieron la formación de dienos conjugados a lo largo de todo el experimento.
- En los experimentos llevados a cabo con Twen 20 como emulsificante durante 5 días, la mayoría de los alquil galatos fueron antioxidantes con significativa eficacia. Sólo el **Gal-C4** presentó una capacidad antioxidante intermedia y en el caso del **Gal** se observó un comportamiento prooxidante.
- En los experimentos llevados a cabo con SDS, la mayor parte de los alquil derivados mostraron un comportamiento prooxidante.

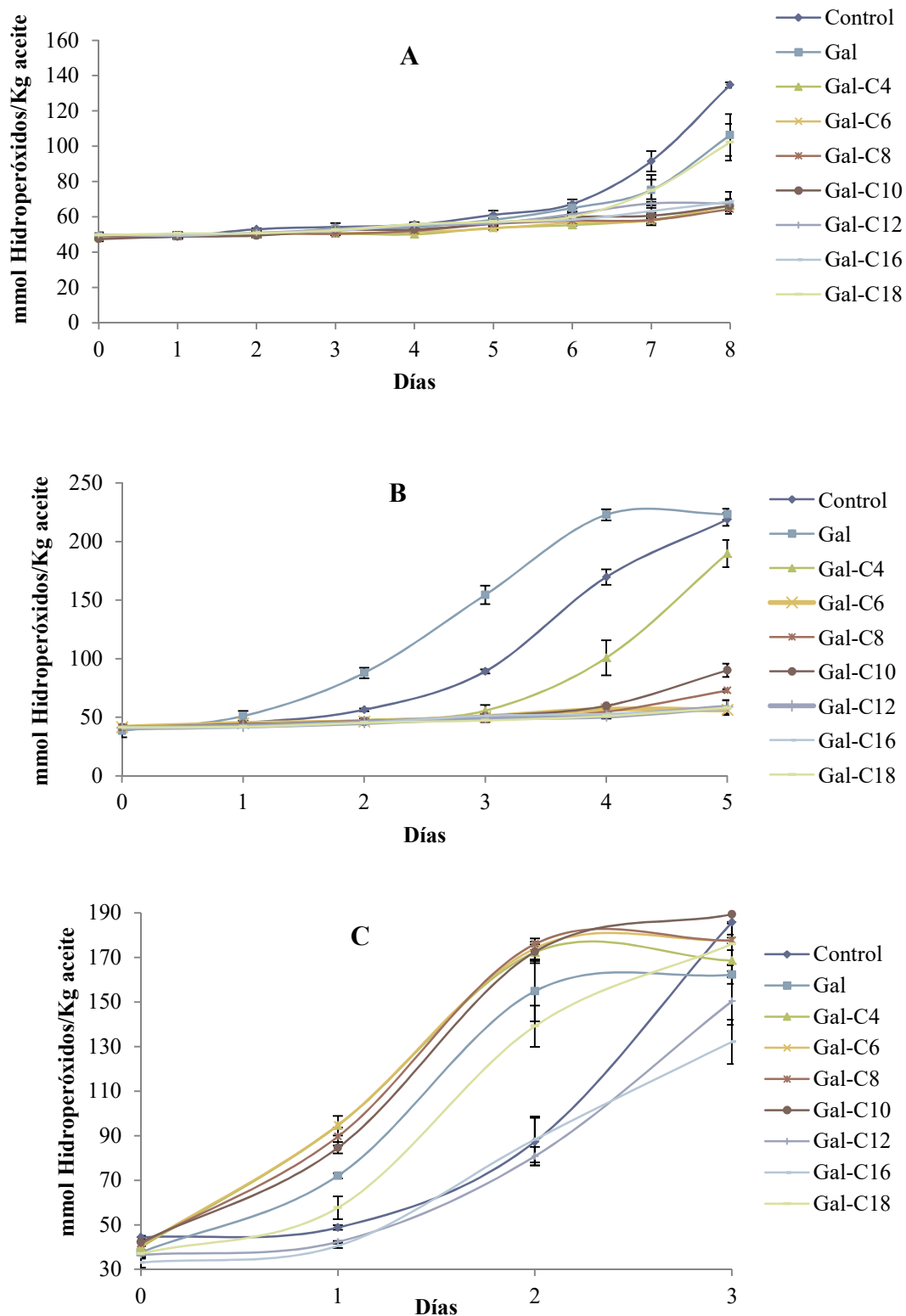


Fig. 48 Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con dienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de Gal y ésteres de Gal, almacenadas a 30 °C.

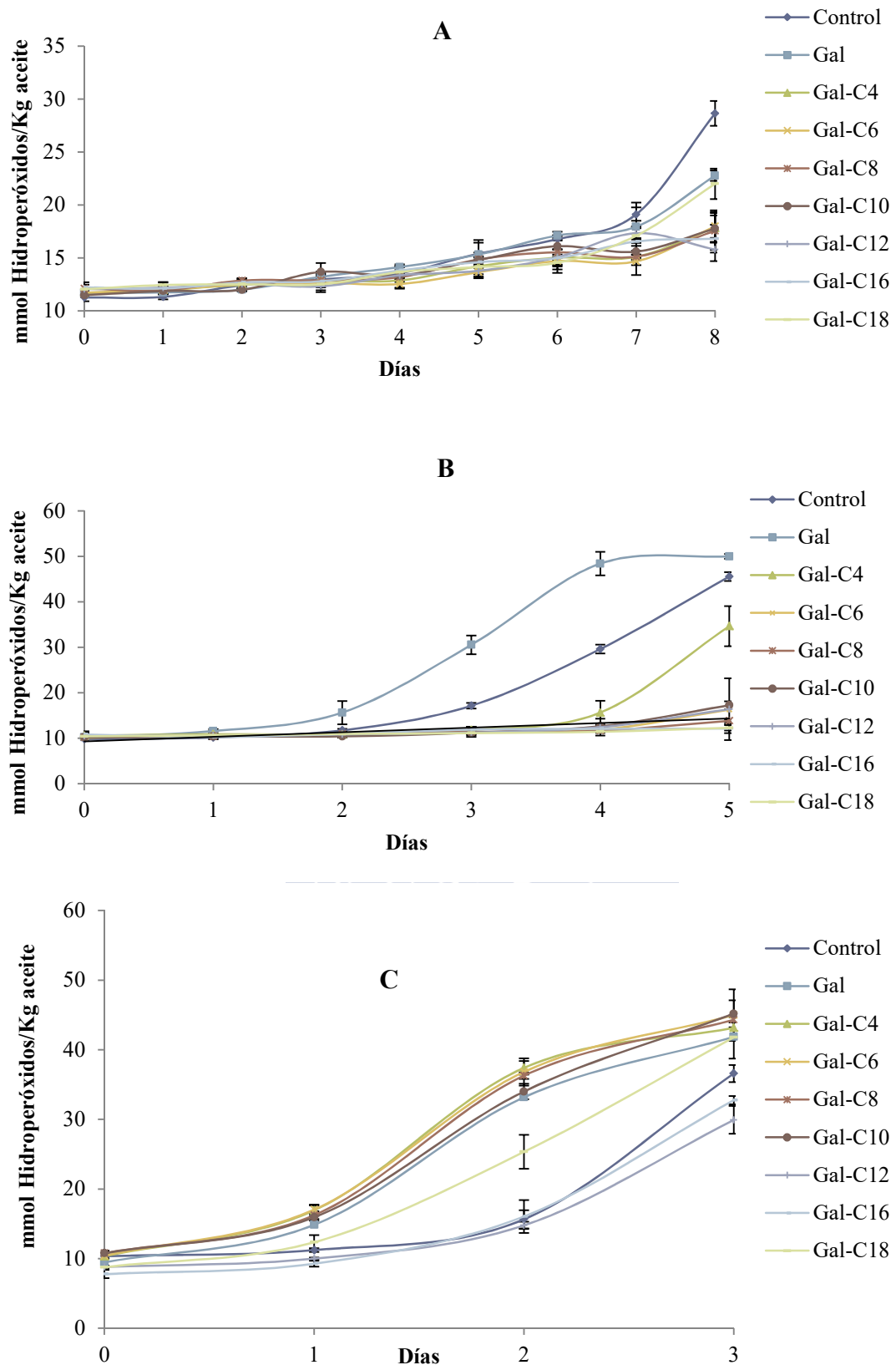


Fig. 49 Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con trienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de Gal y ésteres de Gal, almacenadas a 30 °C.

Los porcentajes de inhibición obtenidos en la formación de dienos y trienos conjugados se muestran en las **Tab. 44** y **Tab. 45**, respectivamente.

Fenol	% I (dienes conjugados)			
	Lecitina (45 °C)	Lecitina (30°C)	Tween 20 (30°C)	SDS (30°C)
	% I (día 7)	% I (día 8)	% I (día 4)	% I (día 2)
Gal	22,22 ± 3,08	32,31 ± 0,87	-26,94 ± 0,14	0,80 ± 0,57
Gal-C4	73,13 ± 3,81	81,97 ± 0,58	54,36 ± 0,45	-13,60 ± 3,58
Gal-C6	84,28 ± 3,58	77,46 ± 2,67	88,48 ± 0,41	-14,31 ± 4,81
Gal-C8	79,51 ± 8,20	80,07 ± 0,11	89,39 ± 1,07	-15,44 ± 1,51
Gal-C10	80,99 ± 2,56	77,97 ± 0,19	85,83 ± 0,51	-11,78 ± 2,96
Gal-C12	83,03 ± 4,16	83,75 ± 2,2	92,26 ± 1,43	-25,68 ± 6,75
Gal-C16	73,45 ± 6,39	82,11 ± 0,19	91,03 ± 0,96	-49,78 ± 6,01
Gal-C18	59,49 ± 4,19	52,90 ± 3,70	92,20 ± 1,47	-176,10 ± 0,54

Tab. 44 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (día 8 y día 10 según esté almacenada a 45 °C o a 30 °C, respectivamente), Tween 20 (día 4) y SDS (día 2) como emulsificantes almacenados a 30 °C (media ± sd).

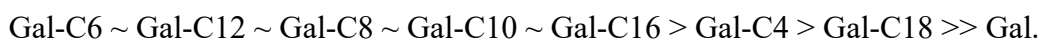
Fenol	% I (trienos conjugados)			
	Lecitina (45 °C)	Lecitina (30°C)	Tween 20 (30°C)	SDS (30°C)
	% I (día 7)	% I (día 8)	% I (día 4)	% I (día 2)
Gal	21,12 ± 2,51	26,93 ± 1,50	-10,34 ± 0,44	-22,75 ± 3,87
Gal-C4	78,59 ± 1,53	65,15 ± 1,53	74,22 ± 3,53	-45,38 ± 4,88
Gal-C6	87,23 ± 5,29	63,77 ± 2,96	91,72 ± 0,87	-46,92 ± 5,92
Gal-C8	80,04 ± 10,89	63,21 ± 2,37	93,17 ± 2,80	-36,71 ± 1,17
Gal-C10	81,71 ± 5,02	64,29 ± 0,34	87,64 ± 1,32	-24,79 ± 6,57
Gal-C12	84,82 ± 10,58	85,38 ± 2,01	96,26 ± 0,92	-30,71 ± 5,86
Gal-C16	74,32 ± 6,78	78,11 ± 0,44	95,43 ± 2,15	-74,37 ± 1,64
Gal-C18	60,82 ± 4,23	52,55 ± 6,10	96,36 ± 0,62	-25,85 ± 15,95

Tab. 45 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (día 8 y día 10 según esté almacenada a 45 °C o a 30 °C, respectivamente), Tween 20 (día 4) y SDS (día 2) como emulsificantes almacenados a 30 °C (media ± sd).

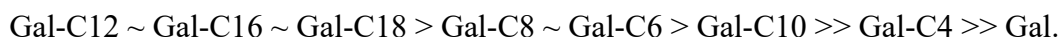
El orden de inhibición frente a la formación de hidroperóxidos conjugados fue similar al obtenido para la inhibición en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados en todos los experimentos llevados a cabo con los distintos emulsificantes empleados.

En los experimentos de oxidación realizados a una temperatura de 30 °C de almacenamiento y empleando lecitina como emulsificante, las muestras que contenían los derivados alquil galatos mostraron un escaso desarrollo de la oxidación y por tanto, un alto porcentaje de inhibición de la formación de hidroperóxidos conjugados. Sólo los compuestos **Gal-C18** y **Gal** presentaron porcentajes de inhibición moderados. Cuando el experimento se llevó a 45 °C, las cinéticas de la oxidación permitieron observar mayores diferencias en el

comportamiento antioxidante de los distintos compuestos. En este caso, el orden de eficacia fue:



Los resultados obtenidos para los experimentos realizados empleando Tween 20 como emulsificante mostraron resultados diferentes a los obtenidos cuando se empleó lecitina. En este caso el orden creciente de capacidad antioxidante mostrado por los alquil galatos fue el siguiente:



Los compuestos con mayor hidrofobicidad son los que presentan la mejor capacidad antioxidante tal y como predice la “paradoja polar”.

En las emulsiones que contenían SDS como emulsificante, los ésteres de **Gal** presentaron un comportamiento prooxidante obteniéndose porcentajes de inhibición de la oxidación negativos

5.3.6.2. Estudio de la inhibición de glucosil alquil derivados en emulsiones de aceite de pescado en agua. Influencia del emulsificante.

De cara a evaluar el efecto de la adición de una unidad de glucosa en el anillo fenólico de los alquil galatos en su capacidad antioxidante en una emulsión de aceite en agua, se llevaron a cabo experimentos de emulsiones de aceite de pescado en agua activadas térmicamente a 45 °C y suplementadas con 0,1 mM de cada uno de los derivados glucosil alquil galatos. El desarrollo de la oxidación se estudió durante 8 días. Además, se adicionaron los correspondientes alquil derivados para llevar a cabo la comparación directa. Como emulsificante se empleó lecitina.

El análisis sensorial de los distintos sistemas mostró que las muestras control y las muestras suplementadas con glucosil alquil galatos se mantuvieron estables hasta el día 4. A partir de ese momento se detectó olor a rancidez.

La evaluación sensorial coincidió con el análisis químico de la formación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados, **Fig 50** y **Fig. 51**, respectivamente.

Todos los glucosil alquil galatos mostraron un período de inducción de la formación de hidroperóxidos de 4 días salvo para el compuesto **Glu-Gal-C16**, que tuvo un período de 3 días. Todos los derivados glucosil alquil galatos mostraron una escasa efectividad en la inhibición de la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. Asimismo, los compuestos **Glu-Gal-C10** y **Glu-Gal-C16** no presentaron ninguna capacidad de inhibición del desarrollo oxidativo.

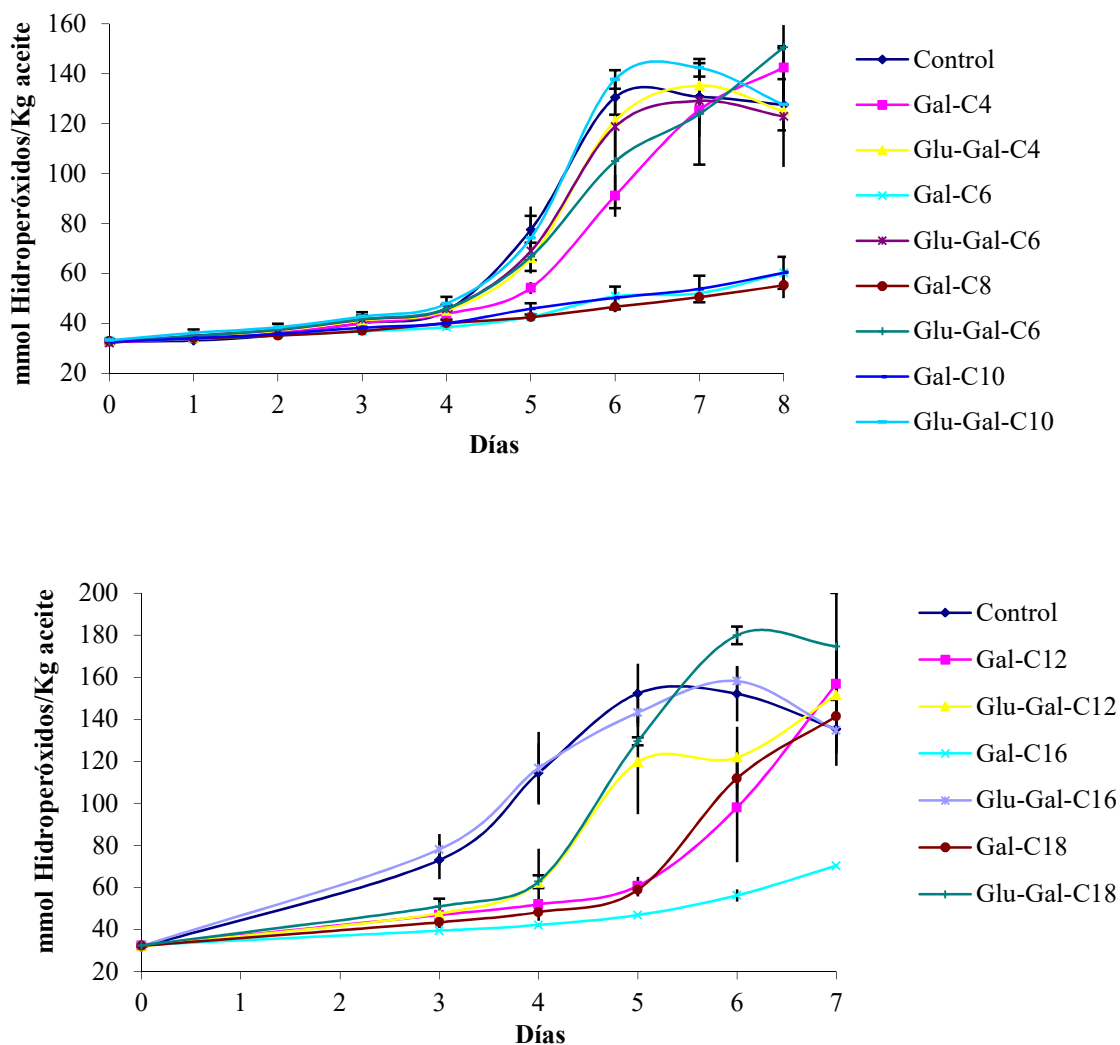


Fig. 50 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados en emulsiones de aceite en agua (10% aceite, 1% lecitina) suplementadas con 0,1 mM de distintos glucosil alquil derivados de Gal comparados con los ésteres correspondientes y almacenadas a 45 °C (media \pm sd).

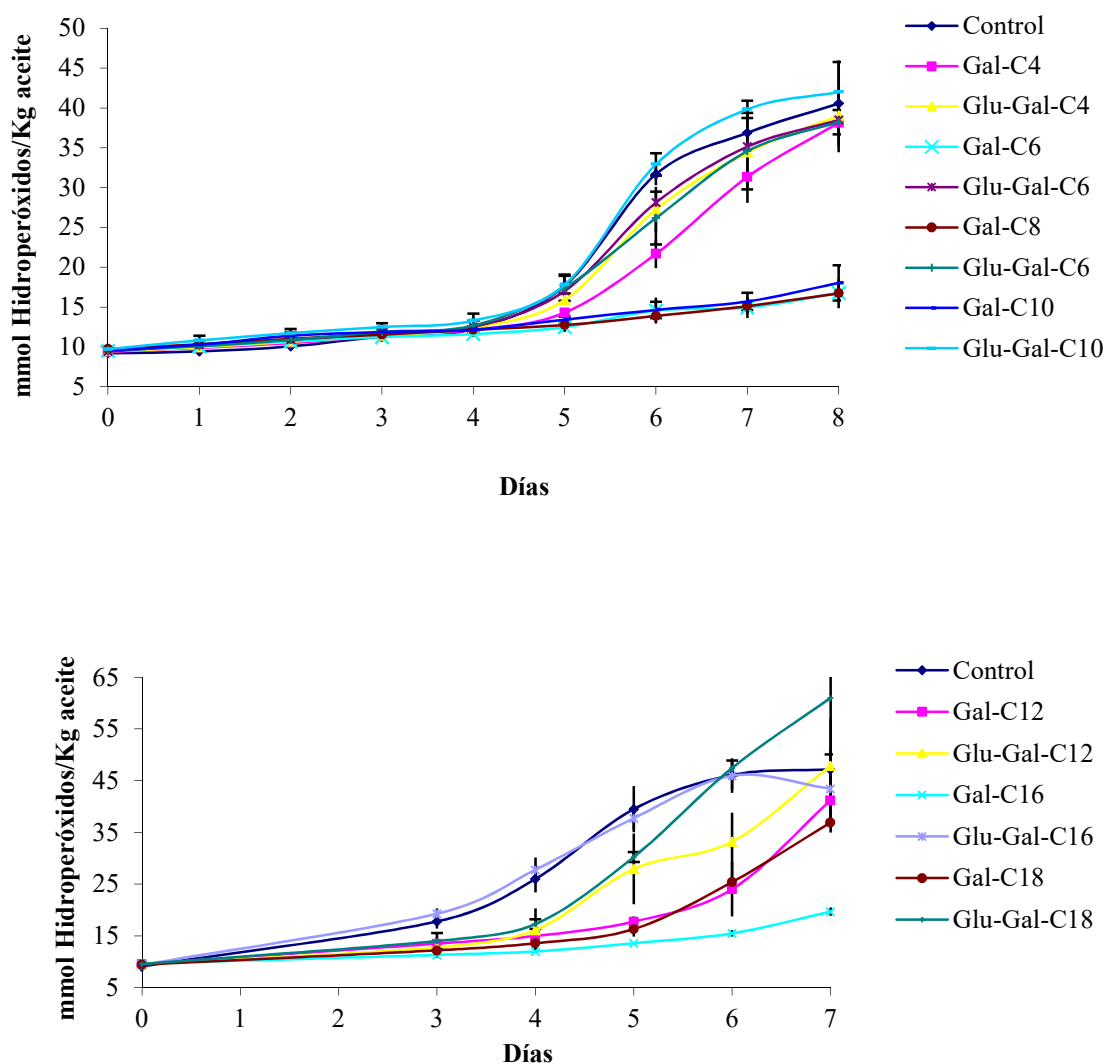


Fig. 51 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados en emulsiones de aceite en agua suplementadas con 0,1 mM de distintos glucosil alquil derivados de ácido Gal comparados con los alquil derivados correspondientes y almacenadas a 45 °C.

Los porcentajes de inhibición de los glucosil alquil galatos se representan en la **Tab. 46**. Se han incluido los porcentajes de inhibición de los análogos alquil galatos.

Todos los glucosil alquil derivados presentaron un porcentaje de inhibición al desarrollo de dienos y trienos conjugados bajo. Los compuestos **Glu-Gal-C4** y **Glu-Gal-16** presentaron una actividad antioxidante muy limitada. La presencia del tercer grupo hidroxilo en el anillo aromático parece jugar un papel muy importante en la capacidad antioxidante de esta familia de compuestos.

Fenol	% I				
	Dienos conjugados	Trienos conjugados	Fenol	Dienos conjugados	Trienos conjugados
Gal-C4	40,35 ± 8,64	44,49 ± 7,93	Glu-Gal-C4	9,62 ± 16,88	19,71 ± 12,69
Gal-C6	81,58 ± 4,17	76,10 ± 7,23	Glu-Gal-C6	12,01 ± 0,67	15,87 ± 1,08
Gal-C8	85,89 ± 2,11	79,17 ± 3,35	Glu-Gal-C8	26,20 ± 1,15	24,51 ± 4,71
Gal-C10	82,20 ± 4,68	75,82 ± 4,49	Glu-Gal-C10	-7,34 ± 3,78	-5,48 ± 6,24
Gal-C12	75,86 ± 3,65	71,49 ± 3,23	Glu-Gal-C12	27,01 ± 2,54	37,99 ± 2,45
Gal-C16	87,31 ± 0,02	85,21 ± 0,56	Glu-Gal-C16	7,52 ± 5,64	5,76 ± 7,26
Gal-C18	77,39 ± 2,56	76,29 ± 4,75	Glu-Gal-C18	18,83 ± 1,54	30,39 ± 3,13

Tab. 46 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de alquil galatos y de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina como emulsificante almacenada a 45 °C a día 6 para los derivados con longitud de cadena C4-C10 y a día 5 para los derivados con longitud de cadena C12-C-18 (media ± sd).

El desarrollo de estos experimentos en condiciones más suaves de temperatura (30°C) permitió diferenciar de una manera más clara el comportamiento antioxidante de los derivados glucosil alquilo de **Gal** y la posibilidad de estudiar los efectos que provoca el emulsificante (lecitina, Tween 20 y SDS) en la capacidad antioxidante de los mismos. Se empleó el **Gal** como control y, en todos los estudios, las muestras se suplementaron con los derivados glucosilados en una concentración de 0,1 mM.

Los experimentos llevados a cabo empleando lecitina (1%) como emulsificante, tuvieron una duración de 8 días. El análisis sensorial mostró que las muestras suplementadas con los derivados glucosilados de cadena larga (C12-C18) desarrollaron rancidez en el día 7. En ese mismo día, el control mostraba valores incipientes de rancidez. Los derivados glucosilo de cadena corta y media (C4-C10) mostraron rancidez incipiente en el día 8.

Cuando las emulsiones se prepararon empleando Tween 20 como emulsificante (2%), la cinética de la oxidación se incrementó acortándose el estudio en tres días. Durante la evaluación sensorial, las muestras control y aquellas suplementadas con los derivados glucosilados manifestaron rancidez incipiente, en el día 3.

Los estudios llevados a cabo en emulsiones empleando SDS como emulsificante (1%) y almacenadas en las mismas condiciones de temperatura presentaron un mayor incremento en la cinética de la reacción, reduciéndose el tiempo de estudio a 3 días. Todas las muestras desarrollaron rancidez a día 2.

La evaluación sensorial se corroboró en todos los casos con el análisis químico de formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 52** y **Fig. 53**). En los tres casos enfocados al empleo de los tres emulsificantes, ambas cinéticas de formación de hidroperóxidos conjugados fueron similares.

En los experimentos realizados empleando lecitina, las cinéticas de formación de dienos y de trienos conjugados fueron similares. Las muestras control y todas las muestras suplementadas con los derivados glucosilo se mantuvieron estables hasta el día 6 (período de inducción). En el día 7, las muestras que contenían los derivados de mayor longitud de cadena

(C12-C18) experimentaron un fuerte incremento en la concentración de dienos y trienos conjugados, siendo este incremento superior al control. Los demás derivados inhibieron de forma moderada la concentración de dienos y trienos conjugados.

Las cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados para las emulsiones preparadas con Tween 20 mostraron que el período de inducción para las muestras control y aquellas que contenían aditivos fue de 3 días. A continuación, todas las muestras experimentaron un fuerte incremento en la concentración de dienos y trienos conjugados.

En las emulsiones preparadas con SDS, tanto en las muestras control como las muestras tratadas con los derivados glucosilados, se observó la formación de dienos y trienos conjugados a partir del día 1.



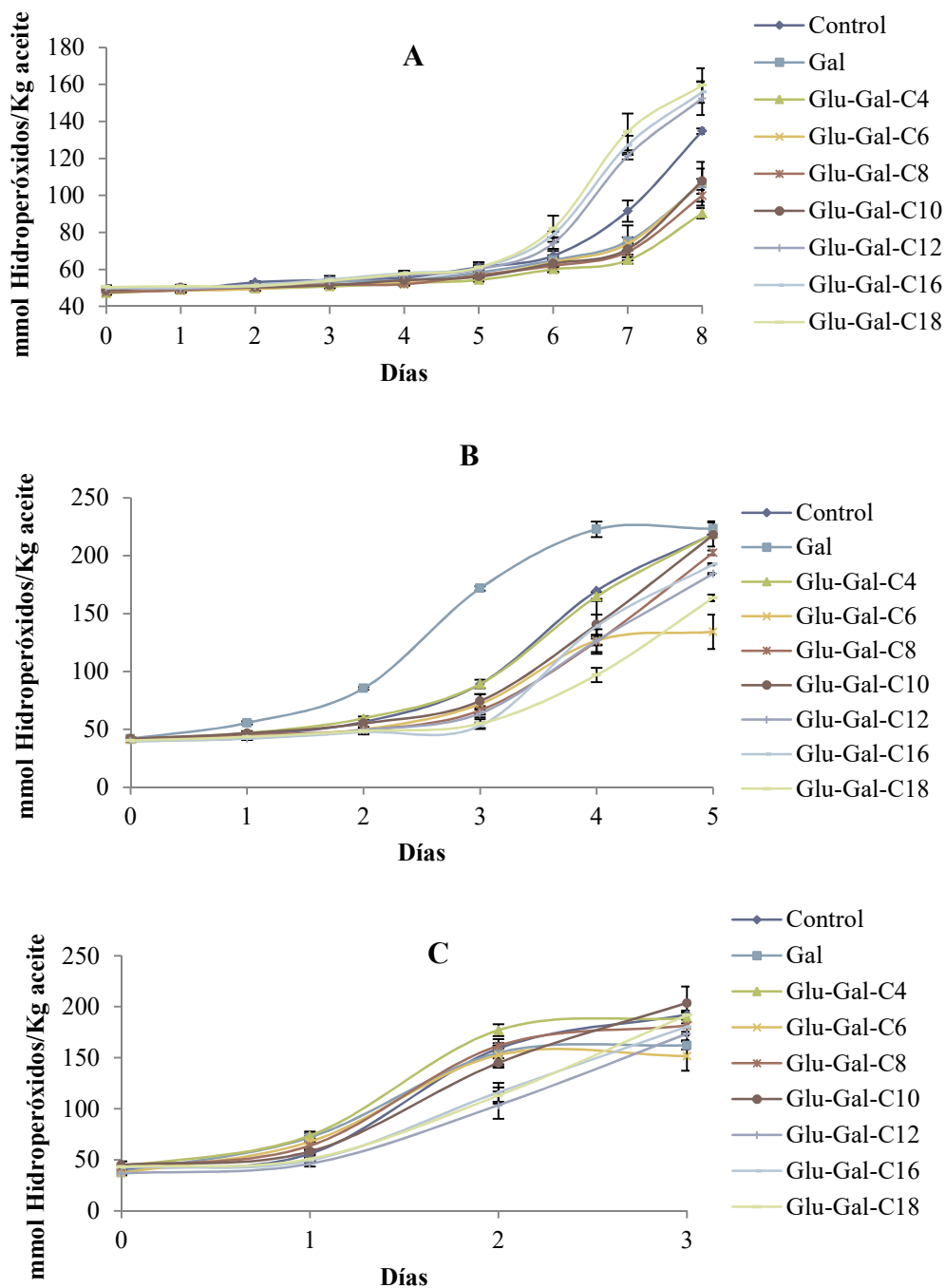


Fig. 52 Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con dienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de Gal y glucosil alquil galatos, almacenadas a 30 °C.

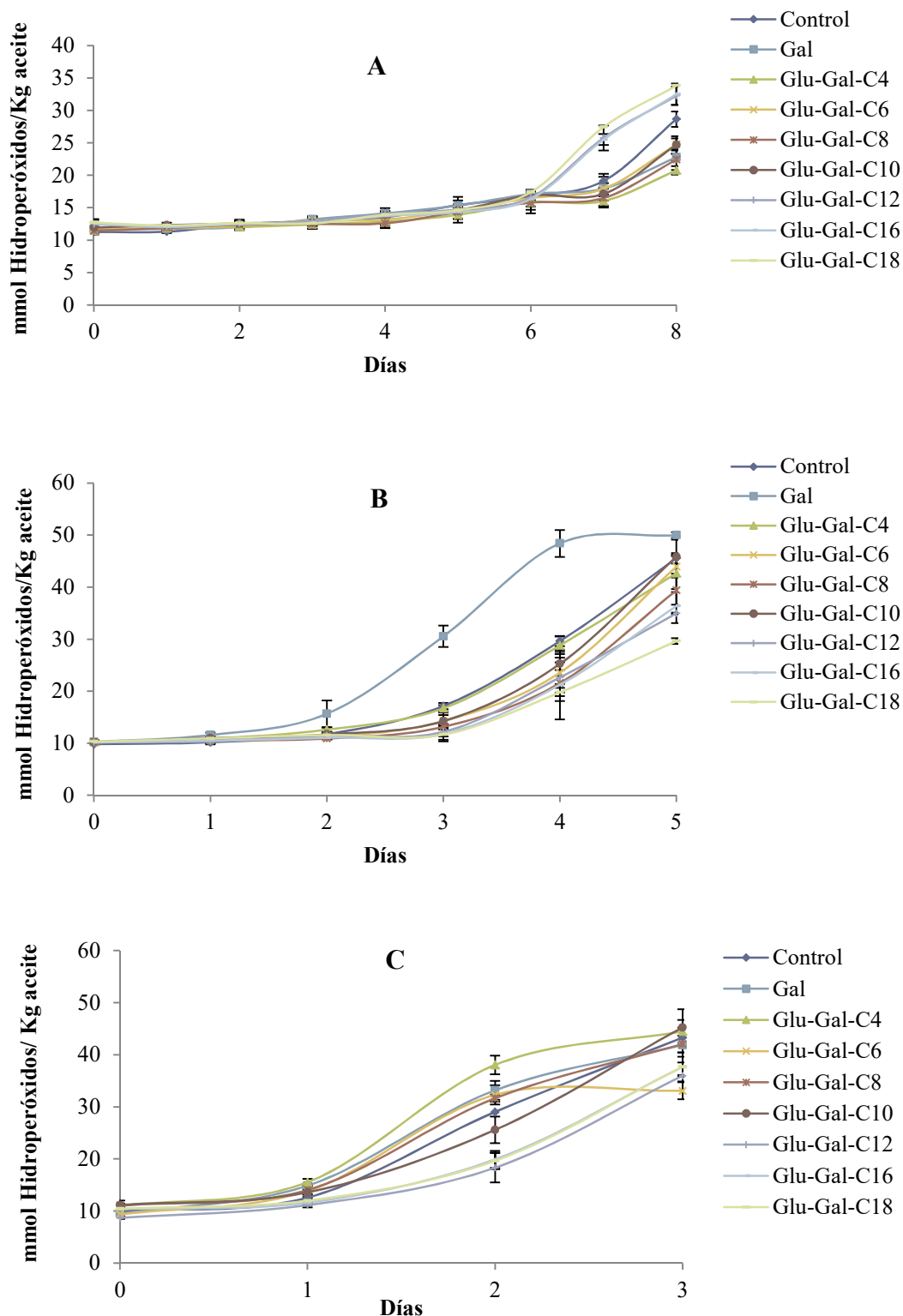


Fig. 53 Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con trienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de Gal y glucosil alquil galatos, almacenadas a 30 °C.

Los porcentajes de inhibición a la formación de dienos y trienos conjugados en las emulsiones preparadas con lecitina, Tween 20 y SDS calculados para los días 8, 4 y 2,

respectivamente se muestran en las **Tab. 47** y **Tab. 48** En ambos casos, los porcentajes de inhibición determinados, son del mismo orden, tanto para la formación de dienos conjugados, como para la formación de trienos conjugados.

Los derivados glucosilados de cadena corta o media (C4-C10) mostraron una eficacia antioxidante moderada en la formación de dienos y trienos conjugados, cuando la emulsión se preparó con lecitina. Los demás derivados tuvieron un comportamiento prooxidante. El orden de eficacia que presentaron fue el siguiente:

Glu-Gal-C4 ~ Glu-Gal-C8 > Gal ~ Glu-Gal-C6 ~ Glu-Gal-C10 >>> Glu-Gal-C12 ~ Glu-Gal-C16 ~ Glu-Gal-C18

Dienos conjugados			
	Lecitina	Tween 20	SDS
Fenol	% I (día 8)	% I (día 4)	% I (día 2)
Gal	32,31 ± 0,87	-26,94 ± 0,14	0,80 ± 0,57
Glu-Gal-C4	49,56 ± 1,04	4,97 ± 0,17	-18,56 ± 2,20
Glu-Gal-C6	31,47 ± 0,42	28,33 ± 0,47	5,76 ± 1,37
Glu-Gal-C8	38,86 ± 1,19	41,63 ± 0,82	-2,20 ± 0,44
Glu-Gal-C10	30,73 ± 0,89	12,44 ± 1,12	13,55 ± 3,69
Glu-Gal-C12	-2,28 ± 0,79	32,59 ± 3,20	-95,81 ± 0,17
Glu-Gal-C16	-6,08 ± 0,86	22,70 ± 0,43	-97,76 ± 2,72
Glu-Gal-C18	-9,10 ± 0,94	56,28 ± 5,33	-79,67 ± 9,60

Tab. 47 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina, Tween y SDS como emulsificantes y almacenadas a 30 °C (media ± sd). El Gal se empleó como control.

Trienos conjugados			
	Lecitina	Tween 20	SDS
Fenol	% I (día 8)	% I (día 4)	% I (día 2)
Gal	26,93 ± 1,50	-10,34 ± 0,44	-22,75 ± 3,87
Glu-Gal-C4	47,40 ± 2,32	5,96 ± 1,15	-52,07 ± 4,23
Glu-Gal-C6	26,61 ± 0,84	33,64 ± 0,47	-17,73 ± 1,01
Glu-Gal-C8	38,84 ± 1,84	43,12 ± 0,55	-10,76 ± 1,82
Glu-Gal-C10	27,85 ± 1,08	8,63 ± 0,62	29,37 ± 6,15
Glu-Gal-C12	-2,45 ± 1,48	50,77 ± 5,54	-109,57 ± 3,27
Glu-Gal-C16	3,55 ± 0,25	66,01 ± 0,73	-113,65 ± 0,14
Glu-Gal-C18	-5,58 ± 0,09	57,64 ± 0,87	-108,90 ± 4,77

Tab. 48 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina, Tween y SDS como emulsificantes y almacenadas a 30 °C (media ± sd). El Gal se empleó como control.

Cuando la emulsión se preparó empleando Tween 20, el compuesto **Glu-Gal-C4** apenas mostró actividad. **Glu-Gal-C18** presentó una efectividad antioxidante relativamente alta y todos los demás derivados glucosilados presentaron una eficacia moderada. El orden de eficiencia antioxidante fue el mostrado a continuación:

Glu-GalC18 > Glu-Gal-C8 > Glu-Gal-C12 > Glu-Gal-C6 > Glu-Gal-C16 > Glu-Gal-C10 > Glu-Gal-C4 > Gal

El compuesto **Glu-Gal-C18** presentó un comportamiento significativamente diferente y dependiente del emulsificante desde el punto de vista de la inhibición de la oxidación, medida en la formación de dienos o trienos conjugados. Mientras que en las muestras preparadas con lecitina presentaba un comportamiento claramente prooxidante, para el caso de las emulsiones que contenían Tween 20 presenta una eficacia antioxidante relativamente elevada.

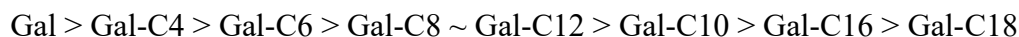
Sólo el compuesto **Glu-Gal-C10** mostró un comportamiento antioxidante moderado en el desarrollo de la rancidez de las emulsiones preparadas con SDS. El compuesto **Glu-Gal-C6** mostró un porcentaje de inhibición en la formación de dienos y trienos conjugados muy limitado y todas las muestras suplementadas con los demás glucosil alquil galatos tuvieron un comportamiento prooxidante.

5.3.7. Discusión de resultados.

El estudio de la hidrofobicidad de derivados alquilo de ácido gálico en base a la determinación de $\log P$ mostró un aumento de la lipofilia con la longitud de cadena hasta C12. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Lu y col. (Lu, Z., et al., 2006). En contraposición, los compuestos **Gal-C16** y **Gal-C18** mostraron una ligera disminución de la lipofilia con respecto a los ésteres de cadena más corta. Estos resultados sugieren una dependencia no lineal entre la hidrofobicidad y la longitud de cadena en derivados de ácido gálico. Esta tendencia también se observó al analizar el coeficiente de partición para los derivados glucosil alquilo de **Gal**: cuando la longitud de cadena es corta o media (C4-C8) se produce un incremento de la hidrofobicidad con la longitud de dicha cadena hasta un valor máximo en C8 y, a continuación se produce una disminución en la lipofilia con el incremento del número de átomos de carbono de la cadena.

La eficacia en la captación de radicales evaluada como DPPH de los alquil derivados fue similar a la presentada por el compuesto **Gal**. Si bien, se observaron ligeras diferencias que pueden ser atribuidas a efectos estéricos tal y como han sugerido Lu y col. para ésteres de ácido gálico (Lu, Z., et al., 2006). La reactividad química de los antioxidantes viene marcada por el número y la localización en la molécula de grupos donadores de hidrógeno (en este caso, grupos -OH). Un incremento de los grupos hidroxilo en el anillo aromático incrementa la actividad de captación de radicales ya que se pueden donar más átomos de hidrógeno procedentes de los grupos -OH fenólicos para estabilizar los radicales libres. (Shahidi, F. & Wanasundara, 1992; Rice-Evans, et al., 1996). Esto explica que la introducción de un residuo de glucosa en el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo aromático, provoque una disminución importante en la eficacia para enmascarar radicales. Las pequeñas diferencias mostradas con la extensión en la longitud de la cadena, se volvieron a observar para el caso de los derivados glucosil alquilo.

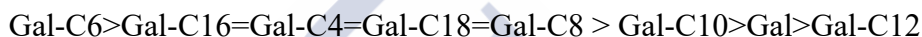
El poder reductor de los alquil galatos presentó el siguiente orden de eficacia:



El incremento en la longitud de la cadena de los alquil derivados provocó una disminución en el poder reductor con respecto al **Gal**. Pereira-Caro y col. (Pereira-Caro, et al., 2009) han atribuido dicha disminución en una serie semejante a impedimentos estéricos que no presentan las cadenas más cortas ya que éstas poseen una estructura casi lineal.

De nuevo, la introducción de una unidad de glucosa provocó una disminución drástica en el poder reductor de los derivados glucosilo en relación a los análogos con la misma longitud de cadena.

Los experimentos de oxidación llevados a cabo en aceites de pescado con los diferentes ésteres de **Gal** mostraron el siguiente orden de actividad en la inhibición de la oxidación lipídica.



Estos resultados no se ajustan a la regla general que muestra la “*paradoja polar*” (Porter, W. L., 1993) al ser el **Gal**, el compuesto más polar, y sin embargo, uno de los que menos capacidad de inhibición presenta a la formación hidroperóxidos con dienos conjugados. Asimismo, si analizamos en conjunto los datos obtenidos para la capacidad de inhibición frente a la formación de dienos conjugados, aquellos compuestos con polaridad e hidrofobicidad intermedia comprendidos entre **Gal** y **Gal-C10** y **Gal-C12** (que son aquellos los que presentan mayor valor de $\log P$ y, en consecuencia, mayor lipofilia) son los que presentaron peor capacidad antioxidante desde el punto de vista de captación de radicales. La representación del poder de inhibición frente a la longitud de cadena (**Fig. 54**) muestra claramente esta tendencia no lineal en la inhibición de formación de dienos conjugados para los alquil galatos y sus correspondientes derivados glucosilados.

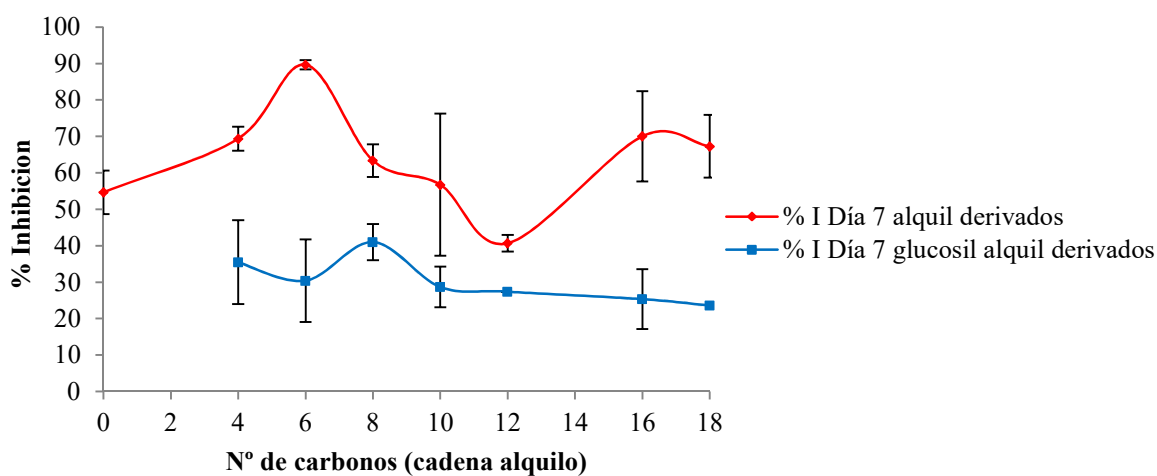


Fig. 54 Porcentajes de inhibición calculados a día 7 de ácido **Gal**, alquil derivados y glucosil alquil derivados (en una concentración de 0,1 mM) frente a la longitud de cadena alquílica en aceite de pescado almacenado a 45 °C.

Esta relación no lineal ya fue observada en este trabajo al estudiar el efecto de la acilación en el derivado glucosilado del **Res**, el **Pic**.

Tal y como ya se ha mencionado, recientemente diversos estudios han puesto en evidencia esta la inexistencia de una relación lineal entre la actividad antioxidante de un compuesto y su hidrofobicidad (Shahidi, Fereidoon & Zhong, 2011; Laguerre, et al., 2015). Estos autores, al estudiar la eficacia de ésteres de ácido gálico, demostraron esta relación no lineal entre la capacidad antioxidante de ésteres de ácido gálico con su hidrofobicidad. De tal forma que, existe una longitud de cadena óptima en torno a los 6-8 átomos carbono, y los compuestos más polares y los menos polares son los que muestran peor capacidad antioxidante. Asimismo, el compuesto **Gal-C18**, a pesar de presentar la mayor longitud de cadena alquílica estudiada, no mostró la hidrofobicidad más alta y tuvo una capacidad antioxidante similar a aquellos ésteres que presentaban una hidrofobicidad similar. Resultados similares fueron obtenidos por Laguerre y col. (Laguerre, et al., 2011) cuando estudiaron las propiedades antioxidantes de ácido clorogénico y una serie de clorogenatos en aceite de maíz. Estos autores, tal y como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, observaron que el ácido clorogénico y su dodecil éster presentaban peor capacidad antioxidante (medida como inhibición a la formación de dienos conjugados) que el clorogenato de butilo y el clorogenato de hexadecilo.

Como se ha descrito en el capítulo anterior, se ha sugerido que los aceites comerciales, al contener trazas de agua, esteroides, mono y digliceroides, etc. , compuestos minoritarios presentan una cierta actividad superficial, pueden agregarse dando lugar a la formación de una pequeñísima interfase aceite-agua. Estas estructuras principalmente son de tipo laminar o micelas reversas, esto es un núcleo de agua a nanoescala estabilizado por una monocapa de moléculas surfactantes con sus cabezas polares orientadas hacia el núcleo de agua y las cadenas alifáticas hacia el medio lipídico (Xenakis, et al., 2010). Las micelas permiten nuevas interacciones entre todos los componentes que forman parte del sistema y pueden alterar, de forma significativa las velocidades de reacción, entre los distintos componentes del mismo (Ghosh & Tiwary, 2001).

El estudio de la capacidad antioxidante de ésteres de ácido gálico en emulsiones de aceite-agua, ha sido llevado a cabo por diversos grupos. Porter y col (Porter, William L., et al., 1989) estudiaron la capacidad antioxidante de ácido gálico y de galatos de alquilo hasta una longitud de cadena de doce carbonos (galato de dodecilo). Estos autores encontraron una tendencia general que se ajustaba a la paradoja polar, de tal manera que, los compuestos más apolares eran más efectivos en emulsiones de aceite. Establecieron una relación entre la capacidad antioxidante y el factor de retención (R_f) medido en capa fina, TLC).

En relación al tipo de emulsificante, los resultados obtenidos muestran que, al representar el porcentaje de inhibición encontrado en las emulsiones de aceite-agua de cada uno de los ésteres estudiados, frente a la longitud de cadena alquilo (**Fig. 55**) se obtiene un comportamiento distinto en función del emulsificante empleado. Cuando el emulsificante empleado fue lecitina, el comportamiento sigue una curva parabólica en desacuerdo con la “*paradoja polar*” ($R^2=0,9182$). Sin embargo, cuando el emulsificante usado fue Tween 20, se encuentra una curva hiperbólica no lineal ($R^2=0,9872$) con una evolución más ajustada al comportamiento predicho por la paradoja polar. Cuando el emulsificante utilizado fue SDS,

únicamente el **Glu-Gal-C10** presentó una capacidad antioxidante moderada mientras que los demás derivados alquil glucosilo mostraron un comportamiento prooxidante.

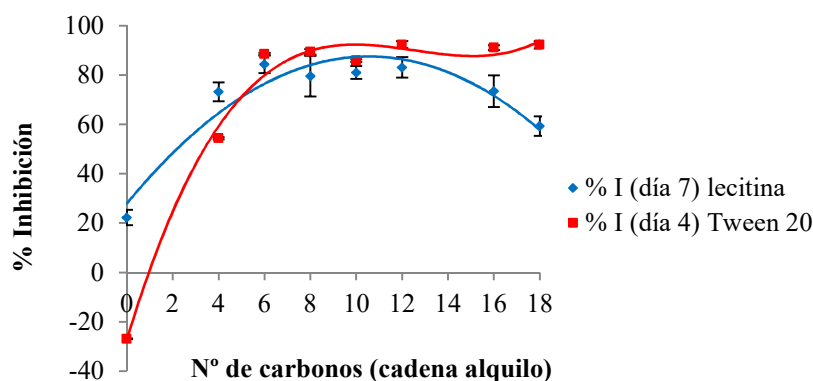


Fig. 55 Porcentajes de inhibición de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (almacenada a 45 °C) y Tween 20 (almacenada a 30 °C) como emulsificantes a día 7 y día 4, respectivamente.

Tal y como se ha indicado, los resultados obtenidos cuando se emplea lecitina como emulsificante parecen estar en desacuerdo con las predicciones de la paradoja polar. Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos y aquellos publicados por Porter y col. (Porter, William L., et al., 1989) pueden ser debidos a que la serie de ésteres de ácido gálico empleada por estos autores finaliza en el dodecil galato. En el presente trabajo, el estudio se extendió hasta el octildodecil galato. Precisamente, los dos ésteres de mayor longitud de cadena (C16 y C18) son los que se alejan del comportamiento predicho por la paradoja polar para este tipo de sistemas. Por otro lado, cuando el emulsificante empleado es Tween 20, el comportamiento de los alquil galatos en las emulsiones de aceite de pescado se ajusta más a lo esperado según la paradoja polar, ya que los compuestos más hidrofóbicos son los que presentan mayor actividad antioxidante. El decrecimiento en los porcentajes de inhibición observado al pasar de **Gal-C12** a **Gal-C16** y **Gal-C18** en las emulsiones preparadas con lecitina, no fue observado cuando las emulsiones se prepararon con Tween 20. Este comportamiento parabólico con puntos de inflexión o “cut-off” coincide con el previamente observado en los derivados alquilados de hidroxitirosol en emulsiones de aceite-agua preparadas con lecitina como emulsificante. El estudio realizado con dichos derivados mostró que el mayor porcentaje de inhibición se corresponde con **Hyd-C8** ya discutido en el apartado anterior. Este efecto “cut-off” también fue observado en este trabajo al estudiar la actividad de distintos derivados acilados de **Pic** en emulsiones de aceite en agua estabilizadas con lecitina siendo **Pic-C12** el derivado más prometedor.

Como se ha mencionado previamente, parece evidente la existencia de un efecto parabólico o “cut-off” en el comportamiento antioxidante de las familias de compuestos con diferentes longitudes de cadena para los derivados. Este comportamiento descrito para los derivados de **Res** de acuerdo con los resultados de esta memoria contenidos en los capítulos anteriores y sugerido por Laguerre y col. (Laguerre, et al., 2009, 2010) en los ésteres del ácido clorogénico y del ácido rosmarínico en emulsiones de aceite en agua, parece evidenciarse de nuevo para el **Gal** y sus derivados acilados.

Tal y como ya se ha explicado en el capítulo anterior, se han propuesto numerosos mecanismos que explican este comportamiento. Dada la importancia de la correcta disposición del antioxidante en la interfase, sugerido por Hens y col. (Heins, et al., 2007), la implicación de los fenolípidos con mayor longitud de cadena en la formación de micelas o agregados (Laguerre, et al., 2009) o la disminución de movilidad por el incremento de tamaño al incrementarse la cadena (Fendler, 1982) podrían limitar la adecuada disposición de estos fenolípidos de mayor tamaño en la interfase, produciendo una disminución en su actividad antioxidante.

Tal y como ya se ha expuesto en el capítulo correspondiente al **Hyd**, Lucas y col. (Lucas, et al., 2010) propusieron que la presencia de características surfactantes podría influir en la actividad antioxidante al favorecer una disposición preferencial en la interfase de estos fenolípidos, y produciendo, en consecuencia, una mayor eficacia en la inhibición de la oxidación lipídica. Sin embargo, Maldonado y col. (Maldonado, et al., 2011) mostraron que la relación entre las propiedades surfactantes y la longitud de cadena en derivados de **Gal** se ajustaba a un comportamiento parabólico. De hecho, los derivados alquilo que presentaron mejor capacidad surfactante con una longitud de cadena media fueron los que exhibieron una mejor actividad antioxidante en emulsiones de aceite-agua cuando se empleaba lecitina como emulsificante. Tal y como se ha comentado, esta correlación no se observó en las emulsiones aceite-agua cuando se utilizó Tween 20 como emulsificante dando como resultado que los alquil derivados con longitud de cadena media mostraron una actividad antioxidante similar a los derivados de cadena larga.

En base a estas observaciones, se deduce que la eficacia antioxidante de los distintos fenolípidos depende de manera significativa del emulsificante que se emplee para preparar la emulsión. Parece existir también una interacción entre el compuesto antioxidante y el emulsificante a nivel del núcleo molecular. De hecho Panya y col. (Panya, et al., 2012) observaron un efecto parabólico cuando estudiaron la capacidad antioxidante de alquil ésteres del ácido rosmarínico en emulsiones aceite-agua preparadas con Tween 20, en contraposición a lo observado en este trabajo para alquil ésteres de **Gal** que, en estas condiciones, parecen ajustarse mejor al comportamiento predicho por la paradoja polar. Estos resultados sugieren que los distintos comportamientos en presencia del mismo emulsificante son debidos a interacciones específicas de cada antioxidante y no a un comportamiento general en función del emulsificante empleado.

Asimismo, la importancia de la naturaleza del emulsificante en la eficacia de los antioxidantes en emulsiones de aceite en agua ha sido estudiada por Stöckmann y col. (Stöckmann, et al., 2000). Estos autores obtuvieron que la capacidad antioxidante de series de ésteres de ácido gálico (comprendidos entre el ácido gálico hasta el octil galato) en emulsiones de aceite-agua en aceite de maíz dependía significativamente del emulsificante empleado (lecitina, Brij 58 o SDS). Estos autores indicaron que las interacciones moleculares específicas entre el antioxidante y el emulsificante era la causa de las diferencias encontradas en el comportamiento de los fenolípidos. La naturaleza de las interacciones podrían ser entre el antioxidante y el grupo característico del emulsificante (por ejemplo, enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos OH fenólicos del antioxidante y la carga del emulsificante) o entre las cadenas alquilo del antioxidante y la cadena lipídica del emulsificante, lo cual podría afectar a la difusión del antioxidante en la emulsión. Otros autores han sugerido la importancia de las interacciones entre antioxidantes y emulsificantes en el seno de la emulsión

ya que en función de las mismas, un mismo compuesto puede mostrar efectividades diversas en función del tipo de emulsión (McClements, D. J. & Decker, 2006; Shahidi, Fereidoon & Zhong, 2011; Alemán, et al., 2015).

Otro aspecto relevante a tener en cuenta y que podría estar relacionado con las diferencias observadas en el comportamiento antioxidante de los distintos ésteres de ácido gálico en las emulsiones preparadas con lecitina, Tween 20 o SDS, es la capacidad antioxidante que pueda presentar el emulsificante per se y que mejora la estabilidad desde el punto de vista de la oxidación de la emulsión. Se sabe que la lecitina, además de presentar buenas características como emulsionante, presenta actividad antioxidante (Judde, et al., 2003). Sin embargo, el Tween 20 y el SDS son emulsificantes sin propiedades antioxidantes conocidas debido a la ausencia de grupos funcionales responsables del potencial comportamiento antioxidante (Kerwin, 2008). Pan y col. (Pan, et al., 2013) han demostrado que la estabilización de la emulsión en presencia de lecitina es debida a la capacidad protectora de la lecitina para disminuir la velocidad de penetración de los radicales peroxilo desde la fase acuosa a la fase oleosa de la emulsión comparada con la velocidad que presentan en el caso de emulsiones preparadas con Tween 20. El incremento de la velocidad de penetración para los radicales peroxilo en presencia de Tween 20 debido a su menor actividad antioxidante, produce una desestabilización de la emulsión en términos de oxidación. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren un posible sinergismo entre lecitina y los alquil galatos que incrementaría la actividad antioxidante de los mismos y que, a su vez, también dependería de la estructura molecular del alquil galato.

Los derivados glucosil alquilo de **Gal** mostraron menos eficacia antioxidante en emulsiones de aceite-agua que sus correspondientes alquil galatos a pesar de sus mejores características surfactantes (Maldonado, et al., 2011). Estos resultados fueron inesperados ya que los glucosil derivados siguen manteniendo la estructura catecol en el anillo fenólico. Sin embargo, la presencia del éster, que parcialmente desactiva el anillo aromático y que puede limitar la capacidad de donar hidrógenos, y la presencia del residuo de glucosa, provocan una disminución importante en la capacidad anirradicalaria, así como en el poder reductor, produciendo una importante reducción de la eficacia antioxidante.

Cuando se representó el porcentaje de inhibición de los derivados glucosil alquilo frente a la longitud de la cadena (**Fig. 56**), se obtuvieron resultados similares a los observados para los alquil galatos. Los glucosil alquil galatos con longitud de cadena C4-C10 presentaron la mejor capacidad antioxidante en las emulsiones preparadas con lecitina con un efecto “cut-off” en el carbono 10. En la presencia de Tween 20, los derivados tienden a seguir la paradoja polar mostrando un aumento en la efectividad antioxidante a medida que se incrementó la longitud de la cadena carbonada y por tanto, la hidrofobicidad.

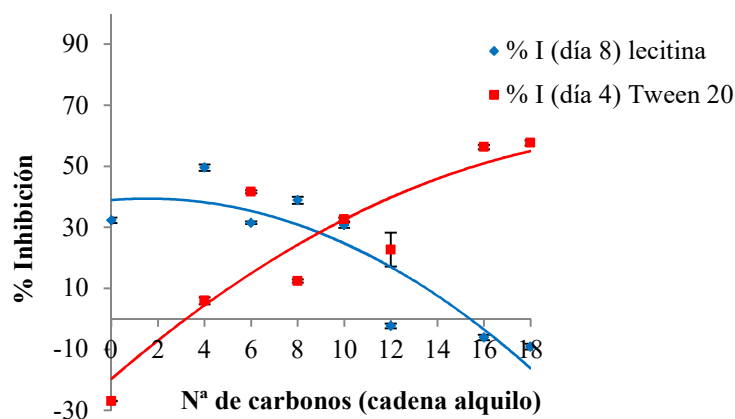


Fig. 56 Porcentajes de inhibición de Gal y glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (almacenada a 45 °C) y Tween 20 (almacenada a 30 °C) como emulsificantes a día 8 y día 4, respectivamente.

Por lo tanto, se puede concluir que la conservación de los tres grupos hidroxilo fenólicos del ácido gálico es fundamental para mantener la eficacia antioxidante de los alquil derivados, mientras que la pérdida de uno de estos grupos hidroxilo con la introducción de una unidad de glucosa produce una disminución de la capacidad antioxidante de estos compuestos. Por otro lado, la mejora de las propiedades surfactantes con la introducción de un residuo de glucosa no produce una mejora en la actividad antioxidante de los alquil galatos correspondientes.

El tipo de emulsificante parece tener un papel importante y, probablemente, las interacciones específicas entre los antioxidantes y el emulsificante, unido al efecto sinérgico que pueden tener algunos emulsificantes como la lecitina al presentar actividad antioxidante, puede dirigir el comportamiento antioxidante de estos compuestos en emulsiones aceite-agua. Además, las fuertes interacciones cabeza-cabeza o cola-cola entre los fenolípidos y los emulsificantes pueden orientar al antioxidante más cerca de la interfase mejorando su actividad antioxidante. Sin embargo, si estas interacciones son débiles, pueden provocar un movimiento del antioxidante al azar no disponiéndose de forma efectiva en la interfase y por ello afectando a su capacidad antioxidante.

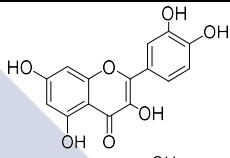
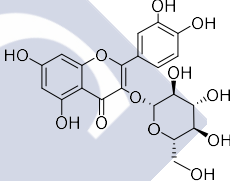
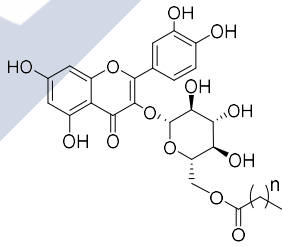
5.4. DERIVADOS DE ISOQUERCITRIN.

Se presenta el efecto de una serie de modificaciones estructurales en la molécula de **IQ** en su capacidad antioxidante. Estas modificaciones consistieron en la lipofilización en el carbono 6 del residuo de glucosa de **IQ**.

Al igual que en los capítulos previos, esta sección presenta dos partes, una primera destinada a la descripción de los parámetros físico-químicos de los compuestos a estudiar, y una segunda parte centrada en el estudio de las capacidades de estos compuestos para inhibir la oxidación de los sistemas lipídicos en aceite y emulsiones.

5.4.1. Síntesis y estabilidad.

La quercetina, el isoquercitrin y los derivados acilados de isoquercitrin se representan en la **Tab. 49**.

Fenol	Abreviatura	Peso molecular	n	Estructura
Quercetina	Q	302,24		
Isoquercitrin	IQ	464,38		
Isoquercitrin butirato	IQ-C4	534,47	2	
Isoquercitrin octanoato	IQ-C8	590,57	6	
Isoquercitrin decanoato	IQ-C10	618,63	8	
Isoquercitrin laurato	IQ-C12	646,68	10	
Isoquercitrin miristato	IQ-C14	674,73	12	
Isoquercitrin palmitato	IQ-C16	702,79	14	

Tab. 49 Derivados acilados de **IQ**.

Los rendimientos obtenidos en la síntesis de los derivados acilados de isoquercitrin fueron los siguientes:

- El isoquercitrin butirato se obtuvo con un 74% de rendimiento.
- El isoquercitrin octanoato se obtuvo con un 64% de rendimiento.

- El isoquercitrin decanoato se obtuvo con un 67% de rendimiento.
- El isoquercitrin laurato se obtuvo con un 45% de rendimiento.
- El isoquercitrin miristato se obtuvo con un 71% de rendimiento.
- El isoquercitrin palmitato se obtuvo con un 46% de rendimiento.

Todos los derivados acilados se obtuvieron con la configuración deseada.

El estudio de estabilidad de estos compuestos almacenados a 4 °C realizado por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa con detector de diodos (**Tab. 50**) demostró que los compuestos fueron estables, al menos durante dos años en estado sólido almacenados a 4 °C bajo atmósfera inerte. Se incluyen también los datos espectroscópicos de la quercetina y del isoquercitrin.

Fenol	Tiempo de retención (min)	λ (nm)
Q	3,919	255,6 y 369,5
IQ	2,595	255,6 y 356,6
IQ-C4	3,356	255,6 y 357,8
IQ-C8	7,560	255,6 y 358,8
IQ-C10	10,754	256,8 y 357,8
IQ-C12	14,077	256,8 y 358,8
IQ-C14	17,254	256,8 y 356,6
IQ-C16	20,109	256,8 y 358,8

Tab. 50 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV-vis de **Q**, **IQ** y derivados acilados de **IQ**.

Todos los derivados acilados mostraron un espectro de absorción semejante al del **IQ** con dos máximos de absorción característicos en torno a 256 y 358 nm.

5.4.2. Coeficientes de partición: $\log P$.

La **Tab. 51** muestra los coeficientes de reparto, $\log P$ de **Q**, **IQ** y los derivados acilados de **IQ** y sus derivados se determinaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Los valores obtenidos para $\log P$ mostraron un incremento de la lipofilia al introducir el grupo alquilo en la molécula de **IQ**. Asimismo, se produjo un ligero aumento en la hidrofobicidad para los derivados acilados de longitud de cadena corta y media (C4-C12), conforme se iba incrementando la longitud de la cadena. Los derivados acilados de cadena larga (C14-C16) mostraron un incremento mayor en la hidrofobicidad con respecto al **IQ** comparado con los derivados C2-C12 los anteriores. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores correspondientes a cada uno de ellos.

Fenol	log <i>P</i>
Q	1,46 ± 0,03
IQ	0,76 ± 0,00
IQ-C4	1,90 ± 0,03
IQ-C8	2,15 ± 0,00
IQ-C10	2,02 ± 0,01
IQ-C12	2,14 ± 0,03
IQ-C14	2,67 ± 0,01
IQ-C16	2,66 ± 0,02

Tab. 51 Coeficientes de partición expresados como log *P* de **Q**, **IQ** y derivados acilados de **IQ** (media ± sd).

5.4.3. Capacidad antirradicalaria: DPPH y TEAC.

La capacidad de captación de radicales se evaluó mediante dos metodologías diferentes: el DPPH y el TEAC. La **Q** se empleó como control positivo. Los resultados obtenidos a través de ambas metodologías indican que los valores más bajos se muestran en la **Tab. 52**.

Fenol	DPPH EC ₅₀ (mM)	TEAC (mM)
Q	0,2829 ± 0,0027	0,2225 ± 0,0016
IQ	0,4496 ± 0,0038	0,3482 ± 0,0137
IQ-C4	0,4507 ± 0,0010	0,3071 ± 0,0108
IQ-C8	0,4132 ± 0,0027	0,3465 ± 0,0244
IQ-C10	0,4201 ± 0,0025	0,4403 ± 0,0097
IQ-C12	0,3962 ± 0,0118	0,6998 ± 0,0190
IQ-C14	0,3994 ± 0,0070	0,7260 ± 0,0387
IQ-C16	0,3059 ± 0,0002	0,8528 ± 0,0109

Tab. 52 Capacidad antirradicalaria de **IQ** y derivados acilados de **IQ**. El DPPH se expresó como EC₅₀, concentración necesaria para captar el 50% del radical DPPH presente en la disolución. El TEAC se expresó como la concentración que produjo la misma captación de radical ABTS^{•+} que 1 mM de Trolox (media ± sd).

El ensayo DPPH mostró que todos los derivados acilados mejoraron la capacidad de captación al radical DPPH a excepción del **IQ-C4** que mostró la misma capacidad de captación al radical DPPH que el **IQ**. La capacidad parece aumentar a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena alquílica.

Los resultados obtenidos con el ensayo TEAC mostraron una disminución en la capacidad de captación del radical ABTS^{•+} con el aumento de la longitud de la cadena. Claramente, los derivados acilados con longitud de cadena entre C4-C10 mostraron una capacidad de captación al radical ABTS similar (siendo el **IQ-C4** el mejor) a **IQ** y aquellos derivados de longitud de cadena mayor (C12-C16) fueron visiblemente peores a **IQ** y con pocas diferencias entre ellos.

En ambos ensayos, la **Q** mostró los mejores resultados.

5.4.4. Capacidad reductora. FRAP.

La Fig. 57 muestra el poder reductor por mol de IQ y de sus derivados acilados evaluado mediante el método FRAP. La Q se usó como control.

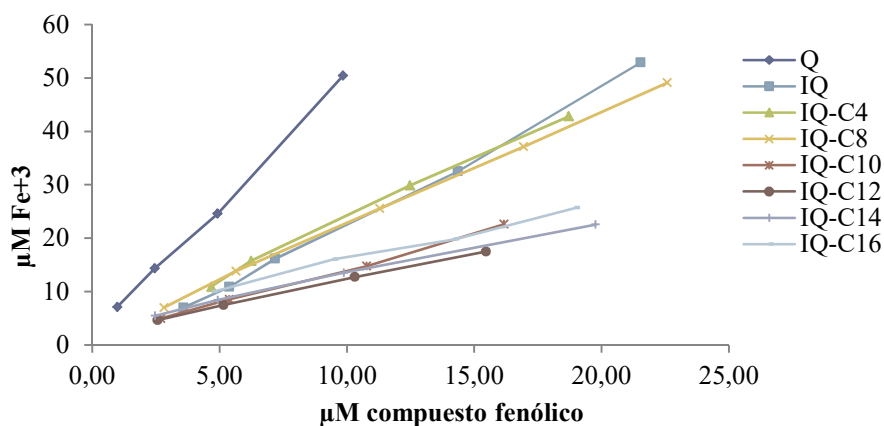


Fig. 57 Poder reductor FRAP de IQ y sus derivados acilados.

Los resultados obtenidos mostraron dos comportamientos diferenciados: Los derivados acilados de longitud de cadena corta y media (C4-C8) mostraron un poder reductor similar al IQ. Los derivados acilados de longitud de cadena mayor (C10-C16) presentaron un poder reductor mucho menor que el IQ.

Al igual que en los casos anteriores, se expresó la capacidad reductora de los distintos fenoles en función de la concentración molar, y las gráficas se ajustaron a la ecuación de una recta ($R^2 > 0,9974$). La pendiente de las ecuaciones lineales indica el número de moles de hierro férrico reducidos por un mol de compuesto reductor. El análisis del nº de moles de electrones que pueden ser cedidos, corroboró esta tendencia (Tab. 53), siendo los derivados IQ-C4 e IQ-C8 capaces de ceder los mismos moles de electrones que IQ. En los demás derivados, esta capacidad se redujo a algo más de la mitad

Fenol	moles de e ⁻
Q	4,8749 ± 0,1624
IQ	2,5380 ± 0,3691
IQ-C4	2,2497 ± 0,0099
IQ-C8	2,1130 ± 0,0339
IQ-C10	1,2926 ± 0,0239
IQ-C12	0,9987 ± 0,0361
IQ-C14	0,9787 ± 0,0078
IQ-C16	1,0744 ± 0,0905

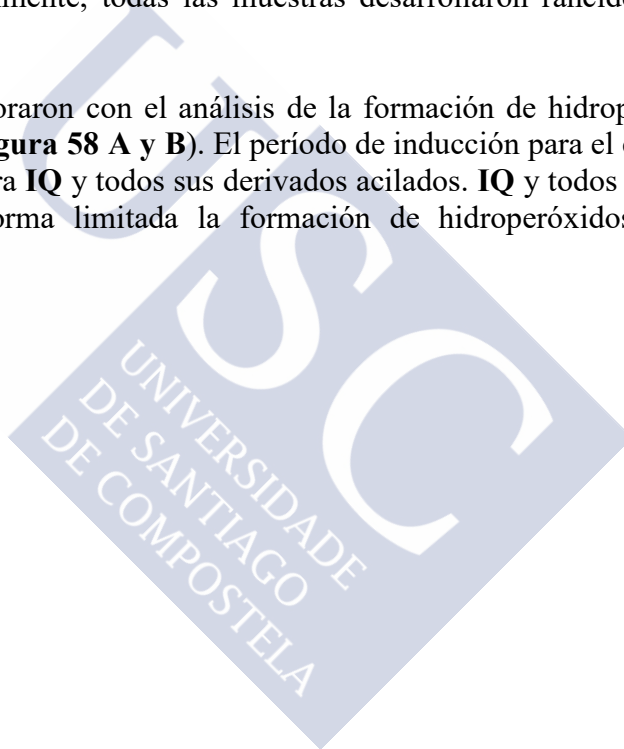
Tab. 53 Moles de electrones que pueden ceder Q, IQ y sus derivados acilados (media ± sd).

5.4.5. Actividad de los compuestos derivados de isoquercitrin en sistemas basados en aceites de pescado.

El estudio de la inhibición de los derivados de **IQ** en un sistema de aceite de pescado se llevó a cabo empleando el aceite de hígado de bacalao previamente caracterizado y empleado en los capítulos anteriores. La concentración en la que los antioxidantes fueron añadidos fue de 0,75 mM de acuerdo con trabajos previos existentes en la bibliografía (Huber, et al., 2009) Los sistemas se activaron térmicamente a 45 °C y se estudió a evolución de la oxidación durante 8 días. A las muestras control no se les adicionó ningún aditivo y se empleó **Q** como antioxidante control a la misma concentración.

La evaluación sensorial mostró que las muestras control y las muestras suplementadas con los derivados acilados de media y larga cadena (C8-C16) desarrollaron una rancidez incipiente a partir del día 2. Las muestras que contenían **Q** e **IQ** no desarrollaron rancidez incipiente hasta el día 4. Finalmente, todas las muestras desarrollaron rancidez evidente a partir del día 5.

Estos resultados se corroboraron con el análisis de la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Figura 58 A y B**). El período de inducción para el control fue de tres días retrasándose un día para **IQ** y todos sus derivados acilados. **IQ** y todos sus derivados acilados inhibieron de una forma limitada la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados.



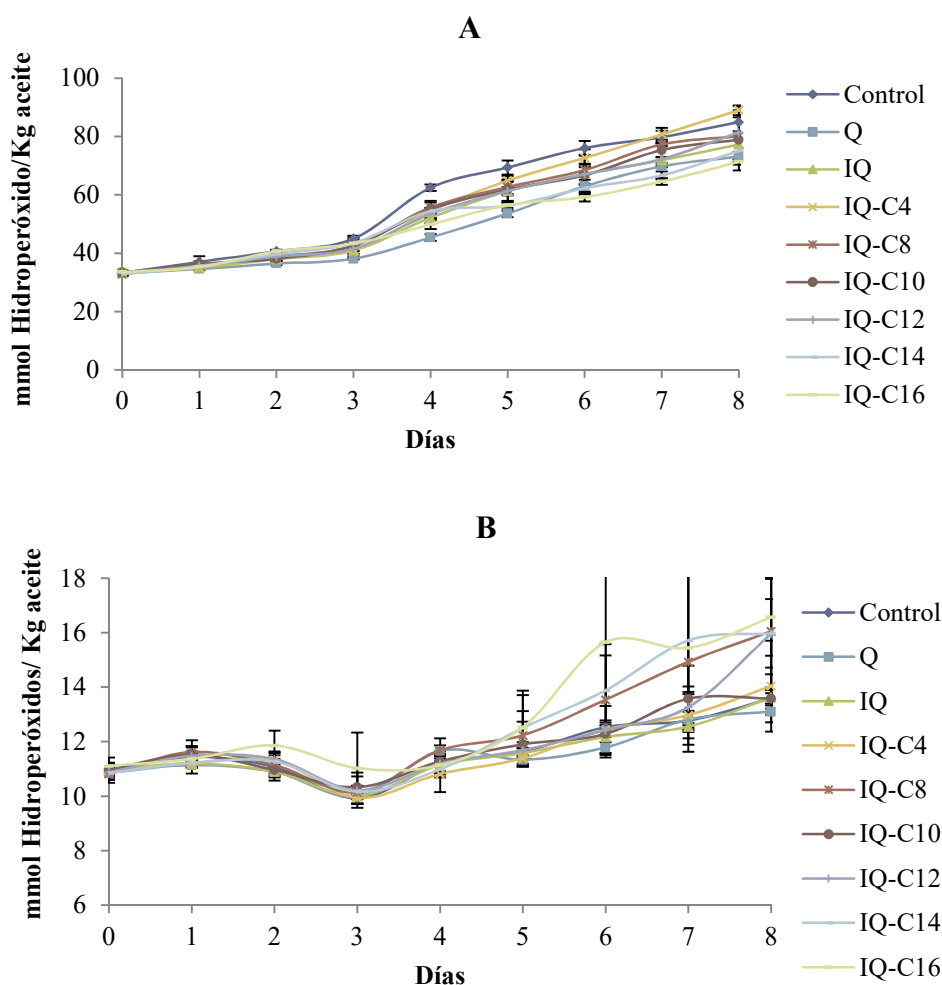


Fig. 58 Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en aceite de pescado almacenado a 45 °C y suplementado con 0,75 mM de Q, IQ y derivados acilados.

El análisis de la cinética de formación de hidroperóxidos con trienos conjugados presentó una cinética mucho más lenta y durante el tiempo de desarrollo del experimento no se llegaron a observar claramente los períodos de inducción y de propagación en la reacción de la oxidación lipídica.

Los porcentajes de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados medidos a día 5 y a día 7 de incubación, mostraron una capacidad antioxidante moderada-baja. IQ-C4, IQ-C10, IQ-C14 e IQ-C16 presentaron los mejores resultados siendo ligeramente superiores a IQ (Tab. 54).

Fenol	Dienos conjugados	
	% I (día 5)	% I (día 7)
Q	46,74 ± 0,01	22,44 ± 1,36
IQ	21,21 ± 1,07	17,90 ± 3,25
IQ-C4	29,79 ± 0,34	20,82 ± 5,38
IQ-C8	16,17 ± 1,85	6,65 ± 2,07
IQ-C10	29,65 ± 4,53	13,95 ± 0,26
IQ-C12	18,52 ± 2,31	24,63 ± 5,81
IQ-C14	36,11 ± 5,30	27,97 ± 2,54
IQ-C16	38,22 ± 3,87	34,58 ± 3,20

Tab. 54 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados de **IQ** y derivados acilados de **IQ** (0,75 mM) en aceite de hígado de bacalao almacenado 45 °C (media ± sd).

5.4.6. Estudio de la inhibición de derivados de isoquercitrin en emulsiones de aceite de pescado en agua. Influencia del emulsificante.

El estudio de la inhibición de la oxidación lipídica de **IQ** y sus derivados acilados fue evaluada en emulsiones de aceite de pescado en agua. Tal y como se ha descrito en los capítulos anteriores, el aceite de pescado empleado fue aceite de hígado de bacalao, *Gadus morhua*. La proporción de aceite en la emulsión fue de un 10%. Para llevar a cabo el estudio de la influencia del emulsificante en la estabilidad oxidativa de la emulsión se emplearon los mismos emulsificantes empleados en el capítulo anterior: lecitina, Tween 20 y SDS. En la mayoría de los casos, el emulsificante estuvo en una proporción del 1% en peso. La activación térmica de los distintos ensayos estuvo comprendida entre 30 y 45 °C.

Con objeto de fijar las concentraciones objeto de estudio a través de ensayos preliminares, se estudió la actividad antioxidante de **Q** en emulsiones de aceite en agua a distintas concentraciones. Para ello se prepararon distintas emulsiones de aceite en agua (10 % de aceite, 1% de lecitina), se suplementaron con 0,10, 0,20 y 0,25 mM de **Q** y se estudió el desarrollo de la oxidación activadas térmicamente a una temperatura de 45°C. La menor concentración no presentó ninguna efectividad. Las concentraciones de 0,20 y 0,25 mM, mostraron una cierta eficacia, alrededor del 45 % para inhibir la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados sin diferencias entre ambas concentraciones. Dado que los estudios sobre la actividad antioxidante in vitro mostraron una efectividad menor para el **IQ** con respecto a la **Q**, se escogió 0,25 mM como concentración de trabajo.

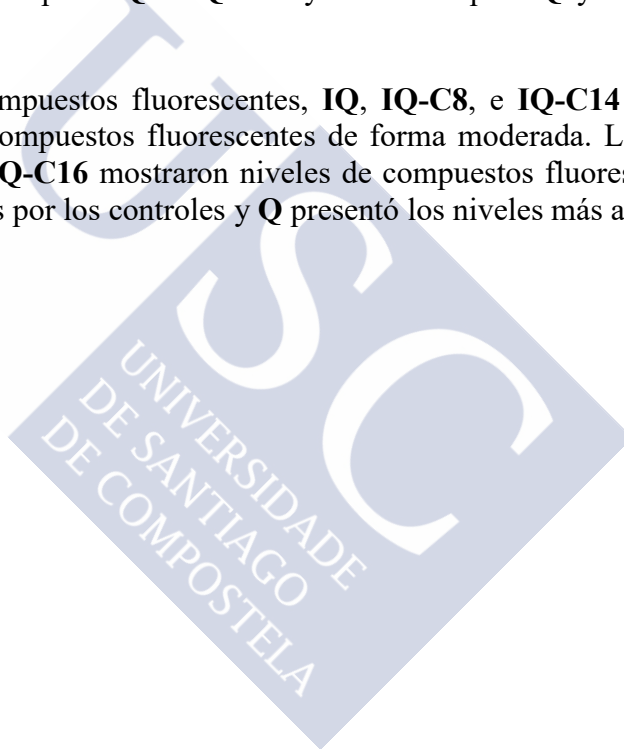
Una vez seleccionada la concentración de antioxidante de trabajo se prepararon emulsiones de aceite en de pescado en agua empleando lecitina como emulsificante, siguiendo el procedimiento ya descrito. En estas condiciones, la adición de los antioxidantes a la emulsión provocó una desestabilización de la misma, especialmente para los derivados de mayor longitud de cadena. Se decidió preparar la emulsión incrementando el porcentaje de emulsificante, lecitina, hasta el 2%. El sistema permaneció estable durante todo el período de estudio de los experimentos de oxidación. La oxidación se indujo mediante la activación térmica a 45 °C y la extensión de la oxidación se estudió durante de 5 días.

El análisis sensorial mostró que las muestras control desarrollaron una rancidez incipiente a partir del día 1 rancidez evidente a partir del día 2. Las muestras suplementadas con **IQ** e **IQ-C14** presentaron aromas asociados a una rancidez incipiente a partir del día 2 y evolucionaron a rancidez clara en el día 3. **Q** y los demás derivados acilados mantuvieron el aroma fresco inicial hasta el día 3 y posteriormente desarrollaron rancidez a partir del día 4.

Como en los casos previos, el desarrollo de la oxidación se estudió mediante la determinación de la formación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y, en este caso, de compuestos fluorescentes de interacción. (**Fig. 59 A, B y C**)

Los resultados indicaron que **IQ** e **IQ-C14** fueron capaces de inhibir la formación de dienos y trienos conjugados en relación al control hasta el día 2. **Q** y los demás derivados inhibieron la formación de dienos y trienos conjugados hasta el día 3. Teniendo en cuenta las curvas de formación, se determinaron los períodos de inducción que fueron de 1 día para las muestras control, de 2 días para **IQ** e **IQ-C14** y de 3 días para **Q** y los demás derivados acilados.

En relación a los compuestos fluorescentes, **IQ**, **IQ-C8**, e **IQ-C14** fueron capaces de inhibir la formación de compuestos fluorescentes de forma moderada. Los compuestos **IQ-C4**, **IQ-C10**, **IQ-C12** e **IQ-C16** mostraron niveles de compuestos fluorescentes ligeramente superiores a los mostrados por los controles y **Q** presentó los niveles más altos.



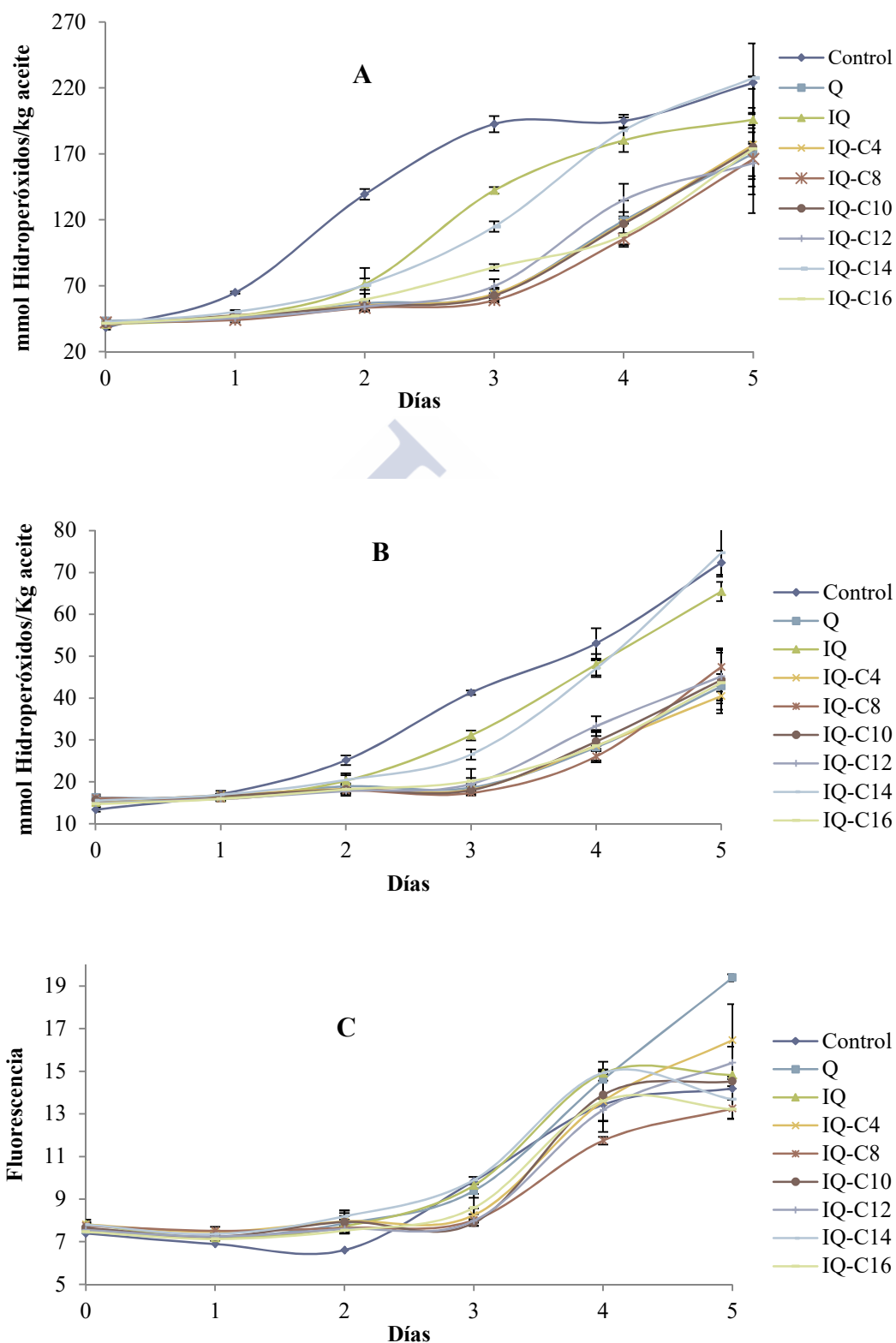


Fig. 59 Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados y de compuestos fluorescentes de interacción (C) de IQ y derivados acilados de IQ (0,25 mM) en emulsión de aceite en agua (10% aceite, 2% lecitina) almacenada a 45 °C. Se empleó Q como control positivo a la inhibición.

Los porcentajes de inhibición de la oxidación en las etapas iniciales y más avanzadas de la oxidación se muestran en las tablas **Tab 55** y **Tab. 56**, respectivamente.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 3)	% I (día 4)	% I (día 3)	% I (día 4)
Q	87,08 ± 3,20	51,61 ± 0,65	91,49 ± 5,91	69,75 ± 1,80
IQ	34,34 ± 0,55	11,06 ± 2,12	43,13 ± 3,69	17,44 ± 6,81
IQ-C4	84,76 ± 2,88	50,53 ± 10,52	89,49 ± 1,97	66,21 ± 8,90
IQ-C8	89,11 ± 1,71	55,04 ± 8,72	95,53 ± 0,68	70,71 ± 8,97
IQ-C10	85,82 ± 2,87	51,39 ± 6,09	91,67 ± 0,74	64,93 ± 8,41
IQ-C12	81,74 ± 3,12	36,04 ± 0,35	83,64 ± 5,48	51,32 ± 5,65
IQ-C14	53,41 ± 2,78	7,58 ± 6,62	61,61 ± 4,60	21,40 ± 5,19
IQ-C16	78,24 ± 7,61	56,96 ± 5,07	79,24 ± 12,33	64,35 ± 8,36

Tab. 55 Porcentajes de inhibición de IQ y derivados acilados de IQ (0,25 mM) en la formación de dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite agua (10% aceite, 2% lecitina) almacenada a 45 °C Se empleó Q como control positivo de la inhibición (media ± sd).

Fenol	Compuestos fluorescentes
	% I (día 5)
Q	-49,81 ± 4,97
IQ	13,67 ± 1,40
IQ-C4	-12,06 ± 3,13
IQ-C8	19,03 ± 2,85
IQ-C10	-17,37 ± 1,61
IQ-C12	-29,03 ± 9,15
IQ-C14	12,69 ± 1,10
IQ-C16	-5,39 ± 7,05

Tab. 56 Porcentajes de inhibición de IQ y derivados acilados de IQ (0,25 mM) en la formación de compuestos fluorescentes en emulsión de aceite agua (10% aceite, 2% lecitina) almacenada a 45 °C. Se empleó Q como control positivo de la inhibición (media ± sd).

Todos los derivados de **IQ** a excepción de **IQ-C14** presentaron una elevada capacidad antioxidante para inhibir la formación de dienos y trienos conjugados y similar a la **Q** con ligeras diferencias entre ellos. Los compuestos **IQ-C8** e **IQ-C14** exhibieron una baja capacidad antioxidante en la formación de compuestos fluorescentes, similar a **IQ**. Todos los demás derivados acilados de **IQ** y **Q** no fueron capaces de inhibir la formación de compuestos fluorescentes.

Para llevar a cabo los experimentos con SDS como emulsificante, se realizaron ensayos previos con **Q** en condiciones similares a las empleadas con lecitina (datos no mostrados) y, de nuevo, una concentración de 0,20 mM mostró una elevada efectividad para inhibir la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. Por lo tanto, para estudiar la inhibición de los distintos derivados acilados de **IQ** se escogió una concentración de 0,25mM. La concentración de SDS con respecto al peso de la emulsión fue de 1% y la temperatura de incubación fue de 30 °C. El estudio de la oxidación se desarrolló a lo largo de 6 días.

El desarrollo de la oxidación se realizó mediante el estudio de la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. Los compuestos fluorescentes de interacción no se determinaron ya que, dada la estructura molecular del emulsificante que, a diferencia de la lecitina, no contiene grupos amino en su estructura, no existe la posibilidad de formación de estos compuestos.

La evaluación sensorial mostró que las muestras control presentaron aromas asociados a una rancidez incipiente a partir del día 2, desarrollando una rancidez evidente a partir del día 3. Todos los derivados acilados de **IQ** de longitud de cadena media - larga (C8-C16) inhibieron la formación de aromas asociados a la rancidez hasta el día 3, para posteriormente, desarrollar una rancidez clara. **IQ** e **IQ-C4** mantuvieron la emulsión en buenas condiciones hasta el día 5, de manera similar al comportamiento presentado por la **Q** que mantuvo estable el sistema durante todo el experimento.

El análisis de las cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 60 A y B**) ratificaron los resultados obtenidos en el análisis sensorial. La formación de dienos y la de trienos conjugados presentó cinéticas muy parecidas. **IQ** e **IQ-C4** mantuvieron niveles bajos de dienos y trienos conjugados hasta el día 5, y a continuación, experimentaron un incremento significativo en la concentración de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. Los derivados acilados de longitud de cadena media-larga, sólo fueron capaces de mantener niveles bajos de hidroperóxidos hasta el día 3. A continuación, la concentración de hidroperóxidos se incrementó drásticamente especialmente para las muestras control y aquellas suplementadas con **IQ-C12**. La **Q** mantuvo niveles bajos de dienos y trienos conjugados durante todo el experimento. Por lo tanto, los períodos de inducción determinados fueron: 3 días para las muestras control y aquellas suplementadas con **IQ-C12**; 3,25 días para **IQ-C8**, **IQ-C10**, **IQ-C12** e **IQ-C16** y 5 días para **IQ** e **IQ-C4**. Tal y como se ha indicado, la **Q** mantuvo niveles bajos de hidroperóxidos y, en consecuencia, no se detectó período de inducción a lo largo de todo el experimento.

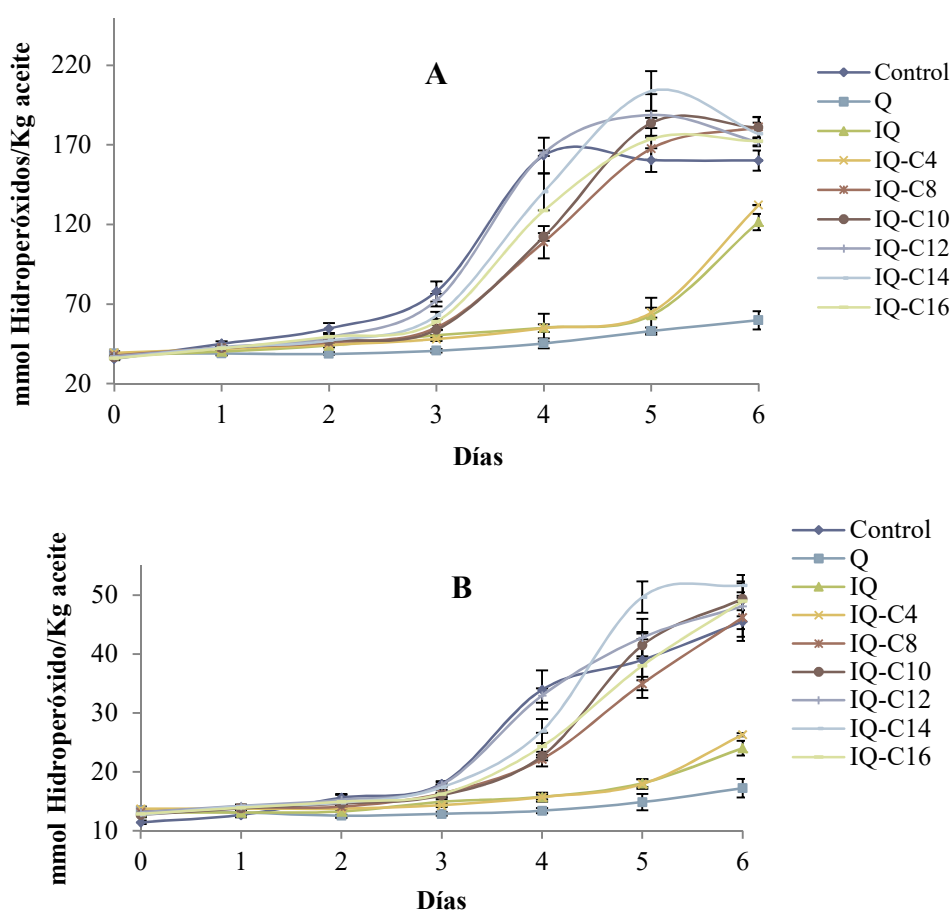


Fig. 60 Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite (10% aceite, 1% de SDS) suplementadas con IQ y derivados acilados de IQ (0,25 mM), almacenadas a 30 °C. Se empleó Q como control positivo a la inhibición.

El cálculo de los porcentajes de inhibición (**Tab. 57**) demostró que **IQ** e **IQ-C4** presentaron una elevada capacidad de inhibición a la formación de dienos y trienos conjugados, similar a la **Q**. Los derivados acilados de **IQ** con longitud de cadena intermedia (C8-C10), presentaron un porcentaje de inhibición a la formación de dienos y trienos conjugados moderado y los derivados de **IQ** de longitud de cadena larga (C14-C16) tuvieron un porcentaje de inhibición bajo. Sólo el **IQ-C12** fue incapaz de inhibir la formación hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados.

Fenol	% I (día 4)	
	Dienos conjugados	Trienos conjugados
Q	93,77 ± 2,16	99,86 ± 0,26
IQ	86,28 ± 0,93	88,52 ± 1,97
IQ-C4	87,37 ± 0,79	90,26 ± 0,30
IQ-C8	48,36 ± 5,50	63,51 ± 2,94
IQ-C10	40,53 ± 0,55	55,54 ± 3,52
IQ-C12	0,08 ± 0,10	11,74 ± 3,71
IQ-C14	18,05 ± 9,81	35,98 ± 6,72
IQ-C16	27,52 ± 7,06	48,86 ± 8,87

Tab. 57 Porcentaje de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en una emulsión de aceite (10% aceite, 1% SDS) suplementada con 0,25 mM de IQ y sus derivados acilados almacenada a 30 °C. Q se empleó como control de inhibición (media ±sd).

A continuación se llevaron a cabo los estudios de oxidación en emulsiones de aceite de pescado empleando Tween 20 como emulsificante. Inicialmente se consideró una proporción 1:10 de aceite: emulsificante de acuerdo con trabajos previos realizados con este emulsificante (Lee, J., et al., 2013).

Los ensayos preliminares incluyeron el estudio de la temperatura para la activación térmica de los sistemas y el estudio en la concentración de antioxidante a añadir (Tab. 58).

Fenol	mM	Temperatura °C	Observaciones
Q	0,1	50	Cinética muy rápida. No hay período de inducción
IQ			
Q	0,2		
IQ			
Q	0,2	45	Cinética muy rápida. No hay período de inducción
IQ			
Q	0,25		
IQ			
Q	0,2	30	No hay inhibición. Se pierde la estabilidad de la emulsión en el tiempo en el día 2.
IQ			
Q	0,25		
IQ			

Tab. 58 Estudios previos de variables de concentración y temperatura de Q e IQ para llevar a cabo el estudio de la inhibición de estos compuestos en emulsión de aceite de pescado en agua con Twen 20 (1%).

Por tanto, utilizando concentraciones de 0,20 y 0,25 mM no se obtuvieron resultados significativos en la inhibición de la oxidación. Debido a esta nula efectividad mostrada por Q a las concentraciones testadas, se llevó a cabo un estudio de concentraciones de Q. Al mismo

tiempo, también se incrementó la concentración de Tween 20 al 2% para la estabilización de la emulsión.

Las condiciones experimentales para llevar a cabo este estudio de concentraciones fueron: emulsión de aceite e agua con un 10 % de aceite y un 2% De Tween20. Las concentraciones estudiadas de **Q** incluyeron el rango 0,1-0,4 mM. Los sistemas se almacenaron a 30 °C y se muestreó diariamente durante 3 días.

En estas condiciones, el análisis sensorial mostró que tanto el control como las concentraciones más bajas de **Q**, 0,1 y 0,2 mM, desarrollaron aromas asociados a una rancidez evidente en el día 2, mientras que las concentraciones de 0,3 y 0,4 mM presentaron una rancidez incipiente en el día 2.

El análisis de la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados confirmó estos resultados (**Fig. 61 A y B**).

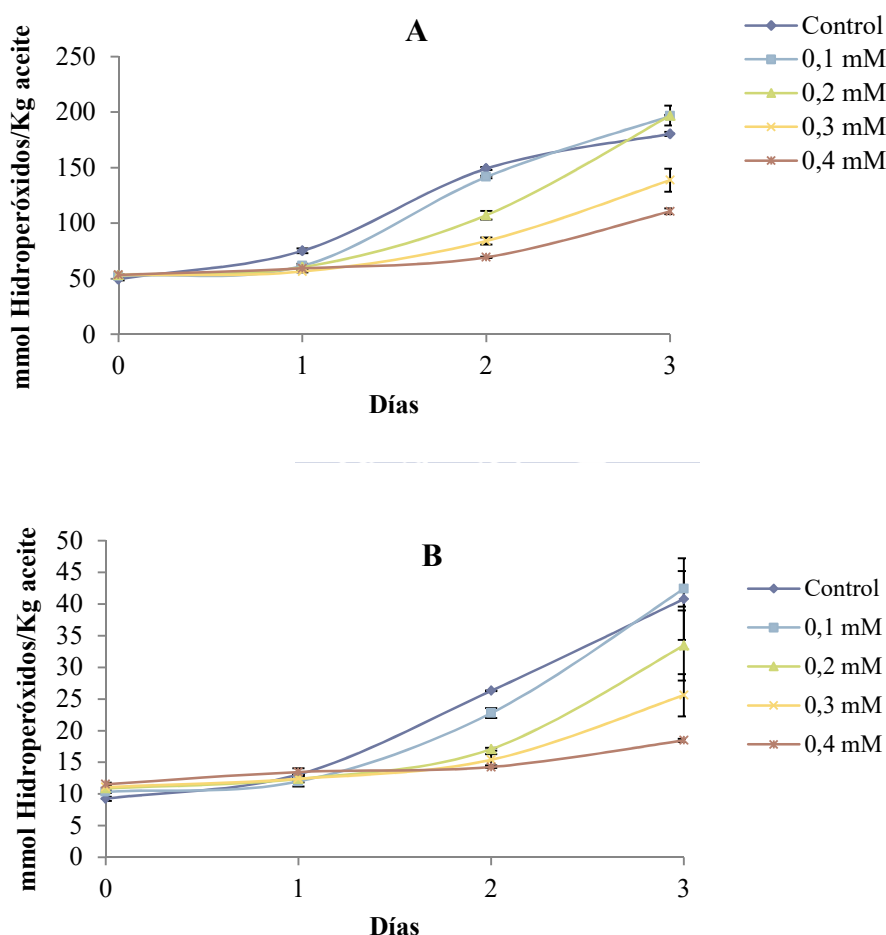


Fig. 61 Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua (10% aceite, 2% Tween 20) suplementadas con distintas concentraciones de **Q** y almacenadas a 30 °C.

La muestra suplementada con **Q** en una concentración de 0,1 mM no fue capaz de inhibir la formación de dienos y trienos conjugados. Las muestras a las que se le había adicionado **Q**

en una concentración superior mantuvieron niveles bajos de dienos y trienos conjugados con diferencias entre ellas. Los períodos de inducción fueron de 1 día para las muestras control, de 1,25 para las muestras suplementadas con **Q** en una concentración de 0,1mM, de 1,75 días para las muestras suplementadas con **Q** en una concentración de 0,2 mM y de 2 días para las muestras suplementadas con las concentraciones superiores a 0,2mM.

Los porcentajes de inhibición determinados a día 3 se muestran en la **Tab. 59**.

Fenol	Dienos	Trienos
	%I (día 3)	% I (día 3)
0,1 mM	-10,11 ± 0,89	-9,74 ± 3,37
0,2 mM	-9,92 ± 6,94	15,28 ± 1,15
0,3 mM	34,51 ± 7,90	54,25 ± 6,10
0,4 mM	56,38 ± 1,83	75,36 ± 0,13

Tab. 59 Porcentajes de inhibición en la formación de dienos y trienos conjugados en un emulsión de aceite en agua (10% aceite, 2% Tween 20) suplementada con distintas concentraciones de **Q** y almacenada a 30 °C.

Las muestras suplementadas con 0,3 y 0,4 mM de **Q** presentaron una capacidad de inhibición baja y moderada respectivamente para la formación de dienos conjugados. Las dos concentraciones inferiores no fueron capaces de inhibir la formación de estos compuestos. En relación a los trienos conjugados, las muestras suplementadas con 0,2, 0,3 y 0,4 mM de **Q** presentaron una capacidad de inhibición baja, moderada y alta, respectivamente.

En base a estos resultados se llevaron a cabo experimentos para determinar la concentración de trabajo de **IQ** tomando como control efectivo de oxidación la **Q** adicionada en una concentración de 0,4 mM y realizados en las mismas condiciones de temperatura (30 °C) y de concentración de emulsificante (2%). El rango de concentraciones ensayadas fue 0,1 a 0,7 mM de **IQ**. Todas las emulsiones que contenían **IQ** en concentraciones superiores a 0,2 mM presentaron una tonalidad amarilla que evolucionó a parduzco durante el período de estudio que se extendió durante 5 días.

El análisis sensorial mostró que todas las muestras suplementadas con **IQ** desarrollaron rancidez al mismo tiempo que las muestras control.

El análisis de formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados confirmó los resultados obtenidos en el análisis sensorial. Todas las muestras que contenían las distintas concentraciones de **IQ** fueron incapaces de inhibir la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados (**Fig. 62 A y B**).

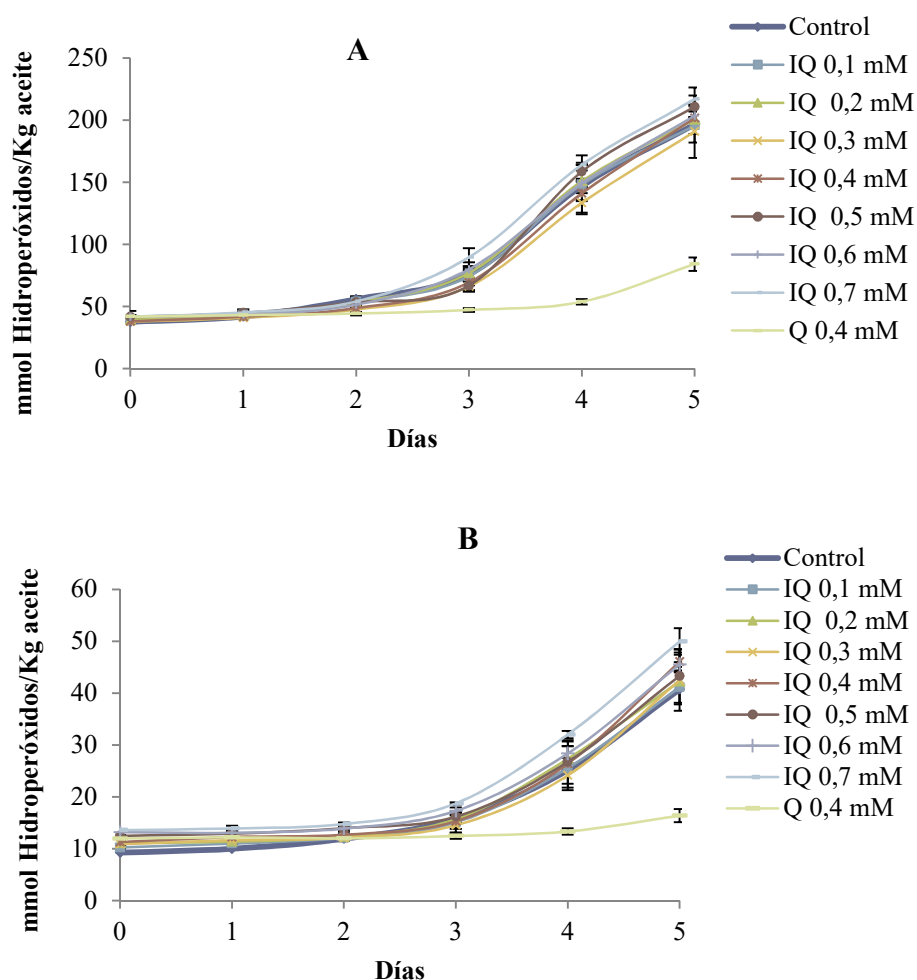


Fig. 62 Cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite en agua (10% aceite, 2% Tween 20) suplementada con distintas concentraciones de IQ almacenadas a 30°C. Q (0,4 mM) se empleó como control positivo de la inhibición.

Dado que ninguna concentración de IQ, dentro del rango estudiado, resultó efectiva, se decidió tomar como concentración de referencia 0,40mM, a la que la Q presentó una alta inhibición, para testar la posible eficacia antioxidante de los distintos derivados acilados de IQ en una emulsión de aceite de pescado. Las condiciones de trabajo consistieron en un 2% de Tween 20 como emulsificante y una temperatura de 30 °C para realizar el experimento de oxidación térmica. Los derivados acilados apenas daban color amarillo a la emulsión a la concentración estudiada.

De la misma manera que cuando se empleó SDS como emulsificante, la estructura química del Tween 20 imposibilitó la posible formación de compuestos fluorescentes de interacción. Por lo tanto, la evolución de la oxidación se llevó a cabo mediante la determinación química de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados. La evolución de la oxidación se llevó a cabo durante 7 días.

El análisis sensorial mostró que las muestras control así como las muestras suplementadas con IQ, y los derivados de IQ longitud de cadena corta y media (C4-C10)

desarrollaron aromas asociados a una rancidez incipiente en el día 3. Estos valores evolucionaron a rancidez evidente un día después. Las muestras que contenían los derivados acilados de **IQ** de mayor longitud de cadena (C-12-C16) presentaron una rancidez incipiente en el día 5 y pudo apreciarse un claro desarrollo de la rancidez en el día 6.

La determinación química de la concentración de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados durante el desarrollo del experimento confirmó los resultados observados en el análisis sensorial. Las cinéticas de formación de estos compuestos provenientes de la oxidación lipídica se muestran en la **Fig. 63 (A y B)**.

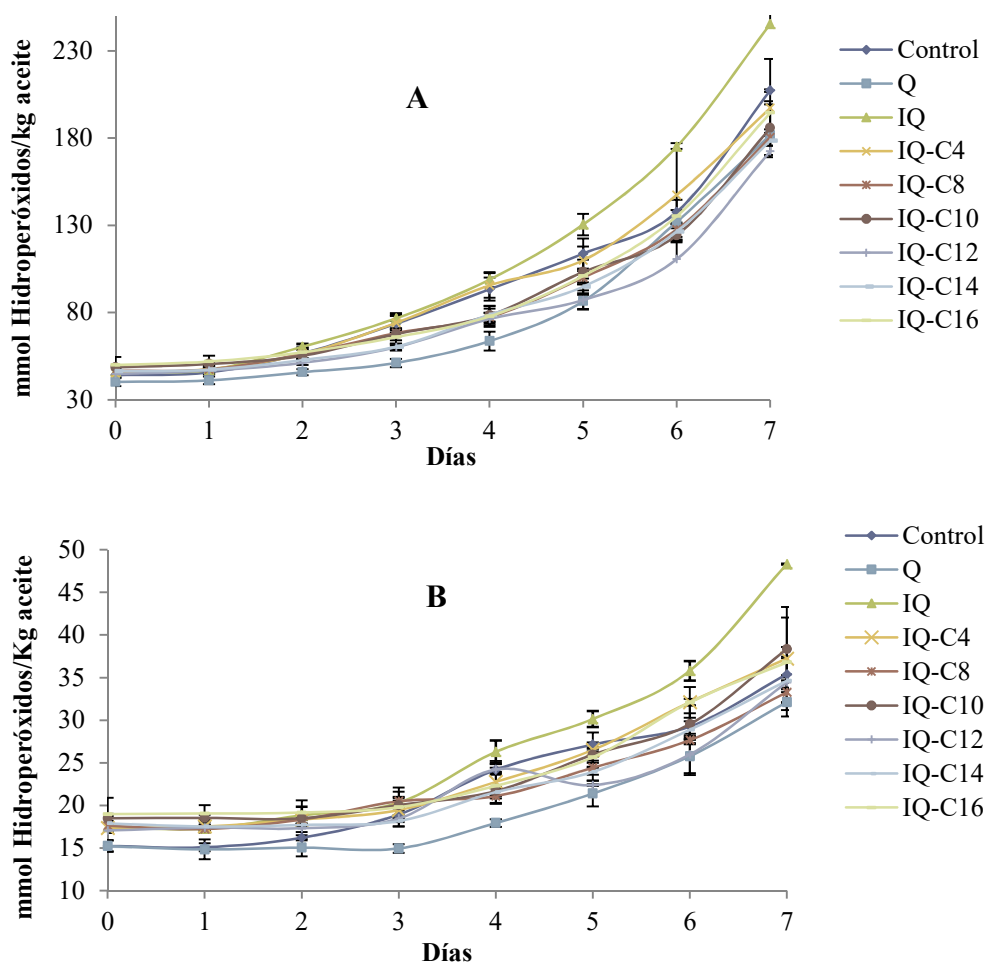


Fig. 63 Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite (10% aceite, 2% Tween 20) suplementadas con 0,40 mM de IQ y derivados acilados de IQ almacenados a 30 °C. Q se empleó como control positivo a la inhibición.

La formación de dienos (**Fig. 63A**) y trienos (**Fig. 63B**) conjugados transcurrió con una cinética relativamente similar. Las muestras control mostraron un período de inducción de dos días, mientras que para aquellas tratadas con **IQ** fue de 1,5 días. **IQ** mostró claramente una actividad prooxidante. El período de inducción para la **Q** fue de 2 días. Es de resaltar los resultados obtenidos con los derivados acilados de **IQ**. Todos los derivados acilados de **IQ** mostraron niveles menores de hidroperóxidos conjugados que los controles e **IQ**. Asimismo, las muestras suplementadas con los derivados acilados de **IQ** presentaron un período de inducción de 2 días.

Los porcentajes de inhibición (**Tab. 60**), mostraron que, en los estadios iniciales de la oxidación, todos los derivados acilados de **IQ** a excepción del **IQ-C4** fueron capaces de inhibir la formación de dienos conjugados. Los porcentajes de inhibición calculados fueron similares a la **Q**. En los estadios más avanzados de la oxidación (día 6), **IQ-C12** mantuvo su capacidad de inhibición.

Fenol	Dienos conjugados		Trienos conjugados	
	% I (día 4)	% I (día 6)	% I (día 4)	% I (día 6)
Q	47,74 ± 2,73	-17,52 ± 7,84	72,24 ± 0,01	15,42 ± 2,34
IQ	-7,42 ± 10,95	-43,82 ± 11,17	-8,57 ± 7,77	-35,87 ± 10,42
IQ-C4	-1,78 ± 12,88	-51,39 ± 8,66	19,38 ± 2,75	-35,48 ± 9,46
IQ-C8	40,32 ± 3,58	13,21 ± 1,69	58,14 ± 4,33	23,84 ± 4,41
IQ-C10	43,39 ± 0,64	18,78 ± 5,44	64,15 ± 3,71	24,46 ± 5,73
IQ-C12	31,41 ± 2,12	35,37 ± 8,23	63,73 ± 4,54	39,92 ± 10,05
IQ-C14	41,25 ± 0,72	12,33 ± 4,04	62,95 ± 9,76	16,23 ± 5,52
IQ-C16	45,70 ± 1,30	7,29 ± 2,65	57,55 ± 3,37	15,54 ± 8,49

Tab. 60 Porcentaje de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en una emulsión de aceite (10% aceite, 2% Tween 20) suplementada con 0,40 mM de **IQ** y sus derivados acilados en los días 4 y 6 almacenada a 30 °C. **Q** se empleó como control de inhibición (media ±sd).

Los porcentajes de inhibición para la formación de trienos conjugados presentaron una tendencia similar a la inhibición en la formación de los dienos conjugados, siendo elevados para todos los derivados acilados de **IQ** y al presentado por la **Q**, a excepción de **IQ-C4** que exhibió un poder de inhibición más limitado.

5.4.7. Discusión de resultados.

Se ha descrito la influencia que tiene la incorporación de una cadena alquilo sobre la molécula de **IQ** en las propiedades antioxidantes in vitro de los derivados sintetizados, en su coeficiente de partición y en su efectividad para inhibir la oxidación lipídica en sistemas modelo de aceite de pescado y de emulsiones de aceite de pescado en agua. Los derivados estudiados variaban en el número de carbonos que estuvieron comprendidos entre C2 y C16. En todas las variables estudiadas, los valores obtenidos se compararon con aquellos correspondientes a **Q** considerada como control positivo.

Los estudios sobre la hidrofobicidad de los diferentes derivados realizados en base a la determinación de *log P* mostraron que la lipofilia aumentó a medida que se incrementaba la longitud de la cadena acilada incorporada en la unidad de glucosa del **IQ**. Es preciso señalar que en los derivados de mayor longitud de cadena **IQ-C14** e **IQ-C16** apenas se observó variación en la lipofilia al añadir dos grupos metileno. El aumento de la hidrofobicidad con la longitud de la cadena alquilo ha sido también observado por Viskupicova y col. al estudiar la lipofilia en derivados acilados de rutina (Viskupicova, et al., 2010). Asimismo, **IQ** presentó menor hidrofobicidad que **Q** debido a la presencia de la unidad de glucosa. Los valores obtenidos de *Log P* para **Q** e **IQ** están en concordancia con los obtenidos previamente por Rothwell y col. (Rothwell, et al., 2005).

En relación a la eficacia de captación de radicales, tanto **IQ** como sus derivados acilados presentaron una menor capacidad de captación de radicales que la **Q**, en base a los resultados obtenidos mediante los dos métodos utilizados, captación de DPPH y ABTS⁺. Estos resultados concuerdan con recogidos en bibliografía por otros autores que indican que la capacidad de captación de radicales de los glicósidos es menor que la de sus correspondientes agliconas (Fabris, et al., 2008).

Existe una relación clara ente la estructura y la actividad de los flavonoides que va a determinar su capacidad antioxidante y/o su capacidad antirradicalaria que justifica estos resultados (Bors, et al., 1990) (**Fig. 64**).

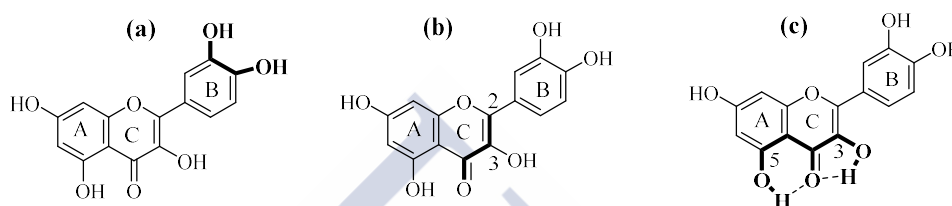
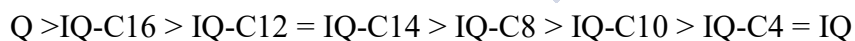


Fig. 64 Grupos estructurales de la **Q** implicados en la capacidad de captación de radicales.

La estructura orto-dihidroxi (catecol) en el anillo B confiere una mayor estabilidad a los radicales aroxilo y participa en la deslocalización electrónica (**Fig. 59**). El doble enlace 2,3 en conjugación con un grupo oxo en la posición 4 del anillo C confiere una significativa deslocalización electrónica en el anillo B (**Fig. 59**). Adicionalmente, la presencia de los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (**Fig. 59**) proporciona un mayor potencial de captación de radicales y una absorción del radical más fuerte. Desde un punto de vista cinético, ambos grupos son equivalentes debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno con el grupo ceto (Slabbert, 1977). Por ello, la presencia de una unidad de glucosa en el hidroxilo de la posición 3 del **IQ** le confiere menor capacidad antioxidante que su aglicona (**Q**) correspondiente.

Los resultados del estudio de la concentración de antioxidante capaz de inhibir la concentración de radical DPPH al 50% de **Q**, **IQ** y los derivados acilados de **IQ** mostró el siguiente orden de eficacia:



Es decir, los compuestos más lipofílicos, con mayores valores de log *P*, son los que presentaron la capacidad de captación al radical DPPH más elevada.

El análisis del TEAC proporcionó el siguiente orden de actividad de mayor a menor:



En este caso, los compuestos hidrofílicos presentaron más capacidad de captación de radical ABTS⁺ que los compuestos más lipofílicos.

Estos resultados coinciden parcialmente con aquellos reportados por Salem y col. (Salem, et al., 2010). Estos autores obtuvieron que para derivados acilados de **IQ** (C4-C18), la capacidad antirradical DPPH disminuía con la longitud de la cadena al contrario de lo encontrado en este trabajo. Para ésteres con longitud de cadena C4-C10, la actividad antirradicalaria disminuyó al incrementarse la longitud de la cadena y, en todos los casos, era menor que para el **IQ**. Sin embargo, y tal y como se ha encontrado en este estudio, para el caso del TEAC, la capacidad antirradicalaria decrece con la longitud de la cadena con el incremento en la longitud de la cadena (C4-C10) y era similar al **IQ** para derivados acilados de mayor longitud de cadena.

Sin embargo, Shahidi y col. (Zhong & Shahidi, 2011) encontraron una relación entre la lipofilia y la capacidad antirradical DPPH en derivados acilados de epigallocatequín galato con distinta lipofilia. Estos autores han descrito que la lipofilia tiene un rol importante en los flavonoides. Los derivados lipofílicos pueden tener más afinidad al radical DPPH (de naturaleza lipofílica). Además, la acilación puede alterar la densidad electrónica y su distribución en los anillos aromáticos produciendo un efecto en la capacidad de donar átomos de hidrógeno. Por otro lado, Viskupicova y col. (Viskupicova, et al., 2010) no encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante de derivados acilados de rutina determinada según el método del DPPH y sí fueron observadas cuando determinaron la capacidad antioxidante según el método del linoleato del β -caroteno.

La determinación del poder reductor mediante el método FRAP mostró el siguiente orden de capacidad reductora:



Claramente, la longitud de la cadena en los derivados acilados tuvo una gran influencia en la capacidad reductora. Por lo tanto, existe una longitud óptima, a partir de la cual, ésta disminuye drásticamente.

Por tanto, los resultados obtenidos a través del ensayo DPPH y los obtenidos a través de los ensayos TEAC y FRAP no fueron coincidentes. Las diferencias encontradas en los resultados obtenidos pueden explicarse teniendo en cuenta los mecanismos que tienen lugar. El FRAP mide la capacidad de la muestra a reducir metales, en este caso hierro, mientras que el DPPH y el ABTS miden la capacidad de la muestra a enmascarar radicales libres. Desde el punto de vista mecanístico, las reacciones implicadas en los ensayos FRAP y $ABTS^{+}$ transcurren a través de la transferencia de un electrón, mientras que el DPPH es una combinación de dos mecanismos que implican la transferencia de un electrón y la de un átomo de hidrógeno. Por lo tanto los resultados obtenidos en los distintos métodos no por qué coincidir exactamente.

En base a estas consideraciones, cabe esperar que los resultados obtenidos por el método de ABTS y FRAP proporcionen una tendencia similar, como así ha sido en este estudio. Asimismo el poder reductor de la sal férrica $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ es de aproximadamente 0,70V que es comparable a la del radical $ABTS^{+}$ que es 0,68 V.

Los experimentos de oxidación llevados a cabo en aceites de pescado mostraron que, tanto **IQ** como sus derivados acilados, presentaban una menor capacidad antioxidante que la **Q**. El orden de actividad mayor a menos en la inhibición de la oxidación lipídica fue:

$$Q > \text{IQ-C16} = \text{IQ-C14} > \text{IQ-C10} = \text{IQ-C4} \sim \text{IQ-C12} = \text{IQ-C8} = \text{IQ}$$

Por tanto, en la serie de derivados acilados de **IQ**, de manera general, los compuestos menos polares son los que presentan mayor eficacia. Estos resultados contradicen la paradoja polar en la que se indica que los compuestos más polares son los que presentan mayor eficacia antioxidante en un medio lipofílico (Porter, W. L., 1993). Los derivados acilados de **IQ**, que presentaron lipofilia similar ($\log P$), presentaron un poder de inhibición similar (**Tab. 61**). Por lo tanto, estos resultados sugieren una relación no lineal entre la inhibición de la oxidación en aceites de pescado y la lipofilia y, en consecuencia con la longitud de la cadena alquilo.

Fenol	%I (día 5)	log <i>P</i>
Q	46,74	1,46
IQ-C16	38,22	2,66
IQ-C14	36,11	2,67
IQ-C4	29,79	1,90
IQ-C10	29,65	2,02
IQ	21,21	0,76
IQ-C12	18,52	2,14
IQ-C8	16,17	2,15

Tab. 61 Relación entre la inhibición de **IQ** y derivados acilados de **IQ** en aceite de pescado (suplementados con 0,75 mM de compuesto fenólico, almacenados a 45 °C) y la hidrofobicidad ($\log P$).

Este comportamiento ya fue observado en el presente trabajo al estudiar la influencia de la acilación de **Pic** en la misma posición del residuo de glucosa con el mismo rango de longitud de cadena en la inhibición de la oxidación en aceite de pescado, obteniéndose mejores resultados para los compuestos con mayor lipofilia. Tal y como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, diversos estudios recientes coinciden con lo obtenido en este trabajo. Viskupicova y col. evaluaron la influencia de la lipofilia en derivados acilados de rutina (C4-C18) en aceite de girasol mediante el test de Rancimat y encontraron que los ésteres de rutina más lipofílicos presentaron mejores características antioxidantes en una matriz oleosa, resultados que coinciden con los obtenidos al estudiar la capacidad de inhibición de **IQ** y sus derivados acilados en aceite. (Viskupicova, et al., 2010). Además, Murata y col encontraron que la lipofilia era un factor importante a tener en cuenta cuando se estudiada la capacidad antioxidante de diversos flavonoides (luteolina, fisetina, kaempferol, quercetina y rutina) en una matriz oleosa (Murata, et al., 2004). Estos autores concluyeron que los compuestos más lipofílicos eran los que presentaron mejor actividad antioxidante. Recientemente, Lue y col. (Lue, et al., 2017) estudiaron la eficacia antioxidante de rutina y ésteres de rutina en aceite (aceite de colza-aceite de bacalao al 50%) en diferentes concentraciones. Estos autores observaron que la rutina, con un carácter más hidrofílico que sus ésteres, presentó mayores características antioxidantes. Sin embargo, al comparar su comportamiento antioxidante con el laurato de rutina y el palmitato de rutina, sus resultados mostraron que el palmitato de

rutina, más lipofílico, presentó mejor capacidad de inhibición que el laurato de rutina, menos lipofílico. De acuerdo con esta observación, los resultados descritos en esta memoria indican que en la serie de derivados acilados de **IQ** estudiados, **IQ-C16** presentó mejores resultados desde el punto de vista de la inhibición de la oxidación lipídica que **IQ-C12**.

Tal y como ya se ha mencionado previamente, Laguerre y col. concluyeron que no existe una buena correlación entre la hidrofobicidad y la capacidad antioxidante al estudiar la capacidad antioxidante de ácido clorogénico y sus ésteres en aceite de maíz (Laguerre, et al., 2011). En ese mismo estudio, evaluaron la capacidad antioxidante del ácido clorogénico y el clorogenato de hexadecilo en presencia de fosfatidilcolina y agua para evaluar el posible efecto de la formación de micelas reversas o coloides en la eficacia antioxidante y concluyeron que la actividad antioxidante puede estar muy influenciada por la formación de ciertas estructuras en el aceite debido a la presencia de componentes minoritarios como agua, ácidos grasos libre, monoglicérols, etc. lo cual le confiere al aceite una cierta heterogeneidad. Diversos estudios (Chen, B., et al., 2011; Laguerre, et al., 2011) han concluido que la existencia de estos coloides asociados en el seno del aceite influyen en la efectividad de los antioxidantes. Esto es debido a que estos compuestos minoritarios con actividad superficial pueden agregarse dando lugar a la formación de una pequeñísima interfase aceite-agua. Estas estructuras fueron descritas por Xenakis y col. como un núcleo de agua a nanoescala estabilizado por una monocapa de moléculas surfactantes con sus cabezas polares orientadas hacia el núcleo de agua y las cadenas alifáticas hacia el medio lipídico (Xenakis, et al., 2010). Dado que estas estructuras están compuestas por moléculas con actividad superficial, permiten nuevas interacciones entre todos los componentes que forman parte del sistema y pueden alterar, de forma significativa las velocidades de reacción, entre los distintos componentes del sistema (Ghosh & Tiwary, 2001).

Warnakulasuriya y col. (Warnakulasuriya, et al., 2014) han descrito una capacidad antioxidante inferior al evaluar la capacidad antioxidante inferior de ésteres de **IQ** de mayor longitud de cadena (C18-C22) en aceite que **IQ** al determinar los productos primarios de oxidación. Estos resultados en conjunto con los obtenidos en el presente trabajo indican, de nuevo, un posible efecto “cut-off”, de tal manera que existe una longitud de cadena óptima de cara a la inhibición lipídica. La inexistencia de una buena correlación entre la hidrofobicidad y la capacidad antioxidante ya fue observada en el presente trabajo al evaluar la capacidad antioxidante en aceite de pescado de derivados acilados de **Pic**, así como de **Gal** y sus ésteres, y también en los glucosil alquil derivados de **Gal**.

En relación a los resultados obtenidos en el estudio de la inhibición de **IQ** y sus ésteres (C4-C16) en las emulsiones de aceite de pescado, se ha obtenido una dependencia significativa de la inhibición al desarrollo oxidativo en función del emulsificante empleado

Los resultados obtenidos en empleando como emulsificante lecitina (2%) indicaron el orden de inhibición de mayor a menor:

$$Q \sim \text{IQ-C8} = \text{IQ-C4} = \text{IQ-C10} = \text{IQ-C16} > \text{IQ-C12} > \text{IQ} = \text{IQ-C14}$$

Estos resultados se ajustan parcialmente a la paradoja polar con la excepción de los compuestos **IQ-C12** e **IQ-C14** que presentan una capacidad antioxidante inferior a lo

esperado. Además, la **Q** con una lipofilia intermedia mostró una eficacia similar a los derivados acilados más lipofílicos.

Tal y como se ha mencionado previamente, la paradoja polar asume que los antioxidantes de naturaleza más hidrofóbica presenta mayor actividad antioxidante que sus homólogos hidrofílicos, lo cual, de forma implícita sugiere que existe una relación lineal entre la capacidad antioxidante y la lipofilia. Los datos obtenidos sugieren que no existe una relación lineal entre la lipofilia y la capacidad antioxidante. De hecho, dos compuestos con la misma hidrofobicidad pueden presentar una inhibición totalmente diferente. Esto se ha observado con los compuestos **IQ-C14** e **IQ-C16**, ambos con la misma lipofilia, y que presentaron un comportamiento antioxidante totalmente diferente (**Tab. 62**). Algo similar se observó con **IQ-C8** e **IQ-C12** que, con el mismo valor de $\log P$, mostraron distinta capacidad de inhibición.

Fenol	%I (día 4)	Log P
IQ-C16	56,96	2,66
IQ-C8	55,04	2,15
IQ-C10	51,39	2,02
IQ-C4	50,53	1,90
Q	51,61	1,46
IQ-C12	36,04	2,14
IQ	11,06	0,76
IQ-C14	7,58	2,67

Tab. 62 Relación entre la inhibición de **Q**, **IQ** y derivados acilados de **IQ** en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 2% lecitina, suplementados con 0,25 mM de compuesto fenólico y almacenados a 30 °C) y la hidrofobicidad, $\log P$.

Cuando el emulsificante empleado fue SDS, los resultados obtenidos mostraron el siguiente orden de inhibición:

$$IQ = IQ-C4 > IQ-C8 > IQ-C10 > IQ-C14 = IQ-C16 > IQ-C12$$

En este caso, los resultados obtenidos contradicen totalmente la paradoja polar, siendo los compuestos menos lipofílicos los que presentan mayor capacidad antioxidante (**Tab. 63**). Estos resultados ya fueron observados por Stöckmann y col. (Stöckmann, et al., 2000) al estudiar la capacidad antioxidante de ésteres de ácido gálico (C3-C8) en emulsiones de aceite estabilizadas con SDS o Brij 58.

Fenol	% I (día 4)	log <i>P</i>
Q	93,77	1,46
IQ-C4	87,37	1,90
IQ	86,28	0,76
IQ-C8	48,36	2,15
IQ-C10	40,53	2,02
IQ-C16	27,52	2,66
IQ-C14	18,05	2,67
IQ-C12	0,08	2,14

Tab. 63 Relación entre la inhibición de Q, IQ y derivados acilados de IQ en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 1% SDS, suplementados con 0,25 mM de compuesto fenólico y almacenados a 30 °C) y la hidrofobicidad, log *P*.

En el caso del empleo de Tween 20, los resultados mostraron que los derivados de IQ más lipofílicos son los que presentaron mayor inhibición frente a la oxidación lipídica (**Tab. 64**). Estos resultados son los predichos por la paradoja polar.

$$Q \sim \text{IQ-C8} = \text{IQ-C10} = \text{IQ-C14} = \text{IQ-C16} > \text{IQ-C12} \gg \text{IQ} = \text{IQ-C4}$$

Fenol	% I (día 4)	log <i>P</i>
Q	47,74	1,46
IQ-C16	45,70	2,66
IQ-C10	43,39	2,02
IQ-C14	41,25	2,67
IQ-C8	40,32	2,15
IQ-C12	31,41	2,14
IQ-C4	-1,78	1,90
IQ	-7,42	0,76

Tab. 64 Relación entre la inhibición de Q, IQ y derivados acilados de IQ en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 2% Tween 20, suplementados con 0,4 mM de compuesto fenólico y almacenados a 30 °C) y la hidrofobicidad, log *P*.

Tal y como ya se ha indicado previamente en la discusión de resultados correspondiente a derivados de ácido gálico, la importancia de la naturaleza del emulsificante fue estudiada por Stöckmann y col. (Stöckmann, et al., 2000). Estos autores obtuvieron una dependencia entre la capacidad antioxidante de ésteres de ácido gálico (C0 a C8) en emulsiones de aceite-agua en aceite de maíz libre de componentes minoritarios como tocoferol, con el emulsificante, empleado para estabilizar la emulsión (lecitina, Brij 58 o SDS). Los autores atribuyeron estas diferencias a las interacciones moleculares específicas que pueden tener lugar entre el antioxidante y el emulsificante. Las interacciones que pueden tener lugar podrían ser entre el antioxidante y el grupo característico del emulsificante (por ejemplo, enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos OH fenólicos del antioxidante y la carga del emulsificante) o entre las cadenas alquilo del antioxidante y la cadena lipídica del emulsificante, lo cual podría afectar a la difusión del antioxidante en la emulsión. Estas interacciones entre los antioxidantes y los emulsificantes en el seno de la emulsión han sido sugeridas por otros

autores (McClements, D. J. & Decker, 2006; Shahidi, Fereidoon & Zhong, 2011; Alemán, et al., 2015).

Ya se ha mencionado que un factor importante a tener en cuenta y que podría influir en el comportamiento antioxidante de los distintos ésteres de **IQ** en las distintas emulsiones preparadas con lecitina, Tween 20 o SDS, es la capacidad antioxidante que pueda presentar el propio emulsificante por si solo y que mejoraría la estabilidad desde el punto de vista de la oxidación de la emulsión. La lecitina, además de presentar buenas características como emulsionante, presenta actividad antioxidante (Judde, et al., 2003). Tal y como ya se ha comentado, esta capacidad antioxidante puede ser debida a la formación de productos de Maillard entre el grupo amino de los fosfolípidos y los productos de oxidación (Husain, et al., 1984) o por un efecto barrera en la interfase aceite-aire (Porter, W. L., 1980). Por otro lado, la propia estructura en ácidos grasos de la lecitina que incluye la presencia de 18:2 ω 6 y el 18:3 ω 3, compuestos que por su estructura son susceptibles de sufrir autooxidación (Passi, et al., 2004; Undeland, et al., 2004) y, por lo tanto, pueden modificar estas características antioxidantes de las lecitinas. Tween 20 y el SDS son emulsificantes sin propiedades antioxidantes conocidas debido a la ausencia de grupos funcionales responsables del comportamiento antioxidante (Kerwin, 2008). Pan y col. (Pan, et al., 2013) han demostrado que la estabilización de la emulsión en presencia de lecitina es debida a la disminución en la velocidad de penetración de los radicales peroxilo desde la fase acuosa a la fase oleosa de la emulsión comparada con la que presentan en el caso de emulsiones preparadas con Tween 20. El incremento de la velocidad de penetración para los radicales peroxilo en presencia de Tween 20 (debido a su menor actividad antioxidante) produjo una desestabilización de la emulsión en términos de oxidación. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren un posible sinergismo entre lecitina y los alquil galatos que incrementaría la actividad antioxidante de los mismos y que, a su vez, también dependería de la estructura molecular del alquil galato. Ramadan estudió el sinergismo entre **Q** y lecitina de soja en un sistema modelo de trioleína y aceite de girasol (Ramadan, 2008, 2012) obteniendo mejor actividad antioxidante cuando se emplea una mezcla de quercetina-lecitina de soja en comparación a la actividad antioxidante de ambos compuestos por separado. Puede ser posible que este sinergismo también esté presente para ésteres de **IQ**. La representación del porcentaje de inhibición frente al n^o de carbonos de la cadena alquilo (**Fig. 65**) mostró claramente que, además de la lipofilia y del efecto del emulsificante, la longitud de la cadena alquilo es un factor relevante. Los datos obtenidos sugieren que, en los tres casos estudiados con los distintos emulsificantes, las longitudes de cadena C12 y C14 parecen ser puntos de inflexión en relación a la tendencia seguida por los demás derivados de **IQ** con mayor o menor n^o de carbonos.

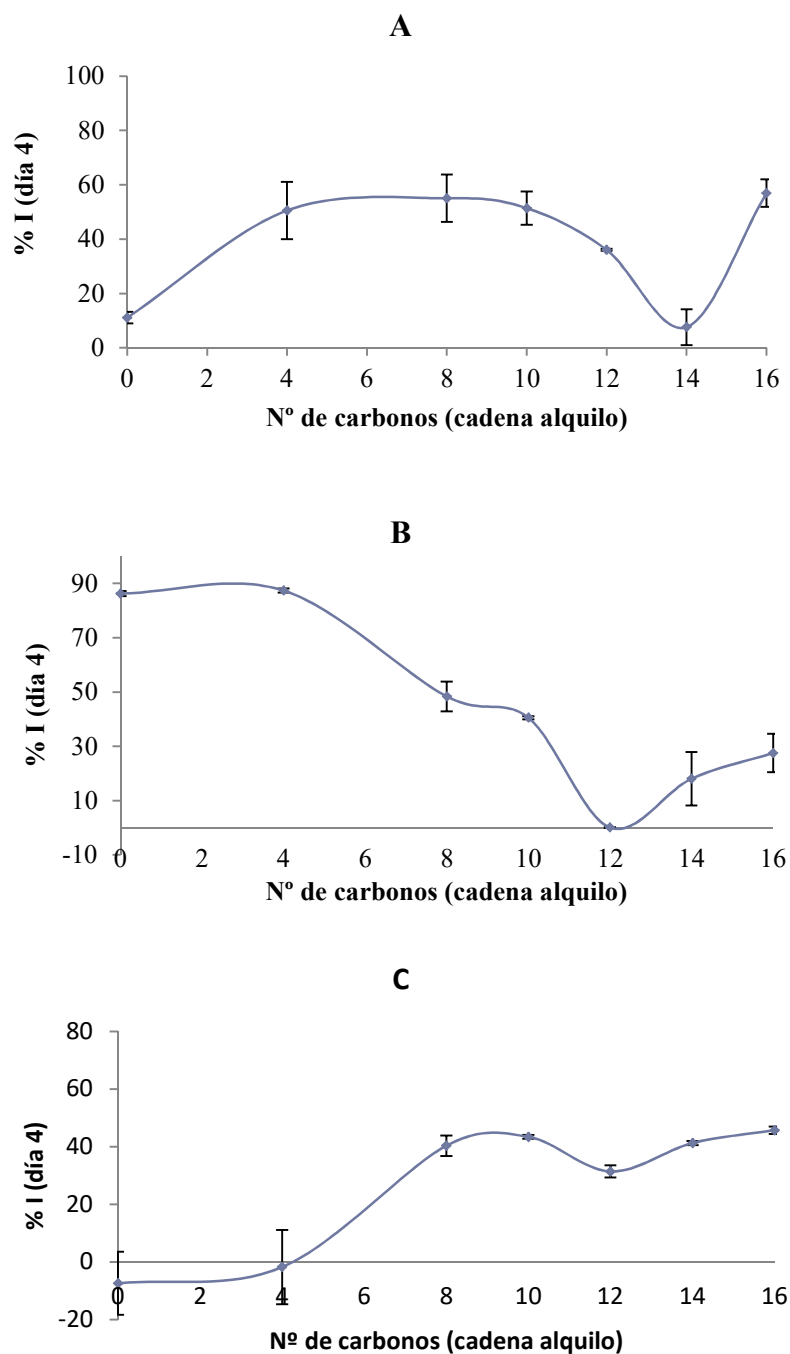


Fig. 65 Porcentajes de inhibición de ésteres de IQ con distinta longitud de cadena en emulsiones de aceite en agua almacenadas a 30 °C con distintos emulsificantes (A, 2% lecitina; B, 1% SDS; C, 2% Tween 20).

Este comportamiento no lineal ya ha sido discutido previamente para ésteres de **Pic** y de **Gal** en este trabajo.

Cabe destacar que muchos estudios que corroboraban la “*paradoja polar*” en emulsiones, se basaban en la comparación de dos compuestos análogos con distinta polaridad, mientras que este comportamiento no lineal o “cut off” se ha observado en distintas series homólogas del mismo compuesto.

Tal y como se ha mencionado en esta memoria al discutir los resultados obtenidos al evaluar la influencia del emulsificante en la capacidad antioxidante de ésteres de Gal y alquil glucosil derivados de Gal en emulsiones de aceite en agua, numerosos autores han demostrado la dependencia del antioxidante con el emulsificante en sistemas dispersos o emulsiones (Stöckmann, et al., 2000; McClements, D. J. & Decker, 2006; Shahidi, Fereidoon & Zhong, 2011; Alemán, et al., 2015).

El efecto “cut off” de las series homólogas de derivados acilados de fenolípidos ha sido descrito por Laguerre y su grupo (Laguerre, et al., 2009). Estos autores han llevado a cabo varios estudios para comprobar que, efectivamente, no existía una relación lineal entre la hidrofobicidad y la capacidad antioxidante de series homólogas en sistemas dispersos. Demostraron por primera vez que en una microemulsión de aceite de tung clarificado (aceite altamente insaturado con un 82 % de ácido eleostearico, ácido (9Z,11E,13E)-octadeca-9,11,13-trienoico) estabilizado con Brij 35, la capacidad antioxidante de ésteres de clorogénico se incrementaba con la longitud de la cadena alcanzando un máximo en 12 carbonos de cadena alquilo, después de la cual se producía un descenso importante en la capacidad antioxidante (Laguerre, et al., 2009). Este efecto también fue observado al estudiar distintas series de ésteres de ácido rosmarínico (C4-C20) (Laguerre, et al., 2010) en emulsiones de aceite-agua estabilizadas con Twen 20. Los resultados que obtuvieron, de nuevo, contradijeron la paradoja polar ya que los ésteres de ácido rosmarínico más apolares (R18 y R20) presentaron la actividad antioxidante más baja. Sugirieron que una posible razón para explicar la influencia no lineal de la longitud de la cadena de alquilo con la capacidad antioxidante podría residir en la capacidad de los ésteres para repartirse en la fase acuosa de la emulsión ya sea formando micelas por sí mismas o a través de micelas mixtas con el emulsificante (Tween 20) que no haya sido absorbido en la superficie de la gota de la emulsión (Laguerre, et al., 2010).

Este efecto “cut off” también fue observado por Sørensen y col. (Sørensen, et al., 2015) al estudiar el efecto de la longitud de cadena de ésteres de ácido ferúlico en su capacidad antioxidante en leche enriquecida con aceite de pescado. En este caso, el compuesto que presentó mayor capacidad antioxidante fue el metil ferulato seguido del ácido ferúlico y butil ferulato, mientras que el octil ferulato mostró un ligero efecto prooxidante, el cual se incrementó cuando la longitud de cadena se extendió de C8 a C12. Los ésteres de ácido ferúlico con longitud de cadena entre C16 y C20 mostraron un leve comportamiento prooxidante y en algún caso una pequeña actividad antioxidante en función de los distintos compuestos volátiles desarrollados durante la oxidación.

Recientemente, Laguerre y col. (Laguerre, et al., 2015) analizando los resultados obtenidos por distintos autores establecieron un posible mecanismo de acción que pudiera explicar este efecto “cut-off” observado. Para ello establecieron que por debajo de una longitud de cadena crítica (longitud de cadena corta o media), los antioxidantes no se encuentran lo suficientemente cerca de la interfase donde se supone que tiene lugar la oxidación. Por lo tanto, la menor capacidad antioxidante de los compuestos más polares puede ser debida al hecho de no presentar la concentración máxima adecuada en el lugar donde la oxidación lipídica es más importante. Por encima de esa longitud de cadena crítica, los fenolípidos con mayor longitud de cadena además de concentrar el antioxidante en el lugar adecuado, lo hacen con una orientación adecuada de la cabeza fenólica hacia la fase acuosa donde se concentran los radicales libres que inician el proceso oxidativo. En consecuencia,

sólo los antioxidantes con una hidrofobicidad apropiada se dispondrán de manera adecuada en la interfase agua-aceite donde se puede contrarrestar la oxidación de forma más eficiente. Esta explicación ya fue propuesta por Frankel y col. en los años 90 (Frankel, Edwin N., et al., 1994).

Por otro lado, a la hora de estudiar el comportamiento antioxidante de series homólogas conviene incluir en el estudio un amplio rango de longitudes de cadena del derivado alquilo, ya que, en caso de darse un efecto “cut off”, según la longitud de cadena escogida se puede estar en una parte de la curva, o en otra, pudiendo dar lugar a interpretaciones parciales. Los trabajos de Sørensen y col (Sørensen, et al., 2012) o de Lue y col. (Lue, et al., 2017) sobre fenolípidos de dihidrocafeico (C8 y C18) y de rutina (C12 y C16) respectivamente, incluían sólo dos de los homólogos, anterior y posterior a la longitud de cadena crítica y, en principio, los resultados que obtuvieron contradecían la paradoja polar.

La explicación de lo que puede ocurrir cuando se supera la longitud de cadena crítica puede resumirse en tres posibles hipótesis (Laguerre, et al., 2015):

a) La hipótesis de la movilidad reducida según la cual la movilidad de los antioxidantes más lipofílicos decrece al incrementarse la longitud de cadena disminuyendo su capacidad de dirigirse hacia los numerosos lugares donde tiene lugar la oxidación. Por ello se produce un incremento de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquilo de los antioxidantes y su entorno molecular como los residuos hidrofóbicos del emulsificante. Esta hipótesis supone que la frecuencia en las interacciones entre el antioxidante y los radicales libres o sustratos oxidables decrecerá en los compuestos con mayor longitud de cadena ya que las interacciones hidrofóbicas serán más efectivas que en aquellos de cadena corta o media. Otro aspecto a tener en cuenta son los posibles impedimentos estéricos debido al incremento en la longitud de cadena dificultando el acceso del antioxidante a los centros de reacción.

b) La hipótesis de la internalización que asume que el incremento en la longitud de cadena podría alejar al antioxidante de la interfase dirigiéndolo hacia el interior de la gota y consecuentemente, disminuyendo la capacidad antioxidante.

c) La influencia de la capacidad de agregación del propio antioxidante según la cual la disminución drástica en la capacidad antioxidante para aquellos compuestos con mayor longitud de cadena es debida a que estos fenolípidos pueden agregarse formando micelas en la fase acuosa de la emulsión. Se asume que en estos compuestos la capacidad de agregarse es mayor que la tendencia a moverse hacia la interfase, disminuyendo la concentración del antioxidante en la membrana interfacial de la gota, lugar donde tiene lugar la oxidación. Además, cuando se forman estos agregados micelares, el coeficiente de difusión disminuye por lo que se produce, también, una disminución en la movilidad.

Por lo tanto, los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la lipofilización en **IQ** evidencian de nuevo un efecto “cut-off” que ya ha sido descrito en esta memoria para otras familias de fenoles. Este efecto “cut-off” se ha obtenido tanto en los ensayos in vitro de captación de radicales de DPPH, así como en la extrapolación a sistemas reales de aceite y de emulsiones, independientemente del emulsificante empleado y se ha presentado en el derivado con longitud de cadena C12. Los resultados obtenidos en esta memoria para las

familias de **Gal** y del derivado glucosilados de **Res**, **Pic** sugieren que esta longitud de cadena óptima estaría alrededor de C12.





6. CONCLUSIONES



1. Se han sintetizado con buenos rendimientos los siguientes grupos de compuestos:
 - a. Derivados de **Hyd**.
 - i. Ésteres de Hyd de distinta longitud de cadena (C2, C4, C8 y C12).
 - ii. Éteres de Hyd formados por Hyd y glucosa y en distintas posiciones (1, 3 y 4).
 - b. Derivados de **Res**:
 - i. Ésteres de Res de distinta longitud de cadena (C2 y C18) y en distintas posiciones (3 y/o 4').
 - ii. Éteres de **Res** formados por **Res** y glucosa en distintas posiciones (3-4' y 3-5').
 - iii. Ésteres de distinta longitud de cadena de **Pic** en C6 del residuo de glucosa (C4, C8, C12, C16 y C18).
 - c. Éteres de alquil galatos de distinta longitud de cadena (C4, C6, C8, C10, C12, C16 y C18) y glucosa.
 - d. Ésteres de **IQ** en C6 del residuo de glucosa y de distinta longitud de cadena (C4, C8, C10, C12, C14 y C16).
2. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la alta eficacia de fenolípidos derivados de **Hyd** y de derivados glucosilados de **Hyd** para inhibir la oxidación lipídica y la generación de volátiles asociados a la rancidez en emulsiones de aceite de pescado en agua de elevada susceptibilidad a sufrir deterioro, muy superior, incluso al **Hyd**. En el rango de longitud de cadena estudiado, los compuestos siguieron el comportamiento predicho por la "paradoja polar".
3. Se ha demostrado la dependencia de la actividad antioxidante de los derivados del **Res** con el tipo de sustituyente introducido y la posición de la molécula donde tiene lugar dicha modificación para inhibir la oxidación que puede ocurrir en aceites de pescado y en emulsiones de aceite de pescado en agua. Además, en aceites de pescado existe una dependencia lineal de la actividad antioxidante de los glucosil alquil derivados de **Res** con la longitud de la cadena, incrementándose con la misma. Asimismo, en emulsiones, para los mismos compuestos se observó una dependencia no lineal, efecto "cut-off", obteniéndose los mejores resultados para C12.
4. Según los resultados mostrados en esta memoria, todos los alquil galatos presentaron una elevada eficacia para inhibir la oxidación lipídica en aceites de pescado. Los glucosil alquil galatos resultaron también eficaces para inhibir la oxidación en aceites de pescado, si bien con un grado de eficacia inferior a los alquil galatos. Ambas series presentaron un comportamiento no lineal, o efecto "cut-off". La capacidad antioxidante de estos compuestos en emulsiones de aceite en agua es altamente dependiente del tipo de emulsificante empleado.

5. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que todos los derivados acilados de **IQ** resultaron eficaces para inhibir de la oxidación lipídica en aceites de pescado, siendo esta eficacia, en algunos casos superior al **IQ**. Los resultados obtenidos en las distintas emulsiones estudiadas evidenciaron, de nuevo, la fuerte dependencia de la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos con el emulsificante empleado. En todos los casos estudiados, el efecto “cut-off” fue observado en la actividad antioxidante mostrada por esta serie de fenolípidos.

Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo, y que concuerdan con aquellos obtenidos por otros autores para otras familias de compuestos fenólicos, se establece de manera clara el efecto “cut-off”, que para las familias estudiadas en esta memoria y los distintos sistemas, parece estar en el rango C8-C12. Es preciso ser cuidadosos ya que la observación o no del efecto “cut-off”, está supeditada a la longitud de la cadena acilada que se considere, ya que este efecto suele observarse en un rango determinado que depende de la familia empleada. Se puede concluir que la “*paradoja polar*” es un caso particular o una excepción dentro de una teoría más general y que se cumple en unas determinadas condiciones. Los resultados obtenidos en este trabajo resaltan que en los estudios encaminados a determinar la efectividad de los antioxidantes, es imprescindible tener en cuenta numerosos factores. Estos incluyen los aspectos relacionados con la estructura química del propio compuesto, sus las propiedades físicas y químicas, el ambiente químico al que está sometido, el tipo de sustrato oxidable, etc. Por todo ello, los trabajos realizados únicamente con los ensayos in vitro, tienen un valor relativo, pero no siempre pueden extrapolarse a un sistema real.

Las propiedades antioxidantes de **Hyd**, **Gal**, **Res** e **IQ** son bien conocidas. Sin embargo, su empleo en la industria es limitada debido a su escasa solubilidad en agua, su estabilidad química y su biodisponibilidad. Este trabajo demuestra que es posible sintetizar derivados a la carta que permitan la estabilización de formulaciones altamente inestables desde el punto de vista de la oxidación lipídica y la rancidez, como son aquellas constituidas por lípidos altamente insaturados, ω 3-PUFA. Por lo tanto, la síntesis de derivados de **Hyd**, **Gal**, **Res** e **IQ** proporciona moléculas que, con unas propiedades físicas y químicas determinadas, facilitan su incorporación en estos sistemas emulsionados siendo capaces de inhibir la oxidación lipídica extendiendo la vida útil de estos productos. Teniendo en cuenta que las emulsiones de aceite en agua se han empleado en gran medida para la incorporación de compuestos hidrofóbicos como los ácidos grasos poliinsaturados ω 3, con remarcados efectos no solo desde el punto de vista nutricional o bioactivo sino también de la salud, pero sustratos altamente oxidables, la incorporación de estas moléculas diseñadas a la carta, y que disminuyen la degradación oxidativa de estos lípidos, abre un campo extenso de posibilidades para el diseño de alimentos funcionales o nuevas formulaciones farmacéuticas basadas en ω 3-PUFA.



7. BIBLIOGRAFÍA



- Alemán, M., Bou, R., Guardiola, F., Durand, E., Villeneuve, P., Jacobsen, C., & Sørensen, A.-D. M. (2015). Antioxidative effect of lipophilized caffeic acid in fish oil enriched mayonnaise and milk. *Food Chemistry*, 167(0), 236-244.
- Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P. A., Testa, B., Brée, F., Zini, R., Tillement, J. P., Labidalle, S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A. M., Crevat, A., & Le Ridant, A. (1998). Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(1), 113-120.
- Ando, H., Funasaka, Y., Oka, M., Ohashi, A., Furumura, M., Matsunaga, J., Matsunaga, N., Hearing, V. J., & Ichihashi, M. (1999). Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *Journal of Lipid Research*, 40(7), 1312-1316.
- AOCS. (1989). *Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, IL.: D. Firestone. AOCS.
- Arkhipenko, Y. V., & Sazontova, T. G. (1995). Mechanisms of the cardioprotective effect of a diet enriched with w-3 polyunsaturated fatty acids. *Pathophysiology*, 2(3), 131-140.
- Aubourg, S. P. (1999). Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *Journal of the American Oil Chemists' Society (J. Am. Oil Chem. Soc.)*, 76(4), 409-419.
- Bang, H. O., Dyerberg, J., & Nielsen, A. B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in greenlandic westcoast eskimos. *The Lancet*, 297(7710), 1143-1146.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 29-41.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In *Methods in Enzymology*, vol. 186 (pp. 343-355): Academic Press.
- 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.
- Brennan, J. G., Butters, J. R., Cowell, N. D., & Lilley, A. E. V. (1990). *Food Engineering Operations*. New York: Elsevier Applied Science.
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., & Rice-Evans, C. A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330(Pt 3), 1173-1178.
- Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C., & Meier, G. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Medicine*, 112(4), 298-304.

- Buick, R. K., & Damoglou, A. P. (1989). Effect of modified atmosphere packaging on the microbial development and visible shelf life of a mayonnaise-based vegetable salad. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(3), 339-347.
- Bylund, A., Saarinen, N., Zhang, J.-X., Bergh, A., Widmark, A., Johansson, A., Lundin, E., Adlercreutz, H., Hallmans, G., Stattin, P., & Mäkela, S. (2005). Anticancer Effects of a Plant Lignan 7-Hydroxymatairesinol on a Prostate Cancer Model In Vivo. *Experimental Biology and Medicine*, 230(3), 217-223.
- Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S., & Solla, F. (1999). A Highly Convenient Synthesis of Hydroxytyrosol and Its Recovery from Agricultural Waste Waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1745-1748.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443-451.
- Cave, W. T. (1996). *Fish oil and cancer prevention*. Boca Raton, Florida: Eds. CRC Press Inc.
- Cleland, L., James, M., & Proudman, S. (2003). The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs*, 63(9), 845-853.
- Costa, M., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F., Bravo-Díaz, C., & Romsted, L. S. (2015). A direct correlation between the antioxidant efficiencies of caffeic acid and its alkyl esters and their concentrations in the interfacial region of olive oil emulsions. The pseudophase model interpretation of the “cut-off” effect. *Food Chemistry*, 175, 233-242.
- Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91.
- Chaiyasit, W., Silvestre, M. P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Ability of surfactant hydrophobic tail group size to alter lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3077-3080.
- Chan, H. W.-S. (1987). *Autoxidation of unsaturated lipids*. London: Academic Press.
- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Influence of interfacial composition on oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by biopolymer emulsifiers. *Food Chemistry*, 131(4), 1340-1346.
- Charu Katare, Sonali Saxena, Supriya Agrawal, Prasad, G., & Bisen, a. P. S. (2012). Flax Seed: A Potential Medicinal Food. *Journal of Nutrition and Food Science*, 2(1).
- Chen, B., Han, A., Laguerre, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Role of reverse micelles on lipid oxidation in bulk oils: impact of phospholipids on antioxidant activity of α -tocopherol and Trolox. *Food & Function*, 2(6), 302-309.
- Chen, C.-W., & Ho, C.-T. (1995). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, 2(1), 35-46.
- Christie, W. W. (1982). *Lipid analysis*: Pergamon Press. Oxford, UK.

- Dalgleish, D. G., Tosh, S. M., & West, S. (1996). Beyond homogenization: The formation of very small emulsion droplets during the processing of milk by a Microfluidizer. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 50, 135-148.
- Davies, J. T. (1957). A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. In *2nd International Congress Surface Activity*, (pp. 426-438). Butterworths, London: Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces.
- Proceedings.
- de Gaulejac, N. S.-C., Vivas, N., de Freitas, V., & Bourgeois, G. (1999). The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1081-1090.
- Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P., & Shahidi, F. (2005). Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4303-4310.
- Dickinson, E. (1992). *An introduction of food colloids*. Oxford.
- Dickinson, E. (2013). Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 710-721.
- Dickinson, E., Hunt, J. A., & Horne, D. S. (1992). Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed β -casein or phosvitin. *Food Hydrocolloids*, 6(4), 359-370.
- Dickinson, E., & McClements, D. J. (1995). *Advances in food colloids*. London: Chapman & Hall.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1982). *Colloids in foods*. London: Applied Science Publishers.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1988). *Advances in food emulsions and foams* London: Elsevier Applied Science.
- Djordjevic, D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Oxidative Stability of Whey Protein-stabilized Oil-in-water Emulsions at pH 3: Potential ω -3 Fatty Acid Delivery Systems (Part B). *Journal of Food Science*, 69(5), C356-C362.
- Dyerberg, J. (1989). Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns. *Arctic Medical Research*, 48(2), 47-54.
- Dyerberg, J., & Bang, H. O. (1979). Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acid in eskimos. *The Lancet*, 314(8140), 433-435.
- Engler, M. B. (1994). Vascular effects of omega-3 fatty acids: possible therapeutic mechanisms in cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 8(3), 53-67.
- Erickson, M. C. (2002a). *Lipid oxidation of muscle food*. New York: Eds. Marcel Dekker Inc.
- Erickson, M. C. (2002b). Lipid oxidation of muscle foods. In E. C. C. Akoh and D. B. Min (Ed.), *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology.*, (pp. 364-411). New York: Marcel Dekker.
- Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G., & Stevanato, R. (2008). Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophysical Chemistry*, 135(1), 76-83.

- Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., & Merillon, J.-M. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sciences*, 61(21), 2103-2110.
- Fendler, J. H. (1982). *Membrane mimetic chemistry*. New York.
- Ferreiro-Vera, C., Mata-Granados, J. M., Priego-Capote, F., Quesada-Gómez, J. M., & Luque De Castro, M. D. (2011). Automated targeting analysis of eicosanoid inflammation biomarkers in human serum and in the exometabolome of stem cells by SPE-LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(3), 1093-1103.
- Figueroa-Espinoza, M.-C., & Villeneuve, P. (2005). Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2779-2787.
- Filip, V., Plocková, M., Šmidrkal, J., Špičková, Z., Melzoch, K., & Schmidt, Š. (2003). Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 83(4), 585-593.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid oxidation*. Dundee, Scotland: The Oily Press.
- Frankel, E. N. (2007). *Antioxidants in Food and Biology*. Gran Bretaña: The Oily Press.
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), 1054-1059.
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., Prior, E., & Aeschbach, R. (1996). Evaluation of Antioxidant Activity of Rosemary Extracts, Carnosol and Carnosic Acid in Bulk Vegetable Oils and Fish Oil and Their Emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(2), 201-208.
- Garti, N. (1997). Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications. *LWT - Food Science and Technology*, 30(3), 222-235.
- Ghose, A. K., & Crippen, G. M. (1987). Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 27(1), 21-35.
- Ghosh, K. K., & Tiwary, L. K. (2001). Microemulsions as Reaction Media for a Hydrolysis Reaction. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 22(4), 343-348.
- Gohtani, S., Sirendi, M., Yamamoto, N., Kajikawa, K., & Yamano, Y. (1999). Effect of droplet size on oxidation of Docosahexaenoic acid in emulsion system. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20(5), 1319-1325.
- González, M. J., Medina, I., Maldonado, O. S., Lucas, R., & Morales, J. C. (2015). Antioxidant activity of alkyl gallates and glycosyl alkyl gallates in fish oil in water emulsions: Relevance of their surface active properties and of the type of emulsifier. *Food Chemistry*, 183(0), 190-196.
- González, M. J., Torres, J. L., & Medina, I. (2010). Impact of Thermal Processing on the Activity of Gallotannins and Condensed Tannins from *Hamamelis virginiana* Used as Functional Ingredients in Seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4274-4283.

- Gopal, E. S. R. (1968). *Principles of emulsion formation. Emulsion science*. London: Academic Press.
- Gordon, M. H., Paiva-Martins, F., & Almeida, M. (2001). Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2480-2485.
- Grasso, S., Siracusa, L., Spatafora, C., Renis, M., & Tringali, C. (2007). Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorganic Chemistry*, 35(2), 137-152.
- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. N., & Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 96(1-4), 27-36.
- Griffin, S. P., & Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211.
- Griffin, W. C. (1949). Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1(5), 311-326.
- Griffin, W. C. (1954). Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 5(4), 249-256.
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210-218.
- Haahr, A.-M., & Jacobsen, C. (2008). Emulsifier type, metal chelation and pH affect oxidative stability of n-3-enriched emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10), 949-961.
- Halliwell, B., & Gutteridge, M. C. (1985). *Lipid peroxidation: a radical chain reaction*. New York: Oxford University Press.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Heins, A., McPhail, D. B., Sokolowski, T., Stöckmann, H., & Schwarz, K. (2007). The Location of Phenolic Antioxidants and Radicals at Interfaces Determines Their Activity. *Lipids*, 42(6), 573-582.
- Ho, C.-T., Chen, C.-W., Wanasundara, U. N., & and Shahidi, F. I. (1997). *Natural antioxidants from tea*. Champaign, Illinois.
- Horn, A. F., Nielsen, N. S., Jensen, L. S. g., Horsewell, A., & Jacobsen, C. (2012). The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions. *Food Chemistry*, 134(2), 803-810.
- Hosseinian, F. S., Muir, A. D., Westcott, N. D., & Krol, E. S. (2006). Antioxidant capacity of flaxseed lignans in two model systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), 835-840.
- Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Impact of Whey Protein Emulsifiers on the Oxidative Stability of Salmon Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1435-1439.

- Huang, S.-W., Frankel, E. N., Schwarz, K., Aeschbach, R., & German, J. B. (1996). Antioxidant Activity of Carnosic Acid and Methyl Carnosate in Bulk Oils and Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 2951-2956.
- Huber, G. M., Vasantha Rupasinghe, H. P., & Shahidi, F. (2009). Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, 117(2), 290-295.
- Hunter, R. J. (1986). *Foundations of colloid Science* (Vol. 1). Oxford: Oxford University Press.
- Hunter, R. J. (1989). *Foundations of colloid Science* (Vol. 2). Oxford: Oxford University Press.
- Husain, S. R., Terao, J., & Matsushita, S. (1984). Comparison of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine affecting the browning reaction of heated oil. In M. N. M. Fugimaki, H. Kato (Ed.), *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*, (pp. 301-309). New York: Elsevier.
- Iglesias, J., Pazos, M., Andersen, M. L., Skibsted, L. H., & Medina, I. (2009). Caffeic Acid as Antioxidant in Fish Muscle: Mechanism of Synergism with Endogenous Ascorbic Acid and α -Tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 675-681.
- Iglesias, J., Pazos, M., Lois, S., & Medina, I. (2010). Contribution of Galloylation and Polymerization to the Antioxidant Activity of Polyphenols in Fish Lipid Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7423-7431.
- Imai, H., Maeda, T., Shima, M., & Adachi, S. (2008). Oxidation of Methyl Linoleate in Oil-in-Water Micro- and Nanoemulsion Systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(9), 809-815.
- Jacobsen, C. (2015). Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(11), 1853-1866.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191-1202.
- Jeong, S.-H., Kim, B.-Y., Kang, H.-G., Ku, H.-O., & Cho, J.-H. (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, 208(1), 49-62.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Emulsiones múltiples: compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 1413-1421.
- Jiménez-Martín, E., Antequera Rojas, T., Gharsallaoui, A., Ruiz Carrascal, J., & Pérez-Palacios, T. (2016). Fatty acid composition in double and multilayered microcapsules of ω -3 as affected by storage conditions and type of emulsions. *Food Chemistry*, 194, 476-486.
- Joscelyne, S. M., & Trägårdh, G. (2000). Membrane emulsification — a literature review. *Journal of Membrane Science*, 169(1), 107-117.
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A., & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1209-1215.

- June, O., Graeme, A. D., & Anna, K. (2002). Fish Lipids. In *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*: CRC Press.
- Kandori, K. (1995). Chapter 7 - Applications of microporous glass membranes: Membrane emulsification. In A. G. Gaonkar (Ed.), *Food Processing*, (pp. 113-142). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Kelly, L., Grehan, B., Chiesa, A. D., O'Mara, S. M., Downer, E., Sahyoun, G., Massey, K. A., Nicolaou, A., & Lynch, M. A. (2011). The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. *Neurobiology of Aging*, 32(12), 2318.e2311-2318.e2315.
- Kerwin, B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2924-2935.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., & Taniguchi, H. (2002). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2161-2168.
- Kiokias, S., Dimakou, C., & Oreopoulou, V. (2007). Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chemistry*, 105(1), 94-100.
- Komaiko, J., Sastrosubroto, A., & McClements, D. J. (2015). Formation of Oil-in-Water Emulsions from Natural Emulsifiers Using Spontaneous Emulsification: Sunflower Phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Kosikowski, F. V., & Brown, D. P. (1973). Influence of Carbon Dioxide and Nitrogen on Microbial Populations and Shelf Life of Cottage Cheese and Sour Cream. *Journal of Dairy Science*, 56(1), 12-18.
- Labrador, V., Fernández Freire, P., Pérez Martín, J. M., & Hazen, M. J. (2007). Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. *Cell Biology and Toxicology*, 23(3), 189-199.
- Laguerre, M., Bayrasy, C., Panya, A., Weiss, J., McClements, D. J., Lecomte, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2015). What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 183-201.
- Laguerre, M., Chen, B., Lecomte, J., Villeneuve, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Antioxidant Properties of Chlorogenic Acid and Its Alkyl Esters in Stripped Corn Oil in Combination with Phospholipids and/or Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10361-10366.
- Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2009). Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11335-11342.
- Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2010). Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of "Phenolipids" in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2869-2876.

- Landy, P., Courthaudon, J.-L., Dubois, C., & Voilley, A. (1996). Effect of Interface in Model Food Emulsions on the Volatility of Aroma Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 526-530.
- Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of BHT(1). *International Journal of Toxicology*, 21(Supp 2), 19-94.
- Larrosa, M., Tomé-Carneiro, J., Yáñez-Gascón, M. J., Alcántara, D., Selma, M. V., Beltrán, D., García-Conesa, M. T., Urbán, C., Lucas, R., Tomás-Barberán, F., Morales, J. C., & Espín, J. C. (2010). Preventive Oral Treatment with Resveratrol Pro-prodrugs Drastically Reduce Colon Inflammation in Rodents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(20), 7365-7376.
- Lecomte, J., Giraldo, L. J. L., Laguerre, M., Baréa, B., & Villeneuve, P. (2010). Synthesis, Characterization and Free Radical Scavenging Properties of Rosmarinic Acid Fatty Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(6), 615-620.
- Lee, C. H. (2012). Resolvins as new fascinating drug candidates for inflammatory diseases. *Archives of Pharmacal Research*, 35(1), 3-7.
- Lee, J., Panya, A., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., & Decker, E. (2013). Comparison of Antioxidant Capacities of Rosmarinate Alkyl Esters in Riboflavin Photosensitized Oil-in-Water Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(2), 225-232.
- Lee, S., Hernandez, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., & Decker, E. A. (2006). Effect of Antioxidants and Cooking on Stability of n-3 Fatty Acids in Fortified Meat Products. *Journal of Food Science*, 71(3), C233-C238.
- Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). Protein-Stabilized Nanoemulsions and Emulsions: Comparison of Physicochemical Stability, Lipid Oxidation, and Lipase Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 415-427.
- Let, M. B., Jacobsen, C., & Meyer, A. S. (2005). Sensory stability and oxidation of fish oil enriched milk is affected by milk storage temperature and oil quality. *International Dairy Journal*, 15(2), 173-182.
- Li, J., Cheng, Y., Tatsumi, E., Saito, M., & Yin, L. (2014). The use of W/O/W controlled-release coagulants to improve the quality of bittern-solidified tofu. *Food Hydrocolloids*, 35, 627-635.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(12), 1646-1660. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1), 3-26.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1847-1856.

- López Giraldo, L. J., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barouh, N., Baréa, B., & Villeneuve, P. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6), 721-726.
- Lu, W., Kelly, A. L., & Miao, S. (2016). Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 1-9.
- Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., & Zhao, B. (2006). Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48(4), 263-274.
- Lucas, R., Comelles, F., Alcántara, D., Maldonado, O. S., Curcuroze, M., Parra, J. L., & Morales, J. C. (2010). Surface-Active Properties of Lipophilic Antioxidants Tyrosol and Hydroxytyrosol Fatty Acid Esters: A Potential Explanation for the Nonlinear Hypothesis of the Antioxidant Activity in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8021-8026.
- Lue, B.-M., Sørensen, A.-D. M., Jacobsen, C., Guo, Z., & Xu, X. (2017). Antioxidant efficacies of rutin and rutin esters in bulk oil and oil-in-water emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(4), 1600049.
- Ma, Y., Barbano, D. M., & Santos, M. (2003). Effect of CO₂ Addition to Raw Milk on Proteolysis and Lipolysis at 4°C. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1616-1631.
- Madrid, A., & Cenzano, J. M. (2000). *Los aditivos en los alimentos según la Unión Europea y la Legislación Española*. Madrid.
- Maldonado, O. S., Lucas, R., Comelles, F., González, M. J., Parra, J. L., Medina, I., & Morales, J. C. (2011). Synthesis and characterization of phenolic antioxidants with surfactant properties: glucosyl- and glucuronosyl alkyl gallates. *Tetrahedron*, 67(38), 7268-7279.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mancuso, J. R., McClements, D. J., & Decker, E. A. (1999). The Effects of Surfactant Type, pH, and Chelators on the Oxidation of Salmon Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4112-4116.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635.
- Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A., & De Caterina, R. (2008). Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3-5), 109-115.
- Massey, K. A., & Nicolaou, A. (2013). Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 59, 45-55.
- Matalanis, A., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry*, 132(2), 766-772.

- Mateos, R., Domínguez, M. M., Espartero, J. L., & Cert, A. (2003). Antioxidant Effect of Phenolic Compounds, α -Tocopherol, and Other Minor Components in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7170-7175.
- Matos, M., Suárez, M. A., Gutiérrez, G., Coca, J., & Pazos, C. (2013). Emulsification with microfiltration ceramic membranes: A different approach to droplet formation mechanism. *Journal of Membrane Science*, 444, 345-358.
- McCarthy, W. W. (1984). Ultrasonic emulsification. *Drug Cosmetic Industry Journal*, 94(6), 821-824.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577-606.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109-R124.
- Medina, I., González, M. J., Iglesias, J., & Hedges, N. D. (2009). Effect of hydroxycinnamic acids on lipid oxidation and protein changes as well as water holding capacity in frozen minced horse mackerel white muscle. *Food Chemistry*, 114(3), 881-888.
- Medina, I., González, M. J., Pazos, M., Medaglia, D., Sacchi, R., & Gallardo, J. M. (2003). Activity of plant extracts for preserving functional food containing n-3-PUFA. *European Food Research and Technology*, 217(4), 301-307.
- Mei, L., Decker, E. A., & McClements, D. J. (1998). Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5072.
- Mikulski, D., & Molski, M. (2010). Quantitative structure-antioxidant activity relationship of trans-resveratrol oligomers, trans-4,4'-dihydroxystilbene dimer, trans-resveratrol-3-O-glucuronide, glucosides: Trans-piceid, cis-piceid, trans-astringin and trans-resveratrol-4'-O- β -D-glucopyranoside. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(6), 2366-2380.
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1995). Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clinical chemistry*, 41, 1789.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., & Macchioni, A. (1993). Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 2228-2234.
- Morris, R. J., & Culkin, F. (1989). *Fish*. . Boca Raton. Florida: Ed. CRC Press.

- Morse, N. L., Reid, A. J., & St-Onge, M. (2018). An open-label clinical trial assessing the efficacy and safety of Bend Skincare Anti-Aging Formula on minimal erythema dose in skin. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, *34*(2), 152-161.
- Murata, Y., Osaki, K.-i., Shimoishi, Y., Baba, N., & Tada, M. (2004). Degradation of Ethyl Docosahexaenoate by γ -Ray Irradiation and Suppression of This Degradation by Antioxidants. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *68*(3), 743-745.
- Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., & Ohshima, T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, *40*(5), 501-507.
- Nenadis, N., Zhang, H.-Y., & Tsimidou, M. Z. (2003). Structure–Antioxidant Activity Relationship of Ferulic Acid Derivatives: Effect of Carbon Side Chain Characteristic Groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(7), 1874-1879.
- Nicolaou, K. C., & Mitchell, H. J. (2001). Adventures in Carbohydrate Chemistry: New Synthetic Technologies, Chemical Synthesis, Molecular Design, and Chemical Biology. *Angewandte Chemie International Edition*, *40*(9), 1576-1624.
- Nielsen HK, Löliger J, & RF., H. (1985). Reactions of proteins with oxidizing lipids. 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of amino acid losses in a whey protein-methyl linolenate model system. *British Journal of Nutrition.*, *53*(1), 61-73.
- Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2002). Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(19), 5445-5449.
- Oh, W. Y., & Shahidi, F. (2017). Lipophilization of Resveratrol and Effects on Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(39), 8617-8625.
- Oh, W. Y., & Shahidi, F. (2018). Antioxidant activity of resveratrol ester derivatives in food and biological model systems. *Food Chemistry*, *261*, 267-273.
- Packer, L., Hiramatsu, M., & Yoshikawa, T. (1999). *Antioxidant food supplements in human health*. San Diego, California: Academic Press. .
- Pan, Y., Tikekar, R. V., & Nitin, N. (2013). Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, *450*(1), 129-137.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270-278.
- Panya, A., Kittipongpittaya, K., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2012). Interactions between α -Tocopherol and Rosmarinic Acid and Its Alkyl Esters in Emulsions: Synergistic, Additive, or Antagonistic Effect? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(41), 10320-10330.
- Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2010). Effects of Chitosan and Rosmarinate Esters on the Physical and Oxidative Stability of Liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(9), 5679-5684.
- Passi, S., Ricci, R., Cataudella, S., Ferrante, I., De Simone, F., & Rastrelli, L. (2004). Fatty Acid Pattern, Oxidation Product Development, and Antioxidant Loss in Muscle Tissue

of Rainbow Trout and *Dicentrarchus labrax* during Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2587-2592.

- Pazos, M., Sanchez, L., & Medina, I. (2005). Tocopherol Oxidation in Fish Muscle during Chilling and Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4000-4005.
- Pereira-Caro, G., Madrona, A., Bravo, L., Espartero, J. L., Alcludia, F., Cert, A., & Mateos, R. (2009). Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, 115(1), 86-91.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2008). Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutrition Research Reviews*, 21(02), 158-173.
- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., & McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*, 68(10), 571-603.
- Phillipson, B. E., Rothrock, D. W., Connor, W. E., Harris, W. S., & Illingworth, D. R. (1985). Reduction of Plasma Lipids, Lipoproteins, and Apoproteins by Dietary Fish Oils in Patients with Hypertriglyceridemia. *New England Journal of Medicine*, 312(19), 1210-1216.
- Phipps, L. W. (1985). *The High Pressure Dairy Homogenizer*. Reading, England: The National Institute for Research in Dairy.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food*. Cambridge.: CRC. Woodhead publishing limited.
- Polavarapu, S., Oliver, C. M., Ajlouni, S., & Augustin, M. A. (2012). Impact of Extra Virgin Olive Oil and Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) on the Oxidative Stability of Fish Oil Emulsions and Spray-Dried Microcapsules Stabilized by Sugar Beet Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 444-450.
- Porter, W. L. (1980). Recent trends in food applications of antioxidants. In M. G. Simic, Karel, M. (Ed.), *Autoxidation in Food and Biological Systems*, (pp. 295-365). New York: Plenum Press.
- Porter, W. L. (1993). Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. In Williams, G. M. (Ed.), *Antioxidants Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects* (pp. 93-122). Princetown, NJ: Princeton Scientific Pub
- Porter, W. L., Black, E. D., & Drolet, A. M. (1989). Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 615-624.
- Privat, C., Telo, J. P., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souchard, J.-P., & Nepveu, F. (2002). Antioxidant Properties of trans- ϵ -Viniferin As Compared to Stilbene Derivatives in Aqueous and Nonaqueous Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1213-1217.
- Pryor, W. A., Cornicelli, J. A., Devall, L. J., Tait, B., Trivedi, B. K., Witiak, D. T., & Wu, M. (1993). A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(13), 3521-3532.

- Ramadan, M. F. (2008). Quercetin increases antioxidant activity of soy lecithin in a triolein model system. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 581-587.
- Ramadan, M. F. (2012). Antioxidant characteristics of phenolipids (quercetin-enriched lecithin) in lipid matrices. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 363-369.
- Reische, D. W., Lilliard, D. D., & R., E. R. (1998). Antioxidants. In D. B. M. Casimir C. Akoh (Ed.), *Food Lipids: chemistry, nutrition and Biotechnology.*, (pp. 423-448). New York: Marcel Dekker.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rothwell, J. A., Day, A. J., & Morgan, M. R. A. (2005). Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4355-4360.
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., & Millington, K. J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17(5), 449-459.
- Sacchi, R., Paduano, A., Fiore, F., Della Medaglia, D., Ambrosino, M. L., & Medina, I. (2002). Partition Behavior of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds in Oil–Brine Mixtures during Thermal Processing for Fish Canning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2830-2835.
- Sagalowicz, L., & Leser, M. E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 61-72.
- Salem, J. H., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Blanchard, F., & Fick, M. (2010). Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry*, 45(3), 382-389.
- Sang, S., Cheng, X., Stark, R. E., Rosen, R. T., Yang, C. S., & Ho, C.-T. (2002). Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(7), 2233-2237.
- Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094-1117.
- Sasaki, K., Alamed, J., Weiss, J., Villeneuve, P., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., & Decker, E. A. (2010). Relationship between the physical properties of chlorogenic acid esters and their ability to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 118(3), 830-835.
- Sato, D., Shimizu, N., Shimizu, Y., Akagi, M., Eshita, Y., Ozaki, S.-i., Nakajima, N., Ishihara, K., Masuoka, N., Hamada, H., Shimoda, K., & Kubota, N. (2014). Synthesis of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol, and their anti-oxidant, anti-allergic, and neuroprotective activities. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 78(7), 1123-1128.

- Schmidt, R. R., & Kinzy, W. (1994). Anomeric-Oxygen Activation for Glycoside Synthesis: The Trichloroacetimidate Method. In D. Horton (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 50 (pp. 21-123): Academic Press.
- Schmidt, R. R., & Michel, J. (1982). Synthese von linearen und verzweigten Cellotetraosen. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 21(1), 78-84.
- Schmidt, R. R., Michel, J., Roos, M., & 1984. (1984). Glycosylimidate, 12 Direkte Synthese von O- und O-Glycosyl-imidaten. *Liebigs Annalen der Chemie.*, 1343–1357.
- Sears, B., & Ricordi, C. (2012). Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16(9), 1137-1154.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 349-361.
- Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., Lu, Y., Siegelman, J., Baer, T., Yang, R., Colgan, S. P., & Petasis, N. A. (2006). Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: Assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *Journal of Immunology*, 176(3), 1848-1859.
- Shahidi, F., & Cadwallader, K. R. (1997). *Flavor and lipid chemistry of seafoods: an overview*. Washington D. C.: Eds. ACS SYMPOSIUM SERIES.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (1995). *Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster: Technomic.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P. K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2011). Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3499-3504.
- Shang, Y.-J., Qian, Y.-P., Liu, X.-D., Dai, F., Shang, X.-L., Jia, W.-Q., Liu, Q., Fang, J.-G., & Zhou, B. (2009). Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented Analogues: Influence of the Solvent, Radical, and Substitution. *The Journal of Organic Chemistry*, 74(14), 5025-5031.
- Sigfusson, H., & Hultin, H. O. (2002). Partitioning of Exogenous δ -Tocopherol between the Triacylglycerol and Membrane Lipid Fractions of Chicken Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7120-7126.
- Silvestre, M. P. C., Chaiyasit, W., Brannan, R. G., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Ability of Surfactant Headgroup Size To Alter Lipid and Antioxidant Oxidation in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2057-2061.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 502-507.
- Simopoulos, A. P. (2008). The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 674-688.

- Slabbert, N. P. (1977). Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols. *Tetrahedron*, 33(7), 821-824.
- Soares, D. G., Andreazza, A. C., & Salvador, M. (2003). Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1077-1080.
- Solans, C., & Solé, I. (2012). Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 246-254.
- Solè, I., Pey, C. M., Maestro, A., González, C., Porrás, M., Solans, C., & Gutiérrez, J. M. (2010). Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale up. *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(2), 417-423.
- Sørensen, A.-D. M., Lyneborg, K. S., Villeneuve, P., & Jacobsen, C. (2015). Alkyl chain length impacts the antioxidative effect of lipophilized ferulic acid in fish oil enriched milk. *Journal of Functional Foods*, 18, 959-967.
- Sørensen, A.-D. M., Nielsen, N. S., Yang, Z., Xu, X., & Jacobsen, C. (2012). Lipophilization of dihydrocaffeic acid affects its antioxidative properties in fish-oil-enriched emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2), 134-145.
- Spernath, A., & Aserin, A. (2006). Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130, 47-64.
- Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U. M., Albini, A., Prosperi, E., & Vannini, V. (2001). Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22586-22594.
- Stöckmann, H., Schwarz, K., & Huynh-Ba, T. (2000). The influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(5), 535-542.
- Stojanović, S., Sprinz, H., & Brede, O. (2001). Efficiency and Mechanism of the Antioxidant Action of trans-Resveratrol and Its Analogues in the Radical Liposome Oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391(1), 79-89.
- Sun, C., & Gunasekaran, S. (2009). Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 165-174.
- Szekeres, T., Fritzer-Szekeres, M., Saiko, P., & Jäger, W. (2010). Resveratrol and Resveratrol Analogues—Structure—Activity Relationship. *Pharmaceutical Research*, 27(6), 1042-1048.
- Tian, F., Decker, E. A., & Goddard, J. M. (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & Function*, 4(5), 669-680.
- Torres de Pinedo, A., Peñalver, P., Rondón, D., & Morales, J. C. (2005). Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. *Tetrahedron*, 61(32), 7654-7660.

- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A., & Plou, F. J. (2010). Regioselective Lipase-Catalyzed Synthesis of 3-O-Acyl Derivatives of Resveratrol and Study of Their Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 807-813.
- Trujillo, M., Mateos, R., Collantes de Teran, L., Espartero, J. L., Cert, R., Jover, M., Alcludia, F., Bautista, J., Cert, A., & Parrado, J. (2006). Lipophilic Hydroxytyrosyl Esters. Antioxidant Activity in Lipid Matrices and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3779-3785.
- Undeland, I., Kristinsson, H. G., & Hultin, H. O. (2004). Hemoglobin-Mediated Oxidation of Washed Minced Cod Muscle Phospholipids: Effect of pH and Hemoglobin Source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4444-4451.
- Villiere, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., & Genot, C. (2005). Oxidative Stability of Bovine Serum Albumin- and Sodium Caseinate-Stabilized Emulsions Depends on Metal Availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1514-1520.
- Viskupicova, J., Danihelova, M., Ondrejovic, M., Liptaj, T., & Sturdik, E. (2010). Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. *Food Chemistry*, 123(1), 45-50.
- Vlachogianni, I. C., Fragopoulou, E., Kostakis, I. K., & Antonopoulou, S. (2015). In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chemistry*, 177, 165-173.
- Vladisavljević, G. T., Lambrich, U., Nakajima, M., & Schubert, H. (2004). Production of O/W emulsions using SPG membranes, ceramic α -aluminium oxide membranes, microfluidizer and a silicon microchannel plate—a comparative study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232(2-3), 199-207.
- von Gadow, A., Joubert, E., & Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 632-638.
- Waddington, E., Sienuarine, K., Puddey, I., & Croft, K. (2001). Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 292(2), 234-244.
- Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335-342.
- Warnakulasuriya, S., Ziaullah, & Rupasinghe, H. (2014). Long Chain Fatty Acid Acylated Derivatives of Quercetin-3-O-Glucoside as Antioxidants to Prevent Lipid Oxidation. *Biomolecules*, 4(4), 980.
- Weiss, J., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2005). Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 605-615.
- Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257-1272.
- Wu, K.-G., & Xiao, Q. (2005). Microencapsulation of Fish Oil by Simple Coacervation of Hydroxypropyl Methylcellulose. *Chinese Journal of Chemistry*, 23(11), 1569-1572.

- Xenakis, A., Papadimitriou, V., & Sotiroidis, T. G. (2010). Colloidal structures in natural oils. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 55-60.
- Yu, C., Gu, L., Lin, Y., & Yu, L. (1985). Effect of alkyl side chain variation on the electron-transfer activity of ubiquinone derivatives. *Biochemistry*, 24(15), 3897-3902.
- Yuji, H., Weiss, J., Villeneuve, P., López Giraldo, L. J., Figueroa-Espinoza, M.-C., & Decker, E. A. (2007). Ability of Surface-Active Antioxidants To Inhibit Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 11052-11056.
- Zhang, Z., Yu, B., & Schmidt, R. R. (2006). Synthesis of Mono- and Di-O- β -d-glucopyranoside Conjugates of (E)-Resveratrol. *Synthesis*, 2006(08), 1301-1306.
- Zhong, Y., & Shahidi, F. (2011). Lipophilized Epigallocatechin Gallate (EGCG) Derivatives as Novel Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6526-6533.







8. ANEXO



8.1. ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1	Tipos de emulsiones.	10
Fig. 2	Emulgentes empleados en la industria.....	15
Fig. 3	Estructura de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6	19
Fig. 4	Rutas metabólicas de los ácidos grasos de la serie ω -3 y ω -6.	20
Fig. 5	Etapas de la oxidación lipídica.	23
Fig. 6	Mecanismo de autooxidación (A) y fotooxidación (B) del ácido linoleico (18: 2 ω -6) y los posibles hidroperóxidos que se pueden formar.	24
Fig. 7	Curva típica de desarrollo de la oxidación lipídica en un sistema modelo de emulsión de aceite de pescado en agua.	25
Fig. 8	Estructuras del ácido ascórbico y del α -tocoferol.....	33
Fig. 9	Estructuras de los antioxidantes sintéticos más empleados en la industria alimentaria.....	34
Fig. 10	Estructura química de los distintos ácidos fenólicos simples.....	36
Fig. 11	Estructura química del ácido gálico y del ácido elágico.....	36
Fig. 12	Estructuras química de derivados del ácido hidroxibenzoico.....	37
Fig. 13	Estructura química de algunos flavonoides.....	39
Fig. 14	Estructura química de algunos lignanos.	40
Fig. 15	Estructura química de hamamelitanino y pentasgaoilglucosa	41
Fig. 16	Derivados acilados de hidroxitirosol objeto de estudio.	53
Fig. 17	Derivados glucosilados de Hyd objeto de estudio.....	53
Fig. 18	Estructuras de derivados de Res objeto de estudio.....	57
Fig. 19	Estructuras de los derivados glucosilados de ésteres de Gal estudiados.	58
Fig. 20	Estructura de quercetina, isoquercitrin y derivados acilados de isoquercitrin.....	60
Fig. 21	Capacidad reductora por mol de Fe^{+2} de Hyd , ésteres de Hyd y derivados glucosilados de Hyd	79
Fig. 22	Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con 0,65 mM ppm de Hyd e Hyd-Ac , durante su almacenamiento a 40 °C.	81
Fig. 23	Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con distintas concentraciones de Hyd-Ac (10-200 ppm), durante su almacenamiento a 40 °C.	83
Fig. 24	Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con Hyd y sus derivados acilados (0,65 mM), durante su almacenamiento a 50 °C.	85

Fig. 25 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en aceite de pescado tratado con Hyd y sus derivados glucosilados e Hyd-Ac (0,61 mM), durante su almacenamiento a 50 °C.....	87
Fig. 26 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, y formación de compuestos fluorescentes (C) en emulsión de aceite de pescado tratado con Hyd e Hyd-Ac (0,65 mM), durante su almacenamiento a 35°C.....	89
Fig. 27 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en emulsión de aceite de pescado tratado con distintas concentraciones de Hyd-Ac (10-200 ppm), durante su almacenamiento a 35 °C.....	91
Fig. 28 Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, y de compuestos fluorescentes (C) en emulsión de aceite de pescado suplementada con ésteres de Hyd (0,65 mM) almacenadas a 50°C.....	93
Fig. 29 Cinética de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos conjugados (B) y formación de compuestos fluorescentes de emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Hyd y derivados glucosilados de Hyd (0,65 mM) almacenadas a 50 °C.	96
Fig. 30 Capacidad reductora por mol de Fe ⁺² de derivados acilados de Res (A), derivados glucosilados de Res (B) y derivados acil glucosilados de Res (C).....	108
Fig. 31 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 10, 25, 50, 100 y 200 ppm de Res-4'-C18 y almacenadas a 40 °C.	112
Fig. 32 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 100 ppm de Res , Res-3-C18 y Res-4'-C18 y almacenadas a 40 °C.	114
Fig. 33 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Res , Res-3-C2 , Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2 en una concentración de 0,65 mM y almacenadas a 50 °C.....	116
Fig. 34 Posiciones en las que se adicionó el residuo de glucosa en el Res	117
Fig. 35 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Res , Res-3-Glu , Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.....	119
Fig. 36 Posición donde tuvo lugar la acilación de Res-3-Glu (Pic) con grupos alquilo de distinta longitud de cadena.	120
Fig. 37 Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Pic , Pic-C4 , Pic-C8 , Pic-C12 , Pic-C16 y Pic-C18 (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.....	121

- Fig. 38** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Res** (10, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm) y almacenadas a 35 °C.....124
- Fig. 39** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Hyd, Res, Res-3-C18 y Res-4'-C18** (100 ppm) y almacenadas a 35 °C.126
- Fig. 40** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Hyd, Res, Res-3-C18 y Res-4'-C18** (100 ppm) y almacenadas a 35 °C en presencia de EtOH.128
- Fig. 41** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Res, Res-3-C2, Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2** (0,75 mM) y almacenadas a 50 °C.130
- Fig. 42** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Res, Res-3-Glu, Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu** (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.....132
- Fig. 43** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con **Pic, Pic-C4, Pic-C8, Pic-C12, Pic-C16 y Pic-C18** (100 ppm) y almacenadas a 40 °C.....134
- Fig. 44** Capacidad reductora por mol de Fe^{+2} de alquil (A) y glucosil alquil galatos (B).....147
- Fig. 45** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 0,1 mM de distintos ésteres de **Gal** y almacenadas a 45 °C.....149
- Fig. 46** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 0,1 mM de distintos glucosil alquil derivados de **Gal** y almacenadas a 45 °C.....151
- Fig. 47** Cinéticas de formación de los hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados, en emulsiones de aceite de pescado en agua, tratadas con 0,1 mM de **Gal** y ésteres de **Gal**, durante su almacenamiento a 45 °C.....153
- Fig. 48** Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con dienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de **Gal** y ésteres de **Gal**, almacenadas a 30 °C.156
- Fig. 49** Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con trienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de **Gal** y ésteres de **Gal**, almacenadas a 30 °C.157

- Fig. 50** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados en emulsiones de aceite en agua (10% aceite, 1% lecitina) suplementadas con 0,1 mM de distintos glucosil alquil derivados de **Gal** comparados con los ésteres correspondientes y almacenadas a 45 °C (media ± sd). 160
- Fig. 51** Cinéticas en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados en emulsiones de aceite en agua suplementadas con 0,1 mM de distintos glucosil alquil derivados de ácido **Gal** comparados con los alquil derivados correspondientes y almacenadas a 45 °C. 161
- Fig. 52** Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con dienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de **Gal** y glucosil alquil galatos, almacenadas a 30 °C. 164
- Fig. 53** Cinéticas de formación de Hidroperóxidos con trienos conjugados en emulsión de aceite en agua con lecitina (A), Tween 20 (B) y SDS (C) como emulsificantes suplementadas con 0,1 mM de **Gal** y glucosil alquil galatos, almacenadas a 30 °C. 165
- Fig. 54** Porcentajes de inhibición (calculados a día 7) de ácido **Gal**, alquil derivados y glucosil alquil derivados (en una concentración de 0,1 mM) frente a la longitud de cadena alquilo en aceite de pescado almacenado a 45 °C. 168
- Fig. 55** Porcentajes de inhibición de **Gal** y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (almacenada a 45 °C) y Tween 20 (almacenada a 30 °C) como emulsificantes a día 7 y día 4, respectivamente. 170
- Fig. 56** Porcentajes de inhibición de **Gal** y glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (almacenada a 45 °C) y Tween 20 (almacenada a 30 °C) como emulsificantes a día 8 y día 4, respectivamente. 173
- Fig. 57** Poder reductor FRAP de **IQ** y sus derivados acilados. 177
- Fig. 58** Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en aceite de pescado almacenado a 45 °C y suplementado con 0,75 mM de **Q**, **IQ** y derivados acilados. 179
- Fig. 59** Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados y de compuestos fluorescentes de interacción (C) de **IQ** y derivados acilados de **IQ** (0,25 mM) en emulsión de aceite en agua (10% aceite, 2% lecitina) almacenada a 45°C. Se empleó **Q** como control positivo a la inhibición. 182
- Fig. 60** Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite (10% aceite, 1% de SDS) suplementadas con **IQ** y derivados acilados de **IQ** (0,25 mM), almacenadas a 30 °C. Se empleó **Q** como control positivo a la inhibición. 185
- Fig. 61** Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua (10% aceite, 2% Tween 20) suplementadas con distintas concentraciones de **Q** y almacenadas a 30 °C. 187

- Fig. 62** Cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite en agua (10% aceite, 2% Tween 20) suplementada con distintas concentraciones de **IQ** almacenadas a 30°C. **Q** (0,4 mM) se empleó como control positivo de la inhibición.189
- Fig. 63** Cinéticas de formación de hidroperóxidos con dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite (10% aceite, 2% Tween 20) suplementadas con 0,40 mM de **IQ** y derivados acilados de **IQ** almacenados a 30 °C. **Q** se empleó como control positivo a la inhibición.190
- Fig. 64** Grupos estructurales de la **Q** implicados en la capacidad de captación de radicales.192
- Fig. 65** Porcentajes de inhibición de ésteres de **IQ** con distinta longitud de cadena en emulsiones de aceite en agua almacenadas a 30 °C con distintos emulsificantes (A, 2% lecitina; B, 1% SDS; C, 2% Tween 20).199



8.2. ÍNDICE DE TABLAS.

Tab. 1 Valores HLB de algunos emulgentes.....	12
Tab. 2 Factores que afectan a la estabilidad oxidativa en productos alimenticios basados en emulsiones enriquecidas con ω 3-PUFA. NI, no investigado.....	30
Tab. 3 Hyd, ésteres de Hyd y derivados glucosilados de Hyd sintetizados.....	76
Tab. 4 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV de Hyd , ésteres de Hyd y derivados glucosilados de Hyd	77
Tab. 5 Coeficientes de partición expresados como log <i>P</i> para Hyd , ésteres de Hyd y derivados glucosilados de Hyd. Para los compuestos señalados con (*), el log <i>P</i> se calculó usando la fragmentación de Crippen incluida en el Software ChemBrioDraw Ultra 11.0 (Ghose & Crippen, 1987) (media \pm sd).....	77
Tab. 6 Capacidad de captación de radicales de Hyd y derivados (media \pm sd).....	78
Tab. 7 Contenido en ácidos grasos en el aceite de hígado de bacalao (media \pm sd).....	80
Tab. 8 Inhibición en la formación de hidroperóxidos de dienos y trienos conjugados durante la oxidación de aceite de pescado a 40 °C suplementados con 100 ppm de compuesto fenólico (media \pm sd).....	82
Tab. 9 Inhibición en la formación de hidroperóxidos de dienos y trienos conjugados durante la oxidación de aceite de pescado a 40 °C suplementados con distintas concentraciones de Hyd-Ac (media \pm sd).....	84
Tab. 10 Inhibición de Hyd y diversos derivados acilados de Hyd en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en aceite de pescado a 50 °C en una concentración de 0,65 mM (media \pm sd).....	86
Tab. 11 Inhibición de Hyd y derivados glucosilados en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en aceite de pescado a 50 °C en una concentración de 0,61 mM (media \pm sd).....	88
Tab. 12 Inhibición de Hyd e Hyd-Ac en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y la formación de compuestos fluorescentes en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 1% lecitina) almacenada a 35 °C (media \pm sd).....	90
Tab. 13 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Hyd-Ac (10, 25, 50, 100, 150, 200 ppm) en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 1% lecitina) almacenada a 35 °C (media \pm sd).....	91
Tab. 14 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite suplementada con Hyd y distintos ésteres de Hyd (0,65 mM) en emulsión de aceite almacenada a 50 °C (media \pm sd).....	94

Tab. 15 Inhibición en la formación de compuestos fluorescentes en emulsión de aceite suplementada con Hyd y distintos ésteres de Hyd (0,65 mM) en emulsión de aceite almacenada a 50 °C (media ± sd).....	94
Tab. 16 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados y compuestos fluorescentes en emulsión de aceite suplementada con Hyd y derivados glucosilados de Hyd (0,65 mM) almacenada a 50 °C (media ± sd).....	97
Tab. 17 Derivados acilados del Res	102
Tab. 18 Derivados glucosilados del Res	103
Tab. 19 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV de Res , derivados acilados de Res y derivados glucosilados de Res	104
Tab. 20 Coeficientes de partición expresados como log <i>P</i> para Res , derivados acilados de Res y derivados acil glucosilo de Res . Para los compuestos señalados con (*), el log <i>P</i> se calculó usando la fragmentación de Crippen incluida en el Software ChemBrioDraw Ultra 11.0. (**), el log <i>P</i> se determinó empleando el software informático desarrollado por Molinspiration Cheminformatics (media ± sd).....	105
Tab. 21 Capacidad antirradicalaria de Res , derivados acilados de Res y derivados acil glucosilo de Res . DPPH se expresó como EC50, concentración necesaria para captar el 50% del radical DPPH presente en la disolución. El TEAC se expresó como la concentración que produjo la misma capacidad de captación de radical ABTS ⁺ que 0,5 mM de Trolox (media ± sd).....	106
Tab. 22 Moles de electrones que pueden ceder Res , derivados acilados de Res y derivados acil glucosilados de Res (media ± sd).....	110
Tab. 23 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con 10, 25, 50, 100 y 200 ppm de Res-4'-C18 y almacenadas a 40°C.....	113
Tab. 24 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res , Res-3-C18 y Res-4'-C18 (100 ppm) en aceite de hígado de bacalao almacenado 40 °C (media ± sd).....	114
Tab. 25 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Res , Res-3-C2 , Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2 (0,65 mM) y almacenadas a 40 °C (media ± sd).....	117
Tab. 26 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Res , Res-3-Glu , Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) y almacenadas a 40 °C (media ± sd).....	119
Tab. 27 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en muestras de aceite de pescado suplementadas con Pic , Pic-C4 , Pic-C8 , Pic-C12 , Pic-C16 y Pic-C18 (100 ppm) y almacenadas a 40 °C (media ± st).....	122

Tab. 28 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua suplementadas con Res (10, 25, 50, 100, 150 y 200 ppm) y almacenadas a 35 °C (media ± st).....	125
Tab. 29 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res , Res-3-C18 y Res-4'-C18 (100 ppm) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 35 °C (media ± sd).....	126
Tab. 30 Períodos de inducción de los dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite de pescado en agua tratada con 0,75 mM de Res , Res-3-C2 , Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2 , durante su almacenamiento a 50 °C.....	129
Tab. 31 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res , Res-3-C2 , Res-4'-C2 y Res-3,4'-C2 (0,75 mM) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 50 °C (media ± sd).....	130
Tab. 32 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Res , Res-3-Glu , Res-3,4'-Glu y Res-3,5-Glu (100 ppm) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 40 °C (media ± sd).....	132
Tab. 33 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Pic , Pic-C4 , Pic-C8 , Pic-C12 , Pic-C16 y Pic-C18 (100 ppm) en emulsión de aceite de pescado en agua almacenada a 40 °C (media ± sd).....	134
Tab. 34 Orden de eficacia antirradical en DPPH y TEAC y poder reductor (FRAP) para Res y derivados acilados de Res	136
Tab. 35 Estructuras de ácido gálico y alquil derivados objeto de estudio.	143
Tab. 36 Estructuras de los glucosil alquil galatos sintetizados.....	144
Tab. 37 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV de Gal , alquil galatos y glucosil alquil galatos.	144
Tab. 38 Coeficientes de partición expresados como log <i>P</i> de Gal , alquil galatos y glucosil alquil galatos (media ± sd).....	145
Tab. 39 Capacidad de captación de radical DPPH expresado como la concentración necesaria para captar el 50% de radical DPPH de Gal , alquil galatos y glucosil alquil galatos (media ± sd). ..	146
Tab. 40 Moles de electrones que pueden ceder Gal , alquil galatos y derivados glucosilados de alquil galatos (media ± sd).....	148
Tab. 41 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en aceite de hígado de bacalao almacenado 45 °C (media ± sd).....	150
Tab. 42 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en aceite de hígado de bacalao almacenado 45 °C. El Gal se empleó como control positivo frente a la inhibición (media ± sd).....	152

Tab. 43 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua (10% de aceite, 1% lecitina) almacenada a 45 °C (media ± sd).....	154
Tab. 44 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (día 8 y día 10 según esté almacenada a 45 °C o a 30 °C, respectivamente), Tween 20 (día 4) y SDS (día 2) como emulsificantes almacenados a 30 °C (media ± sd).....	158
Tab. 45 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados de Gal y alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina (día 8 y día 10 según esté almacenada a 45 °C o a 30 °C, respectivamente), Tween 20 (día 4) y SDS (día 2) como emulsificantes almacenados a 30 °C (media ± sd).....	158
Tab. 46 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados de alquil galatos y de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina como emulsificante almacenada a 45 °C a día 6 para los derivados con longitud de cadena C4-C10 y a día 5 para los derivados con longitud de cadena C12-C-18 (media ± sd).....	162
Tab. 47 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina, Tween y SDS como emulsificantes y almacenadas a 30 °C (media ± sd). El Gal se empleó como control.....	166
Tab. 48 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con trienos conjugados de glucosil alquil galatos (0,1 mM) en emulsión de aceite en agua empleando lecitina, Tween y SDS como emulsificantes y almacenadas a 30 °C (media ± sd). El Gal se empleó como control.....	166
Tab. 49 Derivados acilados de IQ	174
Tab. 50 Tiempos de retención y máximos de absorción del espectro de UV-vis de Q , IQ y derivados acilados de IQ	175
Tab. 51 Coeficientes de partición expresados como log <i>P</i> de Q , IQ y derivados acilados de IQ (media ± sd).....	176
Tab. 52 Capacidad antirradicalaria de IQ y derivados acilados de IQ . El DPPH se expresó como EC50, concentración necesaria para captar el 50% del radical DPPH presente en la disolución. El TEAC se expresó como la concentración que produjo la misma captación de radical ABTS ⁺ que 1 mM de Trolox (media ± sd).....	176
Tab. 53 Moles de electrones que pueden ceder Q , IQ y sus derivados acilados (media ± sd).....	177
Tab. 54 Inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos conjugados de IQ y derivados acilados de IQ (0,75 mM) en aceite de hígado de bacalao almacenado 45 °C (media ± sd).....	180

Tab. 55 Porcentajes de inhibición de IQ y derivados acilados de IQ (0,25 mM) en la formación de dienos y trienos conjugados en emulsión de aceite agua (10% aceite, 2% lecitina) almacenada a 45 °C Se empleó Q como control positivo de la inhibición (media ± sd).....	183
Tab. 56 Porcentajes de inhibición de IQ y derivados acilados de IQ (0,25 mM) en la formación de compuestos fluorescentes en emulsión de aceite agua (10% aceite, 2% lecitina) almacenada a 45°C. Se empleó Q como control positivo de la inhibición (media ± sd).....	183
Tab. 57 Porcentaje de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en una emulsión de aceite (10% aceite, 1% SDS) suplementada con 0,25 mM de de IQ y sus derivados acilados almacenada a 30 °C. Q se empleó como control de inhibición (media ±sd).	186
Tab. 58 Estudios previos de variables de concentración y temperatura de Q e IQ para llevar a cabo el estudio de la inhibición de estos compuestos en emulsión de aceite de pescado en agua con Twen 20 (1%).	186
Tab. 59 Porcentajes de inhibición en la formación de dienos y trienos conjugados en un emulsión de aceite en agua (10% aceite, 2% Tween 20) suplementada con distintas concentraciones de Q y almacenada a 30°C.....	188
Tab. 60 Porcentaje de inhibición en la formación de hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados en una emulsión de aceite (10% aceite, 2% Tween 20) suplementada con 0,40 mM de de IQ y sus derivados acilados en los días 4 y 6 almacenada a 30°C. Q se empleó como control de inhibición (media ±sd).....	191
Tab. 61 Relación entre la inhibición de IQ y derivados acilados de IQ en aceite de pescado (suplementados con 0,75 mM de compuesto fenólico, almacenados a 45 °C) y la hidrofobicidad (log P).	194
Tab. 62 Relación entre la inhibición de Q , IQ y derivados acilados de IQ en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 2% lecitina, suplementados con 0,25 mM de compuesto fenólico y almacenados a 30 °C) y la hidrofobicidad, log <i>P</i>	196
Tab. 63 Relación entre la inhibición de Q , IQ y derivados acilados de IQ en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 1% SDS, suplementados con 0,25 mM de compuesto fenólico y almacenados a 30 °C) y la hidrofobicidad, log <i>P</i>	197
Tab. 64 Relación entre la inhibición de Q , IQ y derivados acilados de IQ en emulsión de aceite de pescado (10% aceite, 2% Tween 20, suplementados con 0,4 mM de compuesto fenólico y almacenados a 30 °C) y la hidrofobicidad, log <i>P</i> .	197

8.3. ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esq. 1 Ruta sintética para la obtención de hidroxitirosol-1'-O- β -glucósido.	55
Esq. 2 Ruta sintética para la obtención de hidroxitirosol-3'-O- β -glucósido y hidroxitirosol-4'-O- β -glucósido.....	55
Esq. 3 Ruta sintética para la obtención de los derivados glucosilo de los alquil galato. R se corresponde con cada una de las cadenas alquilo de los ésteres de gálico de partida, butilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo y octildecilo.	60







