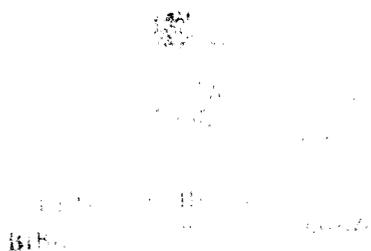


UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y ANTIOXIDANTES



BENJAMÍN ALBERTO ROJANO

Profesor asociado

Departamento de Química

Medellín, Abril de 1997

0

UNAL-Medellín



6 4000 00061175 9

547.77

R64

i

RESUMEN

La reacción de oxidación de lípidos es uno de los procesos más importante en la química de los alimentos e implica una de las áreas de investigación de mayor estudio en los últimos años. El uso de los antioxidantes en la industria alimenticia representa grandes cantidades de dinero; sin embargo, en la mayoría casos se hace de una manera indiscriminada, sin conocer la química de dichos compuestos.

El presente trabajo hace inicialmente una descripción del fenómeno de oxidación de lípidos, haciendo énfasis en cada una de las etapas del proceso (iniciación, propagación y terminación).

Posteriormente, se describe como se clasifican, como actúan y como son estructuralmente los diversos antioxidantes. Además se plantean las tendencias en la búsqueda de estructuras con propiedades antioxidantes, a partir de las investigaciones en el campo de los productos naturales.

En consecuencia se busca con esta revisión dar una visión amplia sobre la oxidación de lípidos a partir de los recientes avances científicos reportados; y estudiar la química del funcionamiento de los diversos antioxidantes usados en los alimentos.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Perfil de las reacciones de autoxidación de lípidos.....	3
Figura 2. Autoxidación del ácido linoleico	5
Figura 3. Mecanismo general de oxidación de lípidos.....	6
Figura 4. Iniciación Enzimática (Lipoxigenasas).....	12
Figura 5. Esquema general de oxidación de lípidos.....	14
Figura 6. Rompimientos homolítico y heterolíticos en la descomposición de hidroperóxidos.....	16
Figura 7. Algunos antioxidantes fenólicos alimenticios.....	21
Figura 8. Estructura de algunos tocoferoles y algunos de sus análogos.....	28
Figura 9. Ácidos fenólicos antioxidantes.....	36

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
INTRODUCCIÓN	...1
PEROXIDACIÓN LÍPIDICA.....	2
1. REACCIONES DE INICIACIÓN.....	7
1.1 Fotooxigenación.....	7
1.2 Metales pesados.....	9
1.3 Hemocompuestos.....	10
1.4 Catálisis enzimática (Lipoxidasas o lipoxigenasas).....	11
2. Reacciones de Propagación y Terminación.....	13
3. Descomposición de hidroperóxidos.....	15
3. Prevención de la oxidación y el uso de antioxidantes.....	17
3.1 Tipos de antioxidantes.....	18
3.1.1 Antioxidantes Primarios.....	18

3.1.1.1 Tocoferoles.....	22
3.1.1.2 Flavonoides y Ácidos fenólicos.....	29
3.1.2 Antioxidantes Secundarios.....	38
3.1.2.1 Agentes secuestrantes.....	38
3.1.2.2. Inactivadores de oxígeno singlete.....	39
3.1.3. Antioxidantes con múltiples funciones.....	40
3.1.3.1 Fosfolípidos.....	40
3.1.3.2 Productos de la reacción de Maillard.....	41
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	46

INTRODUCCIÓN

La reacción espontánea del oxígeno con compuestos orgánicos es una de las reacciones más importantes en los organismos vivos. Muchas enfermedades crónicas se deben a perturbaciones en el metabolismo de los ácidos grasos. Por ejemplo, un exceso de ácidos grasos en la dieta conduce a enfermedades cardiovasculares y una descontrolada peroxidación lipídica causa inflamaciones y se asocia con la artritis, cáncer y aterogénesis^{1,2}.

En los alimentos la oxidación está relacionada con una diversidad de cambios durante su procesamiento, distribución y almacenamiento. Los lípidos son los sustratos más oxidables en un alimento y esta reacción afecta muchos parámetros cualitativos, como el aroma producido por la formación o modificación de compuestos volátiles, el sabor producido por los hidroxiácidos entre otros, modifica el color debido a reacciones tipo Maillard entre las proteínas y sustancias originadas por los lípidos, provoca cambios de textura debido a reacciones de entrecruzamiento, y causa pérdidas del valor nutricional en el alimento por la destrucción de algunas vitaminas liposolubles³.

El proceso de oxidación de los lípidos en los alimentos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres. Este proceso se inicia con pequeñas cantidades de oxígeno, por lo cual resulta difícil evitarlo; sin embargo, se puede controlar o retardar usando adecuadamente las diferentes técnicas de conservación, combinadas con el uso de antioxidantes. Para usar adecuadamente un antioxidante hay que conocer la forma como funcionan estas estructuras, dentro del proceso de oxidación.

Los antioxidantes se clasifican de acuerdo a su modo de acción como primarios y secundarios; los antioxidantes primarios son interruptores de la reacción de propagación; mientras, los antioxidantes secundarios reduce la velocidad de iniciación de diferentes formas.

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA O AUTOXIDACIÓN

La reacción de lípidos con el oxígeno se conoce como peroxidación lipídica, y se puede dividir como autoxidación propiamente dicha y la catálisis promovida por lipoxigenasas. La autoxidación de los ácidos grasos en los alimentos, es un proceso que se puede presentar de dos formas; en el caso (2) de la figura 1, se muestra la situación de reacción

más frecuente y en la cual, después de un cierto período de inducción, se detectan los primeros productos de oxidación que van aumentando exponencialmente con el tiempo⁴. En muchos alimentos se encuentran en concentraciones muy altas algunas sustancias pro-oxidantes como los metales, las cuales aceleran los procesos degradativos, de tal manera, que no hay un período de inducción, y esto corresponde al caso 1.

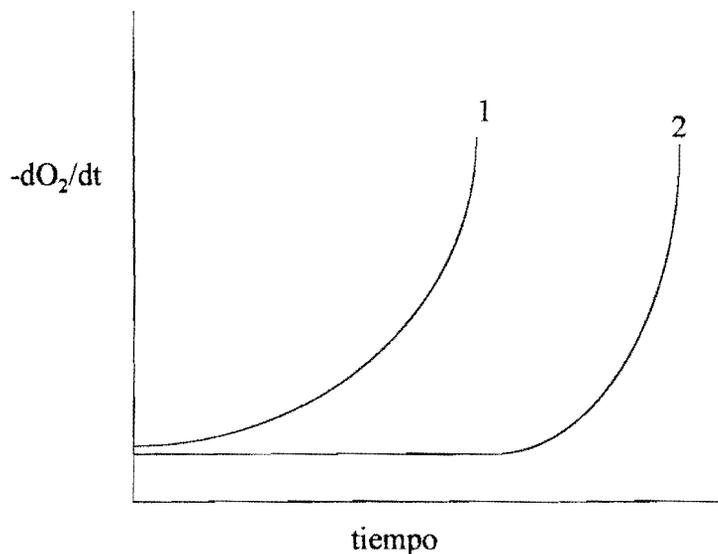


FIGURA 1 Perfil de las reacciones de Autooxidación de Lípidos.

La duración del período de inducción y la velocidad de oxidación dependen de la naturaleza del ácido graso oxidable. El período de inducción, es el tiempo en el cual la oxidación del sustrato es constante, y en los ácidos grasos disminuye en el orden oleico, linoleico, linolénico;

mientras que la velocidad oxidación aumenta en el mismo orden; estas variaciones se deben a la capacidad que tienen los compuestos insaturados para formar radicales estables por la presencia de átomos de hidrógeno especialmente activados. En la tabla 1; se indican las energías necesarias para la sustracción de un átomo de hidrógeno de los diferentes grupos existentes en un ácido graso.

	kj/mol
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \text{ ---} \end{array}$	422
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \text{ --- CH ---} \end{array}$	410
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{--- CH --- CH = CH} \end{array}$	322
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{--- CH = CH --- CH --- CH = CH ---} \end{array}$	272

Tabla 1. Energía para disociar un átomo de hidrógeno

Así pues, los ácidos grasos insaturados, forman más fácil el radical, cuando se extrae un átomo de H del grupo metilénico que de un grupo alilo aislado. En el caso del ácido linoleico se sustrae el átomo de H del

grupo metilénico en posición 11 situado entre los dobles enlaces (Figura 2) ⁵.

La autoxidación de los lípidos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, que tiene las fases de iniciación, propagación y terminación. Como la autoxidación de los ácidos grasos insaturados en los alimentos causa disminución en su calidad, para retardarla hay que conocer cada uno de los pasos dentro del proceso ⁵.

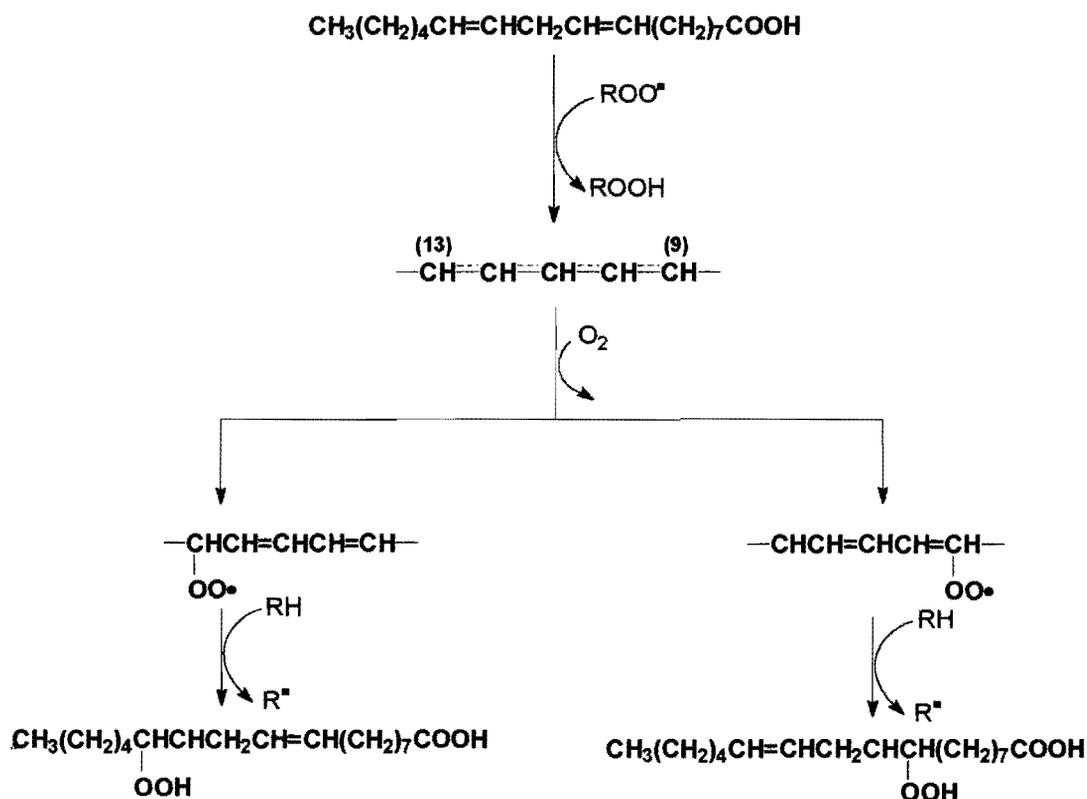


Figura 2. Autoxidación del ácido linoleico.

En la etapa de iniciación el radical lipídico, $R\bullet$; se forma a partir del lípido (RH), usualmente por el ataque de radicales, luz, calor, irradiaciones o por trazas de metales. El radical lipídico formado reacciona rápidamente con oxígeno para dar un radical peroxilo, $ROO\bullet$; el cual ataca otra molécula de lípido y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido lipídico ROOH, y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación. De esta manera, muchas moléculas de lípidos pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas formas de iniciación. El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación, en las cuales hay consumo de los radicales. Las interacciones bimoleculares de radicales libres originan productos no-radicales muy estables. El proceso se resume en la figura 2.

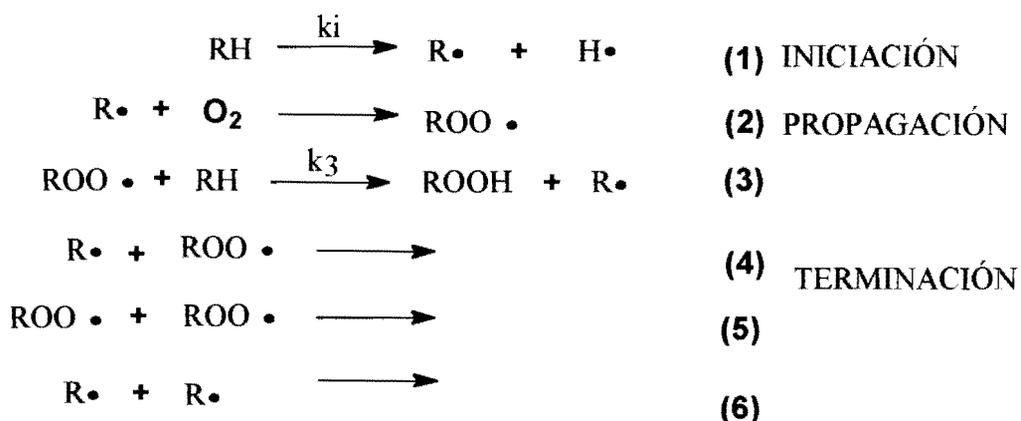


Figura 3. Mecanismo general de oxidación de lípidos

La reacción (3), es rápida cuando la energía necesaria para la sustracción del H de la molécula del ácido graso es menor que la energía liberada en la formación del enlace hidrógeno-oxígeno del nuevo hidroperóxido.

1. REACCIONES DE INICIACIÓN

En los modelos usados para estudiar la autoxidación de lípidos se ha encontrado que existen dos grupos de reacciones que participan en el proceso de iniciación. En el primer grupo tenemos las reacciones de iniciación propiamente dichas, pues con ellas se superan las barreras energéticas que impiden la interacción de los ácidos grasos con el oxígeno. A este grupo de reacciones pertenece la fotooxigenación, los metales y las hemoproteínas. En el segundo grupo se ubica la iniciación enzimática (lipoxigenasas) ⁶.

1.1 Fotooxigenación. El oxígeno en su estado fundamental es un triplete ($^3\text{O}_2$); y por principios mecanocuánticos está impedido para reaccionar con los ácidos grasos que se encuentran en un estado singlete ($^1\text{O}_2$), para formar otro singlete como los hidroperóxidos (reacción

1). La energía de activación para la oxidación directa del ácido graso es muy alta (150-270Kj/mol); por lo tanto, dicha reacción es poco probable⁷



El oxígeno en su estado fundamental (${}^3\text{O}_2$) puede absorber 92 KJ/mol y pasar al estado singlete (${}^1\text{O}_2$), en el que ambos electrones se encuentran apareados en el mismo orbital. En este caso, el oxígeno es un buen electrófilo, cuando reacciona con dobles enlace. La fotooxigenación es potencializada por sensibilizadores como la clorofila a y b, y la feosfitina a y b, entre otros. Estos sensibilizadores son activados por la luz y reaccionan directamente con el sustrato para formar los radicales libres que continúan con la reacción; y otros que activan el oxígeno de la siguiente forma⁶:



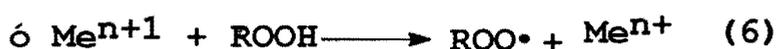
El oxígeno formado reacciona después con el ácido graso para propagar la oxidación.



1.2 Metales pesados. Los alimentos lipídicos generalmente contienen trazas de iones metálicos, que pueden proceder del equipo de refinación, del proceso de hidrogenación, del envase o de los diversos componentes proteicos como las enzimas. Los metales pesados que incrementan la velocidad de oxidación de los ácidos grasos, son aquellos que poseen dos o más estados de oxidación y que tienen además un potencial redox intermedio, como es el caso del Cu, Fe y Mn⁸.

La estabilidad de un alimento depende de la naturaleza del ácido graso y de la concentración del ion metálico; así por ejemplo, los aceites de girasol y de maíz que son ricos en ácido linoleico, deben contener menos de 0.03ppm de Fe³⁺ y 0.01ppm de Cu²⁺, para una permanencia durante un tiempo largo en estantes⁸.

Los iones metálicos pueden iniciar la autoxidación sólo cuando hay presencia de hidroperóxidos a los que descomponen en radicales de acuerdo a las siguientes reacciones:



La velocidad de autoxidación de los ácidos grasos depende del contenido de agua en el alimento. En los alimentos desecados el ion metálico reacciona más fácilmente con el hidroperóxido, por que no existe la capa de hidratación. De tal manera que ha medida que aumenta el contenido de agua en al alimento, desciende la velocidad de autoxidación⁸.

1.3 Hemocompuestos: Las hemoproteínas y heminas, existen en la mayoría de los vegetales. La hemoglobina, mioglobina y el citocromo C aceleran la autoxidación de lípidos en tejidos animales. Tales reacciones son con frecuencia la causa de los defectos de aroma que se producen cuando se almacenan pescados, aves y productos cárnicos. En los vegetales las proteínas hemicas más importantes son la peroxidasa y la catalasa⁹.

Las reacciones de iniciación de radicales libres promovidas por la hemoglobina son de la forma:



1.4 CATÁLISIS ENZIMÁTICA (Lipoxidasas o Lipoxigenasas)

Las reacciones de las lipoxidasas o lipoxigenasas con los ácidos grasos se diferencia de la autooxidación por las características propias de la catálisis enzimática; es decir, la especificidad del sustrato, existencia de un pH óptimo de reacción y la temperatura. Además, el proceso es realmente una oxigenación, en lugar de una oxidación propiamente dicha. Las lipoxidasas peroxidan específicamente los ácidos grasos con sistemas pentadienos (1-cis, 4-cis), como el ácido linolénico y linoleico en las plantas y el araquidónico en los animales; en este caso, el ácido oleico no sirve como sustrato oxidable. La lipoxigenasa, también puede atacar a varios compuestos que tienen dobles enlaces en su estructura química, entre los cuales, tenemos los pigmentos naturales como el β -caroteno y las clorofilas. Su acción decolorante sobre esas estructuras se ha usado en el blanqueado de harinas de cereales, para lo cual se usa la lipoxigenasa de la harina de soya¹⁰.

Las lipoxidasas son metaloproteínas con un ion hierro (II) en el centro activo, La enzima es activada por su producto de oxidación; es decir, cuando el Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} . La catálisis transcurre así: del sustrato oxidable se extrae un átomo de hidrógeno del grupo pentadienilo (1-cis, 4-cis) que se oxida a luego a H^+ ; el radical pentadienilo unido a la enzima

se transforma luego en un sistema conjugado que reacciona con el oxígeno. El radical peróxido formado es reducido por la enzima y, por fijación de un protón se forma el hidroperóxido¹⁰ Figura 4.

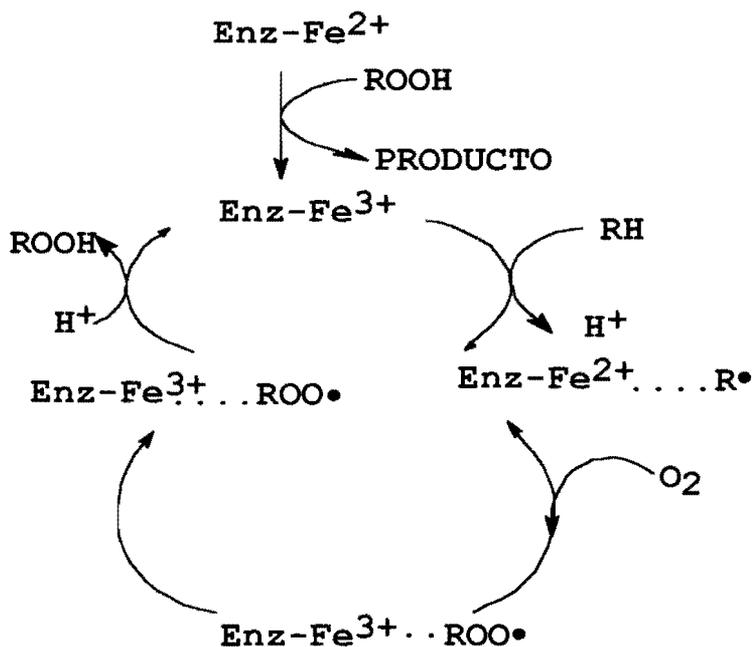


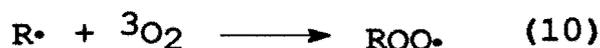
FIGURA 4. INICIACIÓN ENZIMÁTICA (LIPOXIGENASAS)

Una vez formados los hidroperóxidos se pueden seguir las etapas de propagación y terminación, vistas anteriormente. Sin embargo, en algunas frutas y verduras existen sistemas enzimáticos que transforman los hidroperóxidos en sustancias volátiles. Por ejemplo, en el pepino se forma el 2-trans, 6-cis nonadienal, que le confiere un olor característico, debido a la acción de una hidroperóxido-liasa y una isomerasa. En el

trigo y el maíz se forman los ácidos α y/o γ cetograsos por la acción de algunas liasas. La acción de las lipoxidasas de la soya y frijoles produce compuestos volátiles muy similares a pesar de que los hidroperóxidos de donde provienen son diferentes. El sabor amargo de la avena se debe a la formación enzimática del ácido 9-trans hidroxilado, 10-cis-11-octadienoico¹⁰.

2. REACCIONES DE PROPAGACIÓN Y TERMINACIÓN

Los radicales lipídicos formados en las diversas iniciaciones son especies muy reactivas, que pueden sufrir rápidamente las reacciones de propagación, ya sea por abstracción de hidrógeno al reaccionar con una molécula de ácido graso(RH) o por una reacción con oxígeno en su estado basal.



La combinación de dos radicales para que ocurra la terminación de la oxidación, es un proceso con una entalpía de activación muy baja; sin embargo, está limitada por factores de tipo estérico que disminuyen la

colisión entre los radicales debido a que estos deben tener una orientación adecuada, por lo cual se hace poco probable la reacción.

En los productos alimenticios, se ha encontrado que las reacciones laterales son más importantes, porque inducen la formación de sustancias volátiles como los ésteres, cetonas, aldehídos, hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos, productos de polimerización entre otros; los cuales producen los cambios sensoriales que a la vez determinan la calidad del alimento. En la figura , se resume el proceso de oxidación grasos polinsaturados y todas sus consecuencias³.

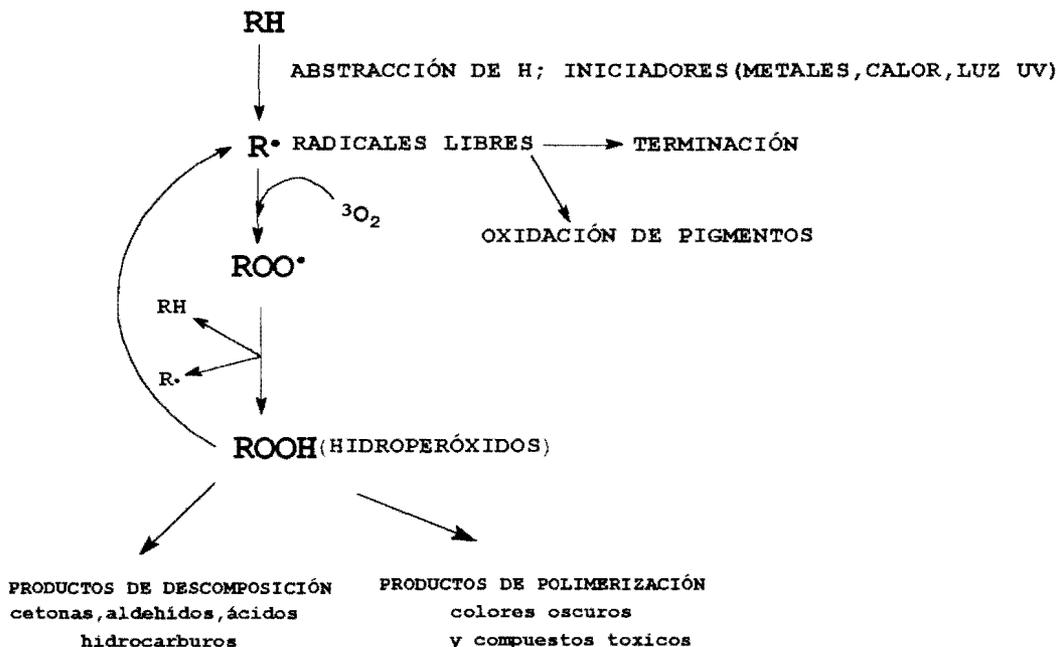


Figura 5 . esquema general de oxidación de lípidos

3. DESCOMPOSICIÓN DE HIDROPERÓXIDOS.

Los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación tienen la capacidad de interactuar con otras moléculas o de intervenir en reacciones secundarias, generando nuevas sustancias. Los hidroperóxidos pueden fragmentarse por rompimientos homolíticos o heterolíticos (figura). El rompimiento homolítico en posición β , produce un radical alcoxi como intermedio, y sufrir posteriormente una unión carbono-carbono. El rompimiento homolítico en el lado a del carbono alcoxi forma pentano y metil-13-oxo-9,11 tridecadienoato, cuando se usa inicialmente el 13-hidroperóxido del metil linoleato. Además se puede formar metil octanoato y 2,4 decadienal, usando el 9-hidroperóxido del metil linoleato.

El rompimiento homolítico b forma hexanal y metil 9-oxononanoato de los 13 y 9 hidroperóxidos del metil linoleato. Los rompimientos heterolíticos bajo condiciones ácidas producen carbocationes intermedios, los cuales rompen selectivamente para formar los mismos compuestos del rompimiento homolítico b; es decir hexanal y metil 9-oxononanoato⁷.

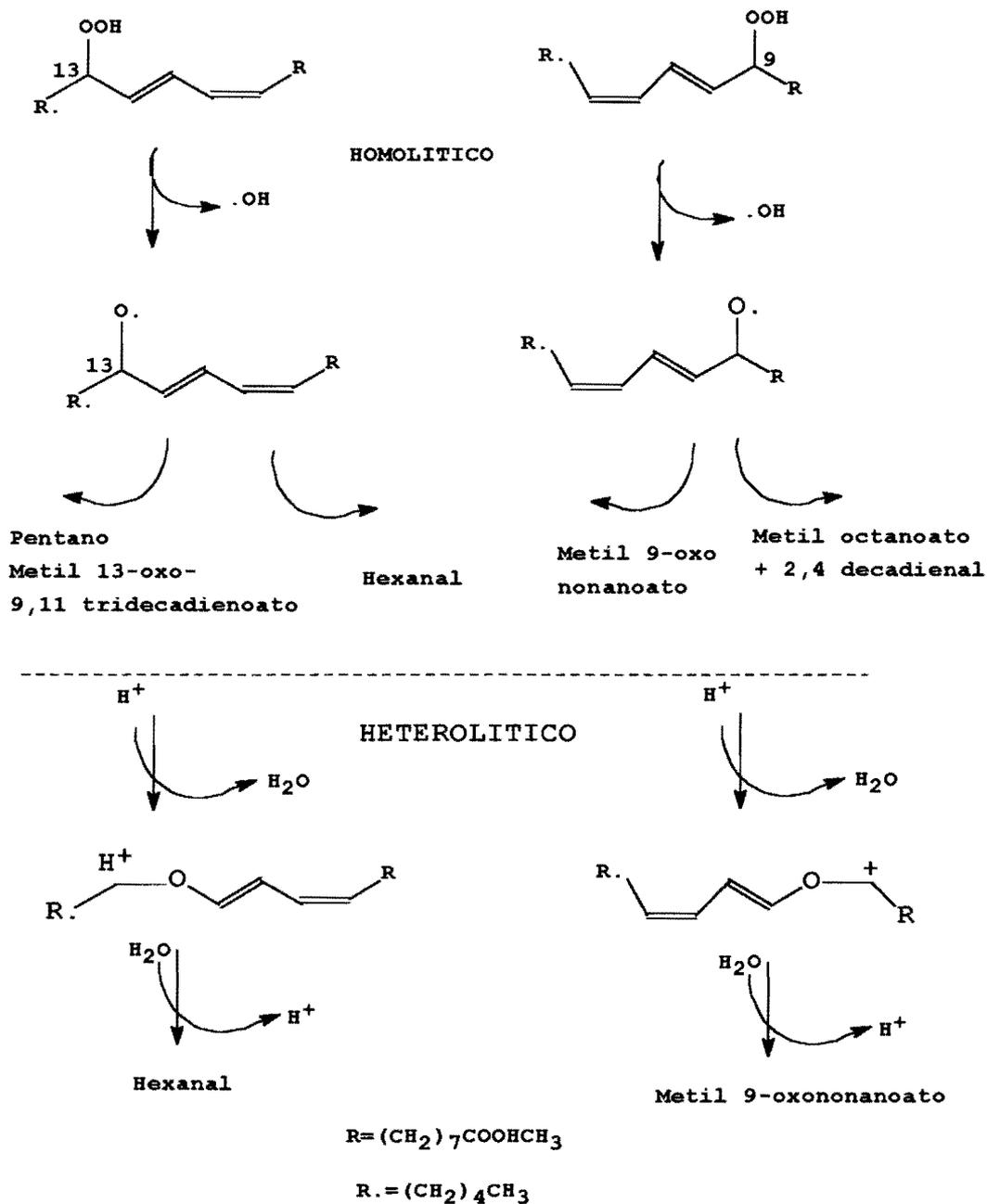


FIGURA 6. Rompimientos homolitico y heteroliticos en la descomposición de hidropéroxidos

3. PREVENCIÓN DE LA OXIDACIÓN Y EL USO DE ANTIOXIDANTES

El proceso de oxidación de lípidos ocurre en presencia de cantidades muy bajas de oxígeno; y por esto, en la mayoría de los casos los métodos de conservación (empaque al vacío, refrigeración, congelación, etc) si se usan aisladamente, resultan insuficientes para evitarlo. Además, es antieconómico tratar de eliminar todo el oxígeno presente, y en su lugar se usan operaciones de conservación combinadas con el uso de antioxidantes.

Los antioxidantes, son compuestos capaces de retardar el proceso de oxidación extienden así el período de oxidación; y por lo tanto, su vida útil. Sin embargo nunca mejoran ni regeneran la calidad de un producto altamente oxidado. Los antioxidantes usados en alimentos, deben cumplir algunos requisitos como: ser inodoro, no impartir color, insípido, ser efectivo a bajas concentraciones, que sea fácil de incorporar, que soporte las condiciones de procesamiento, barato, estable en el producto terminado y que no sea tóxico. Según la USDA "los antioxidantes son sustancias para preservar los alimentos al retardar el deterioro y la rancidez causada por la oxidación"¹².

3.1 TIPOS DE ANTIOXIDANTES

Ingold en 1968¹³, clasificó los antioxidantes de acuerdo a su modo de acción como primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios o interruptores de cadena, participan en la etapa de propagación, reaccionando con los radicales peroxilos (**ROO•**) para convertirlos en productos más estables; mientras, que los antioxidantes secundarios, reducen la velocidad de la etapa de iniciación de la reacción en cadena, mediante diversos mecanismos.

3.1.1 ANTIOXIDANTES PRIMARIOS

A condiciones normales de presión, el radical de mayor concentración es el alquilperoxi (**ROO•**), que puede ser convertido directamente en el hidroperóxido respectivo al reaccionar con una especie que ceda fácilmente protones, como los fenoles y las fenilaminas de acuerdo a la siguiente reacción:



El radical fenoxilo ArO formado es estabilizado por resonancia y no continúa la cadena de reacción, o puede ser destruido al interactuar con un segundo radical peroxilo para formar productos moleculares, interrumpiendo la cadena oxidativa así:



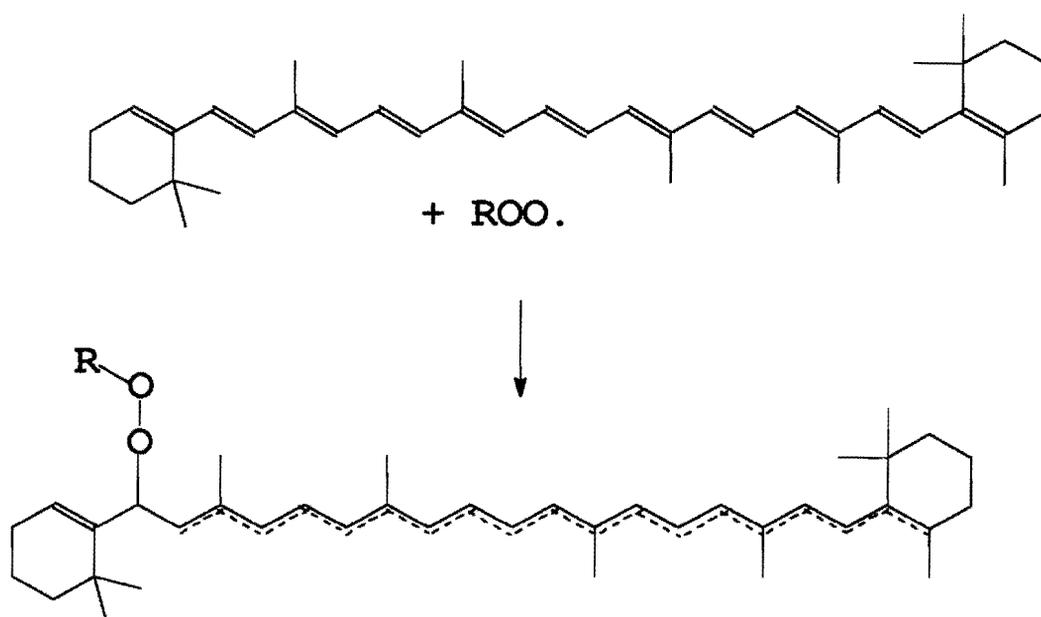
Una molécula que actúa como antioxidante primario, debe ceder fácilmente el hidrógeno al radical lipídico; y el radical fenoxilo resultante del antioxidante debe ser más estable que el radical lipídico inicial, o debe ser convertido a un producto más estable¹⁴.

La acción de un antioxidante primario, está limitada, por la reacción de transferencia de cadena:



la cual disminuye o anula la acción del antioxidante¹⁵

Otra forma de interrumpir la cadena de oxidación es mediante el mecanismo propuesto por Burtón y col¹⁶, para la reacción del β -caroteno con los radicales peroxilos del ácido linoleico a bajas presiones de oxígeno; en este caso, se forma un producto de adición, en lugar del hidroperóxido correspondiente, porque el β -caroteno no tiene hidrógenos ácidos para ceder; este mecanismo es el siguiente:



El producto de adición formado es estabilizado por resonancia e inhibe la extensión de la reacción de propagación.

Los antioxidantes fenólicos pueden ser sintéticos o naturales. Los antioxidantes naturales permitidos por la FDA (Food Drugs Administration) son: Butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propilgalato (PG), dodecilgalato (DG), terbutil dihidroquinona (TBHQ) y el ácido nordihidroguayaretico (NDGA), entre otros.(figura). El BHA y BHT son solubles en aceites y muy poco solubles en agua. El BHT se usa para preservar aceites vegetales y grasas animales; el BHA es particularmente útil en proteger el sabor y color de aceites esenciales, especialmente aceite de palma y coco que son muy usados en productos de confitería.

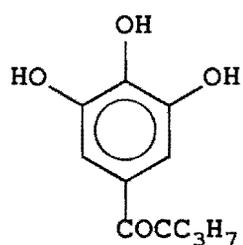
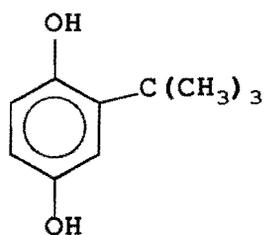
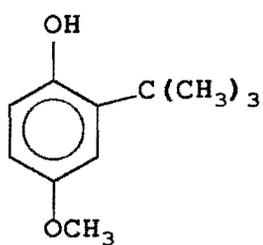
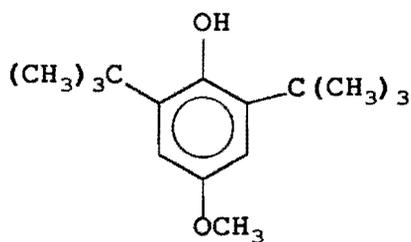
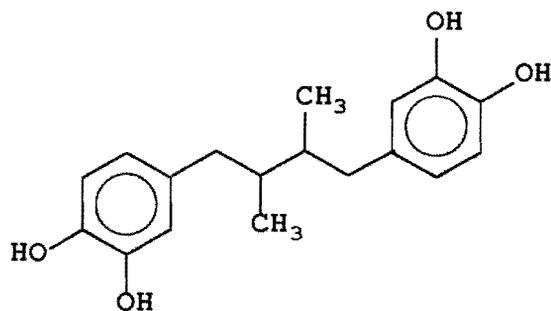
**PG****TBHQ****BHA****BHT****NDGA**

Figura 7. Algunos antioxidantes fenólicos alimenticios

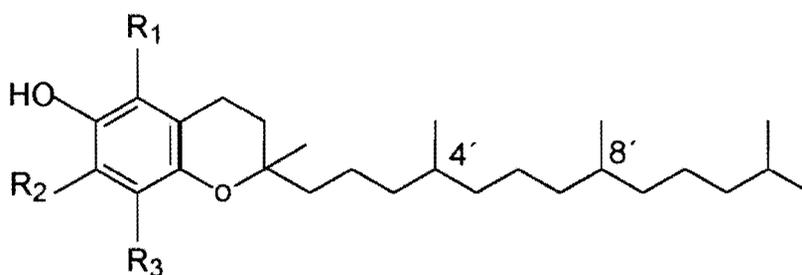
El TBHQ, debido a su alto punto de fusión (126-128°C), es muy utilizado para prevenir la oxidación de aceites, en el caso de frituras. El PG, se usa en aceites vegetales, grasas animales, productos cárnicos que contienen salsas y snacks¹².

Los antioxidantes naturales son esencialmente compuestos mono o polifenólicos encontrados en los diferentes organelos de los tejidos animales y vegetales. Los compuestos químicos naturales, utilizados como antioxidantes primarios, y de mayor estudio son los tocoferoles, flavonoides, derivados del ácido cinnámico y algunos ácidos orgánicos polifuncionales.

En consecuencia, son muchos los trabajos en productos naturales, dirigidos a la búsqueda de nuevas estructuras de este tipo; mediante el uso de las diferentes técnicas de extracción, purificación, identificación y evaluación antioxidante. Los flavonoides y derivados del ácido cinnámico son estudiados posteriormente; debido a sus múltiples funciones.

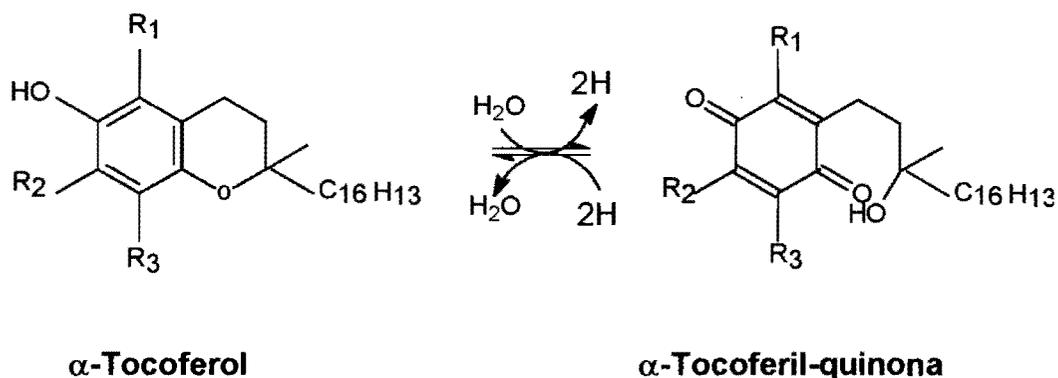
3.1.1.1 TOCOFEROLES. Los tocoferoles son compuestos hidrofóbicos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son antioxidantes monofenólicos que estabilizan la mayoría de los aceites y sus derivados en los extractos de plantas y animales; y se encuentran especialmente en cereales, aceites de semillas, nueces y otras fuentes vegetales, en los

tejidos animales se detectan en pequeñas trazas. Los tocoferoles tienen un anillo cromano acoplado a una cadena lateral o. fitilica insaturada, y se denominan α , β , γ ó δ de acuerdo a la ubicación de los sustituyentes metílicos en el anillo fenólico del grupo cromano **FIGURA.;** Los tocoferoles poseen actividad como vitamina E, y esta decrece en el orden δ hasta α . Además, son producidos comercialmente como antioxidantes en alimentos para preveer la oxidación de ácidos grasos polinsaturados y sistemas lipídicos.

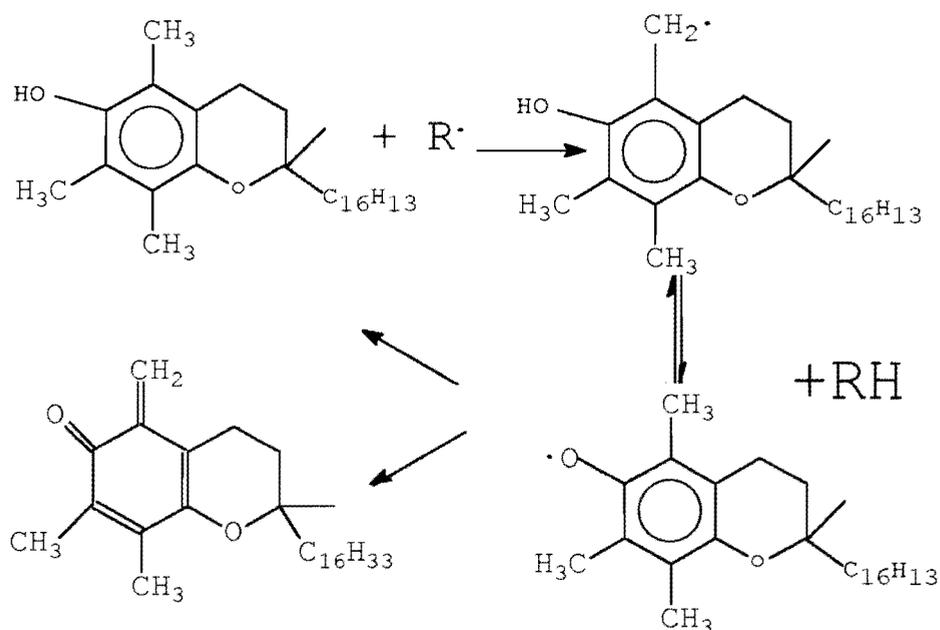


	R_1	R_2	R_3
α - tocoferol	CH_3	CH_3	CH_3
β -tocoferol	H	CH_3	CH_3
δ -tocoferol	CH_3	H	CH_3
γ -tocoferol	H	H	CH_3

El mecanismo de acción antioxidante de los tocoferoles, se debe principalmente al sistema redox tocoferol -tocoferil quinona, así¹⁶:



Los tocoferoles ceden átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos ($R\bullet$) generando moléculas de lípidos (RH) y radicales tocoferil-quinonas, que a su vez se acoplan entre sí para regenerar una molécula de tocoferol, y una molécula de metil-tocoferil-quinona, de acuerdo a las siguientes reacciones¹⁷.



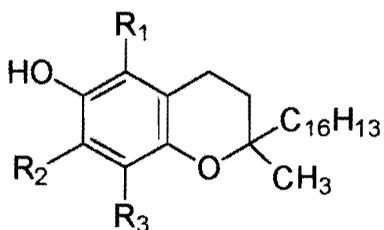
Los tocoferoles, son un grupo amplio de antioxidantes fenólicos, naturales y deben su actividad antioxidante a los sustituyentes en el anillo fenólico, y por esto la diferencia entre ellos. El α - tocoferol totalmente metilado es más activo que el δ - tocoferol con un solo metilo. La influencia de los grupos sustituyentes alquilados se considera de tipo electrónico y estérico. Los grupos metilos son buenos donadores de electrones y pueden estabilizar los radicales fenoxilos ¹⁸. Cuando los sustituyentes están en la posición *orto* el efecto es de tipo estérico; por ejemplo, los fenoles *ortodialquilados* extienden la cadena de transferencia reducida, y esto les da más actividad como antioxidantes ¹⁹;

es así, como el 5,7 dimetil tocoferol es menos activo que el 7,8dimetil tocoferol. Los resultados anteriores permiten sugerir, que en este caso, la actividad antioxidante de los tocoferoles y sus análogos está principalmente determinada por los efectos electrónicos de los sustituyentes ²⁰. Así por ejemplo, los grupos donantes de electrones incrementan la actividad, el OCH₃ es un buen donante de electrones y en la posición *orto* estabiliza el radical por resonancia y se retarda la reacción de transferencia ²¹. La α -tocoferilamina, se forma al sustituir el OH por un grupo NH₂, y se ha encontrado que tiene actividad similar al α -tocoferol; esto se debe a la capacidad que tiene el amino para ceder fácilmente el átomo de H, además el radical anilinio es fuertemente estabilizado por resonancia ²².

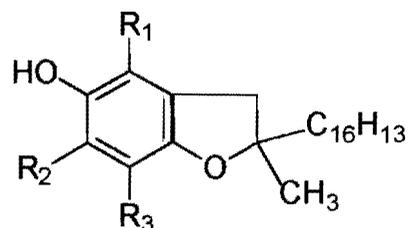
En diversos trabajos ^{23,24,25}, se ha encontrado que la excelente capacidad antioxidante de los tocoferoles y sus análogos se debe al anillo heterocíclico fusionado.

De tal manera que los compuestos con 5 miembros en este anillo, son mejores antioxidantes, debido a la facilidad que tienen para extender la resonancia, además, hay un mejor solapamiento con el anillo aromático.

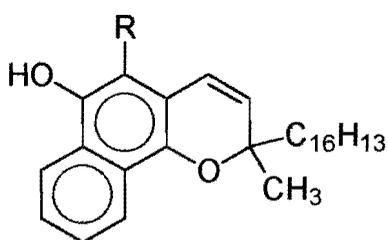
En la búsqueda de nuevas estructuras antioxidantes (Figura 4), se han sintetizado análogos de tocoferoles, adicionando un anillo fenólico extra, que aumenta la deslocalización de electrones en el radical fenoxilo, encontrándose compuestos con mejor actividad antioxidante que los tocoferoles, como los ubiquinoles, polialquilocromanoles, polialquilbenzocromenoles, naftofuranos e hidroquinonas^{27,28}.



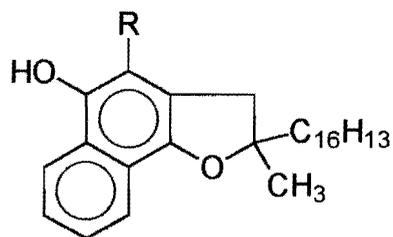
TOCOFEROLES CON ANILLO
DE SEIS MIEMBROS



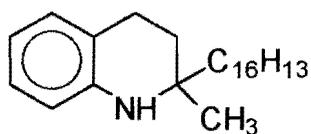
TOCOFEROLES CON ANILLO
DE CINCO MIEMBROS



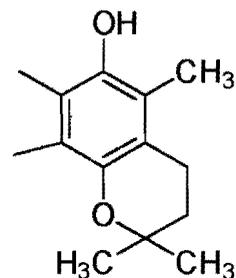
BENZOCROMENOL



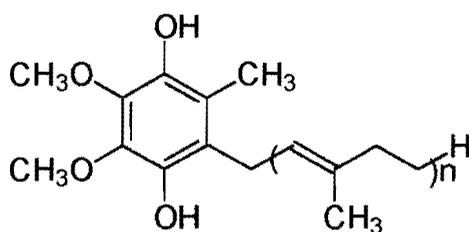
BENZOCROMANOL



TOCOFERILAMINAS



UBICROMANOL



UBIQUINOLES

Figura 8. Estructura de algunos tocoferoles y algunos de sus análogos.

3.1.1.2 FLAVONOIDES Y ÁCIDOS FENÓLICOS.

Los flavonoides y los derivados del ácido cinámico, debido a que contienen hidrógenos fenólicos que tienen carácter ácido, se consideran antioxidantes primarios. Sin embargo, son aceptores de radicales libres, y de acuerdo al pH en que se encuentren pueden actuar como agentes quelantes de metales. Los flavonoides son antioxidantes naturales que se encuentran en los seres vivos en forma de glicósidos, y que se pueden convertir en el respectivo aglicón por acción enzimática o por tratamiento con ácidos.

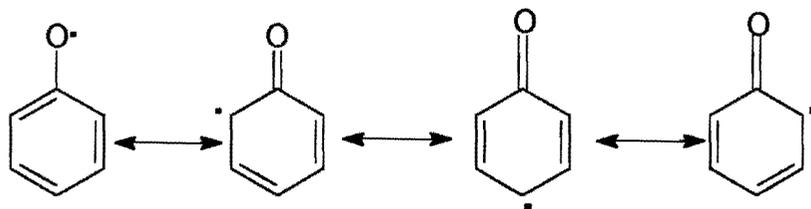
Los flavonoides y los derivados del ácido cinámico, debido a que contienen hidrógenos fenólicos que tienen carácter ácido, se consideran antioxidantes primarios. Sin embargo, son aceptores de radicales libres, y de acuerdo al pH en que se encuentren pueden actuar como agentes quelantes de metales. Los flavonoides son antioxidantes naturales que se encuentran en los seres vivos en forma de glicósido, y que se pueden convertir en el respectivo aglicón por acción enzimática o por tratamiento con ácidos.

Son muchos los trabajos que reportan aislamientos, caracterización e identificación de estructuras flavonoides y derivados del ácido cinámico en plantas, vegetales, frutas y animales. Por ejemplo, isoflavonas en frutas, soya, en té, en orégano, entre otros^{29,30,31,32,33,34}.

Las consideraciones planteadas a continuación, son el resultado de una revisión bibliográfica sobre la relación estructura actividad de antioxidantes tipo flavonoides y análogos; no implica esto, que el autor este de acuerdo con todo lo expuesto.

El fenol es un antioxidante pobre, pero las sustituciones por grupos alquílicos en las posiciones 2,4,6 incrementan la densidad electrónica sobre el grupo hidróxilo por efecto inductivo, aumentando así la reactividad hacia los radicales lipídicos^{14,15}.

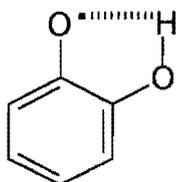
El radical fenoxilo formado al reaccionar un fenol con un radical lipídico, es estabilizado por deslocalización del par de electrones alrededor del anillo aromático, como se indica en las siguientes estructuras resonantes.



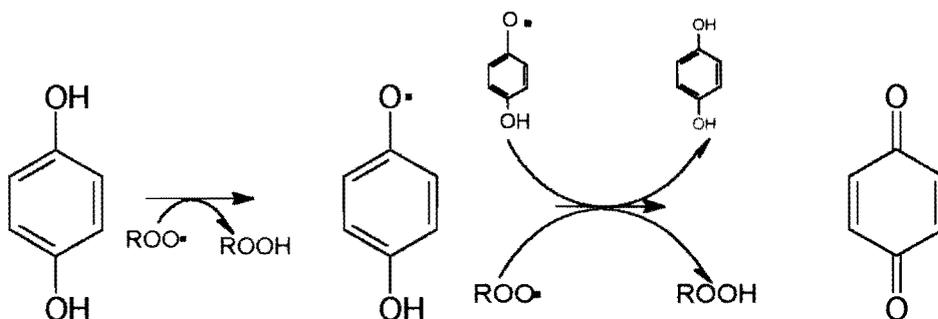
Al aumentar estabilidad del radical fenoxilo ($\text{ArO}\cdot$) aumenta también la actividad antioxidante; pero si se hace extrema disminuye. Así que en principio los sustituyentes que aumentan la estabilidad de ese radical beneficia la actividad antioxidante³⁵.

Cuando se considera un sustituyente alquílico en posición *orto* al grupo hidróxilo, como el 2-terbutil hidroxianisol (BHA) y el 2,6 diterbutiltolueno (BHT), se presentan dos efectos; de un lado, un efecto electrónico (efecto de campo o inductivo) en el cual hay una estabilización del radical fenoxilo que se ha formado previamente; y en el otro caso, un efecto estérico que puede aumentar la estabilidad del radical fenoxilo porque lo protege; pero si el efecto estérico es demasiado grande, el poder antioxidante baja porque se convierte en una obstrucción para alcanzar otras moléculas oxidables³⁵.

La introducción de un segundo grupo hidróxilo al fenol., en las posición 2 aumenta la actividad antioxidante. La efectividad de un 1,2 dihidroxibenceno, se debe a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que estabiliza el radical fenoxilo³⁷.



Los derivados de los 1,4 dihidroxibencenos, deben su actividad antioxidante, a que los radicales semiquínoides formados inicialmente, pueden ser oxidados posteriormente a una quinona por reacción con otro radical lipídico, o formar una quinona y una molécula de hidroquinona por desproporción³⁶.



La actividad de los 2-metoxifenoles, es mucho menor que la del catecol (1,2 dihidroxibenceno), debido a que el grupo metoxilo no estabiliza el radical mediante un enlace de hidrógeno³⁸.

Cuvelier y colaboradores^{39,40}, encontraron que los ácidos *orto*-difenólicos como el protocatecuico y caféico, tienen mayor actividad antioxidante que los respectivos monofenoles (*p*-hidroxibenzoico y *p*-cumárico), además el ácido gálico con 3 grupos hidroxilos, es más activo que el protocatecuico. Sin embargo, Pokorny⁴⁰, reporta que la presencia de más de 3 grupos hidroxilos sobre un núcleo aromático, no mejora la eficiencia antioxidante.

Los sustituyentes donadores de electrones, en posiciones *orto* o *para* al grupo hidróxilo, aumentan la actividad antioxidante. Por ejemplo, el ácido sinápico tiene mayor actividad que el ácido ferúlico, y este a su vez mayor que el ácido *p*-hidroxibenzoico. En el grupo de los ácidos fenólicos, en general se encuentra que los grupos sustituyentes dadores de electrones mejoran la actividad antioxidante. Los ácido cinámicos, son más activos que los benzoicos respectivos; porque el grupo C=C, aumenta la conjugación del radical fenoxilo^{41,42} (Figura 3).

Los flavonoides (Figura 4), son conocidos como antioxidantes primarios, debido a la presencia de hidrógenos fenólicos; sin embargo, pueden actuar como aceptores de radicales libres, y de acuerdo al pH en que se encuentre forman quelatos con trazas de metales.

Los flavonoides son antioxidantes naturales que se encuentran en los tejidos vegetales formando glicósidos. La función bimodal de los flavonoides como antioxidantes, en la mayoría de los casos no es diferenciable, actuando muchas veces de manera sinérgica. Así por ejemplo, las 3,5 dihidroflavonas forman quelatos muy estables con Cu^{+2} ; mientras que las flavonas con más de dos hidroxilos especialmente en las posiciones 3' y 4', como la fisetina, quercetina y luteolina son buenos antioxidantes primarios ^{43,44}.

La posición y el grado de hidroxilación son determinantes en la actividad antioxidante de los flavonoides. La *o*-dihidroxilación del anillo B contribuye eficientemente en la actividad antioxidante. Todos los flavonoides hidroxilados en las posiciones 3', 4' poseen actividad antioxidante ⁴⁵. Las flavonas robinetina y la miricetina, tienen un grupo hidróxilo adicional en la posición 5', que ayuda a aumentar la actividad respecto a los que no lo poseen, como la fisetina y quercetina ⁴⁷.

En las flavonas, se ha encontrado que el agrupamiento de los hidroxilos en posiciones *orto* sobre un anillo, produce antioxidantes muy potentes; por ejemplo, 3,5,8,3',4' pentahidroxi flavonas. Mientras, que las

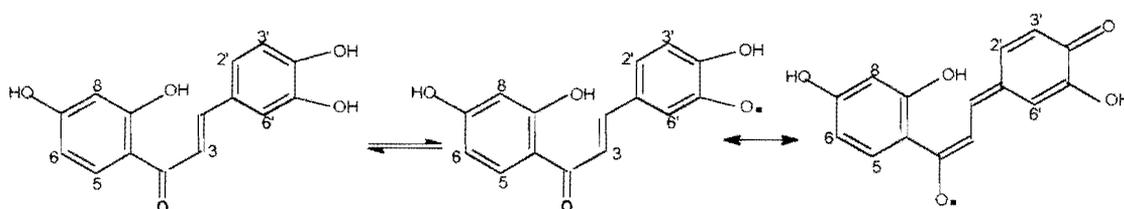
hidroxilaciones 5,7 del anillo A aparentemente tienen poca influencia sobre la actividad antioxidante de los compuestos⁴⁸

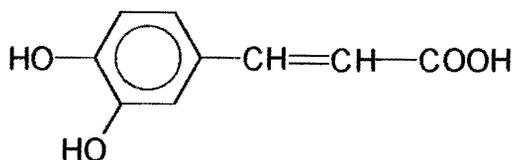
Las polihidroxi flavonas, se encuentran ampliamente distribuidos en los diversos productos naturales, y tienen un gran efecto estabilizador de la fracción lipídica de los tejidos vegetales; esta acción estabilizante se debe al sinergismo como antioxidante primario y secundario⁴⁹.

Las chalconas son los precursores naturales de las flavonas y las flavanonas, cuando se ciclan en medios ácidos. La buteína 2,4,3',4' dihidroxichalcona, y la ocaína 2,3,4,3',4' pentahidroxichalcona, son más activas como antioxidante que su respectiva flavanonas.

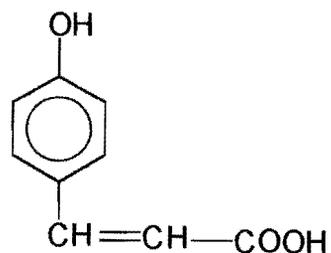
Esta actividad se debe a la formación de radicales libres estabilizados por resonancia de acuerdo al siguiente equilibrio^{37,50}.

En las isoflavonas, para la actividad antioxidante, son determinantes las hidroxilaciones en las posiciones 4' y 5, un ejemplo es la genisteína.³⁸

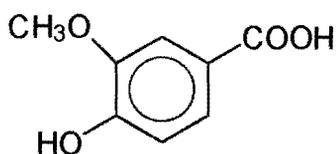




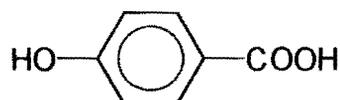
ácido caféico



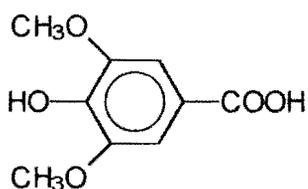
ácido p- cumárico



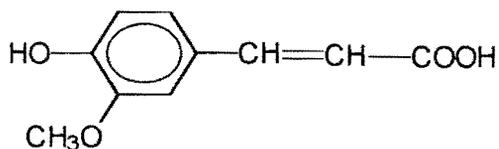
ácido vanílico



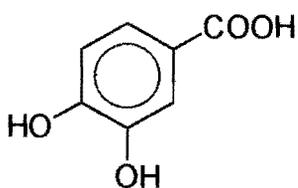
ácido p- hidroxibenzoico



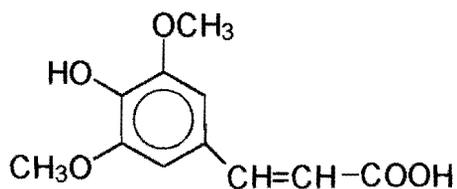
ácido sirínjico



ácido Ferúlico

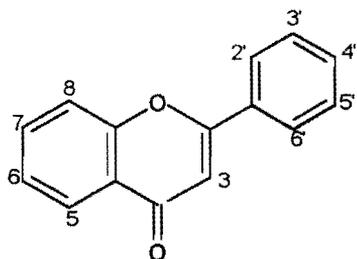


ácido protocatecuico

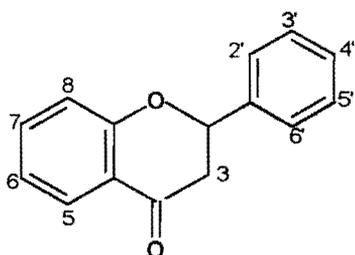


ácido sinápico

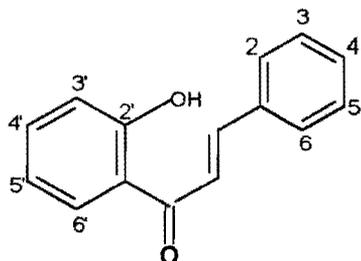
Figura 9. Ácidos fenólicos antioxidantes



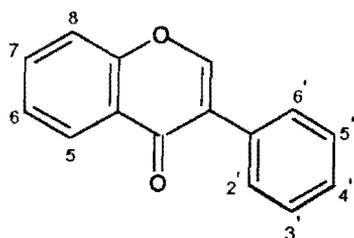
Flavonas
 Quercetina : 3,5,7,3',4' pentahidroxi
 Fisetina : 3,7,3',4' Tetrahidroxi
 Robinetina : 3,7,3',4',5' Pentahidroxi



Flavanonas
 Naringenina : 3,5,4' Trihidroxi
 Hesperitina : 5,7,3' Trihidroxi-4 metox



Chalconas
 Buteina : 2,4,3',4' Tetrahidroxi



Isoflavonas
 Genisteina : 5,7,4' trihidroxi

Figura 10. Estructuras de algunos flavonoides antioxidantes.

3.1.2 ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS

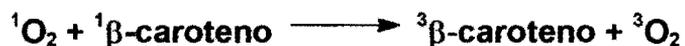
Son aquellos compuestos que retardan la velocidad de oxidación de los lípidos por un mecanismo diferente a la interrupción de la cadena de los radicales libres. Estos pueden operar por una variedad de mecanismos que incluyen agentes acomplejantes, atrapadores de oxígeno, especies que descomponen los hidroperóxidos formados previamente, desactivadores de oxígeno singlete, entre otros. Los antioxidantes secundarios muestran actividad siempre y cuando se encuentre presente otra especie. Por ejemplo, los agentes secuestrantes son efectivos en la presencia de iones metálicos.

3.1.2.1 AGENTES SECUESTRANTES. La quelación de los iones metálicos por algunos componentes de los alimentos reduce su efecto pro-oxidante, elevando la energía de activación de las reacciones de iniciación. Los agentes quelantes que forman enlaces de tipo sigma σ con los metales; como el ácido cítrico, ácido etilendiamio tetracético (EDTA), ácido fosfórico y sus derivados, son compuestos efectivos como antioxidantes secundarios porque reducen el potencial de redox del metal. Se ha encontrado que los agentes quelantes que interactúan con los metales mediante enlaces de tipo π , como las bases nitrogenadas, aumentan el potencial redox y aceleran los procesos oxidativos actuando entonces como agentes pro-oxidantes.

El EDTA es muy usado en la industria alimenticia, es un agente acomplejante que tiene numero de coordinación 6, lo que confiere a sus complejos una alta estabilidad termodinámica debido a su estructura tridimensional, se usa para disminuir la rancidez en margarinas provocada por la presencia de cobre (II). El ácido cítrico, es un agente quelante menos fuerte que el EDTA; sin embargo, su uso en alimentos es mas amplio, y puede retardar el deterioro oxidativo de lípidos y es comúnmente adicionado a los aceites vegetales después del proceso de deodorización para evitar su degradación¹⁷.

3.1.2.2 INACTIVADORES DE OXÍGENO SINGLETE

El β -caroteno actúa también como un inactivador fotoquímico del oxígeno singlete formado por algún sensibilizador en el medio de reacción.



Clements y col en 1973⁵⁰, demostraron que el β -caroteno a concentraciones de 0.46 ppm reduce el nivel de peroxidos en aceite de soya después de 6 horas a 20°C. En general, el efecto atenuador de los carotenoides es muy rápido y actúan impidiendo la transferencia de energía de la clorofila excitada al oxígeno triplete. Los carotenoides se usan para proteger los alimentos grasos de los procesos de fotoxigenación.

3.1.3 ANTIOXIDANTES CON MÚLTIPLES FUNCIONES

Se ha encontrado que los fosfolípidos, los productos de la reacción de Maillard, los flavonoides y ácidos fenólicos, inhiben los procesos oxidativos por diversos mecanismos.

3.1.3.1 FOSFOLÍPIDOS. Los fosfolípidos no tienen un mecanismo definido en su acción como antioxidantes. Sin embargo pueden actuar como bases de Lewis y acomplejar metales. El mayor uso de los fosfolípidos se ha realizado en su función como sinergistas en la presencia de antioxidantes naturales tipo tocoferoles y flavonoides. Hudson y Ghavami⁵¹, observaron que las propiedades antioxidantes del dipalmitoil fosfatidil etanolamina en combinación con el α -tocoferol incrementan la acción antioxidante, cuando se aumenta la concentración de estos hasta un 0.6%.

Se ha encontrado que la fosfatidiletanolamina(PE) actúa sinérgicamente como antioxidante en presencia de hidroxiflavonas, algo que no ocurre con la fosfatidilcolina (PC)⁵². Mientras que el fosfatidilinositol(PI), la fosfatidiletanolamina(PE), la fosfatidil serina y el ácido fosfático fueron efectivos en proteger fueron efectivos en la protección del α -tocoferol durante la autoxidación del metil linoleato^{53,54}.

Además, los fosfolípidos pueden liberar protones y regenerar algunos antioxidantes primarios, como el propilgalato, cuando se utiliza conjuntamente con la fosfatidiletanolamina (PE) .

3.1.3.2 PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD

El uso de las reacciones de pardeamiento de Maillard, se ha considerado como una forma natural de preservación para retardar la oxidación de los alimentos. En los primeros trabajos sobre el uso de los productos de las reacciones de Maillard como antioxidantes se estudió la influencia de estos compuestos formados por la reacción de glucosa y glicina, sobre la oxidación de margarinas^{55,56}.

Los compuestos con actividad antioxidante en la reacción de Maillard, se pueden formar de diferentes formas; así por ejemplo, durante el calentamiento las mezclas de compuestos carbonílicos y aminos, mediante

las diversas degradaciones de Amadori producen amino reductonas, reductonas o polimeros, todos ellos con actividad antioxidante. Namiki en 1988⁵⁷, reporta una buena revisión sobre los diversos compuestos antioxidantes derivados de la reacción de Maillard, y que tienen un gran uso en los alimentos.

Hodge⁵⁸ y colaboradores demostraron la actividad antioxidante de los productos de la reacción de Maillard y su aplicación en la preservación de aceites. Evans y colaboradores⁵⁹ demostraron que las reductonas de igual forma retardan los procesos oxidativos de aceites vegetales. La reductona es un nombre que se les da a los 3-hidroxi, 2-cetopropanos, y tienen un grupo dicarbonilo vecino capaz de enolizar, formando así grupos hidroxilos y enoles que pueden perder hidrógenos y funcionar como antioxidantes primarios.



Donde **R** y **R'** pueden ser grupos alquilos o arilos. o biradicales cíclicos.

En este trabajo se usaron también amino-reductonas cristalinas formadas a partir de hexosas y aminas secundarias, encontrándose inhibición de los

procesos oxidativos de diversos aceites vegetales y animales. La inhibición de la oxidación por estos compuestos es función lineal de la concentración, cuando se usan entre 0.00 y 0.02%. Lee en 1992⁶⁰, encontró actividad antioxidante de los extractos metanólicos de jugo de naranja sobre una emulsión de ácido linoleico a pH = 8.0. De igual forma la acción antioxidante se atribuye a las reductonas; al ceder átomos de hidrogeno a los radicales libres previamente formados en el ácido.

Otro grupo importante de productos de la reacción de Maillard son los melanoïdes formados a partir de la interacción de amino-carbonilos. El mecanismo de acción antioxidantes de estas estructuras puede ocurrir de dos forma: (1) por la formación de radicales libres; Yamaguchi y colaboradores⁶¹, hicieron estudios EPR (resonancia paramágnetica electrónica) de los melanoïdes productos de la reacción de la glucosa y la lisina, evidenciando una alta concentración de radicales libres; y (2) por la capacidad de quelar metales de los melanoïdes; por ejemplo⁶², se ha sugerido que la estructura hidroxí piridona de los melanoïdes pueden acomplejar Fe³⁺ y reducir su actividad catalítica.

CONCLUSIONES

Esta revisión bibliográfica permite establecer las siguientes conclusiones:

- La oxidación de lípidos es un fenómeno que ocurre por reacciones en cadena de radicales libres; y tiene las etapas de iniciación, propagación y terminación.

- La prevención de la oxidación de lípidos es la mejor forma de garantizar la calidad de los productos alimenticios, por lo cual se justifica el uso de antioxidantes, y así extender el tiempo útil y reducir pérdidas nutricionales.

- La etapa de iniciación es una etapa difícil de controlar, porque para que se inicie el proceso oxidativo se necesitan cantidades muy pequeñas de oxígeno; y resulta antieconómico retirar totalmente el oxígeno presente. Sin embargo, se minimizan los efectos de algunos iniciadores usando antioxidantes secundarios como el EDTA, ácido ascórbico, ácido cítrico, β -caroteno, entre otros.

- La etapa de propagación es la determinante dentro del proceso oxidativo; y en la manera en que se extienda causara un mayor deterioro en los alimentos. Esta etapa es retardada con el uso de antioxidantes primarios

(aminas o fenoles), como el BHA, BHT, propilgalatos, tocoferoles, NDGA, entre otros.

- La etapa de terminación no es muy importante en la química de lípidos; porque los daños oxidativos más perceptibles ocurren por causa de las reacciones laterales, con la producción de compuestos volátiles como las cetonas, aldehídos, ácidos; los cuales conllevan a la rancidez y el deterioro de los alimentos.

- Existen antioxidantes que tienen mecanismo de acción muy complejo y muchas veces efectúan funciones múltiples; como los fosfolípidos, los productos de reacción de Maillard y los flavonoides.

-

BIBLIOGRAFÍA

1. **McCord, J.** (1994) Free radicals and Prooxidants in Health and Nutrition. Food Technol. May., 106-111
2. **Halliwell, B.** (1994) Free radicals and antioxidants. a personal view. Nutrition Reviews., 52:8, 253-265
3. **Frankel, E. N.** (1987) Secondary Products of Lipid oxidation. Chemistry and Physics of Lipids. Elsevier. Ireland., 44: 73-85
4. **Belitz, H.D. and Grosch, W.** (1988). Química de Alimentos. Acribia S.A. Zaragoza. España. P.162.
5. **Porter, N.A., Caldwell, S.E. and Mills, K.** (1995), Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids, 30:4, 277,290
6. **Labuza, T.P.** (1971), Kinetics of Lipid Oxidation in Food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition., October, p 355-405.
7. **Frankel, E.N.** 1984. Lipids Oxidation: Mechanism, products and Biological significance. J.Am. Oil Chem. Soc. 61:1908-1915.
8. **Nelson, K.A and Labuza, T.P.** 1992. Relationship between water and lipid oxidation rates: In Lipid oxidation in Food. ACS Washington D.C p93-103.

9. Decker, E and Hulyn, H., 1992. Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. In Lipid oxidation in Food. ACS Washington D.C p 33-55.

10. German, M.H. Zhang, H and Berger, P. 1992. Role de lipoxigenasa in lipid oxidation in Food. ACS Washington D.C p 74-93.

11. Frankel, E.N. 1991. Recent advances in lipid oxidation. J. Sci. Food. Agric. 54: 495-511.

12. Dziezack, J. D. (1986) Preservatives: Antioxidants. Food Technol. 9: 94

13. Ingold, K. U. (1968), Inhibition of Autoxidation. Adv. Chem. Ser., 75: 296-305.

14. Macfaul, P.A., Ingold, K.U. and Luszyk, J. (1996). Kinetic solvent effects on hydrogen atom abstraction from phenol, aniline, and diphenylamine. The importance of hydrogen bonding on their radical-trapping (antioxidant) activities. J. Org. Chem. 61, 1316-1321.

15. Burton, G.W., and Ingold, K.U. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. J. Am. Chem. Soc. (1981), 103:6472-6477

16. Burton, G.W., and Ingold, K.U. (1984). β -Carotene: An usual type of lipid antioxidants. *Science*. 224: 569-573.

17. Schuler, P. 1990. Natural Antioxidants exploited commercially. In *Food Antioxidants*, Hudson, B.J.F. Ed Elsevier, Amsterdam. P 99.

18. Howard, J.A. and Ingold, K.U. The inhibited autoxidation of styrene. Part II. The relative inhibiting efficiencies of meta-and par-substituted phenols. *Can. J.Chem.* (1963), 41:1744-1751.

19. Howard, J.A. and Ingold, K.U. The inhibited autoxidation of styrene. Part III. The relative inhibiting efficiencies of ortho alkyl phenols. *Can. J. Chem.* (1963), 41:2800-2806.

20. Mukai,K., Fukuda, K., Tajima, K. and Ishizu, K. A kinetic study of reactions of tocopherols with a substituted phenoxy radical. *J. Org. Chem.* (1988), 53: 430-432.

21. Burton, G. W., Le Page, Y., Gabe, E.J, and Ingold, K.U. Antioxidant activity of vitamin E and related phenols. Importance of stereoelectronics factors. *J. Am. Chem. Soc.* (1980), 102:7791-7792.

22. Burkey, T.J., Castelhana, A.L., Griller, D. and Lossing, F.P. Heats of formation and ionisation potentials of some α - amino-alkyl. **J.Am.Chem.Soc. (1983), 105:4701-4703,**

23. Niki, E., Kawakami, A., Saito, M., Yamamoto, Y., Tsuchiya, J. and Kamiya, Y. Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. **J. Biol. Chem. (1985), 260, 2191-2196.**

24. Burton, G.W., Foster, D.O., Perly, B., Slater, T.F., Smith, I.C.P. and Ingold, K.U. Biological antioxidants. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. (1985), 311, 565-578.**

25. Burton G. W. and Ingold, K.U. Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. **Acc. Chem. Res. (1986), 19, 194-201.**

26. Barclay, L.R.C., Vinqvist, M.R., Itoh, S. and Motimoto, H. Chain-Breaking phenolic antioxidants: Steric and electronic effects in polyalkylchromanols, Tocopherol analogs, hidroquinones and superior antioxidants of the polyalkylbenzochromanol and naphthofuran class. **J. Org. Chem. (1993), 58, 7416-7420.**

27. Barclay, L.R.C. Edwards, C.D., Mukai, K., Egawa, Y. and Nishi,T. Chain-Breaking Naphtholic antioxidants: Antioxidant activities of

polyalkylbenzochromenol, and 2,3-Dihydro-5-hydroxy-2,2,4-trimethylnaphtho[1,2-b]furan compared to an α -tocopherol model in sodium dodecyl sulfate micelles. *J. Org. Chem.* (1995), 60, 2739-2744.

28. Wang, H., Cao, G. And Pryor, R. Total antioxidant capacity of fruits. 1996. *J. Agrc. Food Chem*, 44, 701-705.

29. Brannan, R.G. and Ericson, M. Quantification of antioxidants in channel catfish during frozen storage. 1996. *J. Agrc. Food Chem*, 44, 1361-66

30. Frankel, E.N., Huang., Aeschbach, R. And Pryor, E, 1996. Antioxidant activity of a Rosemary extract and its constituents, Carnosic acid, Carnasol, and Rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in water emulsion. *J. Agrc. Food Chem*, 44, 131-135.

31. Asamarai, A., Addis, P.B., Epley, R. And Krick, T. 1996. Wild rice hull antioxidants. *J. Agrc. Food Chem*, 44, 126-130.

32. Amarowics, R. And Shahidi, F. 1995. Antioxidant activity of green tea catechins in a β -carotene-linoleate model system. *Journal of Food Lipids*, 2 47-56.

33. Esaki, H., Onozaki, H., Kawasaki, S. And Osawa, T. 1996. New antioxidants isolated from tempech. *J. Agrc. Food Chem*, 44, 126-130.

- 34. Chen, Ch. And Ho, Ch.** 1995. Antioxidants properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, 2, 35-46.
- 35. Gordon, M.H.**, The mechanism of antioxidant action in vitro, in *Food Antioxidants*. Hudson, B.J.F., Ed. Elsevier, Amsterdam, 1990, 1
- 37. Shahidi, F., Janitha, P.K. and Wanasundara, P.D.**, Phenolic Antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, (1992), 32(1):67-103.
- 38. Dzedzic, S. Z. and Hudson, B.J.F.**, Hydroxyisoflavones as antioxidant for edible oils, *Food Chem.*, (1983), 11, 161
- 39. Rosenwald, R.H. and Chenicek, J.A.**, Alkyl hidroxy anisoles as antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1951), 28, 185.
- 40. Cuvelier, M., Richard, H. and Berset, C.**, Comparison of the Antioxidative of some acid-phenols: Structure-Activity Relationship., *Biosci. Biotech. Biochem.*, (1992), 56(2), 324-325.
- 41. Pokorny, j.**, *Autoxidation of unsaturated Lipids*, Ed. Academic Press, London, (1987), 141-206.

42. Marinova, E. and Yanishlieva, N., Inhibited oxidation of Lipids II: Comparison of the Antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. *Fat. sci. Technol.*, (1992), 11, 428-432.

43. Marinova, E. and Yanishlieva, N., Effect of Lipid unsaturation on the Antioxidative activity of some phenolic acids. *J.A.O.C.S.* (1994), 71(4), 427-434..

44. Jovanovic, S.V., Steenken,S., Totic, M. Marjanovic, B. and Simic, M., Flavonoids Antioxidant. *J. Am. Chem. Soc.*. (1994), 116, 4846-4851.

45. Hudson, B.J.F. and Lewis, J. Polyhidroxi flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chem.* (1983), 10, 47-55.

46. Letan, A. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivates II. Secondary (Metal-complexing) activity. *J. Food Sci.* (1966), 395-399.

47. Pratt, D. E. and Hudson, B.J.F., Natural antioxidants not exploited commercially, in *Food Antioxidants*, Hudson, B.J.F., Ed. Elsevier, Amsterdam, (1990), 171

48. Dziedzic, S. Z., Hudson, B.J.F. Polihidroxi chalcones and flavanones as antioxidant for edible oils. *Food Chem.* (1983), 12, 205

49 Hudson, B.J.F. and Lewis, J. Polihydroxi flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids synergists. Food Chem. (1983), 10, 111-120.

50 Clements, A.H., Van den Engh, R.H, and Hoogenhout, K. 1973. Participation of singlet oxygen in photosensitised oxidation of 1,4-dienoic systems and photooxidation of soybean oil. J. Am. Oil Chem Soc.. 50(8)325-330.

51. Hudson, B.J.F. and Ghavami, M. 1984. Phospholipids as antioxidant synergist for tocopherols in the autoxidation of edible oils. Lebnsn. Wiss. U-Technol. 17, 191-194.

52. Hudson, B.J.F. and Ghavami, M. 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. Food Chem, 10, 111-120.

53. Ishikawa, Y., Sugiyama, K. and Nakabayashi, K. 1984. Stabilization of tocopherol by three component synergism involving tocopherol, phospholipids and amino compound. J. Am. Soc. Oil.

54. Hudson, B.J.F. and Mahgoub, S.E.O. 1981. Synergism between Phospholipids and naturally-occurring antioxidants in leaf lipids. J. Sci. Food Agric. 32, 208-210.

- 55. Franke, C., Iwainsky, H. Dtsch. Lebensm. Rundsh. 1954, 50, 251-254.**
- 56. Iwainsky, H., Franke, C. Dtsch. Lebensm. Rundsh. 1956, 52, 129-133.**
- 57. Namiki, M. Adv. Food Res. 1988, 32,115-184.**
- 58. Hodge, J.E. and Rist, C.E. J. Am. Chem. Soc. 1953. 75-316.**
- 59. Evans, C.D., Moser, H.A., Cooney, P.M and Hodge, J.E. J. Am. Oil Chem. Soc. 1958, 35-84.**
- 60. Lee, H. 1992. Antioxidative activity of browning reaction products isolated from storage-aged orange juice. J. Agric. Food Chem. 40, 550-52.**
- 61. Yamaguchi, N. Dev Food Sci. 1986. 13, 155-164.**
- 62. Kato, H., Tsuchidi, H. Prog. Food Nutr. Sci. 1981. 5, 147-156.**