



# TESIS DE DOCTORADO

“Obtención y caracterización de gama-  
orizanol para su aplicación en la  
industria alimentaria”

**Estudiante: M.Sc. Bruno A. Irigaray**

**Directores: Dra. María A. Grompone**

**Dr. Iván Jachmanián**

*Noviembre, 2012*



# Agradecimientos

- **Al PEDECIBA por su apoyo durante el transcurso de la tesis**
- **Al Dr. Pierre Villeneuve y a sus colaboradores por la atención recibida durante la pasantía desarrollada en el Laboratoire de Lipotechnie, CIRAD, Montpellier (Francia).**
- **A la empresa Arrozur S.A. y a la ing. Quím. Mane Kmaid por la colaboración en el suministro de las borras de neutralización del aceite de salvado de arroz con las cuales realice la tesis.**
- **A mi familia por la contención brindada durante el desarrollo de la tesis.**
- **A mis compañeros del laboratorio de Grasas y Aceites**

## **Resumen.**

El aceite de arroz es considerado un subproducto de la industria arroceras y éste posee alrededor de un 3 a 5 % de lípidos insaponificables. Dentro de este grupo de lípidos se encuentran diversos antioxidantes naturales como los tocoferoles, tocotrienoles y los orizanoles. De acuerdo con lo informado en bibliografía los orizanoles representan entre el 0.9 y 2.9 % del aceite crudo mientras que los tocoferoles solamente el 0.1 %. Los orizanoles están constituidos por un grupo de 9 a 10 moléculas diferentes siendo cuatro de ellas las mayoritarias en el aceite de salvado de arroz: el ferulato de  $\beta$ -sitosterilo, el ferulato de campesterilo, el ferulato de 24-metilen cicloartanilo y el ferulato de cicloartenilo. Diversos investigadores han informado que en la etapa de neutralización alcalina, durante el proceso de refinación química, los orizanoles quedan retenidos mayoritariamente en la fase acuosa alcalina conjuntamente con los ácidos grasos libres presentes en el aceite crudo. De esta forma, se genera un subproducto denominado borras de neutralización o "soapstock" que contienen no solamente los ácidos grasos libres bajo forma de jabones sino también gran parte de los orizanoles presentes en el aceite de salvado de arroz crudo. Por lo tanto, estas borras constituyen un material rico en estos antioxidantes siendo generalmente destinadas a la alimentación animal.

Es bien conocido que los orizanoles poseen un poder antioxidante probado y por ende se fabrican concentrados de orizanoles encapsulados de calidad farmacéutica con un valor que oscila entre 1.0 y 1.5 dólares americanos por gramo de orizanol puro. Por este motivo diferentes trabajos de investigación han informado acerca de distintos métodos para su recuperación (Soxhlet, partición con solventes, cristalización, separación en fase sólida) incluyendo la combinación de ellos para alcanzar concentrados de elevada pureza.

El objetivo de esta tesis fue a partir de las borras de neutralización concentrar los orizanoles con el fin de obtener un concentrado con un poder antioxidante similar al de los orizanoles puros y compararlo con la actividad antioxidante de otros antioxidantes sintéticos y naturales. Las borras de neutralización utilizadas fueron gentilmente suministradas por Arrozur S.A. Ellas fueron caracterizadas químicamente para posteriormente estudiar diferentes métodos de concentración de los orizanoles. Los métodos de concentración utilizados se basaron en la extracción por Soxhlet y en la partición con solventes. Los concentrados obtenidos presentaron un contenido de orizanoles que varió entre 5.3 % y 17.8 %. A partir del método con el cual se obtuvo el

concentrado con 17.8 % de orizanoles se diseñó un nuevo método con el fin de aumentarlos en el concentrado final. En este nuevo método las borras se modificaron químicamente previamente a la partición con solventes. Dicha modificación fue realizada con el objetivo de convertir los ácidos grasos libres en ésteres metílicos cambiando así su afinidad por el solvente de extracción utilizado. Mediante este método se obtuvo un concentrado que alcanzó un contenido de orizanoles del 31.3 %, casi el doble respecto al método sin la modificación de las borras. Este concentrado con una tercera parte de orizanoles se utilizó para estudiar el estudio de su poder antioxidante y se lo comparó con el de un estándar de orizanoles puros. Por otra parte, también se comparó su poder antioxidante con el de diferentes antioxidantes naturales y sintéticos comúnmente utilizados en la industria. Los métodos utilizados con este objetivo fueron el método de enranciamiento acelerado (OSI-Rancimat), la calorimetría diferencial de barrido (DSC), y el seguimiento de los hidroperóxidos del linoleico mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). Los análisis realizados mediante el método OSI mostraron que el factor de protección para el aceite de soja y el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de orizanoles puros en una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M fue de 1.9 y 5.7, respectivamente. Sin embargo, para el aceite de soja con la adición de TBHQ y de  $\alpha$ -tocoferol en concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M fue de 4.1 y 18.4 respectivamente. Mediante la aplicación de la calorimetría diferencial de barrido fue posible determinar parámetros vinculados con la cinética de oxidación. La aplicación del método de calorimetría diferencial de barrido no isotérmico mostró que los resultados de energía de activación para el aceite de soja sin antioxidantes fueron similares a los encontrados por otros investigadores, 62 y 65 kJ/mol. Análisis realizados sobre de los ésteres metílicos mostraron que el BHT presentó un factor de protección de 13.3, 8.4 y 7.5 mientras que para los orizanoles fue de 1.3, 2.9 y 5.2 preparados a partir de los aceites de chía, girasol y girasol alto oleico respectivamente.

Todos estos métodos aplicados sobre diferentes matrices lipídicas y realizados en distintas condiciones mostraron que los orizanoles poseen un bajo poder antioxidante y que el concentrado de orizanoles con un contenido de 31.3 % presentó un poder antioxidante similar a los orizanoles puros.

# Índice general

## Capítulo 1.

1.- Importancia del cultivo del arroz. ....	13
2.- Aceite de salvado de arroz y sus antioxidantes.....	17
3.- Actividad antioxidante de los orizanoles.....	26
4.- Potencial económico de la recuperación de los orizanoles a partir de las borras de neutralización.....	30
5.- Objetivos de la tesis .....	33
5.1.- Objetivo general .....	33
5.2.- Objetivos específicos .....	34
6.- Bibliografía .....	34

## Capítulo 2.

1.- Materiales.....	42
2.- Métodos utilizados para la caracterización de la composición fisicoquímica de las borras y los concentrados. ....	43
2.1.- Contenido de agua de las borras. ....	43
2.2.- Determinación cualitativa de clases lipídicas presentes en las borras. ....	44
2.3.- Determinación cuantitativa de los ácidos grasos libres presentes en las borras liofilizadas....	45
2.4.- Determinación cuantitativa de los triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles en las borras liofilizadas .....	48
2.5.-Determinación cuantitativa de los orizanoles. ....	50
2.5.1.- Método espectrofotométrico.....	50
2.5.2.- Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	51
2.6.- Determinación cuantitativa de tocoferoles y tocotrienoles. ....	54
2.7.- Determinación cuantitativa de esteroides libres en las borras liofilizadas.....	59

2.8.- Determinación cuantitativa de fosfolípidos las borras liofilizadas..	60
3.- Bibliografía.	63

### Capítulo 3.

1.- Introducción	67
2.-Materiales y métodos	69
2.1.- Estudio cualitativo	69
2.2.- Estudio cuantitativo.	70
3.- Resultados y discusión.	71
3.1.- Análisis cualitativo.	71
3.2.- Análisis cuantitativo.	72
3.3.- Composición global de las borras de neutralización.	79
4.- Conclusiones.	82
5.- Bibliografía	83

### Capítulo 4.

1.- Introducción	89
2.- Materiales y métodos	91
2.1.- Liofilización	92
2.2. Método de Soxhlet	92
2.3. Métodos de partición con solventes.	93
2.3.1. Método 1 (M1)	93
2.3.2. Método 2 (M2)	94
2.3.3. Método 3 (M3)	94
2.3.4. Método 4 (M4)	95
2.4. Parámetros de evaluación	96
2.4.1. Rendimiento másico (R)	96

2.4.2. Factor de concentración (F) .....	98
2.4.3. Porcentaje de recuperación (P).....	99
3. Resultados y discusión .....	99
3.1. Eliminación del agua por liofilización.....	99
3.2. Método Soxhlet.....	101
3.3. Método M1.....	106
3.4. Método M2.....	107
3.5. Método M3.....	111
3.6. Método M4.....	112
3.7. Comparación de los diferentes métodos de concentración utilizados .....	115
4.- Conclusiones.....	118
5.- Bibliografía. ....	119

## Capítulo 5.

1.- Introducción .....	122
2.- Materiales y métodos.....	124
3.- Resultados y discusión .....	125
4.-Conclusiones.....	134
5.- Bibliografía .....	135

## Capítulo 6.

1.- Introducción. ....	139
2.- Materiales y métodos.....	144
3.- Resultados.....	147
3.1.- Estudio de los aceites refinados comerciales.....	147
3.2.- Efecto del agregado de antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de los aceites .....	151

<b>4. Pérdida de orizanoles durante el proceso de termo-oxidación de un aceite.....</b>	<b>162</b>
<b>5.- Conclusiones.....</b>	<b>167</b>
<b>6.- Bibliografía. ....</b>	<b>168</b>

## **Capítulo 7.**

<b>1.- Introducción .....</b>	<b>173</b>
<b>2.- Materiales y métodos.....</b>	<b>177</b>
<b>3.- Resultados.....</b>	<b>179</b>
<b>3.1.- Estudio isotérmico .....</b>	<b>179</b>
<b>3.1.1.- Aceites refinados purificados .....</b>	<b>179</b>
<b>3.1.2.- Aceites refinados purificados con agregado de diferentes antioxidantes .....</b>	<b>180</b>
<b>3.1.2.1.- Aceite de soja .....</b>	<b>180</b>
<b>3.1.2.2.- Aceite de girasol común.....</b>	<b>192</b>
<b>3.1.2.3.- Aceite de salvado de arroz .....</b>	<b>196</b>
<b>3.1.2.4.- Aceite de girasol de alto oleico.....</b>	<b>201</b>
<b>3.1.3.- Comparación de los resultados para los diferentes aceites. ....</b>	<b>207</b>
<b>3.2.- Estudio no isotérmico.....</b>	<b>212</b>
<b>3.2.1.- Aceites refinados purificados .....</b>	<b>212</b>
<b>3.2.2.- Aceites refinados purificados con agregado de diferentes antioxidantes.....</b>	<b>214</b>
<b>3.2.2.1.- Aceite de soja .....</b>	<b>214</b>
<b>3.2.2.2.- Aceite de girasol común y aceite de salvado de arroz .....</b>	<b>228</b>
<b>3.2.2.3.- Aceite de girasol de alto oleico.....</b>	<b>233</b>
<b>3.2.3.- Comparación de los resultados para los diferentes aceites. ....</b>	<b>244</b>
<b>4.- Conclusiones.....</b>	<b>247</b>
<b>5.- Bibliografía. ....</b>	<b>249</b>

## Capítulo 8.

1.- Introducción .....	254
2.- Materiales y métodos.....	259
2.1.- Preparación de los ésteres metílicos .....	259
2.2.-Oxidación de los ésteres metílicos.....	260
2.3.-Análisis por HPLC .....	261
3.- Resultados y discusión .....	263
3.1.- Velocidad de formación de hidroperóxidos.....	263
3.2.- Composición de los hidroperóxidos formados .....	269
4.- Conclusiones.....	274
5.- Bibliografía .....	275

## Capítulo 9.

1.- Introducción .....	280
2.- Materiales y métodos.....	285
2.1.- Aceites empleados.....	285
2.2.- Obtención de los FAME .....	286
2.3.- Estabilidad oxidativa (método Rancimat) .....	287
3.- Resultados y discusión .....	288
3.1. Control del grado de conversión de los FAME .....	288
3.2.- Estabilidad oxidativa de los FAME de los diferentes aceites.....	289
3.3. Efecto del BHT y de los orizanoles sobre la estabilidad oxidativa de los FAME de los diferentes aceites .....	290
3.4. Efecto de la concentración de orizanoles sobre la estabilidad oxidativa de los FAME de girasol de alto oleico .....	296
3.4.1 Concentrado de orizanoles BM.....	298

<b>4.- Conclusiones.....</b>	<b>300</b>
<b>5.- Bibliografía. ....</b>	<b>301</b>

## **Apéndice 1.**

<b>1.- Puesta a punto del método de etilación de las borras de neutralización.....</b>	<b>304</b>
<b>2.- Etilación selectiva de los ácidos grasos libres. ....</b>	<b>304</b>

# Capítulo 1

## Introducción

# Índice

- 1.- Importancia del cultivo del arroz.
- 2.- Aceite de salvado de arroz y sus antioxidantes.
- 3.- Actividad antioxidante de los orizanoles.
- 4.- Potencial económico de la recuperación de orizanoles a partir de las borras de neutralización.
- 5.- Objetivos de la tesis
  - 5.1.- Objetivo general
  - 5.2.- Objetivos específicos.
- 6.- Bibliografía.

## 1. Importancia del cultivo del arroz.

El arroz es una semilla de la planta "*Oryza sativa*". Si bien existen muchas variedades todas ellas pertenecen a dos tipos de sub-especies: la "*índica*" y la "*japónica*". La variedad "*índica*" es cultivada comúnmente en zonas tropicales mientras que la variedad "*japónica*" es cultivada tanto en zonas tropicales como en zonas de clima templado. Esta última se caracteriza por contener cantidades importantes de almidón.

El arroz es el alimento básico de aproximadamente la mitad de la población del mundo. Su cultivo comenzó hace más de 10000 años en regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. Es posible que haya sido en India donde aparecieron los primeros cultivos de arroz, sin embargo fue en China donde su cultivo se desarrolló; desde estas zonas se trasladó a otros lugares del mundo. Es el más importante del mundo si se considera la extensión de la superficie en que se cultiva y la cantidad de gente que depende de su cosecha. En su cultivo juega un rol importante la humedad de los suelos por lo cual los sistemas de riego implementados son diversos. La Tabla 1.1 muestra la producción de arroz y su rendimiento por hectárea en diferentes países. A nivel mundial, el arroz ocupa el segundo lugar, después del trigo, si se considera la superficie cosechada, pero si se considera su importancia como cultivo alimenticio, el arroz proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cultivo de cereales. Además de su importancia como alimento, el arroz proporciona empleo al sector más grande de la población rural de la mayor parte de Asia, pues es el cereal típico del Asia meridional y oriental. También es ampliamente cultivado en África y en América y, no sólo ampliamente sino

intensivamente, en algunos puntos de Europa meridional, sobre todo en las regiones mediterráneas. En el año 2000 en Uruguay se cultivaron alrededor de 185000 hectáreas y la producción alcanza los 6400 kg/ha (INIA, 2001). Estos rendimientos son similares a los alcanzados en países como Japón, Estados Unidos (U.S.A.) y República de Corea.

**Tabla 1.1.-** Producción de arroz y rendimiento mundial y por países.

<b>País</b>	<b>Producción (tm)</b>	<b>Rendimiento (kg/ha)</b>
<b>Mundo <sup>(1)</sup></b>	592873253	3863
<b>China <sup>(1)</sup></b>	190389160	6241
<b>India <sup>(1)</sup></b>	135000000	3027
<b>Indonesia <sup>(1)</sup></b>	51000000	4426
<b>Vietnam <sup>(1)</sup></b>	32000000	4183
<b>Bangladesh <sup>(1)</sup></b>	29856944	2852
<b>Tailandia <sup>(1)</sup></b>	23402900	2340
<b>Myanmar <sup>(1)</sup></b>	20000000	3333
<b>Japón <sup>(1)</sup></b>	11750000	6528
<b>Brasil <sup>(1)</sup></b>	10940500	301
<b>Filipinas <sup>(1)</sup></b>	12500000	3205
<b>U.S.A. <sup>(1)</sup></b>	8692800	6963
<b>Rep. de Corea <sup>(1)</sup></b>	7270500	6880
<b>Colombia <sup>(1)</sup></b>	2100000	4773
<b>Perú <sup>(1)</sup></b>	1664700	5549
<b>Venezuela <sup>(1)</sup></b>	737000	4913
<b>Uruguay <sup>(2)</sup></b>	1184	6400

<sup>(1)</sup>Infoagro, 2012.<sup>(2)</sup>, INIA, 2001.

En la actualidad, su principal uso es el consumo como grano blanco (pulido), por lo que su aporte a la dieta, es bajo forma de hidratos de carbono, aunque tiene algunos otros nutrimentos en menores cantidades. La Tabla 1.2 muestra el contenido de ellas en el arroz blanco, en el arroz integral y en el salvado de arroz (USDA, 2004). El salvado de arroz es un subproducto obtenido en el proceso del pulido para la obtención de arroz blanco para consumo humano y está constituido por parte de la almendra harinosa, la capa de aleurona y el germen, y representa del orden del 8% del peso del grano. La capa de aleurona y el germen poseen aproximadamente el 90% de los lípidos (Ortohefer, 2005), por lo cual el salvado de arroz posee la mayoría de los lípidos y es de allí de donde se extrae el aceite.

Se han realizado intentos para mejorar la producción y con ello, la rentabilidad del cultivo. Todo ha girado, principalmente, en torno al mejoramiento genético de la especie. Los métodos tradicionales de modificación (pedigree) han logrado desarrollar unas 120.000 variedades. Con la tecnología de mejoramiento genético se ha obtenido algunos arroces transgénicos que ofrecen grandes posibilidades, un ejemplo de ello es el llamado arroz “dorado” que, con la introducción de 7 genes, se ha logrado que produzca  $\beta$ -caroteno y que acumule hierro, el cual está más biodisponible en la semilla (Gura, 1999; Ye *et al.*, 2000). Algunos autores mencionan que dichos granos pueden contener hasta 23 veces más  $\beta$ -caroteno que el arroz convencional (Paine *et al.*, 2005). Cabe mencionar que este tipo de modificaciones genéticas ha generado controversias a nivel mundial.

**Tabla 1.2.-** Contenido de nutrimentos por cada 100 gramos de arroz blanco, de arroz integral y de salvado de arroz (USDA, 2004).

	<b>Arroz blanco</b>	<b>Arroz integral</b>	<b>Salvado de arroz</b>
<b>Humedad (g)</b>	13.3	12.4	6.1
<b>Proteína (g)</b>	6.5	7.5	13.4
<b>Lípidos totales (g)</b>	0.5	2.7	20.9
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	79.1	76.2	49.7
<b>Cenizas (g)</b>	0.5	1.3	10.0
<b>Fibra dietética total (g)</b>	2.8	3.4	21.0
<b>Sodio (mg)</b>	1.0	4.0	5.0
<b>Sílice (mg)</b>	-	-	600-1100
<b>Fósforo (mg)</b>	95	264	1677
<b>Niacina (mg)</b>	4.1	4.4	34.0
<b>Ácido pantoténico (mg)</b>	1.3	1.5	7.4
<b>Alfa-tocoferol (mg)</b>	-	-	4.9

Otra alternativa para elevar la rentabilidad de la producción de arroz, lo constituye la adición de valor a sus subproductos (Moldenhauer *et al.*, 2000). Dichas alternativas se centran en su utilización tal y como salen de la molienda del arroz. Por ejemplo: a) la cascarilla para la elaboración de materiales de construcción (tabiques), b) el granillo para la industria cervecera, c) el salvado (o harina) para la elaboración de alimentos balanceados para animales o bien para consumo humano directo mediante un proceso de estabilización de las grasas (Sekhon *et al.*, 1997). La adición de estos subproductos a alimentos es una práctica común; por ejemplo, en el pan (Lima, 2002), galletas (Sangronis *et al.*, 1990) y sopa de pasta (Sangronis *et al.*, 1997). La obtención de productos

nutracéuticos o con potencial para la alimentación humana es otra práctica que se está haciendo cada vez más frecuente. Como ejemplos se tienen el aceite de salvado de arroz (Orthofer, 2004), extractos proteicos para agregar o mejorar ciertas propiedades funcionales y nutricionales en alimentos (Prakash, 1996; Wang *et al.*, 1999) o como fuente de fibra para alimentación humana (Babcock, 1987).

## **2. Aceite de salvado de arroz y sus antioxidantes.**

El aceite de arroz o, estrictamente, aceite de salvado de arroz, ya que se extrae del mismo, puede considerarse un subproducto de la industria arrocera. El salvado de arroz contiene aproximadamente un 20 % de aceite, cuya composición en ácidos grasos se muestra en la Tabla 1.3 (AOCS, 1990; Orthofer, 2005). Dicha composición es similar al aceite de algunas semillas oleaginosas aunque su contenido en 16:0 es relativamente alto. Este aceite es de uso frecuente en aquellos países en los cuales el arroz constituye una parte importante de la dieta diaria.

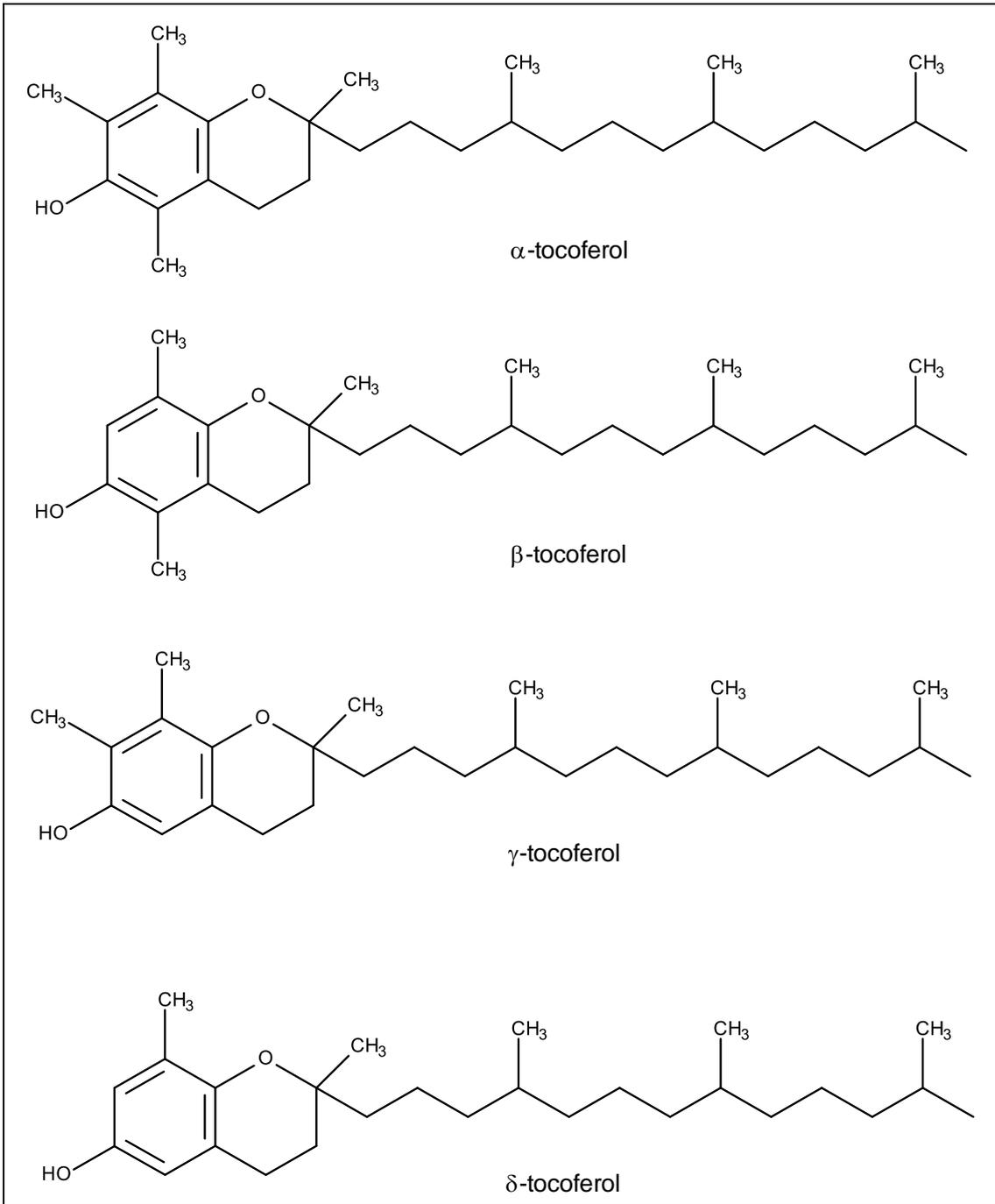
**Tabla 1.3.-** Composición del aceite de salvado de arroz refinado Uruguayo y de diferentes procedencias.

Ácido graso	Aceite de salvado de arroz uruguayo (Grompone <i>et al.</i> , 2009)			AOCS, 1990	Orthofer <i>et al.</i> , 2005
	Mínimo	Máximo	Promedio		
14:0	0.2	0.2	0.2	0.5-0.7	0.6
16:0	16.0	20.8	17.6	16.0-28.0	21.5
18:0	1.5	1.9	1.6	2.0-4.0	2.9
18:1	40.6	43.0	41.3	42.0-48.0	38.4
18:2	32.9	41.1	35.6	16.0-36.0	34.4
18:3	1.1	1.8	1.3	0.2-1.0	2.2

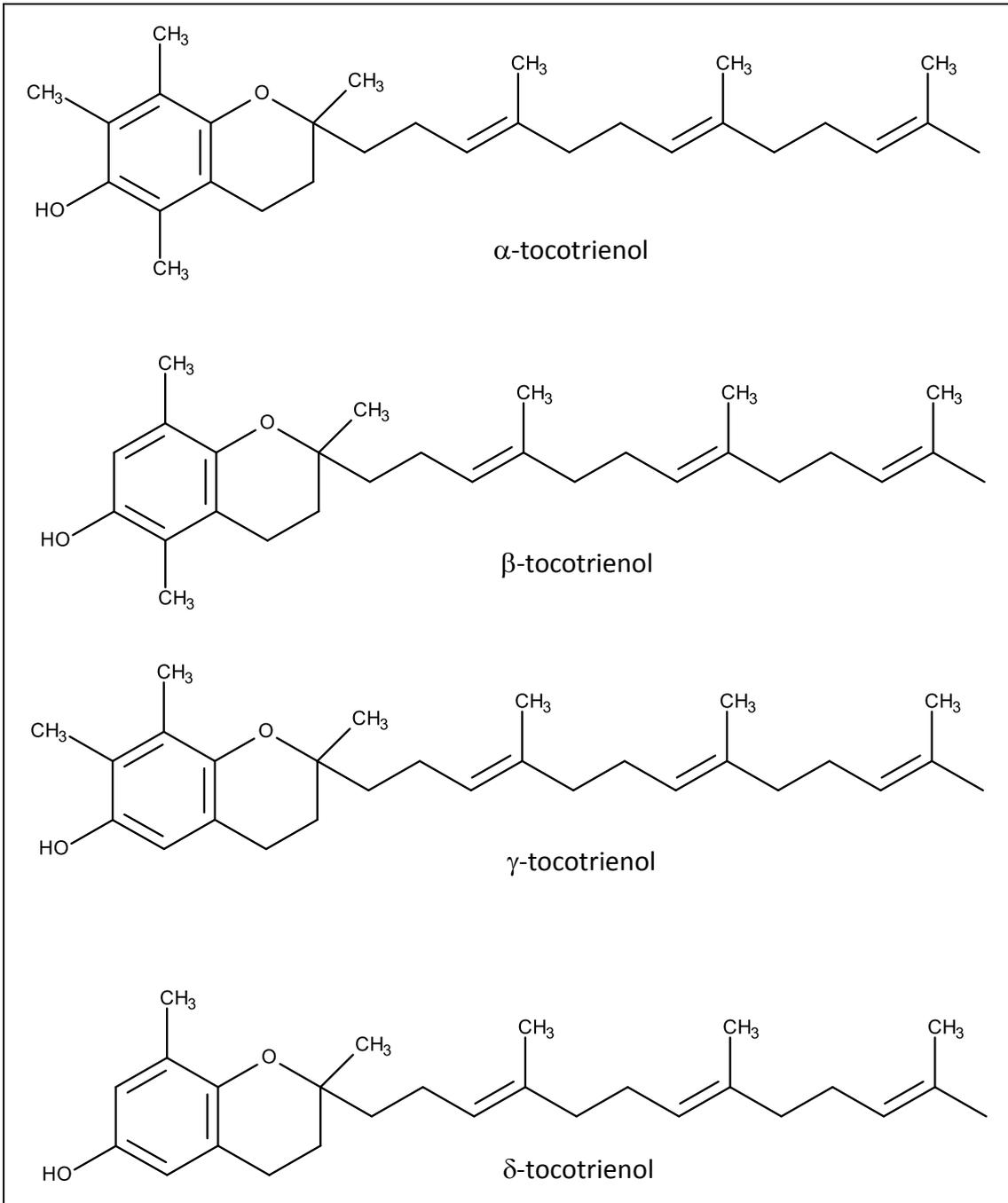
Una característica particular de este aceite es el alto contenido de compuestos lipídicos insaponificables, el que puede variar entre un 3 % y un 5 % dependiendo de la variedad de arroz y del método utilizado para la extracción. En Uruguay se cultivan las siguientes variedades: El paso 144, Tacuarí, Olimar y Coronilla (Punschke *et al.*, 2011). Esta fracción insaponificable contiene una mezcla compleja de varios compuestos que presentan propiedades antioxidantes y que le confieren al aceite una muy elevada resistencia a la oxidación. Entre estos compuestos se encuentran varios tocoferoles y tocotrienoles y los orizanoles, como los más característicos y propios del aceite de salvado de arroz. Los tocoferoles, dentro de los cuales se encuentra la vitamina E, representan alrededor del 0.1 % del aceite y los orizanoles se

encuentran en el rango de 0.9 % a 2.9 % (Lema-García *et al.*, 2009). La presencia y el alto contenido de orizanoles, además de su particular interés debido a sus propiedades, constituye una característica distintiva de este aceite frente a los demás aceites vegetales de uso común (algunos otros aceites, como el de maíz, pueden contener cantidades muy pequeñas de orizanol). Diversos autores identificaron los diferentes tocoferoles y tocotrienoles presentes en el aceite de salvado de arroz. Las Figura 1.1 y 1.2 muestran la estructura química de los tocoferoles y de los tocotrienoles. La Tabla 1.4 muestra el contenido de tocoferoles y tocotrienoles de una muestra comercial de aceite de salvado de arroz uruguayo, en comparación con datos de bibliografía (Van Hoed, 2006). La composición de estos antioxidantes es muy similar, aunque hay diferencias en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol y de  $\gamma$ -tocotrienol.

Van Hoed *et al.* (2006), mencionan que el aceite crudo no presenta grandes diferencias con el aceite desodorizado, en la cantidad total de tocoferoles y tocotrienoles. Es decir, el procesamiento del aceite no afecta considerablemente el contenido de estos antioxidantes.



**Figura 1.1.-** Estructuras químicas de los tocoferoles.



**Figura 1.2.-** Estructuras químicas de los tocotrienoles.

**Tabla 1.4.-** Contenido de tocoferoles y tocotrienoles de una muestra de aceite de salvado de arroz refinado de origen nacional en comparación con datos de, bibliografía (Van Hoed, 2006).

	Van Hoed, 2006	Aceite de salvado de arroz uruguayo (*)
$\alpha$ -tocoferol	107	242
$\gamma$ -tocoferol	94	93
$\delta$ -tocoferol	-	4
$\alpha$ -tocotrienol	23	94
$\gamma$ -tocotrienol	414	316
$\delta$ -tocotrienol	14	11

(\*)Saman, Arrozur S.A.

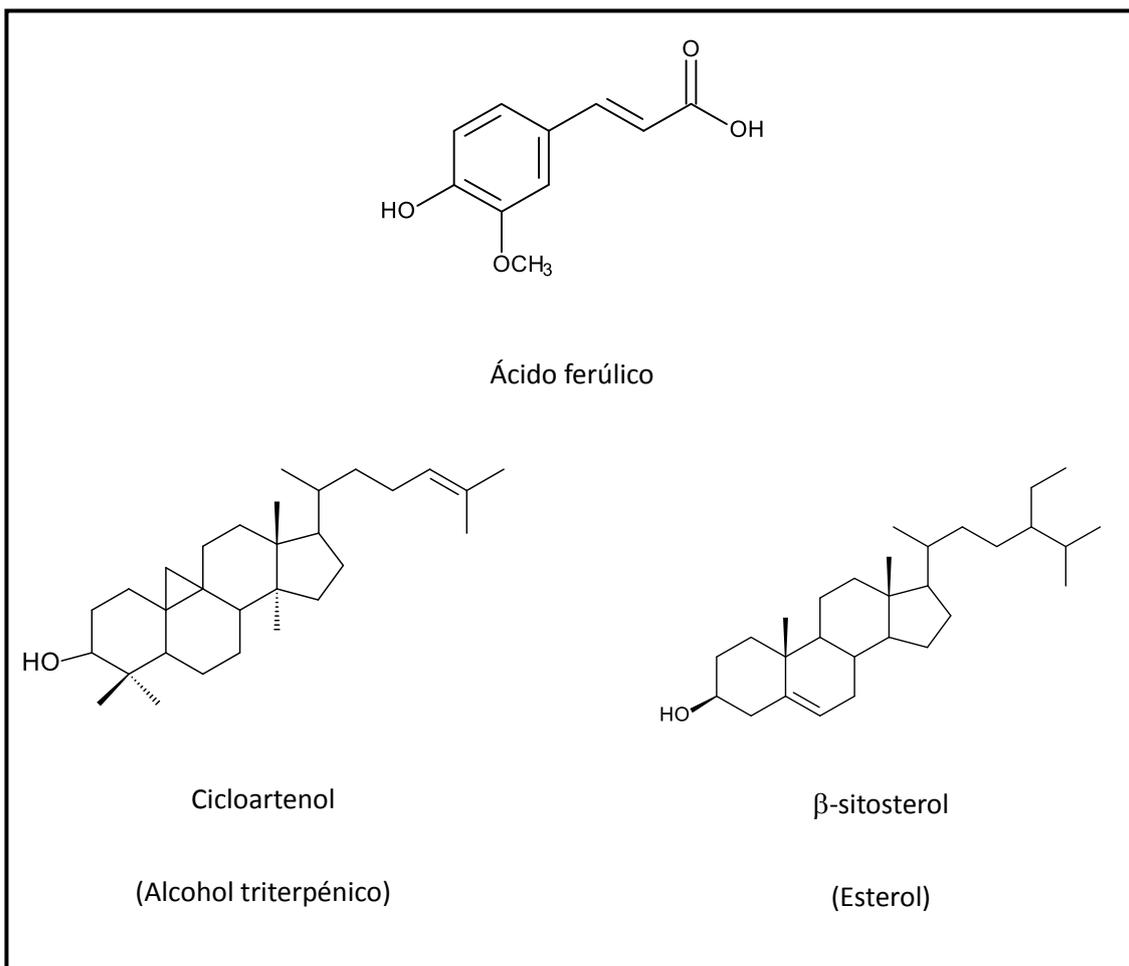
Los orizanoles deben su nombre a la denominación científica en latín del arroz (*Oryza sativa*), dado que como ya se mencionó son compuestos característicos del grano de arroz. Cuando se identificó al orizanol (también llamado  $\gamma$ -orizanol o gama-oyzanol) se lo describió como un compuesto con una única estructura, pero posteriormente se determinó que se trata de una serie de compuestos semejantes que forman en realidad una familia, por lo que también comenzó a utilizarse el término “orizanoles” para considerar esta pluralidad estructural. Estas moléculas se encuentran constituidas por diferentes fitoesteroles o alcoholes triterpénicos unidos al ácido ferúlico por un enlace éster. En la Tabla 1.5 se muestra la composición porcentual de los

esteroles presentes en el aceite de salvado de arroz (de acuerdo con Van Hoed *et al.*, 2006).

**Tabla 1.5.-** Contenido de esteroides en el aceite de salvado de arroz refinado (Van Hoed *et al.*, 2006).

<b>Esterol</b>	<b>Contenido (%)</b>
<b>Campesterol y campestanol</b>	10.6
<b>Estigmasterol</b>	5.8
<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	31.7
<b>Sitostanol + D5-avenasterol</b>	4.0
<b>D5(24)-Stigmastadienol</b>	2.3
<b>D7-Sitosterol + cycloartenol</b>	10.9
<b>D7-Avenasterol</b>	2.1
<b>24-Methylenecycloartanol</b>	15.6
<b>Citrostadienol</b>	5.0
<b>Isomer 24-methylenecycloartanol</b>	6.3

En la Figura 1.3 se presenta la estructura molecular del ácido ferúlico, de uno de los esteroides y de uno de los alcoholes triterpénicos comúnmente constituyentes de los orizanoles. Estas moléculas como ya se mencionó se unen por un enlace éster entre el carboxilo del ácido ferúlico y el hidroxilo del alcohol triterpénico o esteroide involucrado, dando origen a los ferulatos correspondientes.

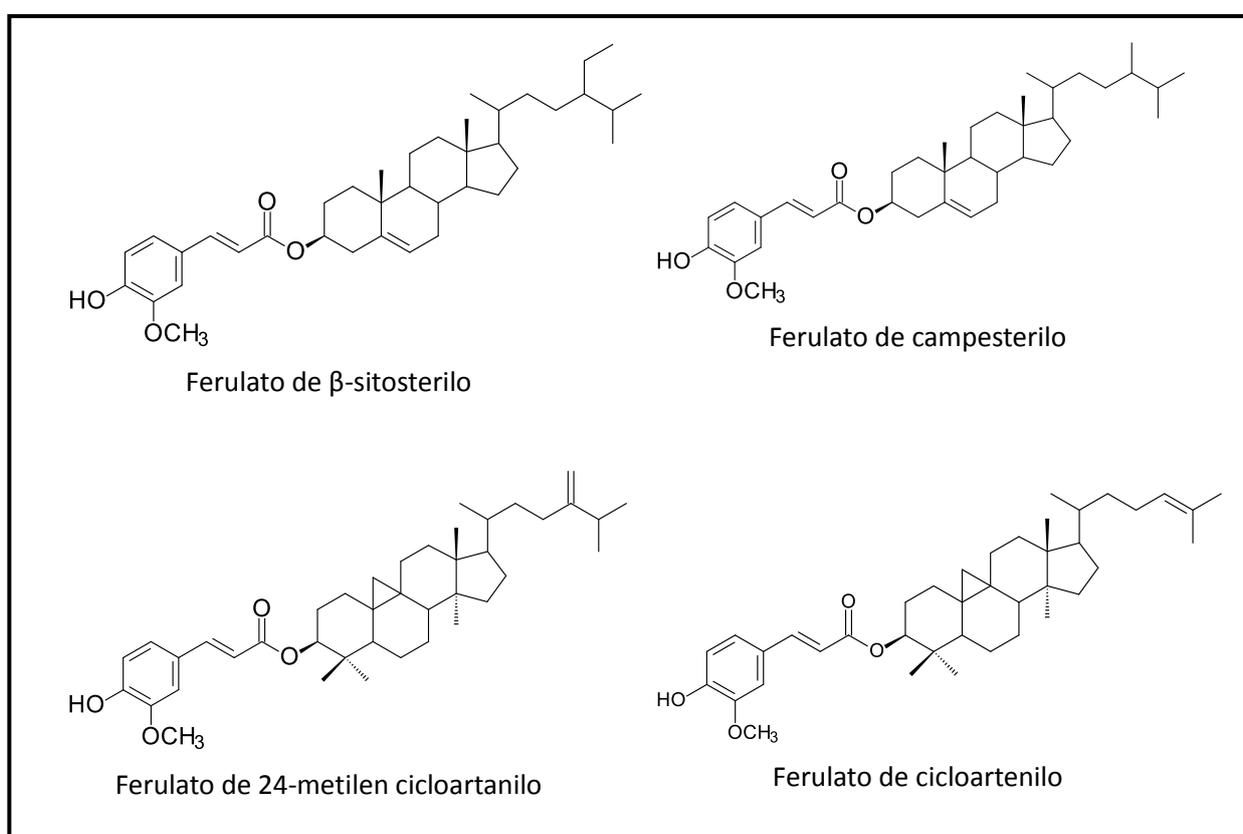


**Figura 1.3.-** Estructuras químicas del ácido férulico de un alcohol triterpénico y de uno de los esteroides constituyentes de las moléculas de orizanoles.

La alta estabilidad oxidativa del aceite de salvado de arroz es atribuida principalmente a sus antioxidantes lipofílicos, lo cual incluye a los orizanoles, tocoferoles y tocotrienoles (Quereshi *et al.*, 1997; Cicero and Gaddi 2001; Wu *et al.*, 2004). Esto ha sido confirmado por resultados obtenidos en el Laboratorio de Grasas y Aceites mediante análisis de oxidación acelerados (método OSI), en los que se encontró que el aceite de arroz crudo presenta una estabilidad oxidativa muy superior que la del aceite de girasol comercial, el cual contiene antioxidantes sintéticos (generalmente TBHQ). Si bien otros

factores, como la composición en ácidos grasos de los aceites, juegan un rol importante sobre este parámetro, las diferencias encontradas están indicando la importancia de los antioxidantes naturales del aceite de salvado de arroz.

La Figura 1.4 muestra la estructura para los cuatro principales compuestos constituyentes de los orizanoles: ferulato de cycloartenol, ferulato de campesterol, ferulato de 24-metilenecycloartanol y ferulato de sitosterol.



**Figura 1.4.-** Estructura de los cuatro principales orizanoles del aceite de salvado de arroz.

También se ha informado la existencia de otros compuestos minoritarios que, estructural y funcionalmente, pertenecen a este grupo. Incluyendo a éstos, son diez los orizanoles identificados en el aceite de salvado de arroz (Xu *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2003); estos se indican en la tabla 1.6.

**Tabla 1.6.-** Orizanoles presentes en el aceite de salvado de arroz. (Xu *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2003)

<b>Esterol o alcohol triterpénico</b>	<b>Orizanol</b>
$\Delta^7$ -Estigmasterol	Ferulato de $\Delta^7$ -Estigmasterilo
Estigmasterol	Ferulato de Estigmasterilo
Cicloartenol	Ferulato de cicloartenilo
24-metilen cicloartanol	Ferulato de 24-metilen cicloartanilo
Campesterol	Ferulato de campesterilo
$\Delta^7$ -sitosterol	Ferulato de $\Delta^7$ -Sitosterilo
$\beta$ -sitosterol	Ferulato de $\beta$ -sitosterilo
Campestanol	Ferulato de campestanilo
$\beta$ -sitostanol	Ferulato de $\beta$ -sitostanilo

### 3. Actividad antioxidante de los orizanoles.

Numerosos estudios realizados sobre la actividad de los orizanoles como antioxidantes naturales han demostrado la efectividad de estos compuestos para aumentar la estabilidad oxidativa de otros aceites, cuando son adicionados a los mismos en muy pequeña cantidad. Por ejemplo, se demostró un marcado aumento de la estabilidad oxidativa en el aceite de soja aditivado con ácido ferúlico o algunos de sus ésteres, tanto en lo relativo al

almacenamiento del aceite como en su utilización en frituras (Warner *et al.*, 2005). Dicha actividad antioxidante se atribuye a la presencia del grupo ferulato en su estructura química. Se debe considerar que la presencia de diferentes grupos esterificados en un antioxidante fenólico pueden jugar un rol atenuador o potenciador de la capacidad antioxidante (López *et al.*, 2009).

Las características antioxidantes *in vitro* demostradas para este tipo de compuestos ha conducido a la investigación de los efectos de la ingesta de los mismos sobre la salud. Se verificó que la ingesta de productos derivados del arroz presenta un efecto benéfico para la salud debido a las propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas mostradas por los orizanoles (Nam *et al.*, 2005). Además del efecto preventivo sobre el desarrollo de tumores, se ha demostrado el efecto antiinflamatorio que presentan los diferentes ésteres del ácido ferúlico (Akhisa *et al.*, 2000). También se ha demostrado que en la prevención de la oxidación de compuestos cuyo rol fisiológico es fundamental, como por ejemplo el colesterol, el efecto de los orizanoles es aún más marcado que el de los tocoferoles, los que eran considerados como los antioxidantes naturales más importantes en el aceite de arroz. Si, además de esto, se considera que los orizanoles se encuentran en el salvado de arroz en una concentración aproximadamente 10 veces superior a la de los tocoferoles, queda claro que los primeros son los antioxidantes más importantes contenidos en este material (Xu *et al.*, 2001). Este efecto inhibitorio sobre la oxidación del colesterol convierte a los orizanoles en potenciales compuestos hipocolesterolémicos, propiedad ya conocida del salvado de arroz (Khalon *et al.*, 1994; Lichtenstein *et al.*, 1994; Cicero *et al.*, 2001; Berger *et al.*, 2005; Suh *et al.*, 2005). Los orizanoles disminuyen los niveles de LDL y VLDL

en ratas con hipercolesterolemia (Suh *et al.*, 2005) y en humanos con niveles medios de hipercolesterolemia (Berger *et al.*, 2005). Además, existen evidencias de que aumenta los niveles de testosterona, estimula la liberación de endorfinas y promueve el crecimiento de los tejidos musculares.

Esto no significa que el papel de los tocoferoles y tocotrienoles, característicos del salvado de arroz y presentes en el aceite obtenido a partir del mismo, deba despreciarse sino que, por el contrario, sería deseable cualquier procedimiento cuyo objetivo sea la obtención de productos de alto valor agregado a partir de subproductos del procesamiento de este aceite. Por lo tanto, es importante considerar la compleja matriz que representan los diferentes compuestos que constituyen la fracción insaponificable del aceite de arroz, ya que actualmente se han identificado nuevos compuestos minoritarios (Qureshi *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, las numerosas propiedades benéficas para la salud que implica la ingesta de productos que contienen orizanoles, ha conducido al surgimiento de una serie de productos farmacéuticos para consumo humano, de alto valor agregado, constituidos por extractos ricos en orizanoles. Actualmente existen concentrados de orizanoles encapsulados en venta por diferentes empresas internacionales, a precios relativamente altos: 6 gramos por U\$A 5-10 (Vitacost), U\$A 1.6-2.2 por gramo (Equiade Body Builder), U\$A 0.5-1.3 por gramo (Gamma Enterprises), U\$A 5.4-10.0 por 6 gramos (Herbs MD), U\$A 6.7-13.4 por 10 gramos (KAL), etc. En definitiva, teniendo en cuenta el precio mínimo y el precio máximo de venta, se tiene un rango de U\$A 1050 a 1666 por kilo de gama orizanoles; su valor medio es de

U\$A 1360 por kilo de gama orizanoles (es decir, más de 1 millón de dólares por tonelada).

En el Uruguay la producción de arroz es una actividad económica relevante, produciéndose en el entorno de un millón de toneladas por año. Un 90 % de dicha producción se destina a la exportación, lo que significó en el año 2005 un 5.9 % del total de las exportaciones en dólares del país. Del procesamiento de este arroz se produce una elevada cantidad de salvado (en el entorno de las 80 mil toneladas/año), del cual un 30 % se destina a la extracción de aceite, actividad que en nuestro país es realizada por una única empresa (ARROZUR S.A., Treinta y Tres, Uruguay), asociada a la de las principales arroceras locales.

La refinación del aceite de salvado de arroz crudo en nuestro país produce una serie de subproductos, entre los cuales se destacan las borras (500 Ton/año), las que son el resultado de su neutralización alcalina. De acuerdo a análisis previos realizados en el Laboratorio de Grasas y Aceites de la Facultad de Química, las borras de neutralización que produce la empresa ARROZUR S.A. presentan un muy elevado contenido de orizanoles: aproximadamente siete veces el correspondiente al aceite crudo. Esto indica que estas borras, que actualmente la empresa vende como subproducto a un precio muy bajo (generalmente para su inclusión en raciones para animales) son una excelente materia prima para la obtención de concentrados de orizanoles de alto valor comercial.

La producción de productos ricos en orizanoles a partir de las borras del aceite de salvado de arroz es habitual en países como India, China, Japón, Tailandia y los Estados Unidos (Narayan *et al.*, 2006). El Japón manufactura

del orden de 7.500 toneladas anuales de orizanoles a partir de 150.000 toneladas de cascarilla de arroz. En cambio, en el año 2004 la producción de orizanoles en China fue de unas 17 toneladas solamente.

Otro uso, además del farmacéutico, al que se puede destinar un concentrado de orizanoles de menor pureza, es como antioxidante para la industria alimentaria y, particularmente, para aceites comestibles, (Warner *et al.*, 2005). A diferencia de lo que ocurre con los antioxidantes sintéticos (BHT, BHA, TBHQ) cuya máxima concentración permitida en los aceites es muy pequeña (del orden de 200 ppm), no se conoce contraindicación a la ingesta de este tipo de antioxidantes naturales. Otro aspecto que también los diferencia de los antioxidantes sintéticos es la mayor aceptación entre los consumidores por tratarse de un producto de origen natural.

#### **4. Potencial económico de la recuperación de orizanoles a partir de las borras de neutralización.**

Para estimar la significación económica de un producto enriquecido en orizanoles obtenido a partir de borras industriales de bajo costo se puede comparar el precio de venta al consumidor de concentrados de orizanoles con el precio de venta del principal producto que actualmente se comercializa a partir del salvado: el aceite de arroz. A modo de ejemplo se puede considerar algunos de los productos farmacéuticos constituidos por extractos ricos en

orizanoles que se comercializan actualmente (y cuya presentación se muestra en los anexos):

- IP6 Optimizer, a un costo de USD 8.66 (120 cápsulas con 50mg de orizanoles y 50 mg de ácido ferúlico c/u), lo que implica en 1.44 USD el gramo de orizanoles.
- Gamma Oryzanol, a un costo de USD 9.71 (100 cápsulas de 60mg c/u), resultando en 1.62 USD por gramo de orizanoles.

En el año 2004 la empresa ARROZUR S.A. procesó 2.885 Ton de aceite de arroz crudo, de las cuales se obtuvo 2.305 Ton de aceite refinado. En el año 2011 Arrozur S.A. procesó 4700 toneladas de aceite crudo registrándose así un claro incremento en la producción de aceite refinado. Según datos de la misma empresa, aproximadamente esta producción arrojó un volumen de 490 Ton de borras de neutralización. Considerando que las borras contienen entre un 2.3 y un 2.5 % de orizanoles, valor que oscila levemente con las características del refinado y con la variedad de arroz que se procesa (Seetharamaiah *et al.*, 1986), la cantidad de orizanoles contenido en la borras está entre 11 y 12 Ton. Si estos orizanoles se purificaran y encapsularan para su comercialización, su venta representaría entre 11 y 12 millones de dólares anuales. Para evaluar el significado económico de esta cifra, se puede realizar un cálculo similar para el negocio del principal producto de la industria que es el aceite refinado. Las 2.305 Ton de aceite refinado cuyo precio de venta al consumidor fue del orden de USD 2.5 el litro, representan unos 28.5 millones de dólares anuales. Obviamente éste es un cálculo muy aproximado pero permite considerar a la

producción de concentrados de orizanoles a partir de un subproducto que actualmente está disponible, como una actividad más que interesante desde el punto de vista económico.

Se ha estudiado diferentes métodos para la obtención de extractos concentrados en orizanoles a partir de salvado de arroz o del aceite crudo o de residuos del proceso de refinación como las borras. Entre ellos se encuentran algunos métodos simples que involucran la separación de los compuestos de interés del resto de los constituyentes del material de partida, mediante su reparto entre solventes de diferente polaridad, procedimientos que se pueden realizar en una o varias etapas (Romeu *et al.*, 2007). Mediante este tipo de procedimiento se obtuvo un extracto conteniendo hasta un 26 % de orizanol a partir de borras que presentaban un contenido de entre 2 % y 3 % (Seetharamaiah *et al.*, 1986). A través de algunos métodos de partición con mezcla de solventes a temperatura ambiente, en una sola etapa, se logró obtener concentrados con un contenido de orizanoles de alrededor de entre 5 % y 8 %. Otros autores usaron el método Soxhlet para concentrar los orizanoles, llegando a porcentajes de entre 30 % a 38 % (Kaewboonnum *et al.*, 2010). Este método presenta la desventaja de que los orizanoles se tratan a una temperatura relativamente elevada. También se han publicado métodos más complejos que involucran varias etapas, como la separación en columnas y la cristalización (Zullaikah *et al.*, 2009; Kaewboonnum *et al.*, 2010).

Mediante la aplicación de métodos más complejos es posible llegar a obtener concentrados de orizanoles con un porcentaje mayor al 70 % (Xu *et al.*, 1999). Cuanto mayor es la complejidad del método, mejor son los resultados

desde el punto de vista de la pureza del concentrado de orizanoles, aunque también pueden aumentar sus costos.

La existencia de productos comerciales ricos en orizanoles para consumo humano, demuestran la viabilidad de la explotación de este recurso. Otro punto a tener en cuenta es que Uruguay exporta aceite de arroz crudo a varios compradores que lo prefieren frente al refinado. Esta modalidad de comercialización no es frecuente en el resto de los aceites vegetales que se producen en nuestro país. Cabe destacar que un aceite crudo extraído con solventes no es comestible, de modo que si el comprador lo adquiere en estas condiciones es para extraer y comercializar su orizanoles o para refinarlo con una tecnología adecuada que impida que los orizanoles se pierdan en las borras de neutralización. Puede inferirse que el comprador del aceite de arroz crudo obtiene un doble beneficio: en primer lugar, lo adquiere a menor precio que el refinado y, en segundo lugar, con el contenido de todos los componentes minoritarios de alto valor que se describieron anteriormente.

## **5. Objetivos de la tesis.**

### **5.1. Objetivo general.**

Estudio de la eficiencia de distintos métodos de obtención de concentrados de orizanoles, caracterización fisicoquímica y evaluación de su poder antioxidante, utilizando como materias primas diferentes productos y subproductos de la industria del aceite de salvado de arroz.

## 5.2. Objetivos específicos.

- Puesta a punto de las técnicas analíticas a utilizar (HPLC, DSC, UV, TLC, etc.).
- Determinación del contenido de orizanoles y su composición en diferentes productos y subproductos de la industria del aceite de salvado de arroz a los efectos de evaluarlos como posibles materias primas para la obtención de los concentrados de interés.
- Diseño y optimización de métodos de concentración de orizanoles a partir de las materias primas definidas en el punto anterior.
- Caracterización de los extractos de orizanoles obtenidos según el punto anterior (determinación de la composición, evaluación de su capacidad antioxidante).

## 6. Bibliografía.

- Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Yamaura, M.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Shimizu, N., Arai, K. Triterpene Alcohol and Sterol Ferulates from Rice Bran and Their Anti-inflammatory Effects, *J. Agric. Food Chem.* (2000) 48:2313-2319.
- AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th edition, edited by R.E. Walker, American Oil Chemists' Society, Champaign (1990).

- Babcock D. Rice bran as a source of dietary fiber. *Cereal Foods World* (1987) 32:538-539.
- Berger A.; Rein D.; Schäfer A.; Monnard I.; Gremaud G.; Lambelet P.; Bertoli C. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied  $\gamma$ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. *Eur. J. Nutr.* (2005) 44:163–173.
- Cicero A. F. G.; Gaddi A. Rice bran oil and  $\gamma$ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phytotherapeutic Research* (2001) 15: 277–289.
- Fang N.; Yu S.; Badger T.M. Characterization of Triterpene Alcohol and Sterol Ferulates in Rice Bran Using LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51:3260-3267.
- Gura T. New genes boost rice nutrients. *Science* (1999) 285:994-995.
- Grompone M. A.; Irigaray B.; Jachmanián I.; Pinchak Y. Características y Propiedades del Aceite de Salvado de Arroz Uruguayo. *A&G.* (2009) 4: 556 - 565.
- InfoAgro, <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm> (2012).
- INIA, Programa Nacional de Arroz <http://www.inia.org.uy/investigacion/programas/cultivos/arroz.htm> (2001).
- Kaewboonnum P.; Vechpanich J.; Pravit Santiwattana P.; Shotipruk A.  $\gamma$ -Oryzanol Recovery from Rice Bran Oil Soapstock. *Sep. Sci. Technol.* (2010) 45: 1186–1195.
- Khalon T. S.; Chow F. I.; Sayre R. N. Cholesterol-Lowering Properties of Rice Bran. *C. F. W.* (1994) 39:99-103.

- Lema-García M. J.; Herrero-Martínez J. M.; Simó-Alfonso E. F.; Mendonca C. R. B.; Ramis-Ramos G. Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -orizanols. *Food Chem.* (2009) 115:389-404.
- Lichtenstein A. H.; Ausman L. M.; Carrasco W.; Gaultieri L. J.; Jenner J. L.; Ordovas J. M.; Nicolisi R. J.; Goldin B. R.; Schaefer E. J. Rice bran oil consumption and plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1994) 14:549–556.
- Lima, I.; Guraya H.; Champagne E. The functional effectiveness of reprocessed rice bran as an ingredient in bakery products. *Nahrung* (2002) 46 (2):112-117.
- López L. J.; Laguerre M. L.; Lecomte J.; Figueroa M. C.; Barea B.; Weiss J.; Decker E.; Villeneuve P. Kinetic and Stoichiometry of the Reaction of Chlorogenic Acid and Its Alkyl Esters against the DPPH Radical. *J. Agric. Food Chem.* (2009) 57:863–870.
- Moldenhauer K. A.; Champagne E. T.; McCaskill D. R.; Guraya H. Productos funcionales del arroz. En: Mazza G. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza, España. Editorial Acribia (2000) :73-92.
- Nam S.H.; Choi S.P.; Kang M. Y.; Kozukue N.; Friedman M. Antioxidative, Antimutagenic, and Anticarcinogenic Activities of Rice Bran Extracts in Chemical and Cell Assays. *J. Agric. Food Chem.* (2005) 53:816-822.
- Narayan A. V.; Barhate R. S.; Raghavarao K. S. M. S. Extraction and Purification of Oryzanol from Rice Bran Oil and Rice Bran Oil Soapstock. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2006) 83 (8): 663-670.

- Orthoefer F. T.; Eastman J. Rice bran and oil. Chapter 19. Rice chemistry and Technology, 3<sup>rd</sup> ed. AACCC (2004) :569-593.
- Orthoefer F. T. Rice Bran Oil, Volumes 2, Chapter 10 Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6th edition *John Wiley & Sons* (2005) 465-489.
- Paine J.; Shipton C.; Chagar S.; Howells R.; Kennedy M.; Vernon G.; Wright S.; Hinchliffe E.; Adams J.; Silverstone A.; Drake R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content; *Nat. Biotechnol.* (2005) 23:482-487.
- Prakash J. Rice bran proteins: properties and food uses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (1996) 36 (6):537-552.
- Punschke K.; Mayans M. Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay.* (2011) 15 (1):19-26.
- Qureshi A. A.; Bradlow B. A.; Salser W. A.; Brace L. D. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. *J. Nut. Biochem.* (1997) 8:290-298.
- Qureshi A. A.; Mo H.; Packer L.; Peterson D. M. Isolation and Identification of Novel Tocotrienols from Rice Bran with Hypocholesterolemic, Antioxidant, and Antitumor Properties. *J. Agric. Food Chem.* (2000) 48:3130-3140.
- Romeu C.; Grompone M.A.; Jachmanián I. Obtención de extractos ricos en orizanol a partir de subproductos de refinación del aceite de arroz, XII Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Florianópolis, Brasil (2007).

- Sangronis E.; Sancio M. Development and characterization of rice cookies. *Acta Cient. Venez.* (1990) 41(3):199-202.
- Sangronis E.; Rebolledo M. A. Quality of pastas supplemented with rice bran. *Arch. Latinoam. Nutr.* (1997) 47(2):141-145.
- Sekhon K. S.; Dhillon S. S.; Singh N.; Singh, B. Funcional suitability of commercially milled rice bran in India for use in different food products. *Plant Foods Hum. Nutr.* (1997) 50 (2):127-40.
- Seetharamaiah G. S.; Prabhakar J. V. Oryzanol content of Indian Rice Bran Oil and its Extraction from Soap Stock. *J. Fd. Sci. and Tech.* (1986) 23:270-273.
- Suh M. H.; Yoo S. H.; Chang P. S.; Lee H. G. Antioxidative activity of microencapsulated  $\gamma$ -oryzanol on high cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* (2005) 53:9747–9750.
- USDA; National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16-1. en línea: [http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut\\_search.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl) (2004).
- Van Hoed V.; Depaemelaere G.; Vila Ayala J.; Santiwattana P.; Verhe R.; De Greyt W. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice brain oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2006) 83: 315-321.
- Wang M.; Hettiarachchy N. S.; Qi M.; Burks W.; Siebenmorgen, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* (1999) 47(2):411-416.
- Warner K.; Laszlo J. A. Addition of Ferulic Acid, Ethyl Ferulate, and Feruloylated Monoacyl- and Diacylglycerols to Salad Oils and Frying Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2005) 82: 647-652.

- Wu X.; Beecher G. R.; Holden J. M.; Haytowitz D. B.; Gebhardt S. E.; Prior R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* (2004) 52:4016–4037.
- Xu Z.; Godber J. S. Purification and Identification of Components of  $\gamma$ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *J. Agric. Food Chem.* (1999) 47:2724-2728.
- Xu Z.; Hua N.; Godber J. S. Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienols, and  $\gamma$ -Oryzanol Components from Rice Bran against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2-Azobis(2-methylpropionamidine) Dihydrochloride, *J. Agric. Food Chem.* (2001) 49:2077-2081.
- Ye X.; Al-Babili S.; Klöti A.; Zhang J.; Lucca P.; Beyer P.; Potrykus I. Engineering the Provitamin A ( $\beta$ -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science* (2000) 287(5451): 303-305.
- Zullaikah S.; Melwita E.; Ju Y. H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. *Biores. Technol.* (2009) 100(1):299-302.

## **Capítulo 2**

# **Materiales y Métodos**

# Índice

1. Materiales.
2. Métodos utilizados para la determinación de la composición fisicoquímica de las borras y de los concentrados.
  - 2.1. Contenido de agua de las borras.
  - 2.2. Determinación cualitativa de las clases lipídicas presentes en las borras.
  - 2.3. Determinación cuantitativa de los ácidos grasos libres presentes en las borras liofilizadas.
  - 2.4. Determinación cuantitativa del contenido de triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles en las borras liofilizadas.
  - 2.5. Determinación cuantitativa de los orizanoles.
    - 2.5.1. Método espectrofotométrico.
    - 2.5.2. Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
  - 2.6. Determinación cuantitativa de tocoferoles y tocotrienoles.
  - 2.7. Determinación cuantitativa de los esteroides libres en las borras liofilizadas.
  - 2.8. Determinación cuantitativa de fosfolípidos en las borras de liofilizadas.
- 3.- Bibliografía.

## 1. Materiales.

En esta tesis, se utilizaron borras de neutralización (*soapstock*) provenientes de la refinación del aceite de salvado de arroz, suministradas gentilmente por la empresa Arrozur S.A. (Treinta y Tres, Uruguay). Estas borras fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico, de acuerdo con diferentes métodos analíticos.

Los análisis que se describen a continuación se realizaron utilizando solventes de calidad HPLC, reactivos y estándares los cuales fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. Los análisis por cromatografía en capa delgada (TLC) se realizaron utilizando placas de silica gel G de espesor de 250  $\mu\text{m}$  y tamaño de partícula 17  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 2.1.-** Aceites vegetales refinados empleados en los “ensayos de oxidación”.

<b>Aceite</b>	<b>Marca</b>	<b>Lote</b>	<b>Fabricante</b>
<i>Girasol</i>	Uruguay	07/12/10	Cousa S.A.
<i>Soja</i>	Primor	-	Cousa S.A.
<i>Arroz</i>	Saman	06/03/11	Arrozur S.A.
<i>Girasol alto de oleico</i>	Optimo	02/04/11	Cousa S.A.

Para los ensayos de oxidación descritos del capítulo 6 al 9 se utilizaron cuatro tipos de aceites refinados: de girasol, de soja, de salvado de arroz y de

girasol de alto oleico. Tres de estos aceites fueron comprados en supermercados de plaza y uno de ellos, el aceite de soja, fue suministrado por la empresa COUSA S.A. sin agregado de antioxidantes sintéticos. En la Tabla 2.1 se muestran los detalles para cada uno de ellos.

## **2. Métodos utilizados para la determinación de la composición fisicoquímica de las borras y de los concentrados.**

### **2.1. Contenido de agua de las borras.**

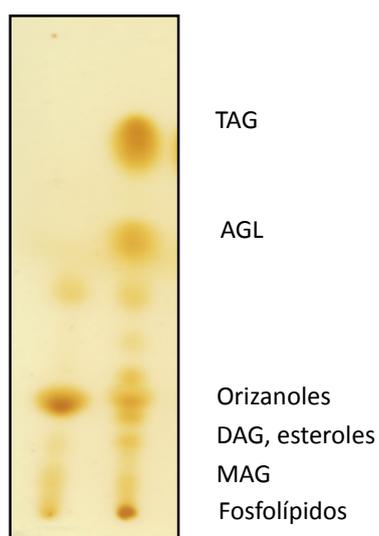
El contenido de agua en las borras de neutralización se determinó mediante liofilización se colocó una masa de aproximadamente 30 gramos de borras húmedas en freezer a -20 °C. Posteriormente, las borras congeladas se liofilizaron en un equipo Christ alpha 1-4 hasta alcanzar masa constante. Considerando la masa inicial correspondiente a las borras húmedas y la masa final correspondiente a las borras secas, se determinó el porcentaje de humedad:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{masa}_{\text{borras húmedas}} - \text{masa}_{\text{borras liofilizadas}}}{\text{masa}_{\text{borras húmedas}}} * 100 \quad [2.1]$$

La determinación fue realizada por sextuplicado, determinándose el valor medio y la desviación estándar.

## 2.2. Determinación cualitativa de las clases lipídicas presentes en las borras.

Se empleó la cromatografía en capa delgada (TLC) para determinar las clases lipídicas presentes en las borras y en algunos de los concentrados obtenidos. La muestra se disolvió en cloroformo (concentración de 30 mg/mL). Posteriormente, se sembró aproximadamente 1 uL de solución sobre una placa de sílica gel de acuerdo con las características descritas anteriormente. Las placas se desarrollaron con una mezcla de éter de petróleo/dietiléter/ácido acético en relación de volumen 80:20:1. Luego de desarrollada a placa se reveló por exposición a vapores de yodo. Se realizó la identificación de los diferentes compuestos por comparación con estándares sembrados en las mismas placas de sílica gel. La figura 2.1 muestra a modo de ejemplo el análisis por TLC de las borras de neutralización.



**Figura 2.1.-** Cromatografía en capa delgada (TLC) de un estándar de orizanoles (izquierda) y de una muestra de borras de neutralización (derecha).

### **2.3. Determinación cuantitativa de los ácidos grasos libres presentes en las borras liofilizadas.**

La determinación de los ácidos grasos libres en las borras se realizó mediante dos análisis por cromatografía de gases.

En primer lugar se realizó una metilación en frío basada en la técnica IUPAC 2.301 (Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 1992), la cual utiliza catálisis básica y permite derivatizar únicamente los ácidos grasos constituyentes de los glicéridos presentes en la muestra (mono-, di y triglicéridos).

En un vial con tapa a rosca se pesó alrededor de 30 mg de borras liofilizadas y luego se disolvieron en 1 mL de hexano o éter de petróleo. Se agregó como estándar interno 200 uL de solución de ácido margárico disuelto en hexano de concentración conocida (aproximadamente 4 mg/mL). Se agregó de 0.3 mL a 0.4 mL de hidróxido de potasio disuelto en metanol (concentración 2 N). Se agitó durante 30 minutos y luego se separó la capa orgánica mediante centrifugación.

La muestra así preparada se analizó por cromatografía de gases en un equipo Shimadzu GC-14B, equipado con una columna capilar Supelco SP 2330 (30 m x 0.25 mm x 0.2 µm), detector de ionización de llama (FID, 340°C) e inyector tipo split (relación de split 80:1, 250 °C).

Como gas portador se utilizó nitrógeno como gas portador a 70KPa y la temperatura del horno se programó según detalle mostrado en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.-** Programa de temperatura empleado en el análisis por GC

Velocidad de calentamiento (°/min)	Temperatura (°C)	Tiempo a la temperatura (minutos)
-	160	0
5°/min	230	5

Paralelamente se realizó una metilación en caliente de una muestra de las mismas borras de acuerdo con la técnica AOCS Ce 2-66, la cual aplica una segunda etapa de catálisis ácida  $\text{BF}_3$ , por lo cual se derivatizan la totalidad de los ácidos grasos de la muestra, incluso los ácidos grasos libres.

Se pesó entre 30 mg y 50 mg de borras liofilizadas. Se agregó como estándar interno 200 uL de ácido margárico disuelto en hexano, de concentración conocida (aproximadamente 4 mg/mL). Luego se agregó 1.5 mL de una solución de KOH en metanol, de concentración 0.5 M. Se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 10 minutos. Se retiró del baño de agua, se dejó enfriar, se agregó 2 mL de una solución de trifluoruro de boro en metanol al 14 % y se volvió a colocar en el baño de agua a 100°C durante 5 minutos adicionales. Transcurrido dicho tiempo se retiró del baño, se dejó enfriar y se agregó 1 mL de hexano o éter de petróleo. Se agitó y luego se centrifugó a 4000 rpm para separar las fases. Se analizó una muestra de la capa orgánica por cromatografía gaseosa, en la misma forma que se describió anteriormente.

Como se mencionó, por el método de la metilación en frío se metilan solamente los ácidos grasos que se encuentran esterificados en los

triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles, mientras que utilizando el método de metilación en caliente se saponifican y metilan todos los ácidos grasos, incluyendo los ácidos grasos libres presentes. De esta manera, considerando, las masas de ácido margárico (estándar interno) es posible calcular la masa de ácidos grasos ligados y de los ácidos grasos libres (AGL) totales (en base seca).

A continuación se muestran las ecuaciones correspondientes:

$$\text{masa de AG totales} = \frac{A_{AGMC}}{A_{17:0}} * C_{17:0} * V_{17:0} \quad [2.2]$$

$$\text{masa de AG ligados} = \frac{\text{Area}_{AGMF}}{\text{Area}_{17:0}} * C_{17:0} * V_{17:0} \quad [2.3]$$

$A_{AGMC}$  .- área total de los picos correspondientes a ésteres metílicos de ácidos grasos (excepto el del 17:0) en el análisis por GC de la muestra preparada por metilación en caliente.

$A_{AGMF}$  .- área total de los picos correspondientes a ésteres metílicos de ácidos grasos (excepto el del 17:0) en el análisis por GC de la muestra preparada por metilación en frío.

$A_{17:0}$  .- area del pico correspondiente al éster metílico del 17:0

$C_{17:0}$  .- concentración de la solución estándar de ácido margárico (mg/mL)

$V_{17:0}$  .- volumen de ácido margárico agregado.

Con estos valores y con el contenido de agua de las borras de neutralización, se determinó el contenido de ácidos grasos libres en las borras húmedas.

$$\% \text{ AG totales en borras húmedas} = \frac{\text{masa AG totales}}{\text{masa}_{\text{borras}}} * 100 * \frac{\% \text{ humedad borras}}{100} \quad [2.4]$$

$$\% \text{ AG ligados en borras húmedas} = \frac{\text{masa AG ligados}}{m_{\text{borras}}} * 100 * \frac{\% \text{ humedad borras}}{100} \quad [2.5]$$

$m_{\text{borras}}$  .- masa pesada de borras.

$$\% \text{AGL}_{\text{borras}} = \% \text{ AG totales} - \% \text{ AG ligados} \quad [2.6]$$

#### **2.4. Determinación cuantitativa del contenido de triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles en las borras liofilizadas.**

La cuantificación de estos compuestos se realizó por cromatografía de gases. Las muestras de las borras liofilizadas se disolvieron en cloroformo y se analizaron en el cromatógrafo de gases mencionado anteriormente, ahora equipado con una columna Macherey Nagel Optima 1-TG (10 m x 0.32mm x 0.10  $\mu\text{m}$ ). Se programó la temperatura del horno de acuerdo al detalle indicado en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.-** Programa de temperatura empleado.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min.)</b>	<b>Velocidad de calentamiento (°/min.)</b>
<b>50</b>	<b>1</b>	<b>-</b>
<b>180</b>	<b>0</b>	<b>15</b>
<b>230</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
<b>370</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Se utilizó nitrógeno como gas portador a una presión de 30 KPa y una relación de split 70:1. Las temperaturas para el FID y la cámara de inyección fueron 380 °C y 250 °C, respectivamente.

Para la cuantificación de estas clases lipídicas se realizaron curvas de calibración mediante la preparación y análisis de mezclas en diferente proporción de estándares puros de mono-oleina, di-oleina y triestearina con tricaprina como estándar interno.

## 2.5. Determinación cuantitativa de los orizanoles.

### 2.5.1. Método espectrofotométrico.

La determinación de orizanoles por espectrofotometría se basó en el método de Seetharamaiah *et al.* (1986). Se utilizó un espectrofotómetro marca Shimadzu, modelo UV-1203

En un matraz aforado de 25 mL se pesó una cantidad de borras de aproximadamente 20 mg con una precisión a la décima de miligramo. La muestra se disolvió en hexano o éter de petróleo. Se obtuvo el espectro de absorción de esta solución entre 220 nm y 400 nm. En los casos en que la absorbancia a la longitud de onda de 315 nm superó la unidad, se repitió el análisis sobre una solución diluida adecuadamente.

Se efectuó el cálculo del contenido de orizanoles teniendo en cuenta el coeficiente de extinción informado por Seetharamaiah *et al.* (1986): 358.9 a 314 nm. En la siguiente ecuación se muestra el correspondiente cálculo, en base a la absorbancia medida a 314 nm.

$$\text{Contenido de orizanoles (\%)} = \frac{A_{314\text{nm}}}{358.9} * \frac{V_{\text{matraz aforado}}}{100} * \frac{1000}{m_{\text{muestra}}} \quad [2.7]$$

$A_{314\text{nm}}$ .- absorbancia de la muestra a 314 nm.

$V_{\text{matraz aforado}}$ .- volumen del matraz aforado en mililitros.

$m_{\text{muestra}}$ .- masa de la muestra en miligramos.

### **2.5.2. Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

En un vial se pesó entre 20 mg y 40 mg de borras liofilizadas. Se agregó 1 mL de una mezcla de acetonitrilo-metanol (50:50) y se dispersó calentando a 50 °C. La disolución se completó mediante exposición a ultrasonido en un equipo de ultrasonido marca Branson, modelo 1510, durante 15 minutos. Transcurridos los 15 minutos, la muestra se centrifugó a 4000 rpm; en caso de ser necesario, se filtró en un filtro para cromatografía líquida de 0.45  $\mu\text{m}$ , tipo Minisart RC 15.

Se inyectó 50  $\mu\text{L}$  de la solución en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) marca Shimadzu, modelo 20A, equipado con una columna de sílice marca Macherey Nagel tipo C18 (25 cm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ), y detector de arreglo de diodos, marca Shimadzu SPD M20A y horno para columnas (T= 35 °C).

Se utilizó el gradiente de solventes indicado en la Tabla 2.4, a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min.

**Tabla 2.4.-** Programación de la mezcla de solventes empleada para el análisis de orizanoles por HPLC.

Tiempo (min.)	Acetonitrilo	Metanol	Isopropanol	Agua
0	47.5	42.8	4.7	5
6	47.5	42.8	4.7	5
10	50	45	5	0
45	50	45	5	0
46	0	0	100	0
53	0	0	100	0
54	47.5	42.8	4.7	5
56	47.5	42.8	4.7	5

Para la cuantificación de los orizanoles se tomó como referencia una muestra de orizanoles puros (estándar) y se empleó la siguiente ecuación,

$$m_{\text{orizanoles}}_{\text{muestra}} = \frac{m_{\text{oriz. estándar}}}{A_{\text{oriz. estándar}}} * A_{\text{oriz. muestra}} * \frac{V_{\text{dil.}}}{V_{\text{iny.}}} \quad [2.8]$$

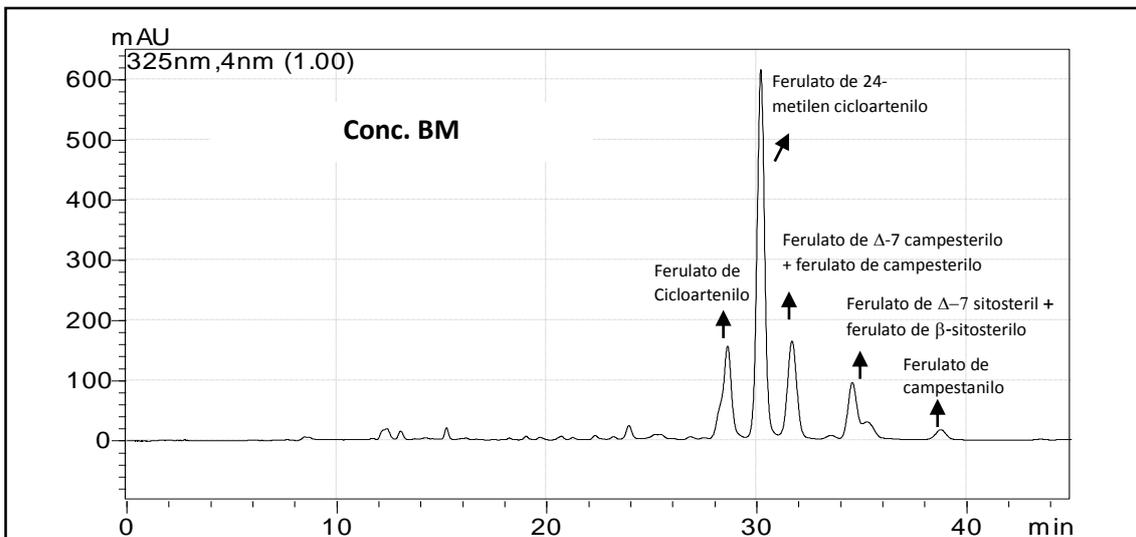
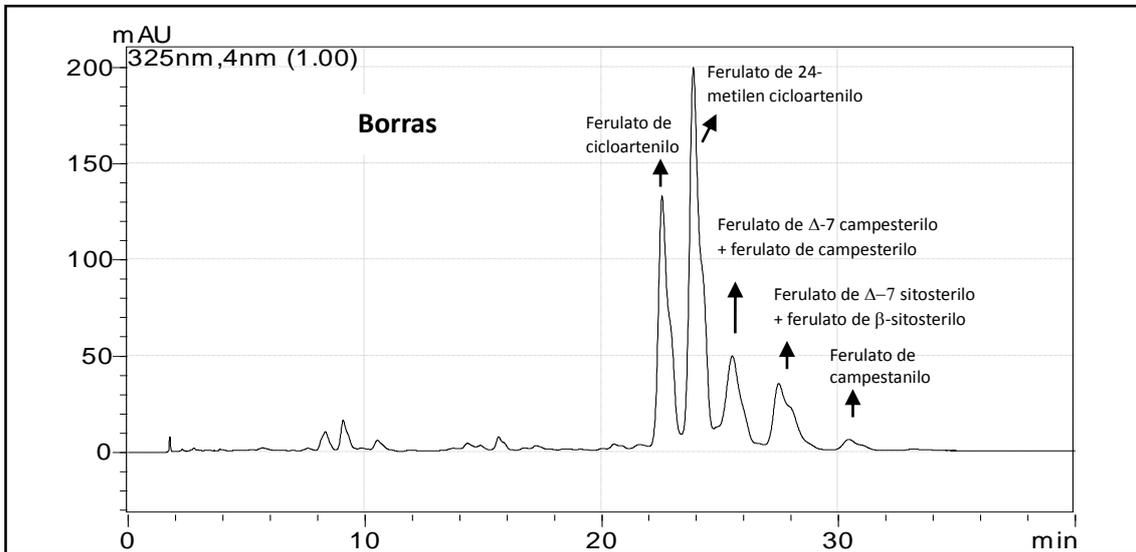
$m_{\text{oriz. estándar}}$ .- masa total de orizanoles en el estándar.

$A_{\text{oriz. estándar}}$ .- área total de los picos de los orizanoles en el cromatograma, para el estándar.

$A_{\text{oriz. muestra}}$ .- área total de los picos de los orizanoles en el cromatograma, para la muestra.

$V_{\text{dil.}}$ .- volumen de solvente en que se disolvió la muestra.

$V_{iny.}$ - volumen inyectado de solución conteniendo la muestra.



**Figura 2.2.-** Cromatograma de los orizanoles presentes en una muestra de borras y en un concentrado.

El porcentaje de orizanoles se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de orizanoles}_{\text{muestra}} = \frac{m_{\text{oriz.muestra}}}{m_{\text{muestra}}} * 100 \quad [2.9]$$

$m_{\text{muestra}}$ .- masa de muestra pesada.

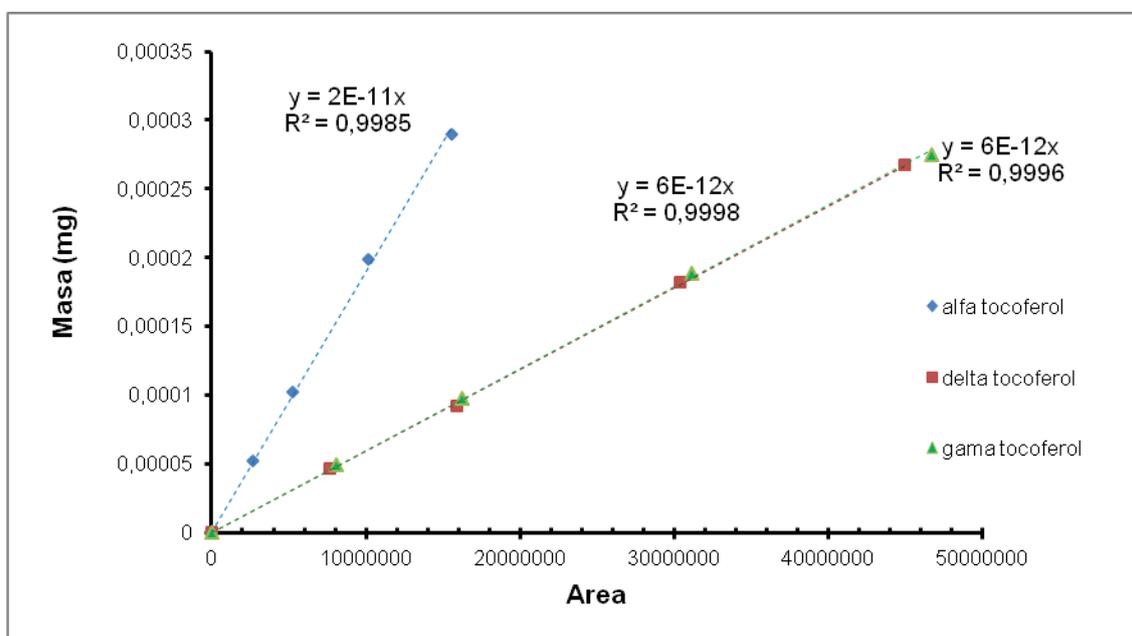
En la figura 2.2 se muestra a modo de ejemplo los cromatogramas correspondientes al análisis de una muestra de borras y un concentrado obtenido a partir de las mismas. La asignación de los picos se verá en más detalle en el capítulo 3.

## **2.6. Determinación cuantitativa de tocoferoles y tocotrienoles.**

Se realizó la determinación de los tocoferoles y tocotrienoles mediante dos métodos diferentes por HPLC. El primero fue utilizando el programa de determinación de los orizanoles descrito anteriormente. Aquí los tocoferoles y los tocotrienoles fueron determinados utilizando el método para la determinación de los orizanoles pero registrando la señal mediante un detector de fluorescencia Shimadzu RF 20A XS, a una longitud de onda de excitación de 290 nm y a una de emisión de 330 nm instalado a continuación del detector tipo PDA mencionado anteriormente. Este método fue utilizado cuando se analizaron las borras de neutralización y los concentrados, determinando junto

con los orizanoles los tocoferoles y los tocotrienoles. El segundo método se utilizó para la determinación de los tocoferoles y tocotrienoles en los aceites utilizados para los ensayos de oxidación. En este caso el análisis se realizó mediante HPLC pero según el método utilizado por Andrikopoulos *et al.* (1991). Se pesó aproximadamente 30 mg de aceite y se disolvió en 1 mL de isopropanol. Se utilizó el mismo equipamiento y columna mencionados anteriormente, manteniendo el horno a una temperatura de 35 °C. El programa utilizado se detalla en la Tabla 2.5.

Se confeccionaron curvas de calibración utilizando estándares de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol (Sigma-Aldrich), como se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.3.-** Curvas de calibración para el  $\alpha$ -tocoferol, el  $\gamma$ -tocoferol y el  $\delta$ -tocoferol.

**Tabla 2.5.-** Programa empleado para la determinación de tocoferoles y tocotrienoles.

Tiempo (min.)	Agua-5% ácido acético	Acetonitrilo	Metanol	Isopropanol	Flujo (mL/min)
0	70	18	13	0	1
25	0	58	42	0	1
30	0	58	42	0	1
45	0	23	17	60	1
46	0	0	100	0	1.7
48	0	0	100	0	1.7
48.5	70	18	13	0	1
57	70	18	13	0	1

Las cuantificaciones se realizaron utilizando los factores correspondientes a cada tipo de compuesto obtenido a partir de las curvas de la Figura 2.3.

El factor correspondiente al  $\alpha$ -tocoferol es diferente a los factores para el  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol. En base a estos factores de respuesta se realizó la cuantificación en las muestras, de la siguiente manera:

$$m_{T,muestra} = pendiente_{T,estandar} * A_{T,muestra} * \frac{V_{disol.}}{V_{iny.}} \quad [2.10]$$

$pendiente_{T,estandar}$  :- pendiente de la curva de calibración para el tocoferol correspondiente.

$A_{T,muestra}$  .- area del pico del cromatograma para el tocoferol correspondiente.

$V_{dil.}$ .- volumen de solvente empleado en la disolución.

$V_{iny.}$ .- volumen de solución inyectada en el HPLC.

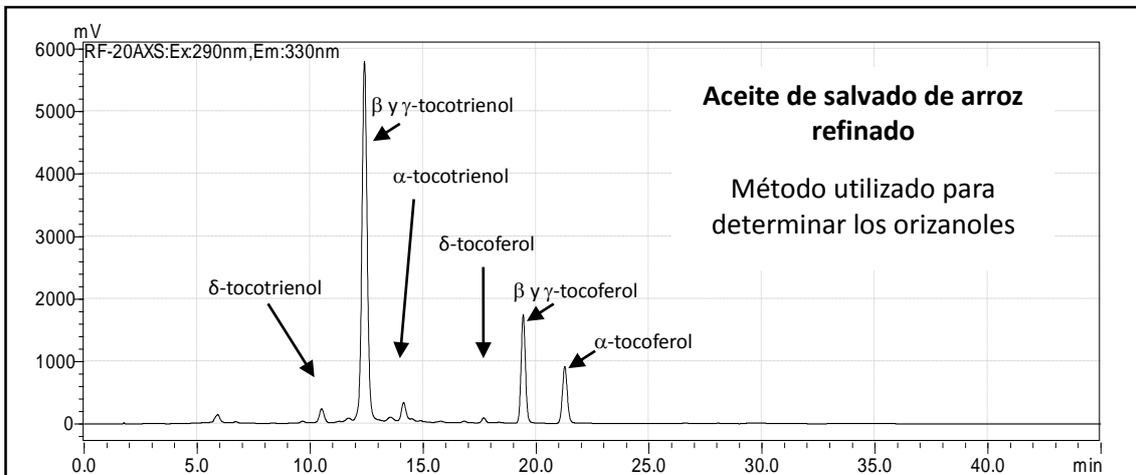
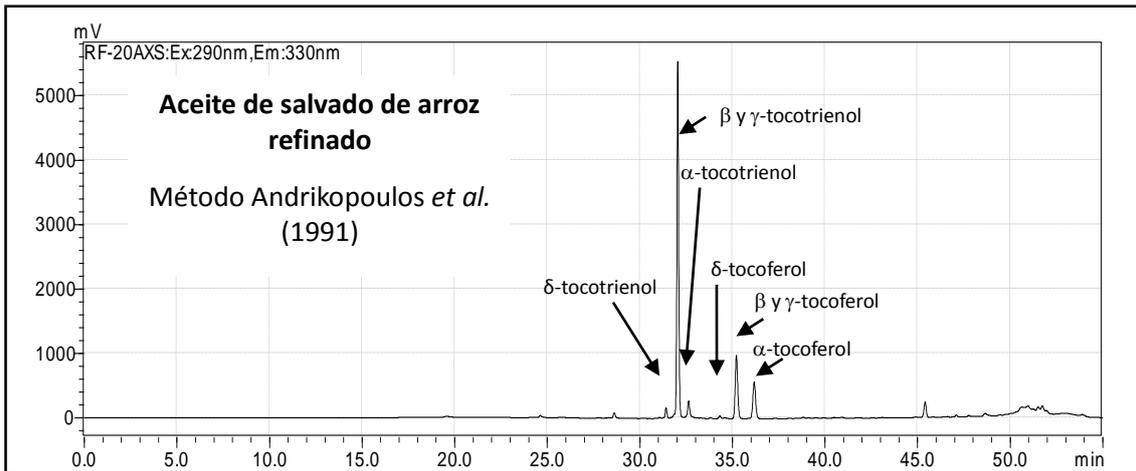
Considerando la masa de la muestra se calculó el contenido de cada tocoferol, expresada en partes por millón (ppm).

$$ppm \text{ de tocoferol} = \frac{m_{T,muestra}}{m_{muestra}} * 1000000 \quad [2.11]$$

$m_{muestra}$ .- masa de muestra pesada.

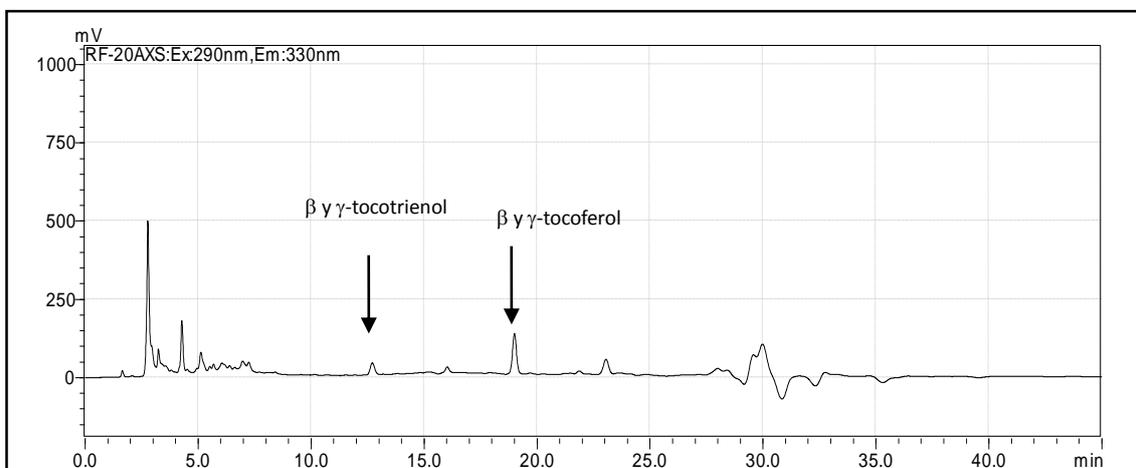
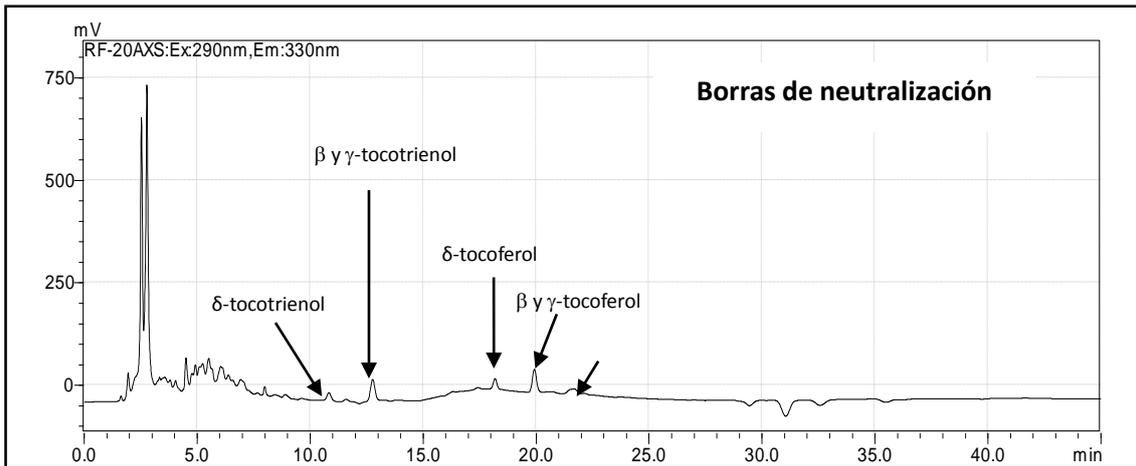
Para la cuantificación de los tocotrienoles se consideró el mismo factor de respuesta que para el tocoferol correspondiente.

En la Figura 2.4 se muestran los cromatogramas correspondientes al análisis de los tocoferoles y los tocotrienoles en un aceite de salvado de arroz refinado obtenido mediante el método correspondiente a la determinación de orizanoles y el método de Andrikopoulos *et al.* (1991).



**Figura 2.4.-** Cromatogramas obtenidos para el aceite de salvado de arroz refinado utilizando el método de Método Andrikopoulos *et al.* (1991) y el método utilizado para la determinación de los orizanoles.

En la Figura 2.5 se muestra el cromatograma obtenido utilizando el programa de orizanoles para las borras de neutralización y para uno de los concentrados obtenidos.



**Figura 2.5.-** Cromatogramas obtenidos para las borras de neutralización y para un concentrado de orizanoles mediante el método utilizado para la determinación de los orizanoles.

### **2.7. Determinación cuantitativa de los esteroides libres en las borras liofilizadas.**

Se pesó 40 mg de borras liofilizadas en un vial y se disolvió en 1 mL de cloroformo y se agregó 200 uL de alfa colestano como estándar interno (25 mg/mL). La solución se analizó por cromatografía de gases en un equipo Shimadzu modelo 14B equipado con una columna Supelco SAC-5 (15 metros,

0.25 mm, 0.25  $\mu$ m). El análisis fue isotérmico a 300 °C. Para la cunatificación de los esteroides libres se realizó una curva de calibración con mezclas en diferente proporción de orizanoles de alto grado de pureza y alfa colestano como estándar interno.

## **2.8. Determinación cuantitativa de fosfolípidos en las borras de liofilizadas.**

El contenido de fosfolípidos en las borras liofilizadas se determinó mediante HPLC en el equipo mencionado previamente, equipado con una columna de fase normal Supelco tipo LC-Si (25 cm, 4.6 mm, 5  $\mu$ m) y detector del tipo “light scattering” Shimadzu ELSD LTII.

La bibliografía acerca de la separación de los fosfolípidos mediante HPLC indica que es posible usar diferentes mezclas de solventes para lograr una separación adecuada (Becart *et al.*, 1990; Kyung *et al.*, 1997; Descalzo *et al.*, 2003; Sala Vila *et al.*, 2003; Rombaut *et al.*, 2005; Mengesha *et al.*, 2010), optándose por la mezcla sugerida por Becart *et al.* (1990). Si bien la mezcla de solventes empleada no es la más simple, los cromatogramas mostraron una muy buena separación de los diferentes fosfolípidos. La concentración de análisis se ajustó de acuerdo al contenido de fosfolípidos de la muestra.

El gradiente de solventes es el que se describe en la Tabla 2.6.

**Tabla 2.6.-** Programa de solventes empleado para la determinación de fosfolípidos por HPLC.

Tiempo (min.)	Cloroformo- Metanol-NH <sub>4</sub> OH (80:19.5:0.5)	Cloroformo-Metanol- Agua-NH <sub>4</sub> OH (60:34:5.5:0.5)	Flujo (mL/min)
0	50	50	1.5
14	0	100	1.5
25	0	100	1.5
30	50	50	1.5
35	50	50	1.5

Para la cuantificación se utilizó un estándar de fosfatidocolina (Sigma-Aldrich), de acuerdo con:

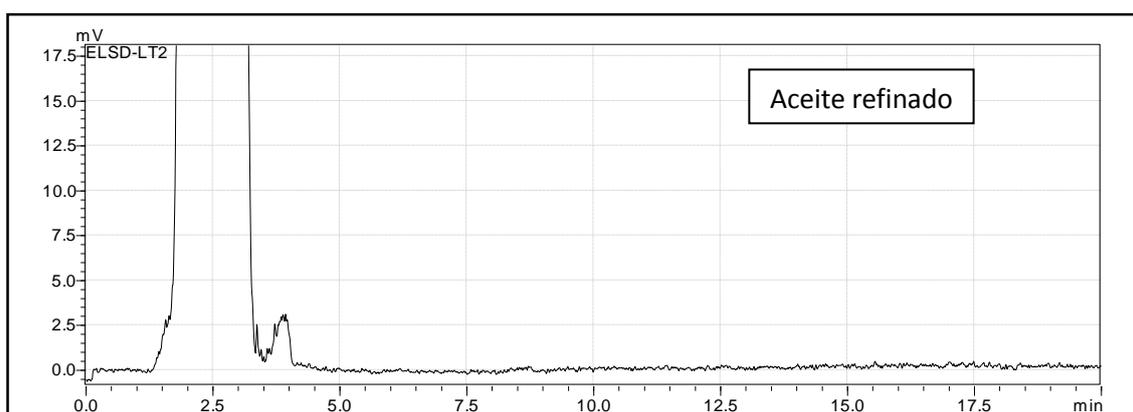
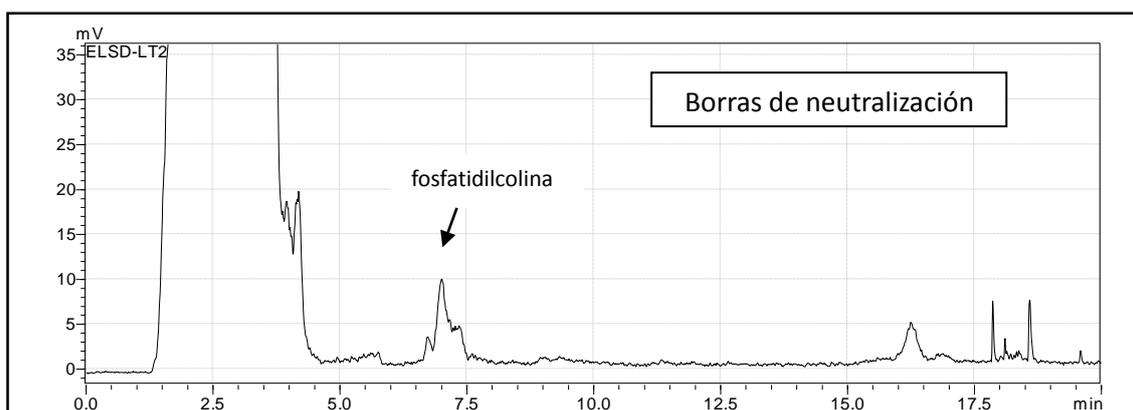
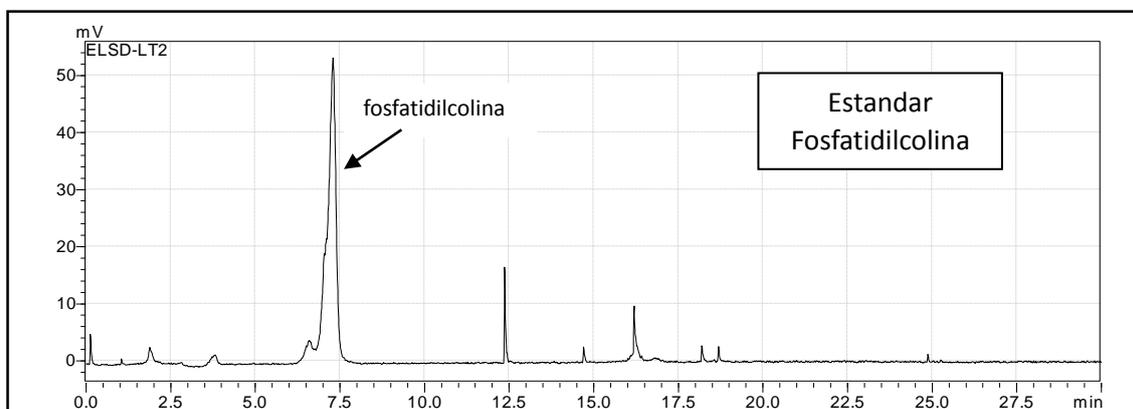
$$m. fosf \cdot muestra = \frac{C_{estandar} \cdot V_{iny,estandar}}{A_{estandar}} * A_{fosf,muestra} \quad [2.12]$$

$C_{estandar}$ .- concentración del estándar.

$V_{iny,estandar}$ .- volumen inyectado de la solución del estándar.

$A_{estandar}$ .- área del pico del cromatograma del estándar.

$A_{fosf,muestra}$ .- área total de los picos del cromatograma correspondientes a cada fosfolípido de la muestra.



**Figura 2.6.-** Cromatogramas obtenidos por el método de análisis de fosfolípidos por HPLC aplicado a un estándar de fosfatidilcolina, a las borras de neutralización y al aceite de salvado de arroz refinado.

Considerando la masa de muestra pesada se calculó las partes por millón de los fosfolípidos presentes en la muestra:

$$ppm \text{ fosfolípidos} = \frac{m_{\text{fosf. muestra}}}{m_{\text{muestra}}} * 1000000 \quad [2.13]$$

En la Figura 2.6 se muestran los cromatogramas obtenidos para el estándar de fosfatidilcolina, para las borras de neutralización y para un aceite de salvado de arroz refinado.

### 3. Bibliografía.

- Andrikopoulos N. K.; Brueschweiler H.; Felber H.; Taeschler Ch. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1991) 68 (6): 359-364.
- Becart J.; Chevallier C.; Biesse J. Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light-scattering evaporating detector- application to raw materials for cosmetic use. *J. High Resolut. Chromatogr.* (1990) 13, 126-129.
- Descalzo A. M.; Insani E. M.; Pensel N. A. Light-Scattering Detection of Phospholipids Resolved by HPLC. *Lipids* (2003) 38 (9): 999-1003.

- IUPAC, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. International Union of Pure and Applied Chemistry. 1st supplement to 7th edition, Pergamon Press, Oxford, (1992).
- Kyung Ho Row; Ju Weon Preparative Separation of Phospholipids from Soybean by NP-HPLC. *J. Chem. Eng.* (1997) 14 (5): 412-415.
- Mengesha A. E.; Bummer P. M. Simple Chromatographic Method for Simultaneous Analyses of Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylcholine, and Free Fatty Acids, *Pharm. Sci. Tech.* (2010) 11 (3): 1084-1091.
- Rombaut R.; Camp J. V.; Dewettinck K. Analysis of Phospho- and Sphingolipids in Dairy Products by a New HPLC Method. *J. Dairy Sci.* (2005) 88 (2): 482-488.
- Sala Vila A.; Castellote-Bargalló A. I.; Rodríguez-Palmero-Seuma M.; López-Sabater M. C. High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of  $\omega$  long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Chromatogr. A* (2003) 1008:73–80.
- Seetharamaiah G. S.; Prabhakar J. V. Oryzanol content of Indian Rice Bran Oil and its Extraction from Soap Stock. *J. Food. Sci. Technol.* (1986) 23:270-273.

# **Capítulo 3**

## **Caracterización de las borras de neutralización industriales**

# Índice

- 1.- Introducción.
- 2.-Materiales y métodos.
  - 2.1.- Estudio cualitativo.
  - 2.2.- Estudio cuantitativo.
- 3.- Resultados y discusión.
  - 3.1.- Análisis cualitativo.
  - 3.2.- Análisis cuantitativo.
  - 3.3.- Composición global de las borras de neutralización.
- 4.- Conclusiones.
- 5.- Bibliografía.

## 1. Introducción.

Como ya fue mencionado en el capítulo 1 el aceite de salvado de arroz es una importante fuente de compuestos fitoquímicos bioactivos, muchos de ellos de interés nutricional, farmacéutico y cosmético (Da Silva *et al.*, 2005; Danielski *et al.*, 2005). Dentro de los constituyentes de la materia insaponificable de dicho aceite se encuentran los tocotrienoles, los tocoferoles y los orizanoles así como otros compuestos en menor concentración como lecitinas y carotenoides (Patel *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Stoggl *et al.*, 2005), alcoholes de cadena larga y escualeno (Ha *et al.*, 2006). La concentración de tocoles y orizanoles, depende en gran medida, de la variedad genética del grano de arroz; los rangos comúnmente considerados van de 0.10 a 0.14 % para los tocoles y de 0.9 a 2.9 % para los orizanoles (Diack *et al.*, 1994; Lloyd *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2004).

Los orizanoles son lipofílicos y, por lo tanto, se extraen en el aceite; sin embargo, a diferencia de los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles), son mayoritariamente removidos del aceite durante la etapa de neutralización alcalina utilizada en la refinación química, acumulándose en las borras de neutralización (*soapstock*) conjuntamente con otras clases lipídicas como los ácidos grasos libres (Narayan *et al.*, 2006; Lema-García *et al.*, 2009). Además, dichas borras de neutralización arrastran consigo gran cantidad de triglicéridos que dan origen a parte de las “mermas” del proceso de refinación. Dado el elevado valor nutricional de estos compuestos se ha propuesto diferentes alternativas a la refinación química para evitar este fenómeno, entre ellas la

refinación física o la tecnología de membrana (Ghosh, 2007; Manjula *et al.*, 2008). Las pérdidas de orizanoles en el proceso de refinación química alcanzan valores de 1.1, 5.9 y de 93.0 a 94.6 % para las etapas de desgomado, descerado y neutralización alcalina, respectivamente (Krishna *et al.*, 2001). El contenido de orizanoles en el aceite de salvado de arroz disminuye desde un valor inicial entre 1.6 y 2.7 % a tan sólo un 0.19 % luego de la neutralización alcalina, mientras que el blanqueo y la desodorización no lo afectan apreciablemente (Lema-García *et al.*, 2009). El contenido de orizanoles en las borras de neutralización alcalina se encuentra en el rango de 1.5 a 6.5 % dependiendo del proceso y del aceite de salvado de arroz crudo utilizado (Rao *et al.*, 2002; Indira *et al.*, 2005; Narayan *et al.*, 2006).

Resulta de mayor interés el diseño de métodos que permitan la recuperación de los orizanoles a partir de las borras de neutralización. Se obtuvo concentrados de muy alta pureza mediante técnicas de cristalización o cromatografía líquida preparativa de alta resolución, aunque fue necesario varias etapas previas de pre-concentración antes de la utilización de estas tecnologías (Du *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2005; Zullaikah *et al.*, 2008).

La empresa ARROZUR S.A., única productora de aceite de salvado de arroz en nuestro país, utiliza el proceso tradicional de refinación química para procesar el aceite de salvado de arroz (información suministrada por la Ing. Quím. Mane Kmaid, Jefa de Producción). Este proceso incluye, entre sus etapas iniciales, la neutralización alcalina del aceite crudo, mediante la cual se eliminan los ácidos grasos libres, convirtiéndolos en jabones (sales de sodio) y separándolos del aceite por centrifugación.

En este capítulo se estudió la composición de las borras de neutralización obtenidas como subproducto del proceso de refinación de aceite de arroz por parte de la empresa ARROZUR S.A. Esta caracterización es imprescindible para el posterior diseño de los métodos de concentración de los orizanoles a partir de dicho material, los que serán descritos en detalle en el capítulo 4.

## **2. Materiales y métodos. .**

Se utilizaron borras de neutralización industriales provenientes de la refinación de aceite de salvado de arroz, suministradas gentilmente por la empresa Arrozur S.A. (Treinta y Tres, Uruguay). Se analizaron por cromatografía en capa delgada (TLC) para la determinación cualitativa de las diferentes clases lipídicas presentes, de acuerdo con el método mencionado en el capítulo 2 (ítem 2.2). Para el análisis cuantitativo se empleó la cromatografía de gases (GC) (capítulo 2, ítem 2.3, 2.4 y 2.7) y la cromatografía líquida de alta resolución (capítulo 2, ítem 2.5.1 y 2.5.2). Se utilizó estándares de Sigma-Aldrich de elevada pureza así como también solventes de calidad para HPLC y GC.

### **2.1. Estudio cualitativo**

Para el análisis por TLC se disolvió 30 mg de borras en un mililitro de cloroformo y se sembró 1 $\mu$ L en una placa de sílica gel (espesor 250  $\mu$ m y

tamaño de partícula 17  $\mu\text{m}$ ). En las mismas condiciones se sembró los estándares de interés. El desarrollo de las placas se realizó con la mezcla de solventes éter de petróleo-dietileter-ácido acético en proporciones 80:20:1 (v/v).

## **2.2. Estudio cuantitativo**

El contenido de agua se determinó mediante la liofilización de las borras hasta peso constante. Para ello se dispuso en el liofilizador varias muestras de aproximadamente 30 g y se procedió de acuerdo al método indicado en el capítulo 2 (ítem 2.1).

A las borras liofilizadas se les determinó el contenido de ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, triacilgliceroles, orizanoles, fosfolípidos y esteroides libres. Los ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, triacilgliceroles y esteroides libres se analizaron por cromatografía de gases (capítulo 2, ítem 2.3, 2.4 y 2.7). Los fosfolípidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (capítulo 2, ítem 2.8).

El contenido de orizanoles se determinó por espectrofotometría UV y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (capítulo 2, ítem 2.4).

También se determinó el contenido de tocoferoles y tocotrienoles por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (capítulo 2, ítem 2.6).

Por otra parte, se determinó la fracción lipídica contenida en las borras liofilizadas. Para ello se pesaron 150 mg de borras y fueron acidificadas hasta

alcanzar un pH=5. Luego se agregó 4 mL de éter de petróleo se agitó y se centrifugó para separar la capa etérea la cual fue travasada a un tubo previamente pesado. Posteriormente, se repitió la extracción con 4 mL de éter de petróleo y los extractos etéreos se juntaron en el tubo anteriormente mencionado. El extracto etéreo fue secado con 1 g de sulfato de sodio para posteriormente ventearlo con nitrógeno hasta alcanzar peso constante.

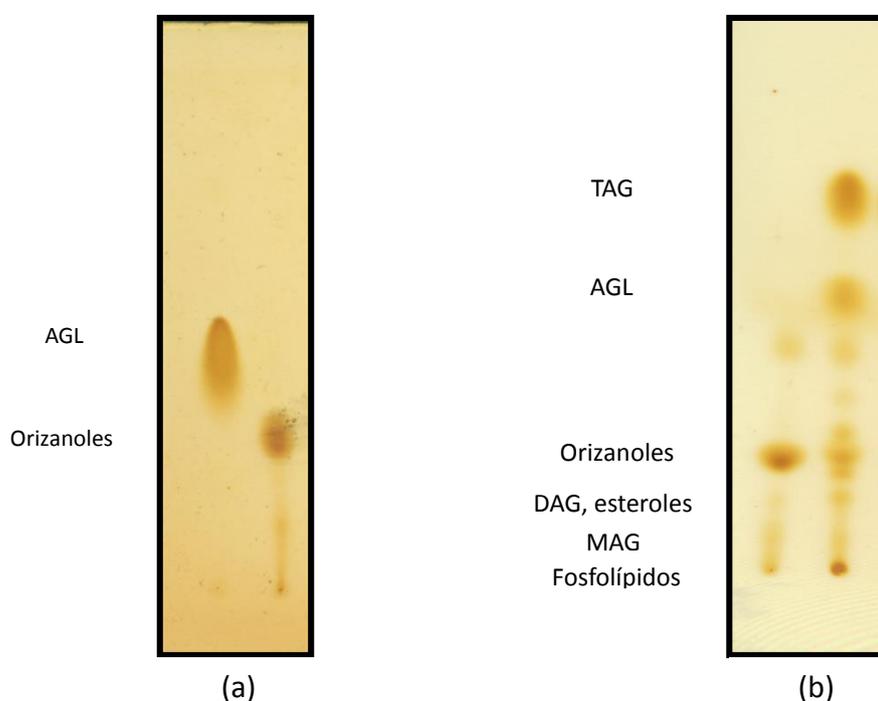
### **3. Resultados y discusión.**

#### **3.1. Análisis cualitativo.**

La Figura 3.1.a muestra la posición de los ácidos grasos libres y los orizanoles en la placa de TLC. Ambos compuestos poseen un factor de retención ( $R_f$ ) diferente con la mezcla de solventes utilizada. Ello permite determinar la presencia de estos compuestos mediante este tipo de análisis. La Figura 3.1.b muestra la placa de TLC para las borras de neutralización utilizadas. Se observa la presencia de diferentes clases lipídicas: triacilgliceroles, ácidos grasos libres, orizanoles, esteroides, diacilgliceroles, diacilgliceroles y fosfolípidos. Este tipo de análisis permite determinar en forma cualitativa qué clases lipídicas son mayoritarias y cuáles son minoritarias en la muestra. De esta manera, se concluye que los triacilgliceroles y los ácidos grasos libres se encuentran en cantidad apreciable conjuntamente con los orizanoles. Sin embargo, en la zona más cercana al punto de siembra algunas de las clases lipídicas, como los esteroides y los diacilgliceroles, poseen el

mismo Rf con lo cual es difícil decidir si ambos se encuentran presentes o solamente uno de ellos. Ello deja en evidencia la complejidad de la composición de las borras de neutralización utilizadas y la importancia del estudio cuantitativo de las clases lipídicas presentes.

**Figura 3.1.-** Cromatografía en capa delgada utilizando una mezcla éter de petróleo-dietileter-ácido acético (80:20:1, v/v/v): a) ácidos grasos libres y estándar de orizanoles y b) estándar de orizanoles y borras de neutralización.



### 3.2. Análisis cuantitativo.

#### *Contenido de agua*

El contenido de agua determinado mediante liofilización fue de 36.2 %. El agua constituye más de la tercera parte de la masa de las borras lo cual implica que es una de las especies químicas mayoritarias. Dado el alto contenido de

agua en la matriz de interés, es necesario el “secado” de este material como primera etapa de cualquier método de concentración de orizanoles que se estudie.

### *Contenido de jabones*

La determinación del contenido de ácidos grasos libres de las borras crudas previamente acidificadas se realizó mediante GC según el método descrito en el Capítulo 2 (ítem 2.3). Este fue del 25.0 %. Dado que los ácidos grasos libres en las borras, en realidad se encuentran bajo forma de jabones de sodio, el contenido de jabones se calculó teniendo en cuenta el peso molar medio de los ácidos grasos constituyentes del aceite de salvado de arroz. Dicho cálculo se describe a continuación:

$$AGL_{jabones\ de\ sodio} = \frac{AGL * PM_{jabones\ de\ sodio}}{PM_{AG}} \quad [3.1]$$

AGL.- porcentaje de ácidos grasos libres en las borras crudas.

PM<sub>jabones de sodio</sub>.- peso molar medio de los jabones de sodio de los ácidos grasos constituyentes del aceite de salvado de arroz.

PM<sub>AG</sub>.- peso molar medio de los ácidos grasos constituyentes del aceite de salvado de arroz.

El peso molar medio de los ácidos grasos constituyentes de los triacilgliceroles de un aceite de salvado de arroz es de 279 g/mol y para los correspondientes jabones de sodio es de 302 g/mol. El contenido de ácidos grasos libres expresados como jabones de sodio es de 27.0 %. Los ácidos grasos libres (bajo forma de jabones) son una parte importante de las especies químicas que constituyen las borras de neutralización y deben ser tenidos en cuenta al momento de diseñar un método de concentración de los orizanoles.

#### *Contenido de fosfolípidos*

El contenido de fosfolípidos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con el método descrito en el capítulo 2 (ítem 2.8). Este fue de 0.3 %. Por lo tanto, esta especie química es minoritaria en las borras de neutralización.

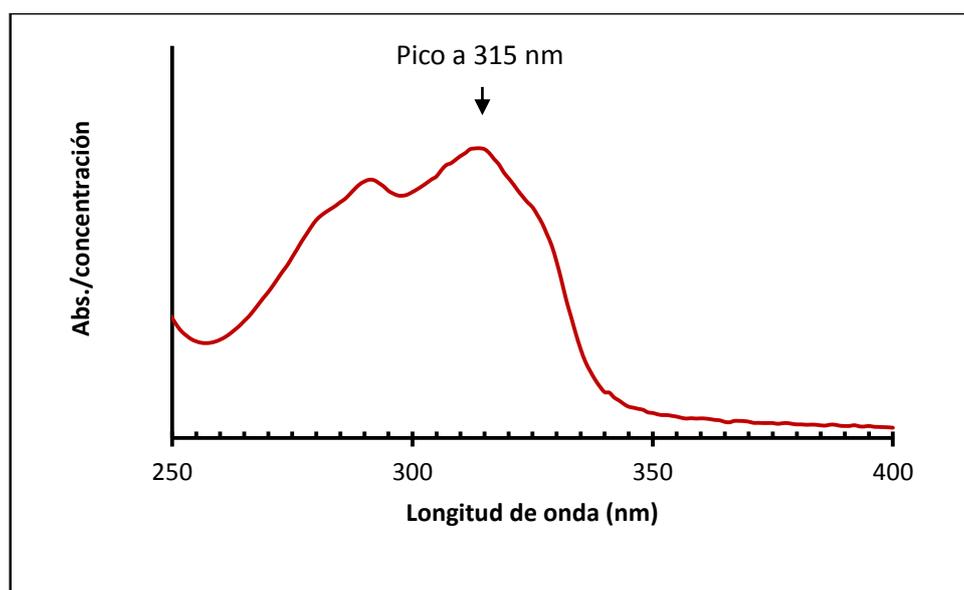
#### *Contenido de mono, di y triglicéridos*

El contenido de mono, di y triacilgliceroles fueron determinados mediante el procedimiento descrito en el Capítulo 2 (ítem 2.4). El contenido total de triacilgliceroles fue de 15.8 %, el de diacilgliceroles fue de 1.2 % y los monoacilgliceroles no se encontraron en cantidades significativas. Los triacilgliceroles son los únicos glicéridos que se encuentran en cantidades

significativas en las borras de neutralización, siendo los mono- y los diacilgliceroles componentes minoritarios.

### *Contenido de orizanoles*

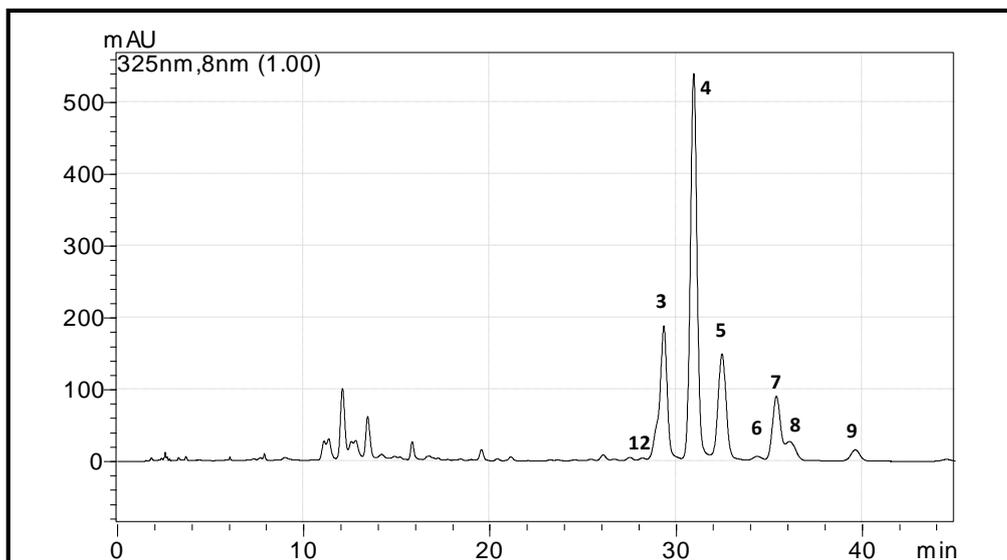
La Figura 3.2 muestra el espectro de absorción obtenido utilizando hexano como solvente hexano para las borras de neutralización del aceite de salvado de arroz. El espectro presenta un máximo de absorbancia a 314-315 nm, característico de los orizanoles, según lo informado por Seetharamaiah *et al.* (1986).



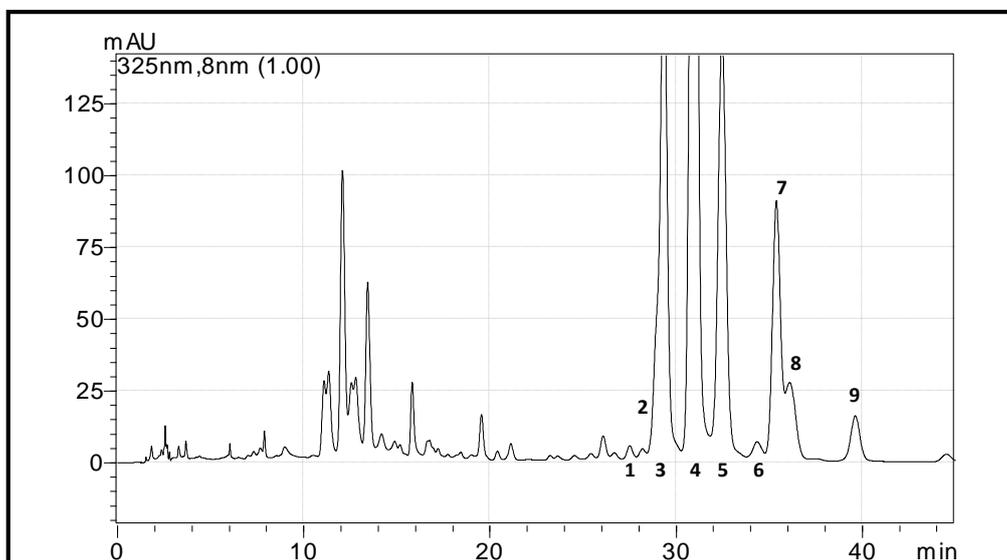
**Figura 3.2.-** Espectro de absorción de una solución en hexano de las borras de neutralización del aceite de salvado de arroz (se indica el máximo a 315 nm utilizado para la cuantificación de los orizanoles).

En la figura 3.3 se muestra el cromatograma correspondiente a los orizanoles presentes en las borras de neutralización, obtenido mediante

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El perfil cromatográfico de los orizanoles es similar al encontrado en bibliografía (Xu *et al.*, 1999; Paucar-Menacho *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2012).



(a)



(b)

**Figura 3.3.-** Cromatograma obtenido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las borras de neutralización del aceite de salvado de arroz: a) atenuación normal y b) baja atenuación.

En la tabla 3.1 se presentan los nombres de las diferentes moléculas que conforman el grupo de los orizanoles y su identificación en el cromatograma de la figura 3.3 (de acuerdo con lo publicado por Xu *et al.*, 1999).

**Tabla 3.1.-** Identificación de las diferentes moléculas correspondientes a los orizanoles de acuerdo con el cromatograma de la figura 2.

Molécula de orizanol	Pico
Ferulato de $\Delta$ -7 estigmasterilo	1
Ferulato de estigmasterilo	2
Ferulato de cicloartenilo	3
Ferulato de 24-metilen cicloartenilo	4
Ferulato de $\Delta$ -7 campesterilo	5
Ferulato de campesterilo	5
Ferulato de $\Delta$ -7 sitosterilo	6
Ferulato de $\beta$ sitosterilo	7
Ferulato de campestanilo	8
Ferulato de sitostanilo	9

La composición porcentual de los orizanoles en las borras se indica en la tabla 3.2. Los mayoritarios son el ferulato de 24-metilen cicloartenilo, el ferulato de cicloartenilo, el ferulato de  $\Delta$ -7 campesterilo, el ferulato de campesterilo y el ferulato de  $\beta$  sitosterilo. Si bien el ferulato de  $\Delta$ -7 campesterilo y el ferulato de campesterilo se encuentran dentro de un mismo pico, según lo informado por Xu *et al.* (1999), el ferulato de campesterilo es el orizanol mayoritario.

**Tabla 3.2.-** Composición porcentual de los orizanoles de las borras de neutralización del aceite de salvado de arroz.

<b>Molécula de orizanol</b>	<b>Contenido (%)</b>
<b>Ferulato de <math>\Delta</math>-7 estigmasterilo</b>	0.3
<b>Ferulato de estigmasterilo</b>	0.2
<b>Ferulato de cicloartenilo</b>	16.1
<b>Ferulato de 24-metilen cicloartenilo</b>	39.4
<b>Ferulato de <math>\Delta</math>-7 campesterilo</b>	13.5
<b>Ferulato de campesterilo</b>	
<b>Ferulato de <math>\Delta</math>-7 sitosterilo</b>	0.6
<b>Ferulato de <math>\beta</math> sitosterilo</b>	8.0
<b>Ferulato de campestanilo</b>	2.7
<b>Ferulato de sitostanilo</b>	1.5

Las borras alcalinas industriales utilizadas como materia prima (BC), presentaron un contenido de orizanoles determinado por espectrofotometría UV de 2.4 % pero de 4.2 % determinado por HPLC. Este valor se encuentra en el rango del contenido de orizanoles encontrado en la bibliografía (Diack *et al.*, 1994; Lloyd *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2004).

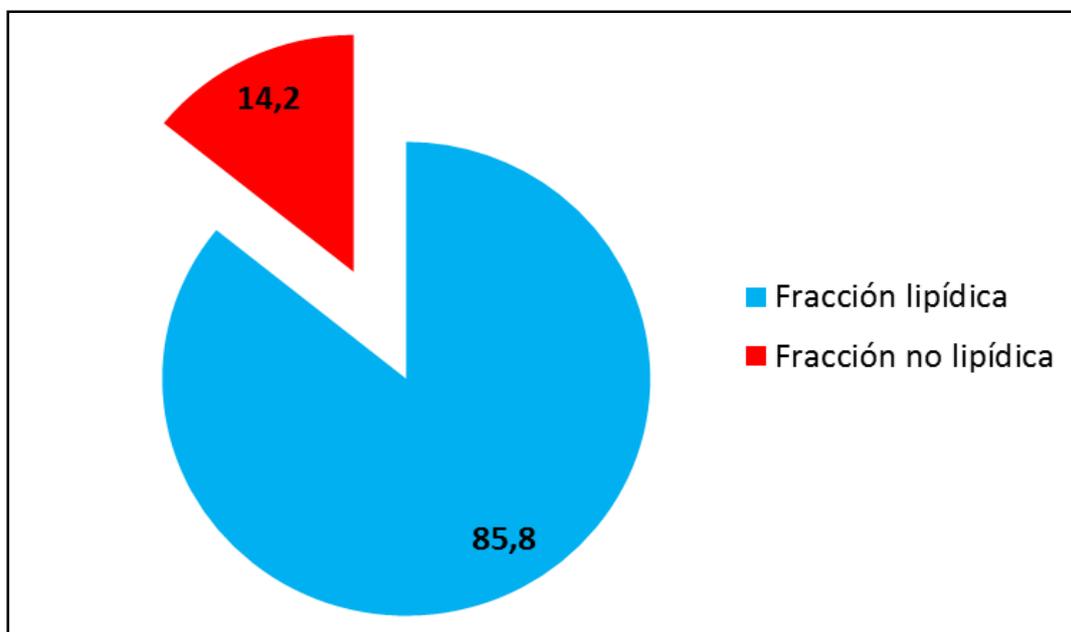
El método utilizado en esta tesis para la determinación del contenido de orizanoles presentes en la borras fue el espectrofotométrico. Este método posee la ventaja de ser más rápido y menos costoso que el método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, el método de HPLC requiere de estándares de elevada pureza, los cuales presentan un costo elevado y, algunas empresas como Sigma-Aldrich, aún no cuenta con ellos.

### **3.3. Composición global de las borras de neutralización.**

En la figura 3.4 se presenta el contenido de material lipídico y el no lipídico en las borras de neutralización liofilizadas, de acuerdo con el procedimiento explicado en el ítem 2.2 del presente capítulo. El contenido total de las clases lipídicas alcanzó un porcentaje de 85.8 %, quedando un remanente de 14.2 % de otras especies químicas que representan la fracción no lipídica. Este material no lipídico seguramente consiste de una matriz constituida por sales generadas en la etapa de neutralización alcalina las cuales son poco afines por un solvente orgánico. Debe considerarse que el tratamiento ácido realizado para esta determinación puede hacer que algunas clases lipídicas como los fosfolípidos se hidraten y no se recuperen en la fase etérea. Por lo tanto, esta determinación representa en forma aproximada la fracción de lípidos contenidos en las borras de neutralización liofilizadas.

La Figura 3.5 muestra la composición porcentual de las borras crudas y el peso relativo de cada uno de los diferentes compuestos analizados de acuerdo con lo ya mencionado en el apartado anterior (3.2). El contenido total de las clases lipídicas comunes incluyendo el agua fue del 83.8 %. Ello deja un contenido de material sin identificar de 16.2 %. Este contenido de material sin identificar seguramente está constituido por sales generadas durante la neutralización alcalina.

**Figura 3.4.-** Fracción lipídica y no lipídica de las borras alcalinas industriales crudas liofilizadas (BS), provenientes de la neutralización industrial de aceite de salvado de arroz.

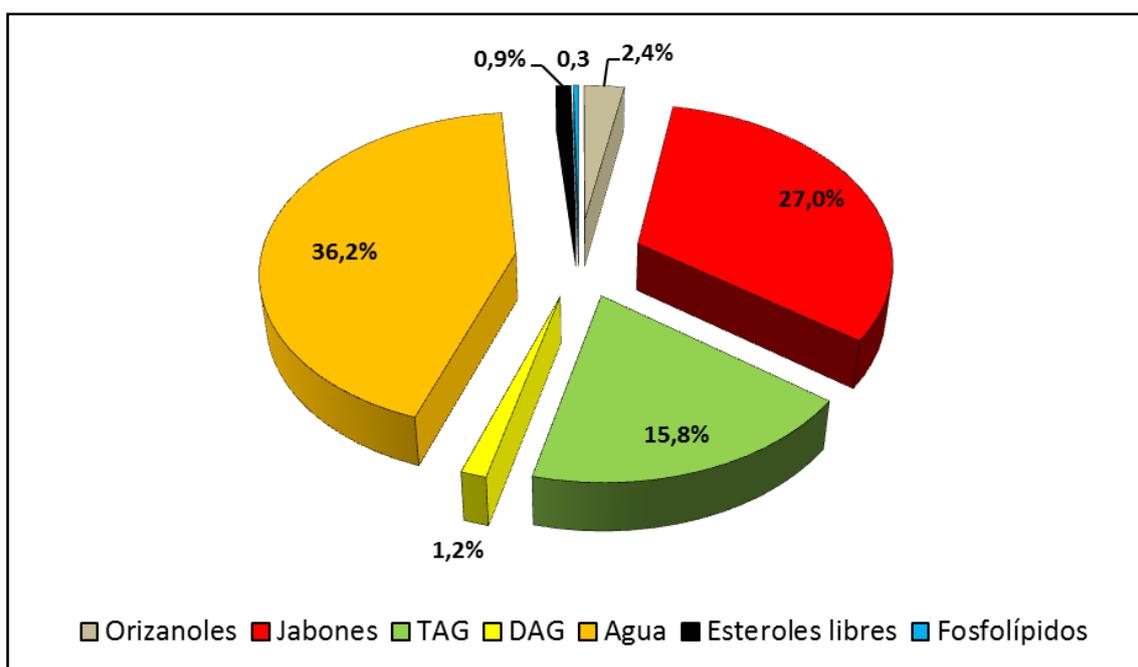


La suma total de las diferentes clases lipídicas en las borras crudas representaron un 47,6 %, lo cual representa un 74.6 % expresado en base seca (borras liofilizadas). Este valor difiere en un 11.2 % del valor determinado mediante la extracción con éter de petróleo (85.8 %). Por lo tanto, una fracción de lípidos no pudieron ser identificados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las determinaciones realizadas para esta cuantificación poseen un error estimado entre el 5 % y el 10 %.

En las borras crudas se encontró cantidades pequeñas de tocoferoles y tocotrienoles, determinados por cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo con la técnica descrita en el capítulo 2 (ítem 2.6). Los valores para

cada uno de ellos se muestran en la tabla 3.3. El contenido de estos antioxidantes naturales es muy bajo en comparación con el 2.4% de orizanoles (aproximadamente 24000 ppm).

**Figura 3.5.-** Composición porcentual de las borras alcalinas industriales crudas (BC), provenientes de la neutralización industrial de aceite de salvado de arroz.



**Tabla 3.3.-** Contenido de tocoferoles y tocotrienoles en las borras crudas (BC).

	Contenido (ppm)
<b>Tocoferoles</b>	6
<b>Tocotrienoles</b>	7

#### 4. Conclusiones

El contenido de orizanoles de las borras crudas está dentro del rango informado por otros investigadores. El contenido de agua presentó un valor inferior a 57 %, correspondiente al informado por Kaewboonnum *et al.* (2010) y el indicado por Narayan *et al.* (2006) se encuentra en el rango de 65 % a 70 %. El contenido de orizanoles en las borras analizadas fue de 2.4 %, también menor al informado por Kaewboonnum *et al.* (2010), que informó un valor de 4.9 % (en base húmeda). Sin embargo, otros trabajos de investigación mencionan que dicho contenido se encuentra en un rango de 1.5 % a 6.5 %, con lo cual las borras de neutralización suministradas por Arrozur S.A. se encuentran dentro de dicho rango (Rao *et al.*, 2002; Indira *et al.*, 2005; Narayan *et al.*, 2006). Según Narayan *et al.* (2006) el contenido de glicéridos está en el rango de 2.0 % a 2.5 %, lo cual es bajo respecto al valor encontrado en las borras de neutralización suministradas por Arrozur S.A., que fue mayor al 15 %.

Las borras presentan un contenido de material “no lipídico” con un porcentaje mayor al 10 %.

Las diferencias encontradas en la composición de las borras de neutralización respecto a los datos de bibliografía, hace que sea importante la caracterización de ellas a los efectos de determinar la composición del material de partida ya que ello deberá tenerse en cuenta para la implementación del método a seguir con el fin de concentrar los orizanoles.

En conclusión, las borras son un material lipídico complejo por lo que es necesario conocer la composición de ellas por los motivos expresados anteriormente. Además, dicha composición estará afectada por las condiciones del proceso de refinación utilizado.

En el siguiente capítulo se estudiarán diferentes procesos de concentración muchos de los cuales han sido referenciados por diferentes investigadores. Estos procedimientos serán probados a los efectos de observar cómo se comportan con las borras de neutralización estudiadas.

## 5. Bibliografía

- Chen M. H.; Bergman C. J. Influence of kernel maturity, milling degree, and milling quality on rice bran phytochemical concentrations. *Cereal Chem.* (2005) 82: 4-8.
- Da Silva M. A.; Sanches C.; Amante E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. *J. Food Eng.* (2005) 75: 487-491.
- Danielski L.; Zetzi C.; Hense H.; Brunner G. A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran. *J. Supercritical-Fluids* (2005) 34: 133-141.
- Diack M.; Saska M. Separation of vitamin E and  $\gamma$ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1994) 71: 1211-1217.
- Du C.; Zhang W.; Feng R. Preparation of oryzanol comprises solvent extraction of RBO. Inventors; Du C.; assignee (march 31, 2004; August 24, 2005). Patent Nos. CN1485330-A & CN1216065-C.

- Ghosh M. Review on recent trends in RBO processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2007) 84: 315-324.
- Ha T. Y.; Ko S. N.; Lee S. M.; Kim H. R.; Chung S. H.; Kim S. R. Changes in nutraceutical lipid components of rice at different degrees of milling. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* (2006) 108: 175-181.
- Indira, T. N.; Narayan, A. V.; Barhate, R. S.; Raghavarao, K. S. M. S.; Khatoon, S.; Channaiah, G.; Rao, A. R. G. R. A.; Prakash, V. (2005) Process for the production of oryzanol enriched fraction from rice bran oil soapstock. US Patent 6896911 B2.
- Kaewboonnum P.; Vechpanich J.; Pravitt Santiwattana P.; Shotipruk A.  $\gamma$ -Oryzanol Recovery from Rice Bran Oil Soapstock. *Sep. Sci. Technol.* (2010) 45: 1186–1195.
- Krishna A. G. G.; Khatoon S.; Shiela P. M.; Sarmandal C. V.; Indira T. N.; Mishra A. Effect of refining of crude RBO on the retention of oryzanol in the refined oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2001) 78: 127-131.
- Lai S. M.; Hsieh H. L.; Chang C. W. Preparative separation of  $\gamma$ -oryzanol from RBO by silica gel column chromatography. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* (2005) 28: 145-160.
- Lema-García M. J.; Herrero-Martínez J. M.; Simó-Alfonso E. F.; Mendonca C. R. B.; Ramis-Ramos G. Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -orizanol. *Food Chem.* (2009) 115:389-404.
- Lloyd B. J.; Siebenmorgen T. J.; Beers K. W. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.* (2000) 77: 551-555.

- Manjula S.; Subramanian R. Enriching oryzanol in rice bran oil using membranes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2008) 151: 629-637.
- Narayan A. V.; Barhate R. S.; Raghavarao K. S. M. S. Extraction and purification of oryzanol from RBO and RBO soapstock. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2006) 83: 663-670.
- Paucar-Menacho L. M.; Hackbart da Silva L.; Anderson de Souza Santana; Guaraldo Gonçalves L. A. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do  $\gamma$ -oryzanol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* (2007) 27: 45-53.
- Patel M.; Naik S. N.  $\gamma$ -oryzanol from RBO- A review. *J. Sci. Ind. Res.* (2004) 63:569-578.
- Rao, K. V. S. A.; Rao, B. V. S. K.; Kaimal, T. N. B. (2002) Process for the isolation of oryzanols from rice bran oil soapstock. US Patent 6410762.
- Ribeiro Pestana-Bauer V., Zambiasi R. C., Mendonça C. R. B., Beneito-Cambra M., Ramis-Ramos G.  $\gamma$ -Oryzanol and Tocopherol Contents in Residues of Rice Bran Oil Refining. *Food Chem.* (2012) 134: 1479-1483.
- Seetharamaiah, G. S. and Prabhakar, J. V. Oryzanol content of Indian Rice Bran Oil and its Extraction from Soap Stock, *J. Food. Sci. Technol.*, 23:270-273 (1986).
- Stoggl W.; Huck C.; Wongyai S.; Scherz H.; Bonn G. Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, and  $\gamma$ -oryzanol in crude RBO by liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detection employing silica C30 stationary phases. *J. Sep. Sci.* (2005) 28: 1712-1718.

- Xu Z.; Godber J. S. Purification and Identification of Components of  $\gamma$ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *J. Agric. Food Chem.* (1999) 47: 2724-2728.
- Zullaikah S.; Melwita E.; Ju Y. H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. *Biores. Technol.* (2008) 100: 299-302.

## **Capítulo 4**

# **Obtención de concentrados en orizanoles a partir de borras de neutralización y caracterización de los mismos**

# Índice

- 1.- Introducción.
- 2.- Materiales y métodos.
  - 2.1.- Liofilización.
  - 2.2. Método de Soxhlet.
  - 2.3. Métodos de partición con solventes.
    - 2.3.1. Método 1 (M1).
    - 2.3.2. Método 2 (M2).
    - 2.3.3. Método 3 (M3).
    - 2.3.4. Método 4 (M4).
  - 2.4. Parámetros de evaluación.
    - 2.4.1. Rendimiento másico (R).
    - 2.4.2. Factor de concentración (F).
    - 2.4.3. Porcentaje de recuperación (P).
3. Resultados y discusión.
  - 3.1. Eliminación del agua por liofilización.
  - 3.2. Método Soxhlet.
  - 3.3. Método M1.
  - 3.4. Método M2.
  - 3.5. Método M3.
  - 3.6. Método M4.
  - 3.7. Comparación de los diferentes métodos de concentración utilizados.
- 4.- Conclusiones.
- 5.- Bibliografía.

## 1. Introducción.

Diferentes métodos han sido reportados para la obtención de extractos concentrados en orizanoles a partir del salvado de arroz, del aceite de salvado de arroz crudo o de residuos del proceso de refinación como las borras.

Algunos autores han aplicado el método tradicional de extracción en Soxhlet, mediante el cual se alcanzaron porcentajes de entre 30 y 38 % de orizanoles (Kaewboonnum *et al.*, 2010). Este tipo de tratamiento fue realizado sobre borras deshidratadas y saponificadas para luego realizar la extracción por Soxhlet utilizando acetato de etilo como solvente. Si bien este procedimiento es relativamente simple, posee la desventaja de que el extracto conteniendo los orizanoles se expone a una temperatura relativamente elevada (la de ebullición del solvente utilizado) durante todo el período de extracción. Por este se han estudiado también otros métodos alternativos que no impliquen el uso de temperaturas elevadas. Entre ellos se encuentran algunos métodos simples que involucran la separación de los compuestos de interés del resto de los constituyentes del material de partida mediante su reparto entre solventes de diferente polaridad, procedimientos que se pueden realizar en una o varias etapas. Entre estos tipos de procedimiento se destaca el reportado por Seetharamaiah y colaboradores, que informaron la obtención de un extracto conteniendo hasta un 26 % de orizanoles a partir de borras con un contenido inicial de entre 2 y 3 % (Seetharamaiah *et al.*, 1986). Dicho procedimiento consistió básicamente en la disolución de las borras en una mezcla metanol/eter dietílico y la posterior extracción de los orizanoles mediante

sucesivos lavados de la misma con una solución acuosa básica. Los orizanoles se recuperaron de esta última mediante neutralización y posterior extracción con solventes. Se ha estudiado la eficiencia de esta metodología sobre las borras industriales que produce en nuestro la empresa ARROZUR S.A. (Romeu *et al.*, 2007), alcanzándose extractos enriquecidos en orizanoles.

A través de algunos métodos de partición con solventes como por ejemplo el método de Folch modificado utilizando una mezcla de hexano-isopropanola temperatura ambiente es posible obtener concentrados con un contenido de orizanoles de alrededor de entre 5 % y 8 %.

También se han publicado métodos más complejos que involucran varias etapas como la separación en columnas y la cristalización (Kaewboonnum *et al.*, 2010; Zullaikah *et al.*, 2009). Mediante la aplicación de estos métodos fue posible llegar a incluso separar los diferentes tipos de orizanoles con un porcentaje de pureza mayor al 70 % (Xu *et al.*, 1999). Obviamente cuanto mayor es la complejidad y el número de etapas involucradas en el método mayor es la pureza del concentrado obtenido. También siempre existirá un compromiso entre el grado de complejidad del método y la calidad del producto con la mayor o menor facilidad de su aplicación a escala industrial.

En este capítulo las borras de neutralización industriales fueron sometidas a diferentes métodos para la obtención de extractos enriquecidos en orizanoles. Se estudio la eficiencia de métodos tradicionales como el Soxhlet y de otros métodos del tipo de partición con solventes. Algunos se aplicaron

directamente sobre las borras nativas (métodos directos) mientras que en otros casos previamente se realizó alguna modificación química de las mismas (métodos indirectos). El propósito de estos últimos fue el de introducir modificaciones estructurales en alguno de los constituyentes de la mezcla de forma de modificar la afinidad de los mismos por los diferentes solventes utilizados en el método, maximizando así la eficiencia de la separación.

El diseño de estos métodos se basó en la información de composición de la materia prima presentada en el capítulo 3, donde se indicó que las borras se contienen mayoritariamente de agua, ácidos grasos libres, triacilgliceroles y orizanoles. Dado que el agua representó un 36.2 % en peso de este material, la eliminación del agua fue en todos los casos la primer etapa de concentración, ya que esta operación implica un incremento en la concentración inicial de orizanoles de un 1.4 %.

## **2. Materiales y métodos.**

Se utilizaron las borras de neutralización industriales, suministradas gentilmente por ARROZUR S.A. Una vez recibidas en el laboratorio fueron almacenadas en freezer a -20 °C hasta su utilización.

## 2.1. Liofilización.

Previo a la aplicación de cualquiera de los métodos de concentración, las borras fueron liofilizadas como se describe en el capítulo 3. Las borras liofilizadas se homogeneizaron mediante molienda (utilizándose un molinillo de café del tipo “doméstico”). Las borras molidas fueron utilizadas en forma inmediata o almacenadas a -20 °C para hasta su utilización.

Si bien estrictamente la liofilización no puede considerarse un método de concentración, dado el importante contenido de agua de las borras de neutralización, el efecto de la remoción de la misma sobre la concentración de los orizanoles es significativo.

A los efectos de diferenciar el material de partida tal como se obtiene de la empresa y el material liofilizado se utilizará la nomenclatura siguiente:

**BC:** borras de neutralización crudas, tal como se obtienen de la empresa Arrozur.

**BS:** borras de neutralización secas, luego de sometidas al proceso de liofilización y por lo tanto libres de humedad.

## 2.2. Método Soxhlet.

Se colocaron 3.5 gramos de borras liofilizadas en un cartucho de celulosa para Soxhlet y se armó el extractor, colocándose aproximadamente 200 mL de

solvente. Se utilizaron cuatro solventes diferentes: acetato de etilo, acetona, isopropanol y hexano. En todos los casos las extracciones se llevaron a cabo durante 6 horas. Luego de éste período de extracción el solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria a vacío, manteniendo el baño a 40 °C.

### **2.3. Métodos de partición con solventes.**

#### **2.3.1. Método 1 (M1).**

Se pesaron 0.7 g. de borras liofilizadas y se dispersaron en 5 mL de agua destilada, luego se agregaron 1.75 mL de metanol y 10.5 mL de dietileter. La mezcla se agitó y centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. La fase orgánica se trasvasó a un segundo tubo y se secó mediante el agregado de aproximadamente 1 g. de sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica se trasvasó a un segundo tubo y el sulfato de sodio anhidro se lavó con 5 mL. de una mezcla metanol-dietileter en igual proporción que la anterior. El solvente usado en el lavado se separó por centrifugación y se combinó con el primer extracto. Finalmente la mezcla de solventes se eliminó mediante corriente de nitrógeno hasta constatar peso constante.

### **2.3.2. Método 2 (M2).**

Se procedió de la misma manera que en el método M1 hasta la obtención del extracto metanol-dietileter, pero en lugar de remover el solvente se continuó como se describe a continuación.

Sobre dicho extracto se agregó 5 mL de solución acuosa de hidróxido de potasio al 5%, se agitó en vortex y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. Este procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario hasta observar que la capa acuosa quedó incolora (lo que se consiguió en general a partir del quinto lavado). Posteriormente los extractos acuosos se combinaron y sobre los mismos se agregó solución acuosa de ácido acético 1 N hasta pH neutro. Posteriormente se realizaron tres extracciones con 3.5 mL de éter dietílico cada una. Los extractos etéreos se combinaron y se lavaron 3 veces con 5 mL de agua destilada, luego se secó con sulfato de sodio anhidro, se recogió en otro tubo y se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno, obteniéndose el extracto como residuo sólido.

Este método fue descrito originalmente por Seetharamaiah y colaboradores (Seetharamaiah et al., 1986).

### **2.3.3. Método 3 (M3).**

A 0,7 g. de borras se le agregó 7 mL de agua destilada caliente a aproximadamente 60 °C se agitó enérgicamente hasta dispersión completa de

las borras. Posteriormente se agregó 9 mL de mezcla de solventes hexano/isopropanol (50:50 en volumen), se agitó en vortex y se centrifugó (3500 rpm, 15min), separándose así dos fases. La fase orgánica se separó y se lavó con agua destilada (2 x 5 mL) y se centrifugó. Se combinaron las aguas de lavado y sobre éstas se agregaron 9 mL de la mezcla hexano/isopropanol, se agitó en vórtex y se centrifugó. La fase orgánica se combinó con el extracto orgánico obtenido anteriormente, se secó con sulfato de sodio anhidro, se recogió en otro tubo y el solvente fue evaporado bajo corriente de nitrógeno, obteniéndose el extracto como un residuo sólido.

#### **2.3.4. Método 4 (M4).**

Se denominará como método 4 (M4) al método M2 aplicado sobre las borras a las que previamente se sometieron a una etapa de modificación química. Dicha modificación consistió en la etilación selectiva de los FFA mediante catálisis ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ /etanol).

Se pesaron 4 g. de borras liofilizadas se disolvieron en 28 mL de alcohol etílico absoluto y se dispersaron las borras mediante vortex y posteriormente ultrasonido durante 20 minutos. Posteriormente se agregó 41 mL de ácido sulfúrico y se dejó reaccionar a 40 °C durante 20 minutos, manteniendo la mezcla bajo agitación magnética. Transcurrido el tiempo de reacción de 20 minutos se trasvasó a un embudo de decantación y se lavó con 43 mL de éter de petróleo. Este procedimiento se realizó dos veces más. Los extractos etéreos se juntaron y se lavaron dos veces con 41 mL de agua. A la fase

orgánica se le agregó 3 gramos de sulfato de sodio y luego se centrifugó a 4000 rpm separando la fase orgánica a un balón de 250 mL. Luego se evaporó en un evaporador rotatorio a 40 °C hasta alcanzar masa constante.

Las borras así modificadas (BM) se destinaron posteriormente al método M2.

La puesta a punto de este método se describe en el apéndice 1.

## **2.4. Parámetros de evaluación**

A los efectos de evaluar la eficiencia de los diferentes métodos, además de la concentración de orizanoles en los diferentes extractos, se definieron los siguientes parámetros:

### **2.4.1. Rendimiento másico (R)**

Se definió el *rendimiento másico* simplemente como el porcentaje en masa del extracto obtenido, en base a la masa de borras de partida. Dado que como ya se mencionó, el agua aporta un porcentaje de masa considerable al material de partida, esta definición debe contemplar la consideración de las borras crudas (BC) o de las borras secas (BS) para el cálculo de este parámetro.

$$R_i = 100 \cdot \frac{m_e}{m_i} \quad [4.1]$$

Donde:  $m_e$  : masa de extracto obtenida

$m_i$  : masa de borras de partida

$i$  : es igual a BC o BS, según si el cálculo se realiza considerando la borras crudas o liofilizadas, respectivamente.

Se demuestra fácilmente la siguiente relación entre  $R_{BC}$  y  $R_{BS}$ :

$$R_{BC} = R_{BS} \cdot \frac{R_{Liof}}{100} \quad [4.2]$$

Donde  $R_{Liof}$  se refiere al rendimiento másico de la etapa de liofilización.

Obviamente  $R_{BC}$  representa el rendimiento másico “neto” del proceso de concentración, es decir considerando todas las etapas involucradas. Sin embargo  $R_{BS}$  resultará más útil a los efectos de evaluar el rendimiento exclusivamente del método de concentración propiamente dicho, el cual se realiza a partir de BS.

### 2.4.2. Factor de concentración (F)

Se definió el *factor de concentración* como el cociente entre el contenido de orizanoles del extracto obtenido sobre el correspondiente al del material de partida. Considerando también en este caso como referencia las BC o las BS, esta definición se puede expresar de la siguiente manera:

$$F_i = \frac{C_e}{C_i} \quad [4.3]$$

Donde:  $C_e$  : concentración de orizanoles en extracto obtenido

$C_i$  : concentración de orizanoles en las borras de partida

$i$  : es igual a BC o BS, según si el cálculo se realiza considerando la borras crudas o liofilizadas, respectivamente.

En forma análoga al caso de R, se puede demostrar fácilmente la relación entre  $F_{BC}$  y  $F_{BS}$ :

$$F_{BC} = F_{Liof} \cdot F_{BS} \quad [4.4]$$

Donde  $F_{Liof}$  se refiere al factor de concentración debido a la remoción de agua en la etapa de liofilización.

### 2.4.3. Porcentaje de recuperación (P)

Se definió como *recuperación* al porcentaje de orizanoles remanente en el extracto, en relación al contenido de orizanoles de las borras de partida.

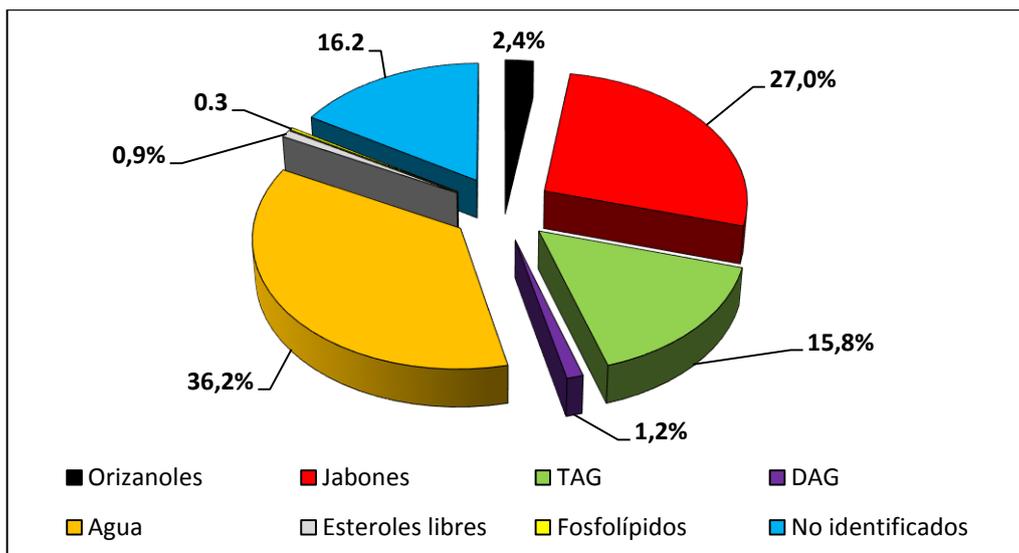
$$P = 100 * \frac{m_e * C_e}{m_i * C_i} = R * F \quad [4.3]$$

Dado que la liofilización no implica pérdida de orizanoles,  $(m_i \cdot C_i)$  tiene un único valor independientemente de que se refiera a BC o BS.

## 3. Resultados y discusión

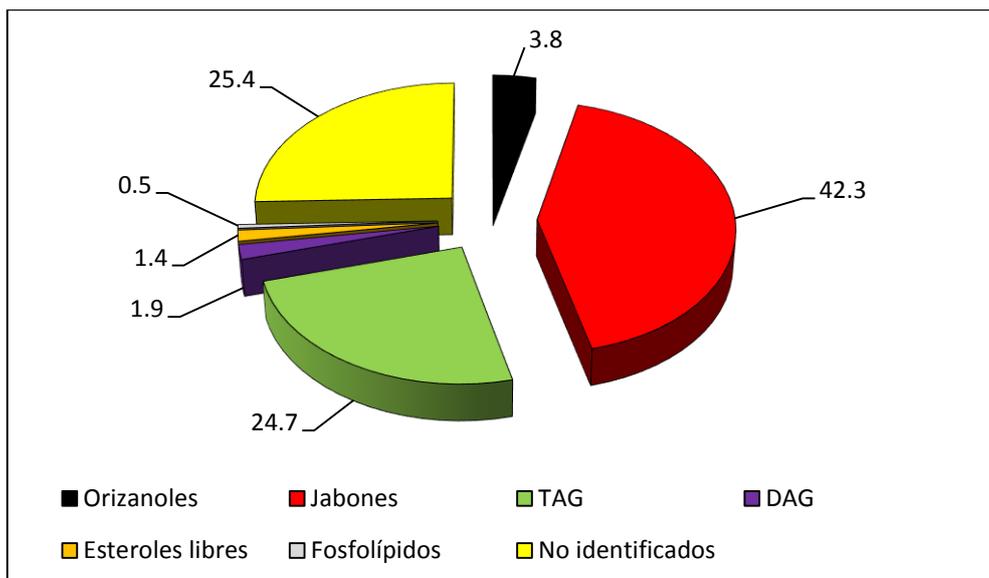
### 3.1. Eliminación del agua por liofilización

Como ya se mencionó en el Capítulo 2, las borras crudas (BC) presentan un contenido significativo de agua (36.2%), por lo que su remoción ejerce un efecto considerable sobre la concentración de los orizanoles en este material.



**Figura 4.1.-** Composición global de las borras alcalinas industriales crudas (BC), provenientes de la neutralización industrial de aceite de salvado de arroz.

En base a los valores de la composición global de las borras crudas (Figura 4.1) se calcularon los correspondientes valores para las borras liofilizadas o secas BS (Figura 4.2). La Tabla 4.1 muestra el efecto de la concentración debido a la eliminación del agua luego de la liofilización de las borras crudas. El factor de concentración fue de 1.6 mientras que el rendimiento alcanzó el 63.8 %. En esta etapa no existió pérdida de orizanoles y por ende el porcentaje de recuperación fue del 100 %.



**Figura 4.2.-** Composición global de las borras alcalinas industriales liofilizadas o secas (BS), provenientes de la neutralización industrial de aceite de salvado de arroz.

**Tabla 4.1.-** Concentración de orizanoles en las borras liofilizadas (BS) y parámetros de eficiencia determinados para esta etapa respecto a las borras crudas.

Orizanoles (%)	R <sub>Liof</sub> (%)	F <sub>Liof</sub>	P (%)
3.8	63.8 ± 2.5	1.6	100

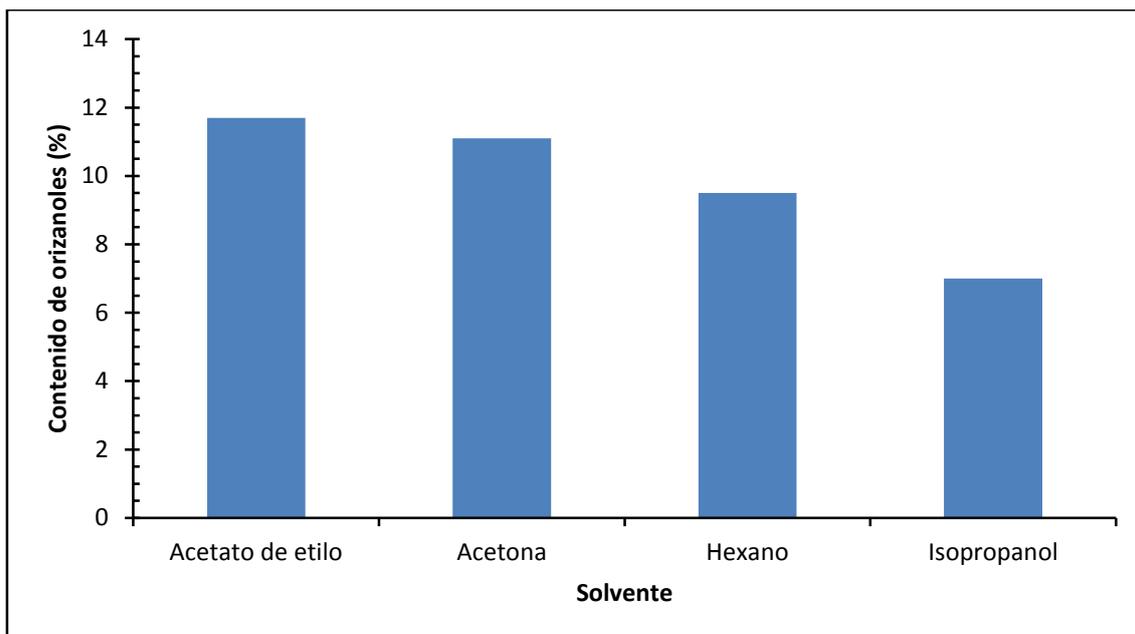
### 3.2. Método de Soxhlet

En la Tabla 4.2 se presentan los valores de contenido de orizanoles, rendimiento másico, factor de concentración y porcentaje de recuperación para el método de Soxhlet aplicado con los cuatro solventes mencionados.

**Tabla 4.2.-** Concentración de orizanoles en los extractos obtenidos por el método de extracción por Soxhlet con diferentes solventes y parámetros de eficiencia del método respecto a las borras liofilizadas (BS).

Solvente	Orizanoles (%)	R (%)	F	P (%)
Acetato de etilo	11.7 ± 1.2	32	3.1	99 ± 4
Acetona	11.1 ± 1.2	32	2.9	95 ± 4
Hexano	9.5 ± 1.0	31	2.5	78 ± 3
Isopropanol	7.0 ± 0.7	47	1.8	86 ± 3

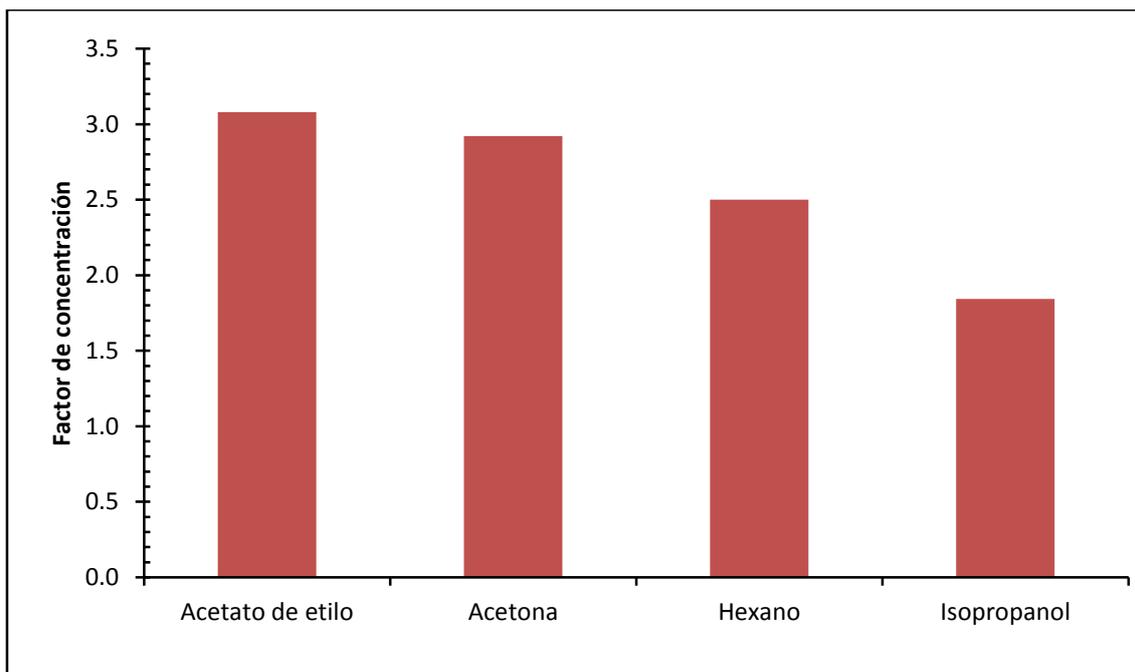
En cuanto al contenido de orizanoles (Tabla 4.2, Figura 4.3) se observa que el acetato de etilo y la acetona fueron los solventes que permitieron obtener extractos más concentrados (11.7 y 11.1% de orizanoles, respectivamente, muy próximos y dentro del intervalo de error). En orden de eficiencia los siguen el hexano (9.5 % de orizanoles) y finalmente la acetona (7.0% de orizanoles). Como era de esperar la eficiencia de este método depende en gran medida de las características del solvente utilizado y de la solubilidad en el mismo de los compuestos de interés.



**Figura 4.3.-** Contenido de orizanol en los extractos obtenidos por el método de Soxhlet aplicado con diferentes solventes.

El rendimiento másico (R) correspondiente a este método se ubicó entre un 31 y un 32 % para acetato de etilo, acetona y hexano, mientras que en el caso del isopropanol fue muy superior: 47 % (Tabla 4.2). Considerando que además este solvente fue el que produjo el extracto más pobre en orizanol, el elevado valor de R obtenido estaría indicando que se produjo la co-extracción de otros compuestos presentes en las borras.

En cuanto al factor de concentración (F) se observa que el mayor valor correspondió al acetato de etilo (Tabla 4.2, Figura 4.4), cuyo extracto resultó 3.1 veces más concentrado que las borras de partida (BS). En segundo lugar se ubica la acetona, luego el hexano y en último lugar el isopropanol, con un valor de F de 1.8.



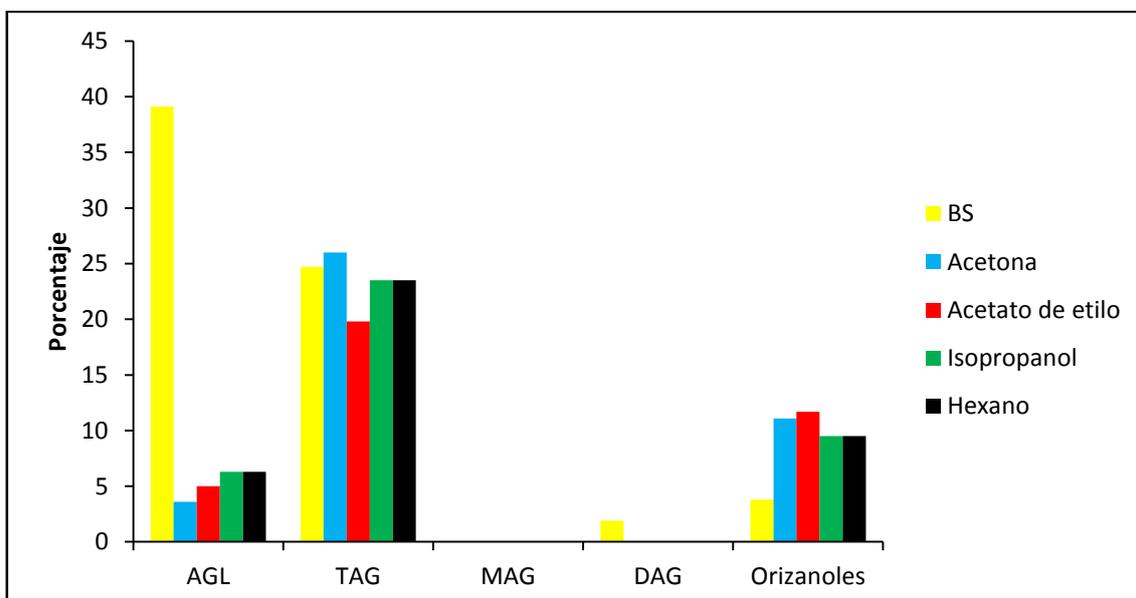
**Figura 4.4.-** Factores de concentración (F) de orizanoles para el método Soxhlet con diferentes solventes.

Finalmente, los mayores valores de porcentaje de recuperación (P) correspondieron al acetato de etilo y a la acetona, cuyos extractos conservaron el 99 y el 95% de los orizanoles presentes en las borras de partida (BS), respectivamente. Por lo que estos solventes, además de presentar una elevada eficiencia para la extracción de los compuestos de interés (P), son también los que ofrecieron una mayor selectividad, ya que sus extractos presentaron los mayores valores de F.

En cambio en el caso del hexano y, en mayor medida, el isopropanol, los extractos fueron más pobres en orizanoles y, además, en el residuo de la extracción quedan cantidades considerables de orizanoles sin extraer.

Además del contenido de orizanoles se determinó el contenido de glicéridos (mono-, di- y triglicéridos) y el contenido de ácidos grasos libres en los extractos obtenidos con cada solvente (Figura 4.5).

Los concentrados obtenidos presentaron diferencias importantes en el contenido de los ácidos grasos libres respecto a las borras liofilizadas o secas (BS), pasando de 39.1 % a un valor en los concentrados de alrededor del 5 %. Sin embargo, el contenido de triacilgliceroles presentó un leve cambio respecto a las borras de partida. Existen diferencias marcadas entre los diferentes métodos. El isopropanol extrajo una cantidad elevada de ácidos grasos libres respecto al resto de los solventes. Ninguno de ellos presentó un contenido significativo de monoacilgliceroles y diacilgliceroles. Los triacilgliceroles si bien presentaron algunas diferencias no fueron tan importantes como en el caso de los ácidos grasos libres.



**Figura 4.5.-** Concentración de las diferentes clases lipídicas en los concentrados obtenidos mediante el método Soxhlet con diferentes solventes y en las borras liofilizadas (BS).

### 3.3. Método M1

La Tabla 4.3 muestra los valores correspondientes a los parámetros de eficiencia determinados para el método 1 así como el contenido de orizanoles alcanzado.

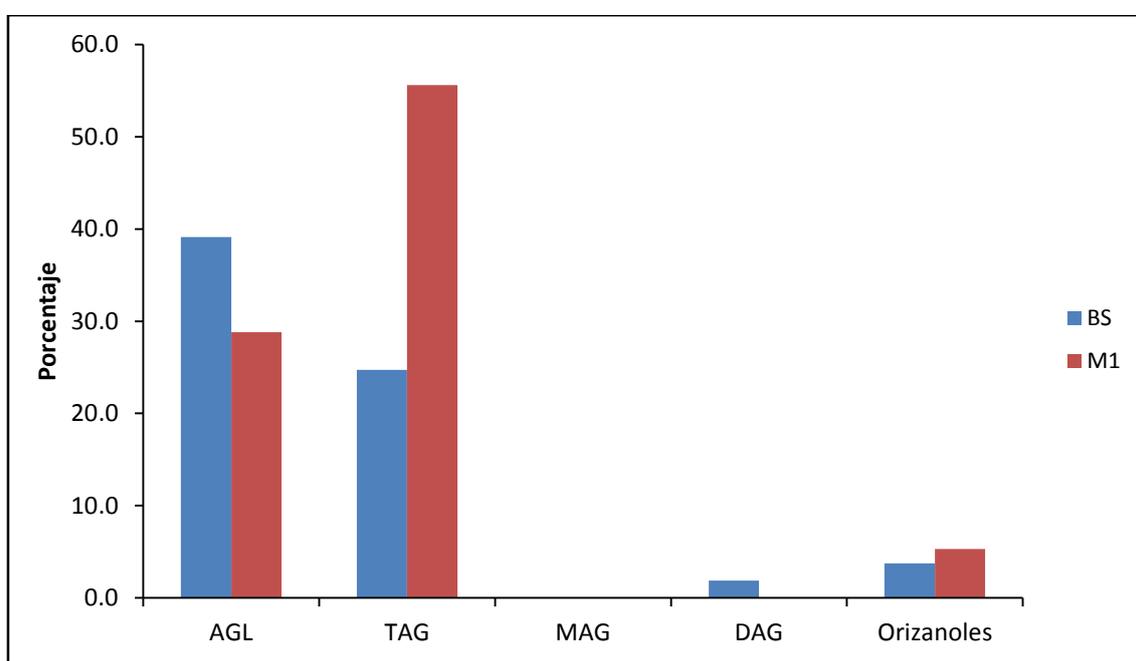
**Tabla 4.3.-** Concentración de orizanoles en el extracto obtenido por el Método M1 y parámetros de eficiencia del mismo.

Orizanoles (%)	R (%)	F	P (%)
5.3	33	1.4	45

El valor de contenido de orizanoles fue de 5.3 % lo cual implicó un factor de concentración expresado respecto a las borras liofilizadas de 1.4. El rendimiento másico fue de 33 % lo cual supuso recuperar la tercera parte de la masa original de borras utilizadas. El porcentaje de recuperación alcanzó un valor de tan solo 45 % ello significa que solamente prácticamente la mitad de los orizanoles presentes en las borras no se extrajeron, permaneciendo en la fase acuosa en la que se dispersó el material de partida.

La Figura 4.6 muestra la concentración de las diferentes clases lipídicas y de orizanoles en el las borras liofilizadas (BS) y en el concentrado obtenido mediante el método M1 a partir de las mismas. Los triacilgliceroles (TAG) fueron los lípidos que presentaron mayor variación en su concentración con

respecto a las borras crudas (BC), concentrándose 3.5 veces, mientras que los ácidos grasos libres se concentraron levemente. Esto indica que el método presenta una relativa baja selectividad por los compuestos de interés, ya que sólo se verificó una disminución del 10 % de los ácidos grasos libres (AGL), sino que en el caso de los TAG su concentración se multiplicó por un factor aún mayor que el correspondiente a los orizanoles.



**Figura 4.6.-** Concentración de las diferentes clases lipídicas en los concentrados obtenidos mediante el método Soxhlet con diferentes solventes y en las borras liofilizadas (BS).

### 3.4. Método M2

La Tabla 4.4 muestra el contenido de orizanoles del extracto obtenido por el Método M2 y los parámetros de eficiencia correspondientes. El rendimiento

másico resultó sensiblemente inferior a los obtenidos con métodos anteriores, alcanzando un valor de tan sólo el 8 %. Esto era de esperarse ya que este método constituye una continuación del Método M1, por lo que implica la aplicación de varias operaciones de separación a partir del extracto obtenido en esta primera instancia y en consecuencia la pérdida de más material durante los procedimientos. Sin embargo, el método resulta más eficiente en relación a la concentración de orizanoles alcanzada (17.8 %) y el factor de concentración correspondiente (4.7 %).

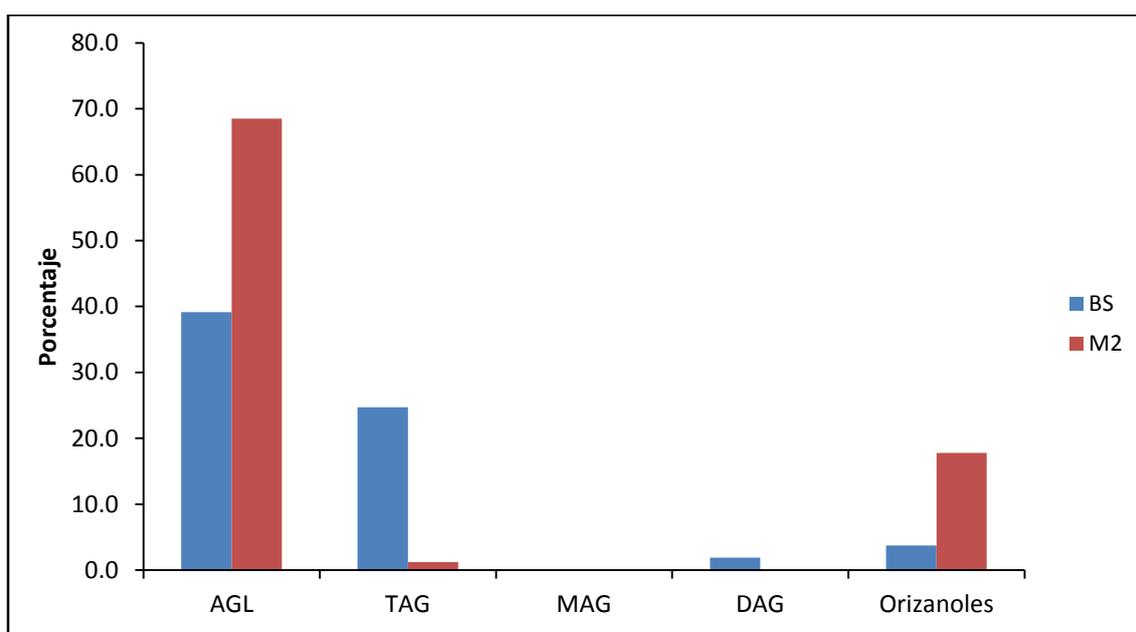
**Tabla 4.4.-** Concentración de orizanoles en el extracto obtenido por el Método M2 y parámetros de eficiencia del mismo.

Orizanoles (%)	R (%)	F	P (%)
17.8	8	4.7	36

El porcentaje de recuperación presentó una disminución en relación al método anterior, presentando en este caso un valor de 36%.

En cuanto a las principales clases lipídicas que acompañan a los orizanoles en el extracto obtenido mediante este método (Figura 4.7), se observa una importante disminución en la proporción de triacilgliceroles con relación a las borras liofilizadas de partida (24.7 a 1.2 %). Este método por lo tanto discrimina con mayor eficiencia que el método M1 a este tipo de compuestos, que en el caso del extracto obtenido mediante el método M1 los triacilgliceroles representaron el 55.6 %.

Sin embargo, se observó que la proporción de ácidos grasos libres se incrementó en forma muy significativa, desde un 39.1 en las borras BS hasta un 65.5 % en el extracto obtenido en por el método M2.

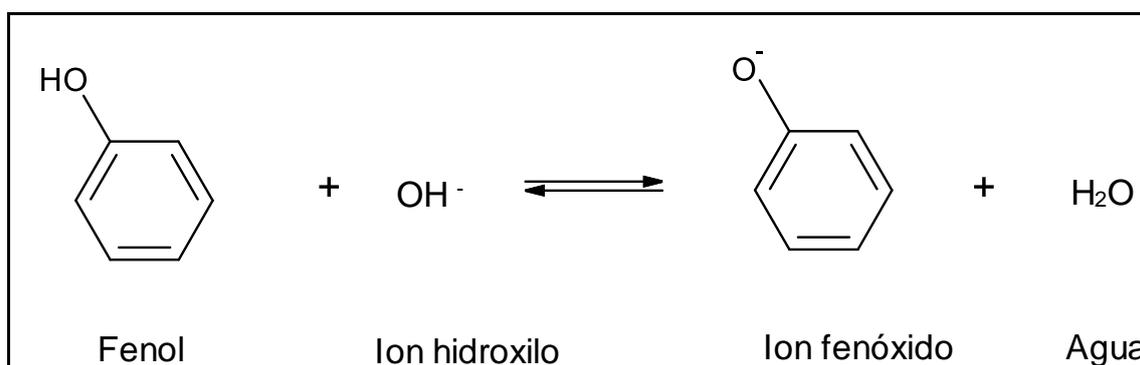


**Figura 4.7.-** Concentración de las diferentes clases lipídicas en el concentrado obtenido mediante el método M2.

Si se consideran las concentraciones de TAG y de AGL obtenida por el método M1: 55.6 y 28.8 %, respectivamente (Figura 4.5) y se calcula el efecto que tendría sobre el porcentaje de AGL si se eliminaran completamente los TAG en dicho extracto, se obtiene un valor de 64.9 % ( $AGL = 100 * 28.8 / (100 - 55.6)$ ). Este valor efectivamente aproximadamente coincide con el porcentaje de AGL obtenido por el método M2 (68.5 %), por lo que esto sugiere que M2 es un método de alta efectividad para la eliminación de los TAG pero con una alta preferencia por los AGL que permanecen prácticamente en su totalidad en el extracto.

Este resultado es explicable si se considera que el método M2 se basa en la realización de sucesivas extracciones con una solución acuosa básica desde la solución del extracto obtenida en el método M1, por lo cual los AGL se encontrarán completamente ionizados y presentarán una alta preferencia por la fase acuosa. Este aspecto se deberá considerar a los efectos de mejorar la eficiencia de este método y es el motivo en el cual se basó el diseño del Método M4, que se discute más adelante.

La elevada eficiencia del método M2 indica que los orizanoles en medio alcalino presentan preferencia por la fase acuosa, lo que sugiere que la función hidroxilo del grupo ferulato (común a todos los orizanoles) se debe encontrar ionizada en una elevada proporción en el medio alcalino utilizado. Si bien no se dispone de valores de pKa de los diferentes orizanoles, la ionización de los mismos en medio básico es muy factible considerando el equilibrio ácido-base para el grupo fenol (Figura 4.8) presenta un valor de pKa de 10 (Karan, 1998) y la solución alcalina utilizada es de pH = 13.



**Figura 4.8.-** Equilibrio ácido-base para los fenoles.

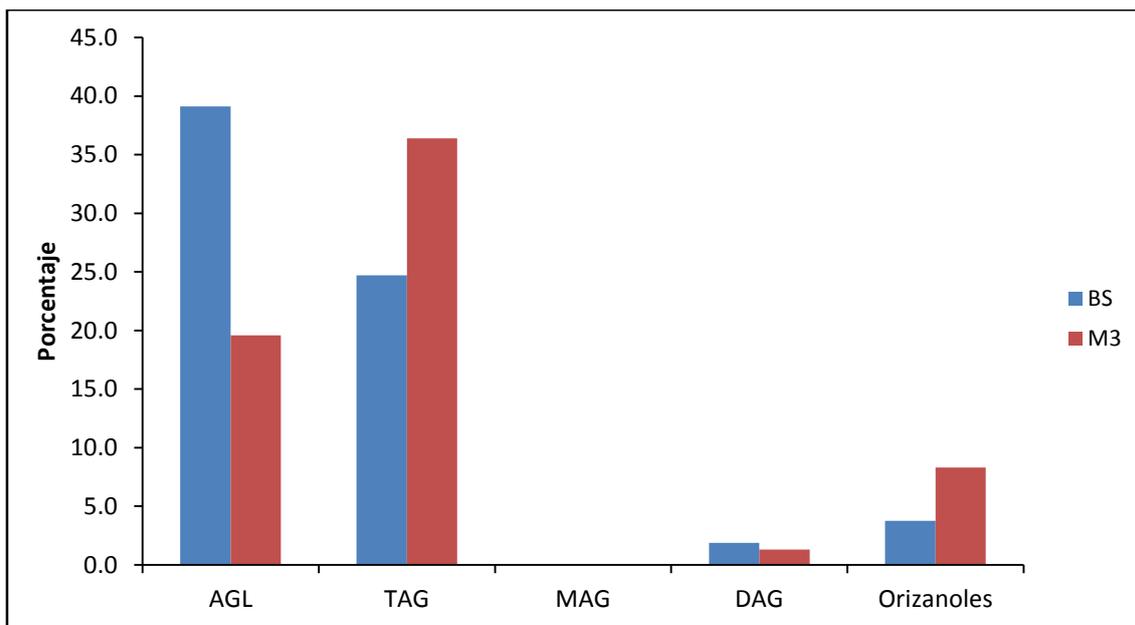
### 3.5. Método M3

La Tabla 4.5 presenta los valores de contenido de orizanoles y los parámetros de eficiencia para el método 3. En este método se parte directamente de las borras al igual que en el método de Soxhlet y el método M1. El contenido de orizanoles fue de 8.3 %, superior al obtenido mediante el método M1, con lo cual el factor de concentración (F) fue de 2.2 respecto a las borras liofilizadas (BS). A su vez, el rendimiento másico (R) fue de 34 %, similar al método M1. Por lo tanto, el porcentaje de recuperación (P) presentó un valor de 75 % notoriamente superior al del método M1.

**Tabla 4.5.-** Concentración de orizanoles en el extracto obtenido por el Método M3 y parámetros de eficiencia del mismo.

Orizanoles (%)	R (%)	F	P (%)
8.3	34	2.2	75

En la Figura 4.9 se presenta la composición lipídica para el concentrado M3. Se observó un incremento tanto de los ácidos grasos libres (AGL) pero en mayor magnitud para los triacilgliceroles (TAG). En este método los triacilgliceroles pasaron del 24.7 al 36.4 %. Esta situación es similar a la observada en el método 1 donde los triacilgliceroles se incrementaron más que los ácidos grasos libres.



**Figura 4.9.-** Concentración de las diferentes clases lipídicas en el concentrado obtenido mediante el método M3.

### 3.6. Método M4

Este método fue diseñado de acuerdo con los resultados obtenidos de los métodos anteriores y en particular considerando los resultados obtenidos por el método M2 que fue el que presentó el mayor factor de concentración (4.7). Como se indicó anteriormente, el concentrado obtenido por el método M2 presentó una concentración extremadamente elevada de los ácidos grasos, debido a su separación hacia la solución acuosa alcalina utilizada. Para evitar esto, en este método se incluyó una etapa previa de etilación selectiva de los ácidos grasos libres presentes en las borras de partida, a los efectos de eliminar su carácter iónico y evitar así su migración hacia la fase acuosa junto con los orizanoles, incrementando la selectividad del método.

En el Apéndice 1 se describe la puesta a punto del método de etilación (realizado mediante catálisis ácida, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/etanol), donde se definen las condiciones de reacción más convenientes (descritas en 2.2.4) para alcanzar la conversión completa de los AGL sin afectar a los orizanoles de interés

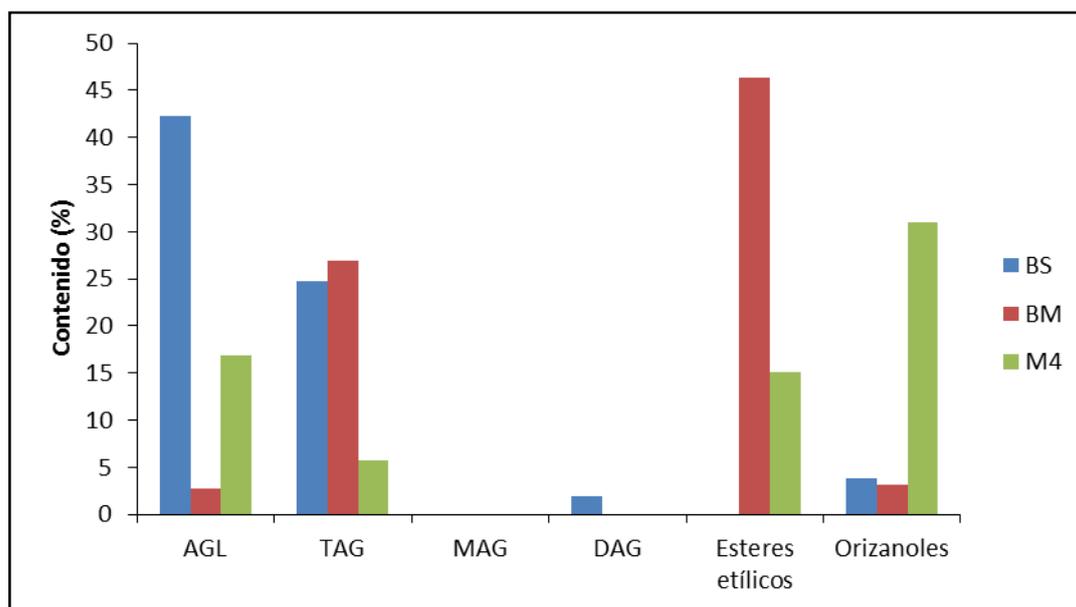
La Tabla 4.6 presenta el contenido de orizanoles en el extracto obtenido por este método y los parámetros vinculados a la eficiencia de este método. Se observa un contenido de orizanoles del 31.3 %, valor muy elevado en comparación con los obtenidos mediante los métodos anteriores.

**Tabla 4.6.-** Concentración de orizanoles en el extracto obtenido por el Método M4 y parámetros de eficiencia del mismo.

Orizanoles (%)	R (%)	F	P (%)
31.3	12	8.2	93

A su vez, el rendimiento másico fue del 12 %, que si bien es bajo es superior al obtenido en el método M2 (8 %). De acuerdo con lo anterior el factor de concentración respecto a las borras liofilizadas (BS) fue de 8.2, también el más elevado de todos los métodos utilizados. Además, el factor de recuperación fue de 93 %, lo cual implica que prácticamente se recuperan todos los orizanoles presentes en las borras de partida y que, de acuerdo a lo esperado, los orizanoles no sufren ningún proceso de deterioro debido a la etapa de esterificación de los AGL.

La concentración de las diferentes clases lipídicas en el concentrado obtenido por este método se presenta en la Figura 4.10. Allí se compara la concentración de los diferentes lípidos en el concentrado con la correspondiente a las borras de partida (BS) y la de las borras modificadas (BM) mediante el proceso de esterificación de los AGL. Los ácidos grasos libres (AGL) en las borras modificadas presentaron un valor de 2.7 %, mientras que la aplicación del método 4 logró concentrarlas alcanzando un valor de 16.9 %. A su vez, se verifica una disminución importante de los triacilgliceroles (TAG).



**Figura 4.10.-** Concentración de las diferentes clases lipídicas en el concentrado obtenido mediante el método M4.

Este método presentó una alta selectividad para concentrar los orizanoles, debido a la conversión de algunos de los lípidos hidrofílicos (AGL) en el material de partida en hidrofóbicos. De esta manera, la previa esterificación de

los AGL puede considerarse como una estrategia interesante para poder obtener un concentrado con elevado contenido de orizanoles.

### **3.7. Comparación de los diferentes métodos de concentración utilizados**

En la Tabla 4.7 se presentan los rendimientos y los factores de concentración respecto a las borras crudas (BC) y a las borras secas (BS) así como el porcentaje de recuperación para cada uno de los concentrados obtenidos de acuerdo con los métodos anteriormente mencionados.

El método de Soxhlet con acetato de etilo concentró casi cinco veces los orizanoles y su factor de recuperación del 99 %. Sin embargo, dicho método posee la desventaja de tratar las borras durante un período de tiempo prolongado (6 horas) a una temperatura superior a la ambiente lo cual puede provocar cambios químicos en ellos. Ello hace una diferencia importante respecto al resto de los métodos utilizados que son realizados a temperatura ambiente. El método M1 y el método M3 presentaron los valores de contenido de orizanoles más bajos de todos los métodos ensayados, 5.3 y 8.3 % respectivamente. El porcentaje de recuperación del método M3 fue más alto que el del método M1, 75 y 45 % respectivamente. De esta manera, el método M3 presenta no solo un contenido de orizanoles superior sino que los recupera mejor que el método M1. El método M2 posee un contenido de orizanoles muy superior al método M1 y al método M3, sin embargo solamente recupera la tercera parte de los orizanoles presentes en las borras. Este método concentró

los orizanoles 1.5 veces más que el método de Soxhlet pero su porcentaje de recuperación fue tres veces menor.

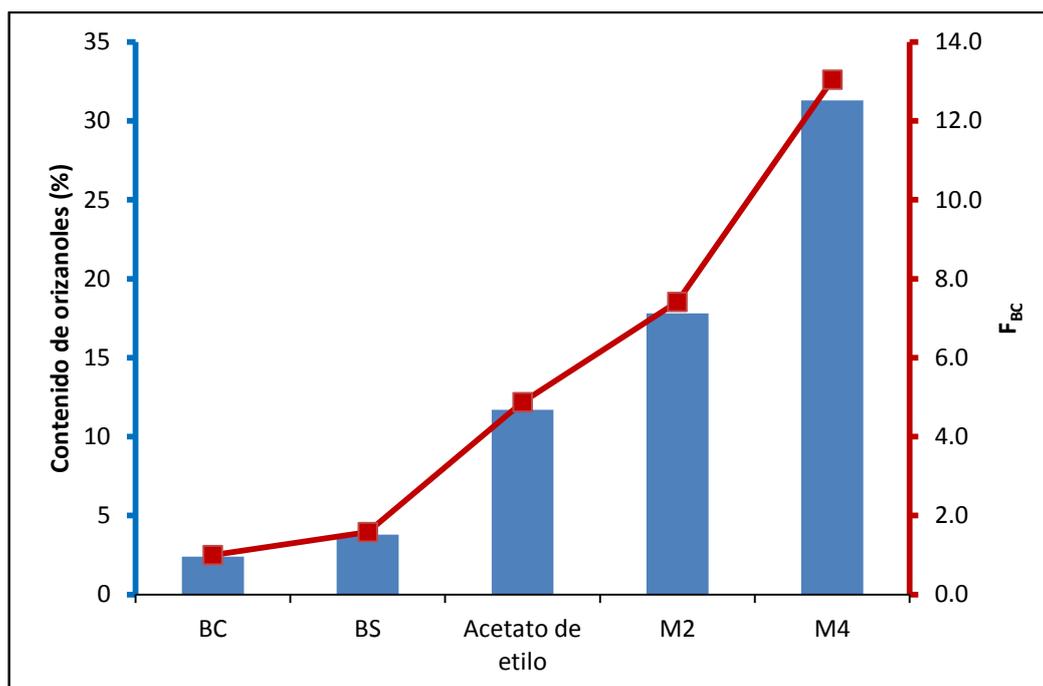
**Tabla 4.7.-** Concentración de orizanoles en los extractos obtenidos por cada método y parámetros de eficiencia correspondientes.

<b>Método</b>	<b>Orizanoles (%)</b>	<b>R<sub>BC</sub> (%)</b>	<b>R<sub>BS</sub> (%)</b>	<b>F<sub>BC</sub></b>	<b>F<sub>BS</sub></b>	<b>P (%)</b>
<b>Liofilización</b>	3.8	64	100	1	11.6	<b>100</b>
<b>Acetato de etilo</b>	11.7	20	32	4.9	3.1	<b>99</b>
<b>Acetona</b>	11.1	21	32	4.6	2.9	<b>95</b>
<b>Hexano</b>	9.5	20	31	4.0	2.5	<b>78</b>
<b>Isopropanol</b>	7	30	47	2.9	1.8	<b>86</b>
<b>M1</b>	5.3	21	33	2.2	1.4	<b>45</b>
<b>M2</b>	17.8	5	8	7.4	4.7	<b>36</b>
<b>M3</b>	8.3	22	34	3.5	2.2	<b>75</b>
<b>M4</b>	<b>31.3</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>13.0</b>	<b>8.2</b>	<b>93</b>

Notas: R<sub>BC</sub> - rendimiento másico respecto a las borras crudas, R<sub>BS</sub> – rendimiento másico respecto a las borras secas, F<sub>BC</sub>-factor de concentración respecto a las borras crudas y F<sub>BS</sub> – factor de concentración respecto a las borras secas.

La Figura 4.11 muestra los resultados para alguno de los concentrados obtenidos a partir de los métodos utilizados. Allí se puede observar claramente que el método M4 es el que logra un concentrado con mayor contenido de orizanoles, además de presentar una recuperación casi completa de los mismos (P= 92 %).

Cabe mencionar que el total de las clases lipídicas identificadas fue inferior al 100% en todos los métodos. Una justificación a ello podría ser la concentración de parte de los compuestos no identificados en las borras crudas mediante estos métodos.



**Figura 4.11.-** Contenido de orizanoles y factor de concentración para los concentrados obtenidos a partir de algunos de los métodos utilizados.

Si bien el método M4 presenta un tratamiento térmico, previo de las borras liofilizadas, a 40°C este no presenta un efecto significativo en la pérdida de los orizanoles (Apéndice 1). Por otra parte, en el análisis de orizanoles mediante HPLC se encontró en este concentrado una pequeña cantidad de tocoferoles y tocotrienoles siendo el valor de aproximadamente 75 ppm. Estos

antioxidantes, que no pudieron ser identificados en las borras secas, mediante este método se lograron concentrar conjuntamente con los orizanoles.

#### **4. Conclusiones.**

Algunos de los métodos ensayados poseen un poder de concentración bajo con lo cual los concentrados obtenidos no podrían ser utilizados a nivel de la industria de los alimentos o farmacéutica. A partir de los resultados obtenidos mediante el método 2 fue posible diseñar uno nuevo con el cual se obtuvo un concentrado con elevado contenido de orizanoles (31.3 %). Este nuevo método que involucro la modificación química de las borras no solo fue el que presentó mayor capacidad de concentración sino que además presentó un porcentaje de recuperación muy elevada (93% respecto a las borras secas). Además, en este concentrado se observó la presencia de otros antioxidantes (tocoferoles y tocotrienoles), que también resultan valiosos por sus propiedades antioxidantes. Por lo tanto, este concentrado parece ser el más atractivo a los efectos de su aplicación tecnológica, debiendo considerarse según el tipo de uso al que se lo destine la presencia de un contenido importante de otras especies químicas. Es por ello que en los siguientes capítulos se estudiará el poder antioxidante de este concentrado y el efecto de su adición sobre materiales grasos de diferente origen sobre la estabilidad oxidativa de los mismos.

## 5. Bibliografía.

- Kaewboonnum P.; Vechpanich J.; Pravit Santiwattana P.; Shotipruk A.  $\gamma$ -Oryzanol Recovery from Rice Bran Oil Soapstock. *Sep. Sci. Technol.* (2010) 45: 1186–1195.
- Karan A. Separation of Oryzanol from Crude Rice Bran Oil, *Thesis of Master of Science Applied*, University of Toronto, Canada (1998).
- Romeu C.; Grompone M. A.; Jachmanián I. Obtención de extractos ricos en orizanol a partir de subproductos de refinación del aceite de arroz, *XII Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites*, Florianópolis, Brasil (2007).
- Seetharamaiah; G.S. Prabhakar Oryzanol content of Indian Rice Bran Oil and Its Extraction from Soap Stock. *J. Fd. Sci. and Tech.* (1986) 23:270-273.
- Xu, Z; Godber S. Purification and Identification of Components of  $\gamma$ -Oryzanol in Rice Bran Oil. *J. Agric. Food Chem.* (1999) 47:2724-2728.
- Zullaikah S.; Melwita E.; Ju Y. H. Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. *Biores. Technol.* (2008) 100: 299-302.

## **Capítulo 5**

# **Estudio del poder antirradicalario de los orizanoles y de uno de los concentrados obtenidos**

# Índice

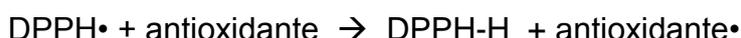
- 1.- Introducción.
- 2.- Materiales y métodos.
- 3.- Resultados y discusión.
- 4.-Conclusiones.
- 5.- Bibliografía.

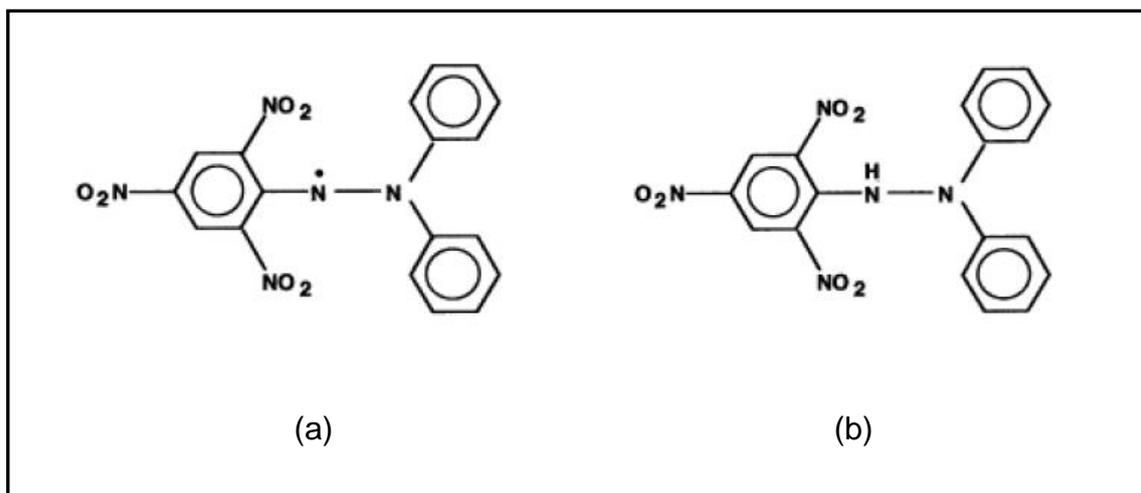
## 1. Introducción.

El método mediante el cual se utiliza el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) para la determinación del poder antirradicalario fue informado originalmente por Blois en 1958 y ha sido extensamente utilizado para la determinación de la actividad anti-radicalaria de numerosos tipos de compuestos. El DPPH actúa como un radical libre estable debido a la deslocalización del electrón libre (Figura 5.1a) lo que impide su dimerización, como sucede con la mayoría de los radicales libres (Molyneux, 2004). Esta deslocalización da lugar al color violeta oscuro que posee el DPPH; en solución de etanol o metanol se caracteriza por una banda de absorción centrada alrededor de los 515-520 nm.

Al mezclar una solución de DPPH con la de una sustancia donante de hidrógeno, como por ejemplo un antioxidante, se produce la reducción del DPPH (Figura 5.1b) con la consecuente pérdida del color violeta, quedando un color remanente amarillo pálido debido al grupo picrilo todavía presente (Molyneux, 2004).

Según Brand-Williams *et al.*, (1995) la reacción simplificada entre el DPPH y el antioxidante involucra la donación de un protón de éste último, dando lugar a la formación de la 1,1-difenil-2-picrilhidracina (DPPH-H):





**Figura 5.1.-** Estructuras del 1,1-difenil-2-picrilhidracilo y de la 1,1-difenil-2-picrilhidracina.

Este método de determinación de la actividad antirradicalaria se realiza entonces exponiendo el DPPH a una solución de antioxidante (generalmente en metanol) y el seguimiento de la disminución de la concentración de DPPH mediante la medida de la absorbancia de la mezcla de reacción a la longitud de onda característica del mismo (515 nm).

El objetivo de estudiar la capacidad antirradicalaria de los orizanoles mediante este método es interesante ya que los lípidos se oxidan mediante mecanismos que involucran radicales libres. Sin embargo, este estudio se realiza en ausencia de un determinado material graso. El objetivo de esta tesis es estudiar el poder antioxidante de los orizanoles en presencia de diferentes materiales grasos y a su vez compararlos con el de otros antioxidantes. Por ello, en los siguientes capítulos se estudia el poder antioxidante de los orizanoles y de antioxidantes sintéticos y naturales mediante métodos que si involucran la presencia de lípidos en contacto con ellos.

Estos estudios se realizaron durante una pasantía de investigación realizada en el Laboratoire de Lipotechnie, CIRAD, Montpellier (Francia).

## **2. Materiales y métodos.**

Para los ensayos se utilizaron los siguientes reactivos: DPPH de calidad Sigma-Aldrich, un concentrado de orizanoles obtenido en el laboratorio mediante el método 3 (descrito en el capítulo anterior) y los orizanoles puros los cuales fueron suministrados por el Dr. Haiko Hense, de la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil.

### **Método del DPPH.**

Se preparó una solución en metanol madre de DPPH  $6 \times 10^{-3}$  M y soluciones del antioxidante a estudiar (orizanoles puros o concentrado de orizanoles) en el rango de 400-700 mg/L. Dichas soluciones se guardaron en freezer (temperatura aproximada de  $-20$  °C) hasta su uso.

Para cada ensayo, se preparó diariamente una solución de DPPH de concentración  $6 \times 10^{-5}$  M por dilución de la solución madre. En una celda espectrofotométrica de vidrio de 1 cm de camino óptico se colocó un determinado volumen de la solución de DPPH  $6 \times 10^{-5}$  M y posteriormente se agregó la solución de antioxidante. Se utilizaron diferentes relaciones de

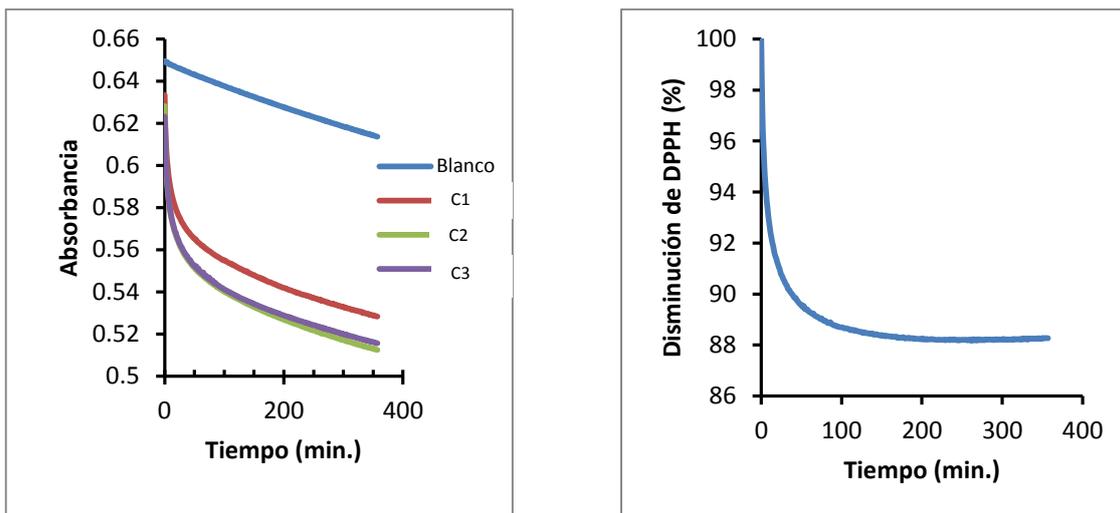
volumen de manera de variar la relación molar en un rango de 0.30 a 0.85 (siendo en todos los casos el DPPH el reactivo limitante)

La celda se colocó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-VIS Lambda 25, equipado con control de temperatura (ajustado a 20 °C) y agitación. Se registró la absorbancia a intervalos de tiempo de 1 minuto y se construyeron las curvas de absorbancia contra el tiempo de reacción. Paralelamente se corrió una solución blanco de referencia, conteniendo únicamente la solución de DPPH diluída con metanol a la misma concentración que en la mezcla reaccionante.

Todas las corridas se realizaron por triplicado, informándose como resultados los valores medios.

### **3. Resultados y discusión.**

En la figura 5.2a se presentan las curvas obtenidas para el blanco y para una misma mezcla del concentrado de orizanoles hecha por triplicado (C1, C2 y C3). Se puede observar que, a medida que aumenta el tiempo, la absorbancia disminuye hasta alcanzar una pendiente similar a la de la referencia.



(a)

(b)

**Figura 5.2.-** a) Curvas de absorbancia contra tiempo obtenidas por el método del DPPH para el blanco y para una muestra conteniendo un extracto de orizanoles obtenido a partir de borras industriales; b) Disminución porcentual de la concentración de DPPH durante una corrida realizada con una mezcla conteniendo el concentrado de orizanoles.

Suponiendo que se cumple la ley de Lambert-Beer y teniendo en cuenta esta disminución, se corrigieron los valores para cada una de las muestras de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Abs.corregida\ muestra = Abs.\ muestra(t) + [Abs.ref.(t_0) - Abs.ref.(t)] \quad [5.1]$$

Donde  $t_0$  = tiempo inicial

Con el valor de la absorbancia corregida se calculó la concentración del DPPH remanente, a un cierto tiempo  $t$ , expresada como porcentaje respecto al valor inicial:

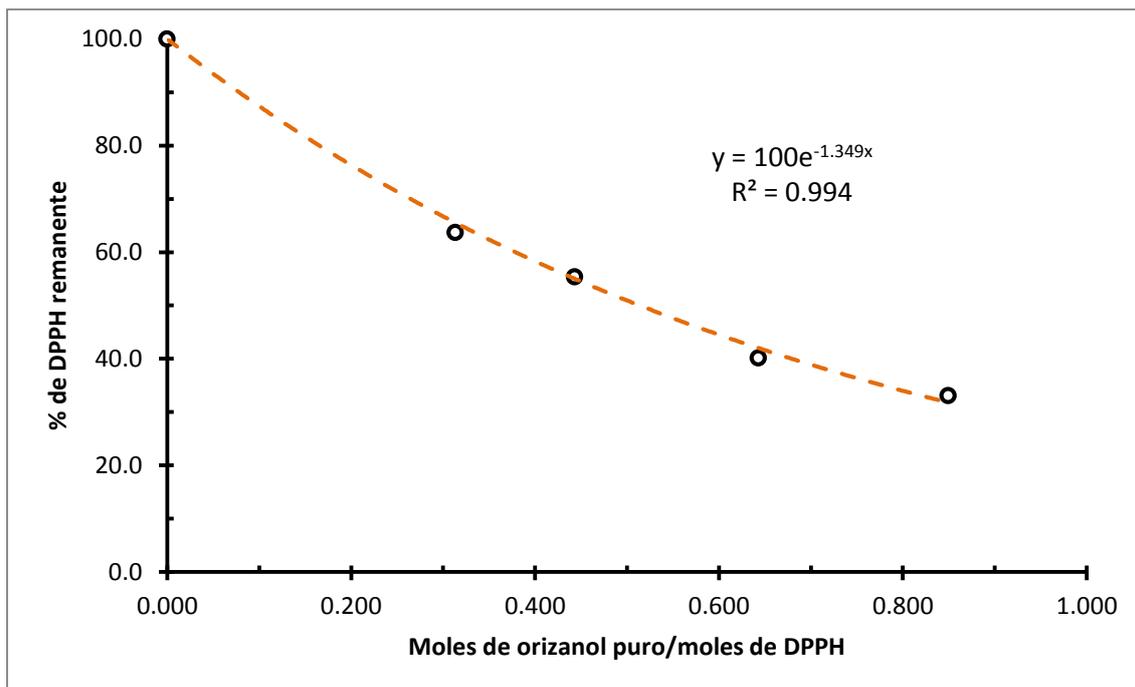
$$\% \text{ DPPH remanente } (t) = \frac{Abs.(t)}{Abs.t_0} * 100 \quad [5.2]$$

Por diferencia del valor anterior con el valor de inicial (100 %) se calculó el porcentaje de DPPH que reaccionó con el antioxidante:

$$\% \text{ DPPH consumido } (t) = 100 - \% \text{ DPPH remanente } (t) \quad [5.3]$$

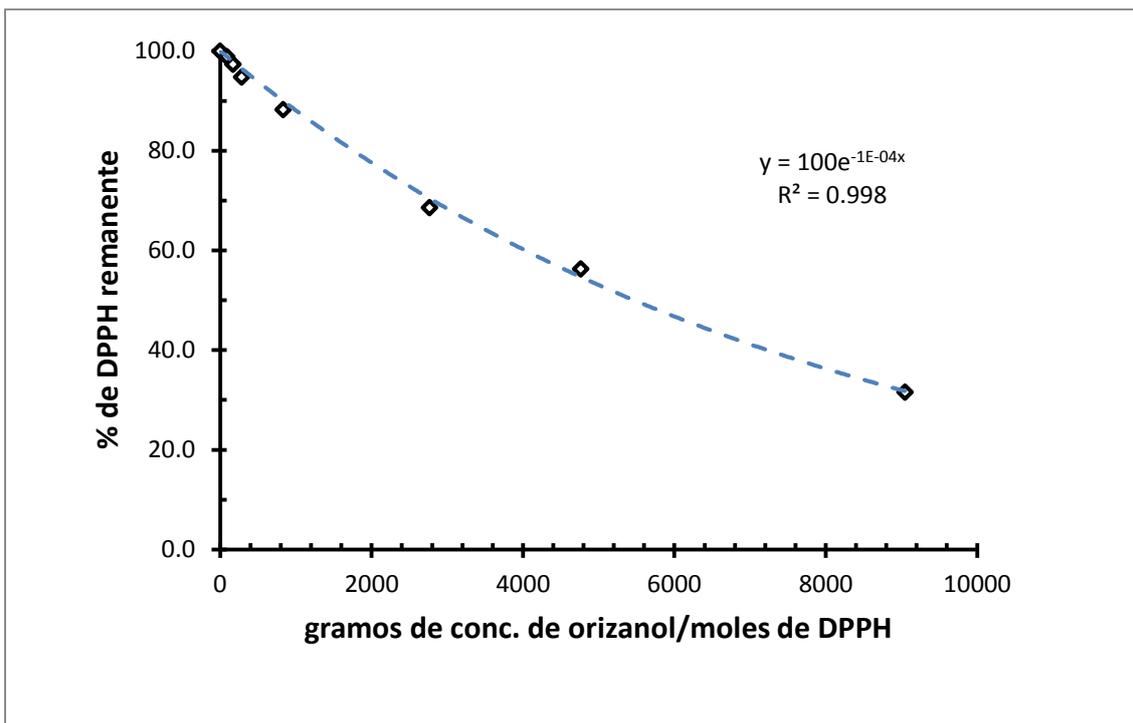
Con los valores para las tres repeticiones de una misma mezcla se calculó el promedio y se graficó en función del tiempo (figura 5.2b).

El porcentaje de DPPH disponible, una vez que la reacción alcanzó el equilibrio se graficó en función de la relación molar inicial del antioxidante y del DPPH (figura 5.3). Para el cálculo de los moles de orizanoles se tomó un peso molecular medio de 600, considerando el promedio ponderado de los pesos moleculares de los cuatro orizanoles mayoritarios.



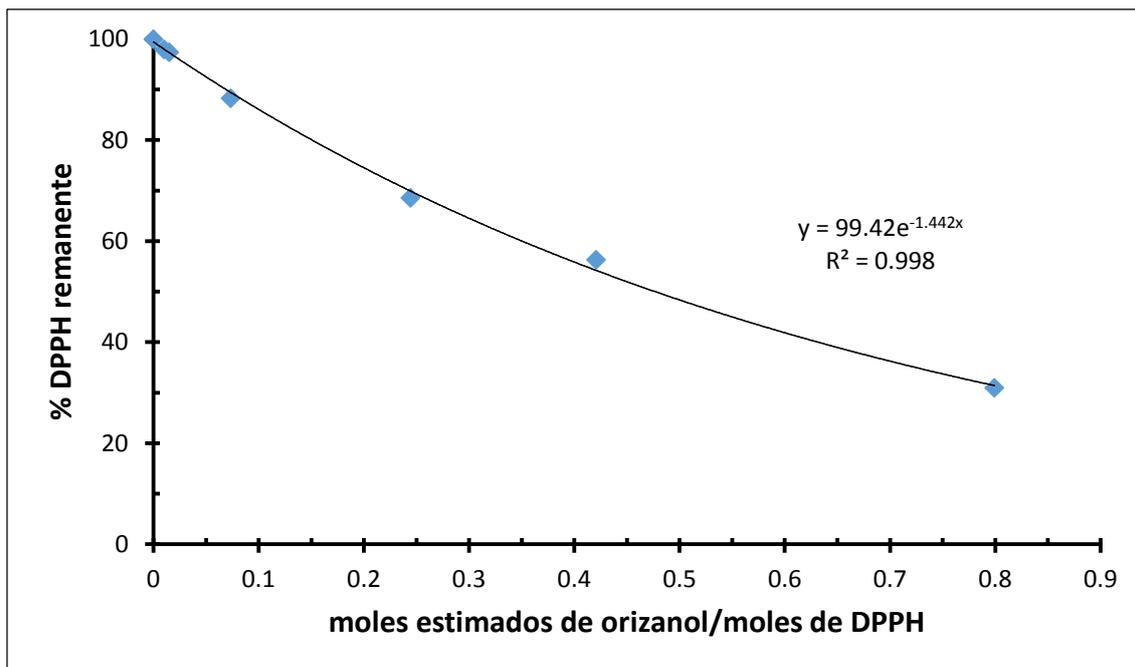
**Figura 5.3.-** Porcentaje de DPPH remanente versus la relación molar de orizanoles y DPPH.

Se realizó un estudio similar para un concentrado de orizanoles a partir de las borras generadas industrialmente durante la refinación del aceite de salvado de arroz el cual fue obtenido mediante el método 1. Se utilizó una concentración de 500 mg/L de concentrado de orizanoles. En la figura 5.4 se muestra la gráfica del porcentaje de DPPH remanente en función de la relación “gramos de concentrado de orizanoles sobre moles de antioxidante”.



**Figura 5.4.-** Porcentaje de DPPH remanente versus la relación “gramos del concentrado de orizanoles moles de DPPH”.

Dicho concentrado contiene, además de los orizanoles, otras clases lipídicas. Se encontró que el contenido de orizanoles para este concentrado fue de 5.3 %. Este concentrado además de los orizanoles presentó una cantidad importante de ácidos grasos libres y triacilgliceroles. Considerando una masa molar media de 600 para los orizanoles presentes (al igual que en el caso anterior) y el porcentaje determinado por HPLC, se puede graficar los moles estimados de orizanoles en el concentrado en función de los moles de DPPH iniciales (figura 5.5).



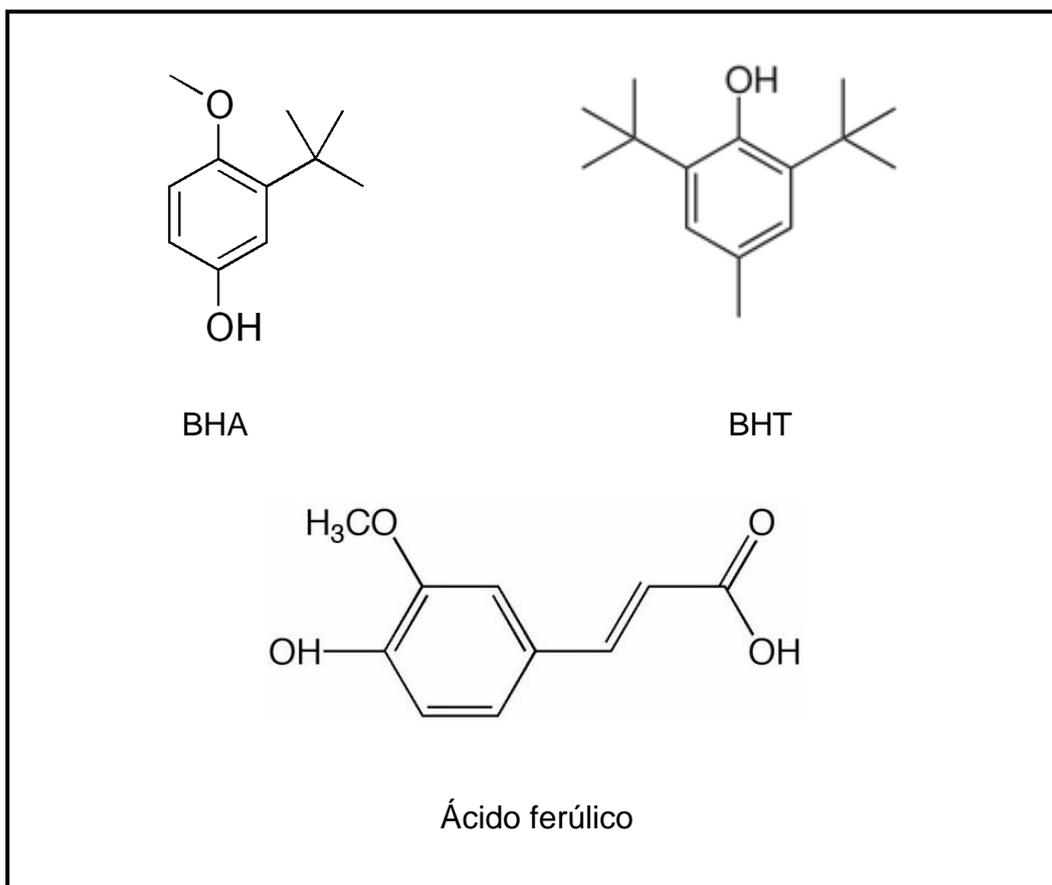
**Figura 5.5.-** Porcentaje de DPPH remanente versus la relación molar inicial del concentrado de orizanoles y DPPH.

A partir del gráfico de porcentaje de DPPH en función de la relación entre el número de moles de antioxidante y el número de moles de DPPH es posible determinar la “concentración eficiente”, la que se define como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50 % la concentración inicial de DPPH ( $EC_{50}$ ). Por razones de claridad se habla en términos de  $1/EC_{50}$ , poder anti-radicalario o “anti radical power” (ARP), ya que cuanto mayor es su valor, más eficiente es el antioxidante.

El valor de  $EC_{50}$  determinado del gráfico de orizanoles puros (figura 5.3) fue de 0.51 mientras que para el concentrado de orizanoles (figura 5.5) fue de 0.48. De esta manera, los orizanoles presentaron un poder anti-radicalario de 2. Según Bondet *et al.* (1997) la estequiometría de la reacción entre el antioxidante y el DPPH es:

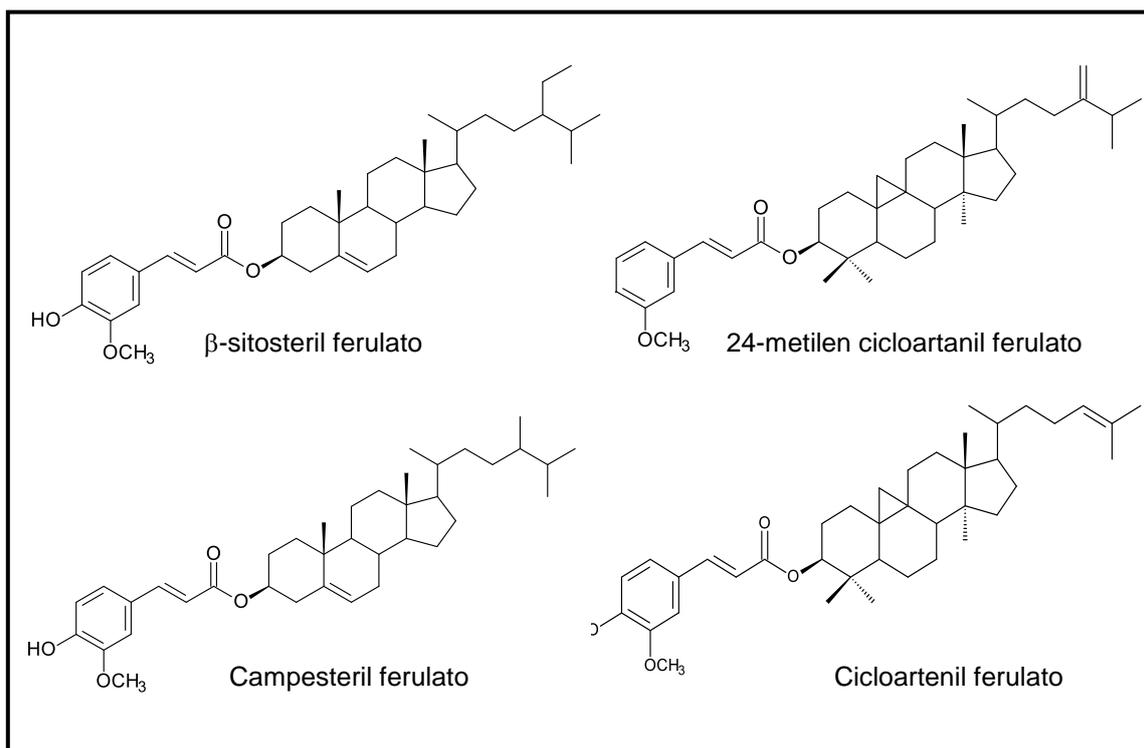
$$\frac{\text{Moles de antioxidante}}{\text{Moles de DPPH}} = \frac{1}{(2 * EC_{50})} \quad [5.4]$$

Como el valor  $EC_{50}$  para los orizanoles fue de 0.5, la estequiometria de la reacción DPPH-orizanoles es de un mol de antioxidantes por mol de DPPH. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores. Moltini *et al.* (2009) mencionan poderes anti-radicalarios entre 5 y 6 para el BHA y BHT. Brands-Williams *et al.* (1995) fundamentan estos resultados basados en las importantes diferencias estructurales entre ambos tipos de compuestos. Si bien todos los compuestos estudiados son monofenólicos, tanto el BHT como el BHA (figura 5.6) son capaces de reducir dos o más moléculas de DPPH. En el caso del BHT se explica porque posee tres hidrógenos en el carbono de la posición para del anillo aromático, siendo así capaz de donar un segundo hidrógeno a través de la deslocalización de electrones. El BHA posee la posición orto libre por lo que está expuesto a una dimerización entre dos radicales fenólicos. Luego de la dimerización, se regeneran dos grupos hidroxilo mediante una transferencia intramolecular de  $H\bullet$ , pudiendo de esta manera interactuar nuevamente con una segunda molécula de DPPH.



**Figura 5.6.-** Estructura molecular para algunos antioxidantes.

Resulta interesante considerar la estructura de los orizanoles (figura 5.7), que al igual que el ácido ferúlico, poseen un grupo de dobles enlaces conjugados en posición *para* respecto al grupo hidroxilo, que puede entrar en resonancia con el anillo aromático. De esta forma el electrón puede deslocalizarse fuera del anillo con lo que las posibilidades de dimerización se ven reducidas. Esto explica los valores de ARP menores para los antioxidantes derivados del ácido ferúlico que para los antioxidantes sintéticos.



**Figura 5.7.-** Estructura molecular de los principales orizanoles del concentrado.

Datos de trabajos realizados en condiciones experimentales similares (Brand-Williams *et al.*, 1995; Nenadis *et al.*, 2003) informan un ARP=2.3 para el ácido ferúlico. Moltini *et al.* (2009) reportaron un valor de ARP de 3.3 para el ácido ferúlico, de 5.7 para el BHT y de 4.9 para el BHA. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en las condiciones en que se llevaron a cabo los métodos analíticos empleados (tipo y sensibilidad del espectrofotómetro, tiempos de reacción, solventes utilizados y temperatura).

Es de esperar valores similares de ARP para los orizanoles y el ácido ferúlico, debido a que la actividad antioxidante de los orizanoles se debe a la presencia del grupo ferulato en su estructura (Akiyama *et al.*, 2005). Sin embargo, el valor determinado ARP en esta tesis de para ambos compuestos orizánolicos (ARP=2) fue similar al informado por Brand-Williams *et al.* (1995) y

por Nenadis *et al.* (2003), aunque considerablemente menor al obtenido por Moltini *et al.* (2009) para el ácido ferúlico (ARP=3.3). Trabajos realizados en condiciones experimentales diferentes, empleando el método del ácido linoleico, informan que la actividad antioxidante del ácido ferúlico resulta superior a la de los componentes mayoritarios de los orizanoles (Xu *et al.*, 2001). Es conocido que la actividad antioxidante se ve afectada por la naturaleza y características de diferentes grupos funcionales esterificados con el grupo funcional responsable de dicha actividad, lo que ha sido reportado para este tipo de antioxidantes y para otros de diferente naturaleza (López-Giraldo, 2009). En el caso de los orizanoles esto se ha atribuido a que la porción triterpénica disminuye la movilidad de la molécula debido a su mayor tamaño en relación al ácido ferúlico libre (Xu *et al.*, 2001). Por lo tanto, el ARP para los orizanoles deberá ser menor que para el ácido ferúlico.

Los valores informados por diferentes investigadores son similares al obtenido en esta tesis para el concentrado de orizanoles, lo que sugiere que las especies químicas presentes, además de los orizanoles, no influyen en su capacidad antiradicalaria frente al DPPH.

#### **4. Conclusiones.**

En conclusión, el poder antioxidante de los orizanoles respecto a otros antioxidantes informados en la bibliografía (Moltini *et al.*, 2009) fue inferior. También es posible decir que las otras especies químicas presentes en el

concentrado ensayado no afectan el poder antioxidante de los orizanoles que se encuentran en él.

De acuerdo con este estudio, como el resto de las especies químicas presentes no afectan el poder antioxidante de los orizanoles, sería posible la utilización de un concentrado con un contenido no elevado de orizanoles como fuente de antioxidante, pero debería tenerse en cuenta la proporción de orizanoles en el mismo para lograr un efecto antioxidante similar al de los orizanoles puros.

## 5. Bibliografía.

- Akiyama Y.; Hori K.; Takahashi T.; Yoshiki Y. Free Radical Scavenging Activities of  $\gamma$ -Oryzanol Constituents. *Food Sci. Technol. Res.* (2005) 11 (3): 295-297.
- Blois M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* (1958) 181: 1199-1200.
- Brand-Williams W.; Cuvelier E.; Berset C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* (1995) 28: 25-30.
- Bondet V.; Brand-Williams W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology* (1997) 30: 609-615.

- Moltini M.; Ferreira N. Estudio del poder antioxidante de un concentrado de orizanoles obtenido a partir de borras industriales. Trabajo práctico de la Carrera Ingeniería de Alimentos, Montevideo (Uruguay), 2009.
- Nenadis N.; Zhang Hong-Yu; Tsimidou Maria Z. Structure–Antioxidant Activity Relationship of Ferulic Acid Derivatives: Effect of Carbon Side Chain Characteristic Groups. *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51: 1874-1879.
- Xu Z.; Godber S. Antioxidant Activities of Major Components of  $\gamma$ -Oryzanol from Rice Bran Using a Linoleic Acid Model. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2001) 78 (6): 645-649.

## **Capítulo 6**

# **Aplicación de los orizanoles a la estabilización de aceites comestibles:**

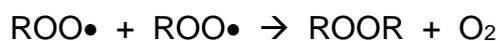
## **A.- Métodos AOM automáticos (OSI y Rancimat)**

# Índice

- 1.- Introducción
- 2.- Materiales y métodos
- 3.- Resultados
  - 3.1.- Estudio de los aceites refinados comerciales
  - 3.2.- Efecto del agregado de antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de los aceites
- 4.- Pérdida de orizanoles durante el proceso de termo-oxidación de un aceite
- 5.- Conclusiones
- 6.- Bibliografía

## 1. Introducción.

Las grasas y los aceites sufren cambios durante su almacenamiento debido a reacciones de oxidación que ocurren a nivel de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que componen los triacilglicérol. Este fenómeno conocido como autooxidación es el responsable de la generación de compuestos responsables de los cambios en el aroma y sabor. A este proceso también se lo suele denominar como “enranciamiento” del aceite o de la grasa. Se trata de una reacción en cadena, con formación de radicales libres  $R\bullet$  y  $ROO\bullet$  (Simic *et al.*, 1992; Shahidi *et al.*, 1997). Durante la primera etapa se forman y acumulan hidroperóxidos (ROOH) a partir de los triacilglicérol insaturados (RH); esto se conoce como oxidación primaria. A continuación se detallan las diferentes etapas del proceso de autooxidación:



La oxidación primaria presenta una etapa “lag” inicial, en la que la formación de los hidroperóxidos ocurre a una velocidad muy lenta (también llamada “período de inducción”) y una segunda etapa donde la velocidad se incrementa en forma exponencial.

La etapa de terminación de la cadena, en la que se forman dímeros (RR y ROOR), sólo tiene lugar en una proporción importante si se acaba el suministro de oxígeno.

A medida que el material graso se oxida, se van acumulando los hidroperóxidos formados. Debido a su estabilidad relativamente baja, estos compuestos se descomponen, dando lugar a otros compuestos de oxidación como por ejemplo: carbonilos (aldehídos y cetonas), lactonas, éteres, alcoholes, ácidos, hidrocarburos, etc. Esta segunda etapa se conoce como oxidación secundaria (Frankel, 1998). El período de inducción es una medida de la estabilidad oxidativa del material graso, es decir de su resistencia al enranciamiento, por lo que se vincula directamente a la vida útil de un aceite comestible (cuanto mayor sea el período de inducción más tiempo se podrá almacenar el material graso sin que sufra un grado de deterioro importante).

Los procesos de oxidación primaria y secundaria dependen de muchos factores entre los cuales se destacan la temperatura (la cual obviamente afectará las cinéticas de los procesos de deterioro) y la velocidad de suministro de oxígeno (imprescindible para que ocurra el proceso). A los efectos de estudiar estos procesos en un tiempo de análisis razonable se utilizan lo que se conocen como “métodos de enranciamiento acelerado”, en los que se recurre a ambos parámetros para acelerar los procesos de oxidación: se mantiene la muestra calefaccionada a una determinada temperatura (entre 80 y 130 °C

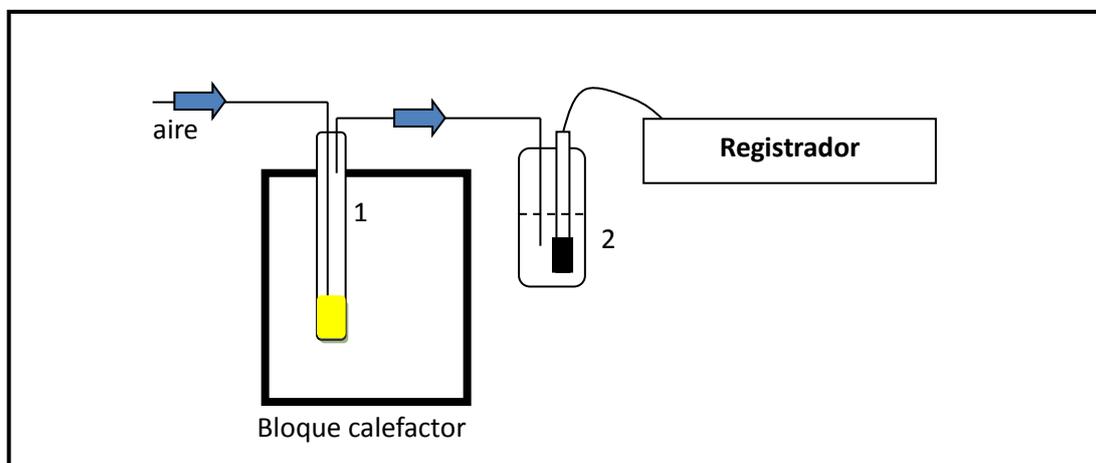
según el método) y se le suministra un flujo de oxígeno a la misma (ya sea mediante aire u oxígeno puro). De esta manera, es posible en pocas horas sobrepasar la etapa “lag” (o período de inducción) del proceso que, en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente implicaría un período de meses o años (Wan, 1995).

El método tradicional de enranciamiento acelerado es el conocido como AOM (Active Oxygen Method, método oficial de la AOCS nº Cd 12-57, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society Fourth Edition, 1990). Dicho método implica la construcción de un dispositivo especialmente diseñado para la exposición de una muestra del aceite a estudiar a alta temperatura (97.8 °C) y a un flujo de aire determinado (2.33 mL/s). Se toman muestras del aceite en estas condiciones en forma periódica, las que se destinan al análisis de hidroperóxidos (por titulación). Posteriormente de la curva de hidroperóxidos contra el tiempo de oxidación se determina el período de inducción de la muestra.

Obviamente este método ha sido reemplazado por métodos AOM automáticos, los que han sido normalizados por la AOCS (método Cd 12b-92: Oil Stability Index) y para el cual existen al menos dos equipos disponibles en el mercado, denominados OSI y Rancimat (fabricados por Omnion y Metrohm, respectivamente, y ambos reconocidos por la norma AOCS Cd12b-92).

Este método, al igual que el AOM, está basado en la oxidación acelerada del material graso a alta temperatura y bajo suministro de aire. En la figura 6.1

se muestra una representación gráfica del equipo utilizado para el estudio de las muestras.



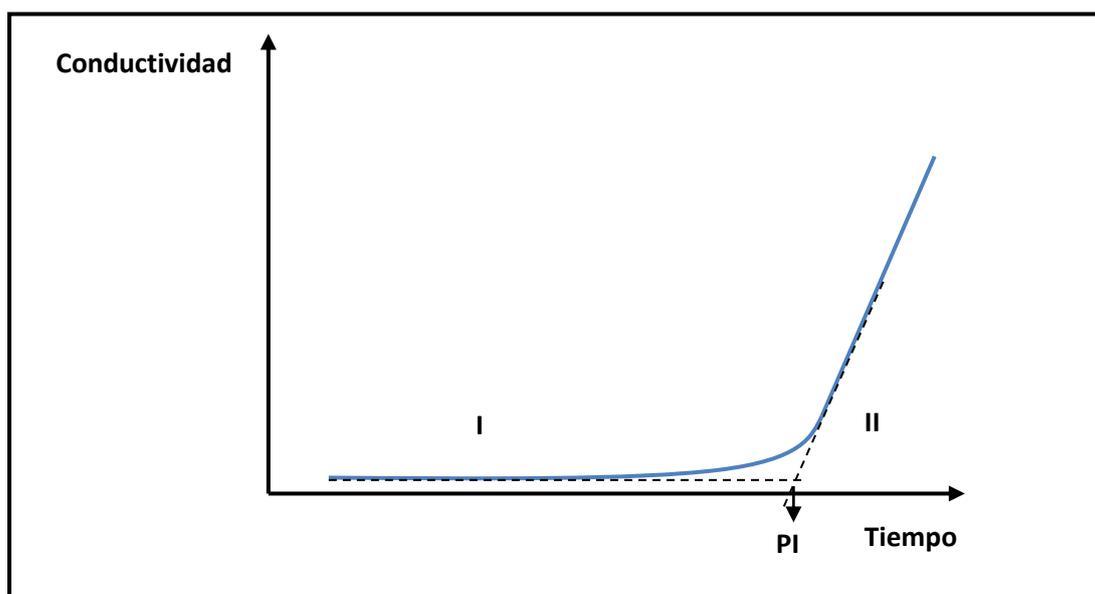
**Figura 6.1.-** Esquema del equipamiento utilizado para el método de enranciamiento acelerado AOM automatizado (válido para equipos OSI y Rancimat).

La muestra se coloca dentro de un tubo de vidrio (1) y éste dentro de un bloque calefactor termostatzado a la temperatura de oxidación y se inicia el pasaje de una corriente de aire a través del aceite contenido en el tubo. El oxígeno del aire reacciona con el material graso a alta temperatura, desencadenándose los procesos de oxidación. Luego de pasar a través del aceite el aire es conducido a un segundo recipiente (2) que contiene una determinada cantidad de agua deionizada, a través de la cual se lo hace burbujear. Los compuestos volátiles producidos por la oxidación (entre ellos varios ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido fórmico) se disuelven en el agua deionizada, incrementando apreciablemente la conductividad de la misma. Por lo tanto la conductividad del agua es proporcional a la cantidad de productos de oxidación recogidos en la misma que, a su vez, son

proporcionales al grado de deterioro del material graso. De esta manera, mediante el seguimiento de la conductividad durante el proceso de oxidación (la cual se registra y procesa en forma automática y mediante el software del equipo).

Inicialmente la conductividad del agua no varía demasiado debido a que la velocidad de oxidación del aceite es baja y, por ende, los productos de oxidación generados por unidad de tiempo son pocos. Sin embargo, alcanzado el período de inducción la velocidad de reacción se incrementa drásticamente así como la velocidad de generación de los productos de oxidación, lo que produce un cambio notorio en la velocidad de aumento de la conductividad como se muestra en la Figura 6.2.

El período de inducción (PI) se determina como el tiempo correspondiente al punto de corte de las pendientes antes y después del cambio en la velocidad de aumento de la conductividad eléctrica del agua.



**Figura 6.2.-** Representación de una curva típica obtenida por el método de enranciamiento acelerado (OSI o Rancimat).

En el Capítulo 5 se informaron los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antirradicalaria de los orizanoles, tanto en estándares puros como en extractos obtenidos a partir de las borras. Como se mencionó anteriormente la autooxidación lipídica transcurre mediante un mecanismo radicalario, por lo que es de esperar que los mismos resulten eficientes en la estabilización de aceites vegetales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el método del DPPH involucra un sistema muy específico (temperatura ambiente, medio metanólica, etc.) por lo que los resultados obtenidos no son directamente extrapolables a lo que ocurrirá cuando estos compuestos se adicionen a un medio graso.

En este capítulo se estudió el efecto de la adición de orizanoles (tanto puros como extractos obtenidos a partir de las borras) sobre la estabilidad oxidativa de diferentes aceites vegetales. Para ello, aceites de diverso origen fueron aditivados con una determinada concentración de orizanoles y se analizó la variación en el período de inducción. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos con varios antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados por la industria alimentaria, a los efectos de evaluar la posible utilización de los orizanoles para esta aplicación de interés tecnológico.

## **2. Materiales y métodos.**

Los ensayos de enranciamiento acelerado se realizaron en un equipo OSI 8 (Omnion, USA) y se procedió de acuerdo a la técnica oficial de la AOCS (Cd-12b-92).

Se utilizaron aceites refinados de origen comercial (soja, girasol común, arroz y girasol de alto oleico). Estos aceites fueron previamente purificados para eliminar los antioxidantes naturales presentes y/o agregados por el fabricante. Se utilizó el método de purificación en columna de alúmina descrita por Yoshida *et al.* (1992) y Morales *et al.* (2010). Para ello se pesó 50 gramos de alúmina básica activada a 200 °C y se colocó en una columna de vidrio para cromatografía. Posteriormente, se pesó 50 gramos de aceite el cual se hizo pasar a través de la columna, conteniendo la alúmina, realizando vacío a través de un kitasato conectado al extremo inferior de la misma. El aceite purificado se recogió en el kitasato y luego fue transferido a un frasco de color ámbar.

Estos aceites sin antioxidantes fueron conservados en la oscuridad a la temperatura de freezer, aproximadamente -20 °C, bajo atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su uso.

Los antioxidantes utilizados fueron: BHA, BHT, TBHQ, alfa-tocoferol, delta tocoferol de calidad Sigma-Aldrich, un estándar de orizanoles suministrado por el Dr. Haiko Hense, de la Universidad Federal de Santa Catarina (Brasil) y el concentrado de orizanoles obtenido mediante el método 4.

La adición de antioxidantes a estos aceites purificados se realizó preparando previamente una solución de los mismos en isopropanol o cloroformo. La adición de antioxidante se realizó directamente sobre los 5 g de aceite destinados al ensayo en OSI, mediante la adición del volumen de solución de antioxidante (no más de 150 µL) necesario para obtener una

concentración molar de  $3 \times 10^{-3}$  M. Esta concentración, equivalente a 500 ppm de TBHQ, fue la misma para todos los antioxidantes. Luego de adicionar el antioxidante la muestra se colocó en un baño de ultrasonido durante 10 min para asegurar su homogeneización. Las muestras de aceites así acondicionadas se destinaron al análisis de enranciamiento acelerado, sin previa remoción del solvente aportado por la solución de antioxidante ya que el mismo no interfiere en el resultado del análisis (Moltini *et al.*, 2009). Ello permitió asegurar que la concentración de antioxidante durante el análisis fuera efectivamente la adicionada, lo que podría no haber sido así si la muestra hubiese sido sometida a cualquier procedimiento para la remoción del solvente (dada la relativamente alta volatilidad de alguno de los antioxidantes sintéticos utilizados).

Todas las medidas se realizaron por duplicado, a una temperatura de 97.8 °C. Los resultados se compararon con los obtenidos para los aceites sin el agregado de antioxidantes.

Por otra parte, se oxidó el aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado del estándar de orizanoles ( $3 \times 10^{-3}$  M), sin suministro de aire, en el equipo OSI a una temperatura de 97.8 °C; se realizó la experiencia por duplicado. A determinados tiempos de oxidación, se realizó tomas de alrededor de 30 mg. Éstas se disolvieron en un volumen de 5 mL de hexano. Se determinó la absorbancia de la solución a 315 nm de acuerdo con Seetharamaiah y colaboradores (1986).

### 3. Resultados.

#### 3.1. Estudio de los aceites refinados comerciales.

Se analizaron los siguientes aceites refinados comerciales: de soja, de girasol común, de salvado de arroz y de girasol de alto oleico. En la tabla 6.1 se muestra la composición en ácidos grasos de cada uno de ellos: existen diferencias apreciables en el grado de insaturación.

**Tabla 6.1.-** Composición en ácidos grasos de los diferentes aceites utilizados.

Composición	Aceite			
	Soja	Girasol común	Salvado de arroz	Girasol de alto oleico
16:0	11.2	5.8	16.0	3.6
18:0	3.9	3.1	1.6	3.1
18:1	21.0	32.3	41.0	87.1
18:2	55.0	57.1	35.7	4.8
18:3	6.6	0.2	1.0	-

Dado que la reacción del oxígeno con el doble enlace del ácido graso ocurre en el carbono vecino al mismo (carbono alílico). Una mayor cantidad de dobles enlaces significa una mayor cantidad de carbonos alílicos (o bis-alílicos, vecinos a dos dobles enlaces). Por lo tanto, la velocidad de oxidación de un

ácido graso poli-insaturado será mayor que la de un ácido graso mono-insaturado. Esto queda de manifiesto en la Tabla 6.2, donde se muestran las velocidades de oxidación relativas al ácido oleico para los ácidos linoleico y linolénico (Perkins and Erickson, 1996). Esta tabla muestra que la velocidad de oxidación del ácido linoleico es 10 veces superior a la del ácido oleico y la del ácido linolénico es 25 veces superior a la del ácido esteárico.

**Tabla 6.2.-** Velocidad de oxidación relativa para tres ácidos grasos de una serie homóloga (Perkins and Erickson, 1996).

Ácido graso	Número de dobles enlaces	Velocidad de oxidación relativa
<b>Oleico</b>	1	1
<b>Linoleico</b>	2	10
<b>Linolénico</b>	3	25

A partir de la composición en ácidos grasos y de la velocidad de oxidación de la tabla 6.2, se puede determinar la estabilidad inherente de cada aceite de la siguiente manera (Perkins and Erickson, 1996):

$$Estabilidad\ inherente = \sum \frac{Porcentaje\ de\ AG}{100} * velocidad\ de\ reacción_{AG} \quad [6.1]$$

Donde “velocidad de reacción” es la velocidad de oxidación relativa (Tabla 6.2.)

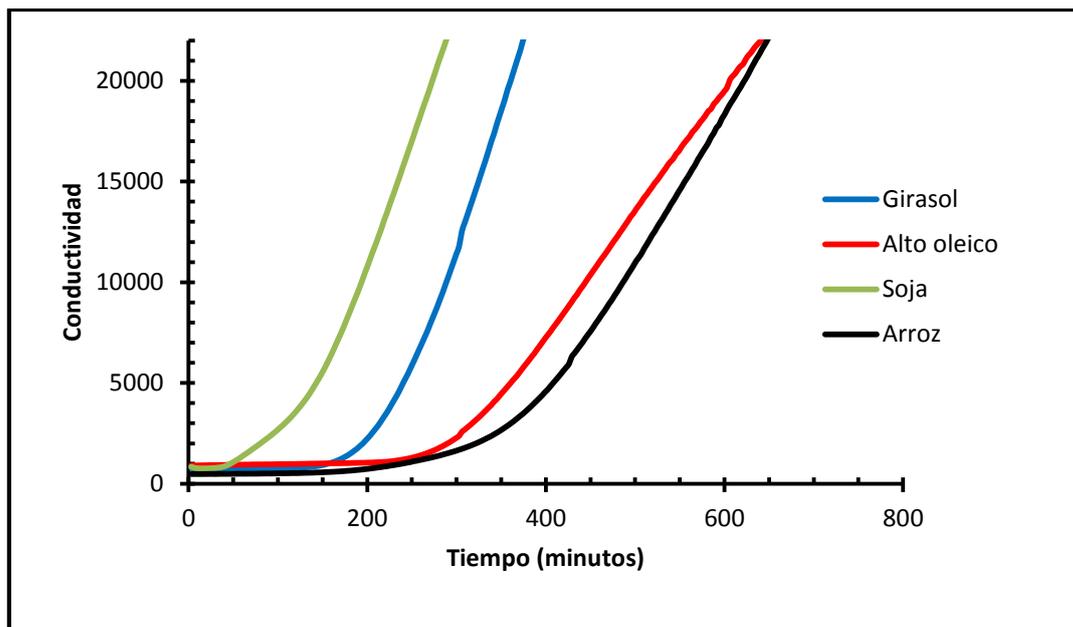
Este parámetro es indica la estabilidad que surgiría de considerar solamente la composición en ácidos grasos y sirve para comparar la estabilidad oxidativa entre diferentes materiales grasos.

Los datos de estabilidad inherente para cada aceite se presentan en la tabla 6.3. De acuerdo con esto el aceite de soja es el que debería poseer la menor estabilidad oxidativa seguido del aceite de girasol común y del aceite de salvado de arroz. El aceite de girasol de alto oleico es el que presenta el menor valor de estabilidad inherente y, por ende, éste debería presentar la mayor estabilidad oxidativa.

**Tabla 6.3.-** Estabilidad inherente calculada según la Ec. 6.1 en función de los datos de las tablas 6.1 y 6.2.

Aceite	Estabilidad inherente
<b>Soja</b>	7.4
<b>Girasol común</b>	6.1
<b>Salvado de arroz</b>	4.2
<b>Girasol de alto oleico</b>	1.4

En la figura 6.3 se muestra las curvas de conductividad contra tiempo correspondiente al análisis por OSI de los cuatro aceites mencionados.



**Figura 6.3.-** Curvas obtenidas mediante el análisis de enranciamiento acelerado en el equipo OSI a 97.8 °C para los aceites purificados de soja, girasol común, salvado de arroz y girasol de alto oleico.

A partir de estas curvas se determinó los valores del período de inducción (PI) para cada aceite, los que se muestran en la Tabla 6.4. El aceite de soja presentó la menor estabilidad oxidativa (PI = 2.1 h), seguido por el aceite de girasol común (PI = 3.4 h), el aceite de girasol de alto oleico (PI = 5.3 h) y el aceite de salvado de arroz (PI = 6.2 h).

En general el orden de estabilidades oxidativas está de acuerdo con lo esperado de acuerdo a las estabilidades inherentes determinadas anteriormente (Tabla 6.3), con la excepción de que el PI del aceite de salvado de arroz fue mayor que el del girasol de alto oleico. Esto no es de extrañar ya que la estabilidad inherente es un parámetro indicativo de la estabilidad oxidativa “esperable” sólo en función de la composición en ácidos grasos, por lo que no considera el efecto de otros compuestos minoritarios contenidos en el

aceite que puedan jugar un rol tanto pro- como antioxidante (como ser trazas metálicas, concentración inicial de hidroperóxidos, trazas de pigmentos, etc.) y que eventualmente pueden no haber sido removidos completamente por el proceso de purificación.

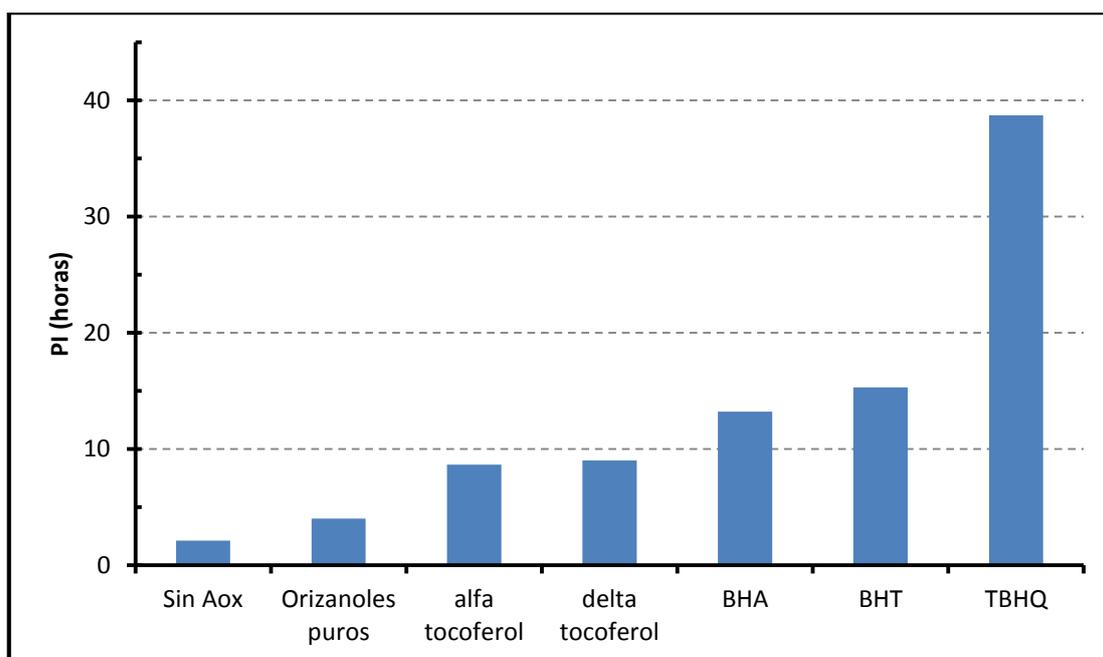
**Tabla 6.4.-** Períodos de inducción (PI) obtenidos a partir de las curvas de la Figura 6.3 para los diferentes aceites.

<b>Aceite</b>	<b>PI (horas)</b>
<b>Soja</b>	2.1 ± 0.1
<b>Girasol común</b>	3.4 ± 0.2
<b>Girasol de alto oleico</b>	5.3 ± 0.2
<b>Salvado de arroz</b>	6.2 ± 0.2

### **3.2. Efecto del agregado de antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de los aceites**

A los aceites purificados se les agregó una misma concentración molar ( $3 \times 10^{-3}$  M) de diferentes antioxidantes. El objetivo de esto fue el estudio de su capacidad antioxidante y la comparación con el extracto de orizanoles obtenido mediante el Método M4 descrito en el Capítulo 4 (modificación química de las borras y posterior partición con solventes), el cual presentó un contenido de orizanoles de 31.3 %. Como ya fue mencionado anteriormente, otros antioxidantes utilizados fueron: BHA, BHT, TBHQ, alfa-tocoferol, delta tocoferol

y un estándar de orizanoles. En la Figura 6.4 se presenta los períodos de inducción obtenidos a 97.8 °C para el aceite de soja purificado y con el agregado de diferentes antioxidantes.



**Figura 6.4.-** Períodos de inducción a 97.8 °C (método OSI) del aceite de soja purificado (Sin Aox) y con el agregado de diferentes antioxidantes a una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M.

El TBHQ resultó el más eficiente a 97.8 °C con un período de inducción cercano a las 40 horas. Otros antioxidantes, como BHA y BHT, presentan valores del período de inducción notoriamente menores a la mitad del TBHQ.

Al estar trabajando a temperaturas de 97.8 °C los antioxidantes pueden perderse por volatilización y por ende cambiar la concentración del mismo a lo largo del tiempo de análisis afectando así al valor del período de inducción. De

esta manera, es necesario tener en cuenta los puntos de ebullición de los antioxidantes a los efectos de evaluar los períodos de inducción.

En la Tabla 6.5 se muestra los puntos de ebullición de estos antioxidantes sintéticos. Estos valores son similares para el BHA y BHT por lo que no existe una diferencia apreciable respecto a sus volatilidades. El punto de ebullición del TBHQ es un poco superior por lo que su volatilidad es un poco menor que la del BHA y del BHT. De acuerdo con estos datos, las diferencias en los períodos de inducción para el BHA y BHT no se pueden deber a la pérdida por volatilización a 97.8 °C. Como el TBHQ tiene un punto de ebullición ligeramente superior, las pérdidas por volatilización deberían ser menores por lo que, el período de inducción debería ser mayor.

Otro aspecto a considerar respecto al poder antioxidante es la cantidad de grupos hidroxilo que intervienen en el poder antioxidante. El TBHQ posee 2 grupos hidroxilo mientras que el BHA y BHT poseen solamente uno. Por lo tanto, el TBHQ debería tener un mayor poder antioxidante.

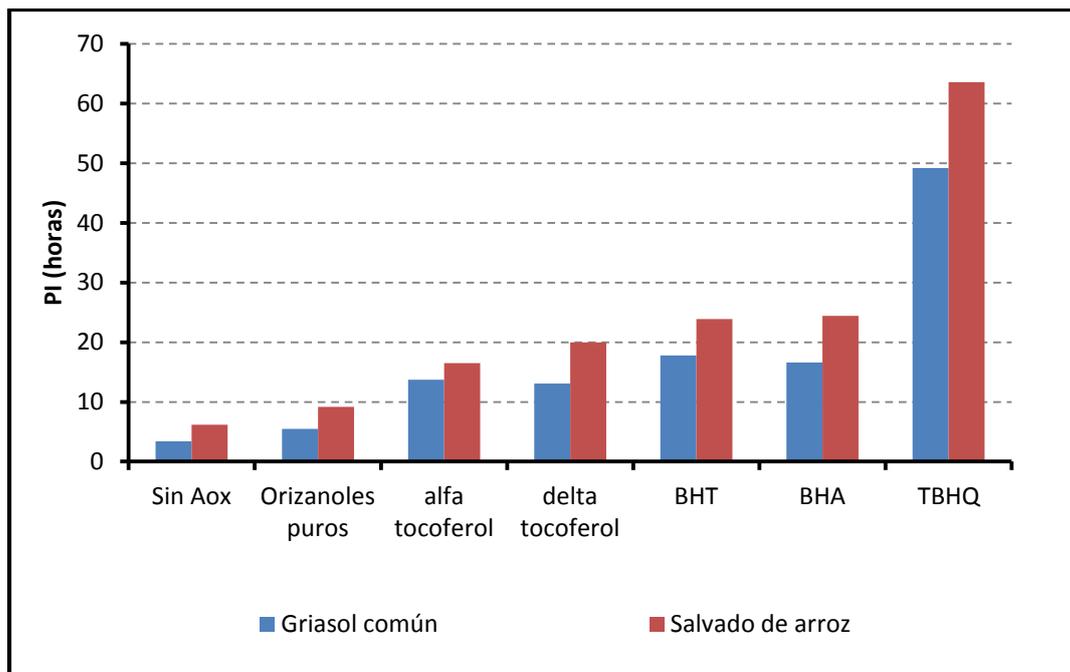
Los antioxidantes naturales ( $\alpha$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol y orizanoles puros) presentan valores del período de inducción más bajos. Ello significa que el poder protector de los estos antioxidantes naturales es menor que el de los sintéticos estudiados. Sin embargo, el  $\alpha$ -tocoferol tiene un punto de ebullición más bajo que el resto de los antioxidantes sintéticos por lo que se pierde con más facilidad por volatilización. No se encontró datos respecto al punto de ebullición del  $\delta$ -tocoferol.

**Tabla 6.5.-** Puntos de ebullición de diferentes antioxidantes sintéticos y naturales.

<sup>(1)</sup> Sigma Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)), <sup>(2)</sup> Sparchem ([www.sparchem.com](http://www.sparchem.com)) y <sup>(3)</sup> Guidechem. ([www.guidechem.com](http://www.guidechem.com))

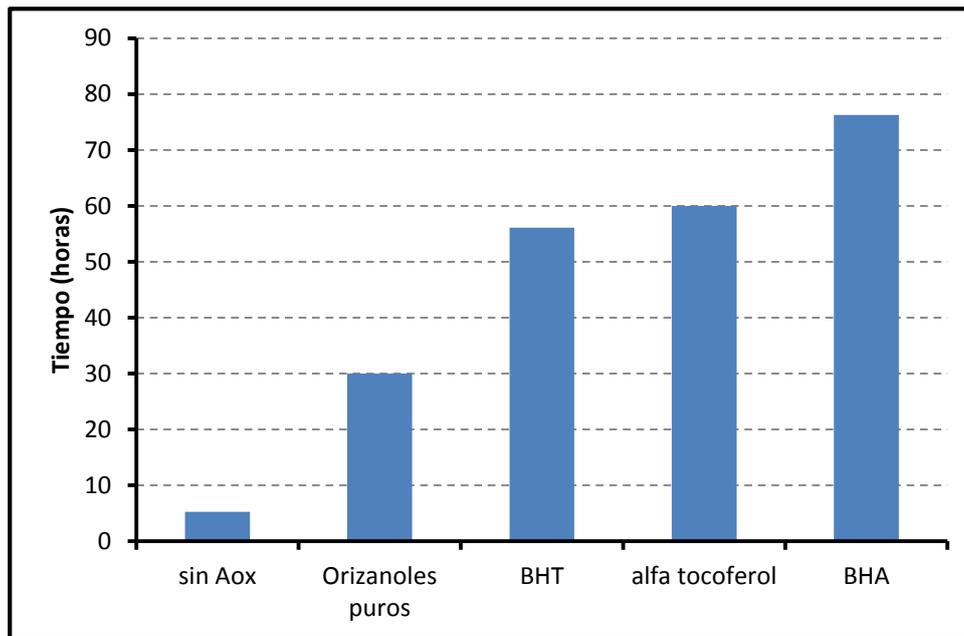
Antioxidante	Punto de ebullición (°C)
BHA	268 <sup>(1)</sup>
BHT	265 <sup>(1)</sup>
TBHQ	291-295 <sup>(2) y (3)</sup>
$\alpha$ -tocoferol	200-220 <sup>(1)</sup>
Cicloartenil ferulato	663 <sup>(3)</sup>

El cicloartenil ferulato, uno de los compuestos que constituyen los orizanoles, tiene el punto de ebullición más alto de todos los antioxidantes utilizados, por lo que se perdería en menor cantidad por volatilización. El período de inducción fue el más bajo con lo cual, si el resto de los orizanoles posee un punto de ebullición similar, se puede concluir que es el que posee el más bajo poder protector de todos los antioxidantes. Como ya se mencionó es importante aclarar que esta disminución solo tiene en cuenta la pérdida de antioxidantes por volatilización pero no el poder protector intrínseco de cada uno. En consecuencia, los resultados experimentales pueden diferir de estas conclusiones.



**Figura 6.5.-** Períodos de inducción a 97.8 °C (método OSI) del aceite de girasol común purificado y del aceite de salvado de arroz purificado (Sin Aox) y ambos con el agregado de diferentes antioxidantes.

En la Figura 6.5 se muestran los períodos de inducción del aceite de girasol común purificado y del aceite de salvado de arroz purificado y ambos con el agregado de diferentes antioxidantes. Como era esperable de acuerdo con el grado de insaturación, los períodos de inducción de estos aceites respecto al del aceite de soja son mayores. El  $\delta$ -tocoferol presentó mayor poder antioxidante que el  $\alpha$ -tocoferol en el aceite de salvado de arroz mientras que en el aceite de girasol común sucedió lo contrario. Para el aceite de girasol común y para el aceite de salvado de arroz con agregado de TBHQ se obtuvo un período de inducción mayor que con el resto de los antioxidantes.



**Figura 6.6.-** Períodos de inducción a 97.8 °C (método OSI) del aceite de girasol de alto oleico purificado (Sin AOx) y con el agregado de diferentes antioxidantes.

El aceite de girasol de alto oleico es el que contiene menor cantidad de ácidos grasos poli-insaturados por lo cual su período de inducción debe ser mayor que el del resto de los aceites analizados. En la figura 6.6 se presentan los períodos de inducción para el aceite de girasol de alto oleico purificado al que se le agregó diferentes antioxidantes en la misma concentración molar. Los valores del PI para estos antioxidantes son inferiores a las 90 horas pero superiores al resto de los aceites con estos mismos antioxidantes. El TBHQ y el  $\delta$ -tocoferol que no se muestran en la Figura 6.6 presentaron valores de PI superiores a las 90 horas y por ende no pudo ser determinado el período de inducción. El  $\delta$ -tocoferol mostró un poder antioxidante más pronunciado respecto al alfa tocoferol en el aceite de girasol de alto oleico.

De estos resultados obtenidos se concluye los aceites de soja, de girasol común y de salvado de arroz con BHA presentan un valor de PI inferior a los

correspondientes con BHT mientras que el aceite de girasol de alto oleico es inverso. Esto está de acuerdo con lo informado en diferentes trabajos de investigación (Hammama *et al.*, 1991). El TBHQ ha sido informado como mucho más efectivo que el BHA y BHT (Augustin *et al.*, 1984; Gordon *et al.*, 1995; Allam *et al.*, 2002). Todos los aceites con orizanoles puros presentaron el menor PI. Es posible definir un factor de protección en base a cada uno de los aceites sin purificar de la siguiente manera:

$$F. P. = \frac{P.I._{\text{aceite con Aox}}}{P.I._{\text{aceite sin Aox}}} \quad [6.2]$$

Donde:  $P.I._{\text{aceite con Aox}}$  = período de inducción del aceite purificado con  
agregado de antioxidante

$P.I._{\text{aceite sin Aox}}$  = período de inducción del aceite purificado

**Tabla 6.6.-** Factores de protección de los antioxidantes sintéticos y naturales agregados a los aceites purificados de soja, girasol común, girasol de alto oleico y salvado de arroz a una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M.

Aceite	Factor de protección					
	Orizanoles puros	$\alpha$ -tocoferol	$\delta$ -tocoferol	BHA	BHT	TBHQ
Soja	$1.9 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.3$	$6.3 \pm 0.4$	$7.3 \pm 0.4$	$18.4 \pm 1.1$
Girasol común	$1.6 \pm 0.1$	$4.0 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$	$4.9 \pm 0.3$	$5.2 \pm 0.3$	$14.5 \pm 0.8$
Salvado de arroz	$1.5 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.2$	$3.2 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$	$10.3 \pm 0.4$
Girasol de alto oleico	$5.7 \pm 0.3$	$11.3 \pm 0.4$	> 17	$14.4 \pm 0.6$	$10.6 \pm 0.4$	> 17

La Tabla 6.6 muestra que los factores de protección para un mismo aceite con agregado de antioxidantes naturales son inferiores respecto a los antioxidantes sintéticos agregados en la misma cantidad. El aceite de girasol de alto oleico presentó un comportamiento diferente al resto de los aceites: con el agregado de  $\delta$ -tocoferol el factor de protección (mayor a 17) es notoriamente superior al del BHA (14.4) y del BHT (10.6). El  $\alpha$ -tocoferol presentó un valor similar al del BHT. Para todos los aceites estudiados, los factores de protección correspondientes a los orizanoles puros fueron los más bajos. Los orizanoles presentaron un bajo poder antioxidante sobre los aceites utilizados; éste fue notoriamente inferior respecto al resto de los antioxidantes ensayados. En

conclusión, de acuerdo con estos resultados, los orizanoles no son antioxidantes eficientes para proteger un material graso.

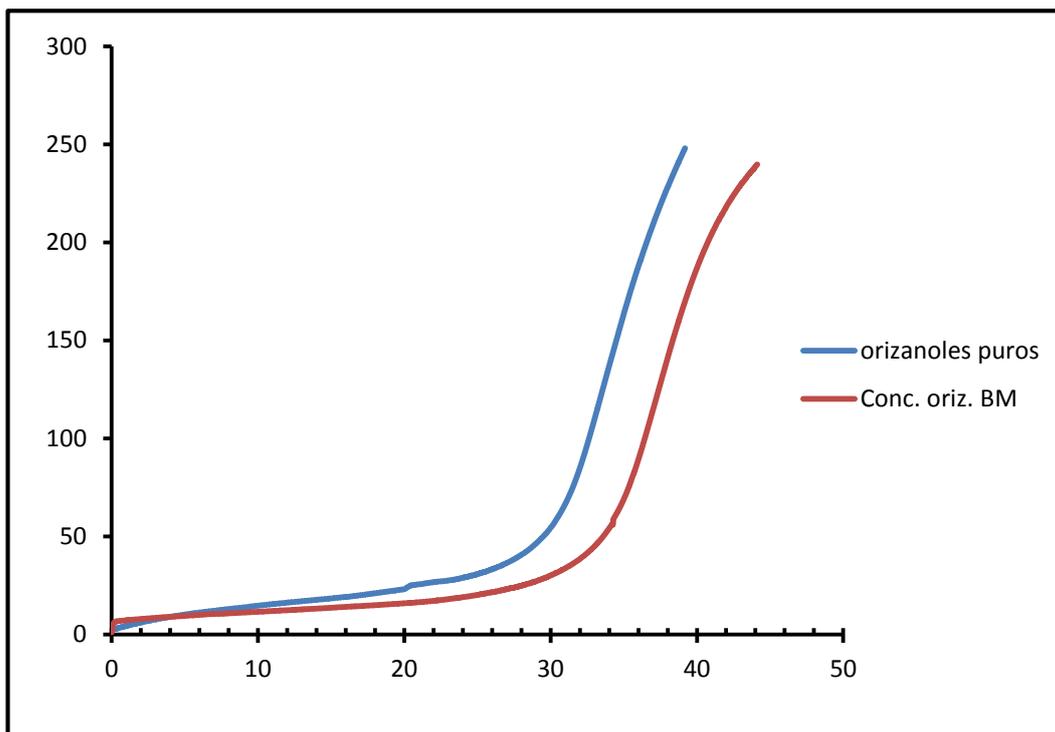
La complejidad que involucra el estudio de la oxidación de los triacilgliceroles a diferentes temperaturas ha llevado a que muchos autores hayan realizado aportes acerca de este tema. Algunos investigadores (Augustin *et al.*, 1984; Gordon *et al.*, 1995) realizaron estudios sobre la eficiencia de diferentes antioxidantes (BHA, BHT y TBHQ) a la temperatura de fritura (180 °C) con lo cual los mecanismos de oxidación no son comparables con los que tienen lugar a baja temperatura (Marmesat *et al.*, 2010). Kurechi *et al.* (1980) mencionan que algunos compuestos de oxidación formados a partir de algunos antioxidantes como el BHA y el BHT a temperatura ambiente poseen un cierto poder antioxidante. Ello llevaría a que, a temperaturas bajas, los aceites no solo quedarían protegidos por el contenido remanente de antioxidante sino también por alguno de sus compuestos de oxidación.

Verleyen *et al.* (2001) explican que la cinética de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol está notoriamente influida por el grado de insaturación del aceite. A mayor grado de insaturación del aceite, queda un mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol luego de la termo-oxidación. Se entiende por “termo-oxidación” al proceso en el cual el aceite se oxida a temperatura elevada por contacto con el aire circundante; usualmente se emplea como un símil de lo que ocurre en los procesos de fritura. Por otra parte, el  $\alpha$ -tocoferol posee una muy alta susceptibilidad para captar radicales peroxilo formados durante la termo-oxidación. Ello explica que proteja más a aquellos aceites con menor grado de

insaturación, ya que la vida media de los hidroperóxidos es mayor que en los aceites muy insaturados, como en el caso del aceite de girasol de alto oleico.

Barrera-Arellano *et al.* (2002) estudiaron el efecto del  $\alpha$ -tocoferol y del  $\delta$ -tocoferol en diferentes aceites. Encontraron que durante la termo-oxidación son muy importantes las pérdidas de los tocoferoles y que el  $\alpha$ -tocoferol es el menos estable de todos. Ello explica los resultados encontrados en esta tesis ya que el  $\alpha$ -tocoferol es el que menos protege de los dos tocoferoles utilizados, a casi todos los aceites empleados.

En función del bajo poder de protección de los orizanoles puros, se procedió a probar la eficiencia del concentrado de orizanoles obtenido con un 31.3 % (concentrado BM), ya que éste fue el extracto que mostró la mayor concentración de orizanoles. Los ensayos fueron realizados con el aceite de girasol de alto oleico debido a que fue el aceite al cual los orizanoles protegieron mejor. El agregado del concentrado de orizanoles BM se realizó teniendo en cuenta una concentración molar neta de orizanoles igual a la agregada para el estándar de orizanoles puros ( $3 \times 10^{-3}$  M). En la figura 6.7 se muestra las curvas OSI obtenidas a 97.8 °C para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado del concentrado de orizanoles BM y con el mismo agregado molar de los orizanoles puros ( $3 \times 10^{-3}$  M).



**Figura 6.7.-** Curvas OSI a 97.8 °C obtenidas para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de orizanoles puros y con el concentrado de orizanoles BM a la misma concentración molar neta de orizanoles ( $3 \times 10^{-3}$  M).

En la tabla 6.7 se presentan los períodos de inducción para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de los orizanoles puros y del concentrado de orizanoles BM (método OSI a 97.8 °C). A los efectos de comparar los resultados se analizó su dispersión, calculando la desviación estándar de ellos. Teniendo en cuenta la dispersión, los períodos de inducción para ambos agregados presentan una leve diferencia, siendo un poco mayor para el concentrado de orizanoles BM.

**Tabla 6.7.-** Períodos de inducción (método OSI a 97.8 °C) para el aceite de girasol de alto oleico purificado y con una concentración molar neta de orizanoles igual a  $3 \times 10^{-3}$  M, proveniente del agregado de los orizanoles puros o del concentrado BM.

Antioxidante	Período de inducción (horas)
Orizanoles puros	$30.6 \pm 1.1$
Concentrado oriz. BM	$33.5 \pm 0.9$

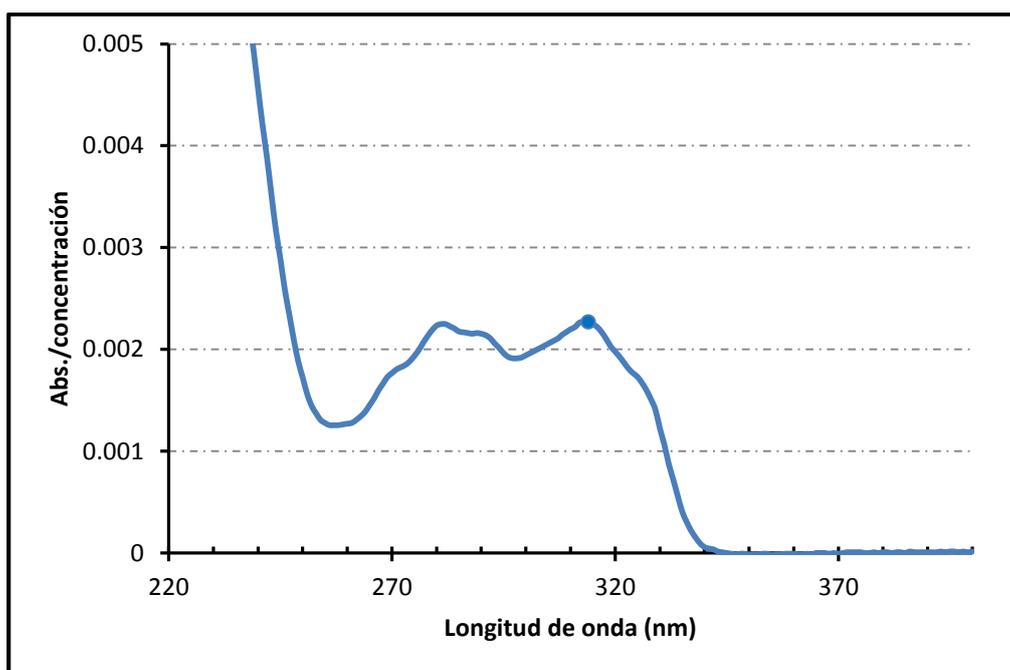
Pese a que el concentrado de orizanoles BM presentó un 68.7 % de compuestos no-orizanoles, cuando fue adicionado al aceite de girasol de alto oleico en una cantidad tal que se obtuvo la misma concentración neta de orizanoles, mostró un efecto sobre el PI levemente superior al producido por los orizanoles puros. Ello se justifica porque el concentrado posee una pequeña cantidad de tocoferoles de 75 ppm (mencionado en el capítulo 4). Esto indica que dicho concentrado puede ser dosificado a los efectos de estabilizar un aceite comestible en función únicamente de su contenido de orizanoles, sin que el resto de los compuestos que lo constituyen tengan un efecto apreciable sobre la estabilidad oxidativa del aceite.

#### **4. Pérdida de orizanoles durante el proceso de termo-oxidación de un aceite.**

Mediante el estudio realizado en OSI y se concluye que los orizanoles presentaron un mayor poder antioxidante cuando se agregaron al aceite de

girasol de alto oleico purificado que cuando se agregaron a los otros tres aceites utilizados (soja, girasol común y salvado de arroz). Por ello se eligió este aceite para hacer el estudio de su pérdida durante el proceso de termo-oxidación.

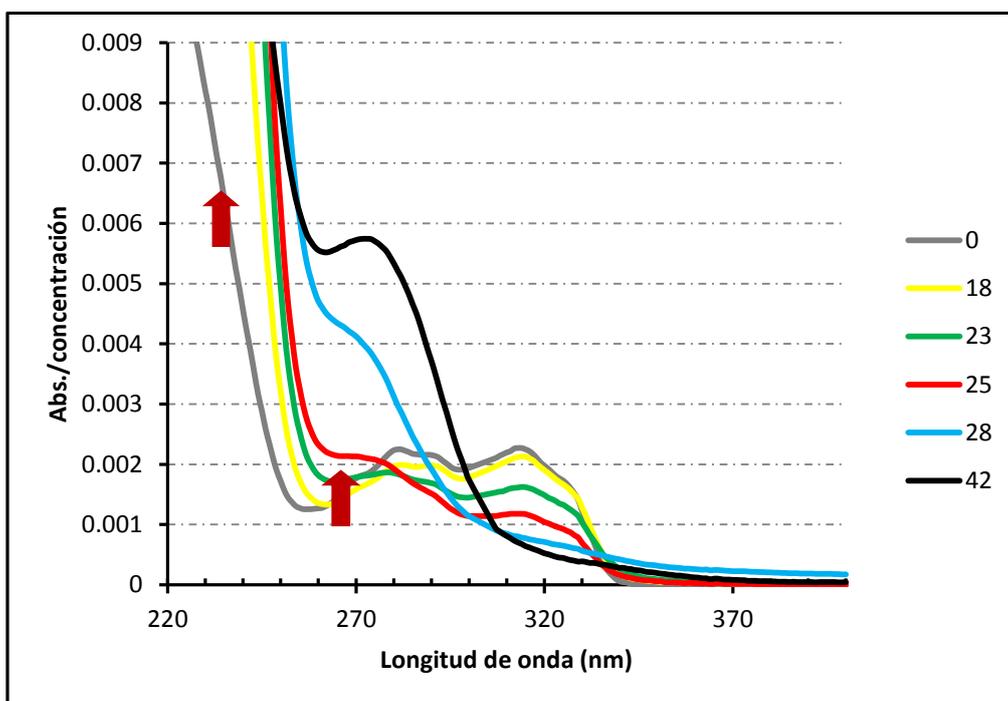
La Figura 6.8 muestra el espectro de absorción entre 220 nm y 400 nm para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de orizanoles a una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M antes de termo-oxidar, donde se muestra el máximo correspondiente a los orizanoles (314-315 nm).



**Figura 6.8.-** Espectro de absorción para el aceite de girasol de alto de oleico purificado pero con el agregado de orizanoles ( $3 \times 10^{-3}$  M), antes de termo-oxidar (absorbancia normalizada considerando la concentración de aceite en miligramos por mililitro)

La Figura 6.9 muestra los espectros de absorción desde el inicio de la termo-oxidación hasta su finalización, para muestras tomadas a diferentes

tiempos de oxidación (horas). Se observa claramente que al aumentar el tiempo de oxidación, el espectro característico de los orizanoles se modifica y el pico a 314-315 nm disminuye hasta desaparecer completamente en el entorno de las 28 horas. Morales *et al.* (2010) indican los máximos característicos de los compuestos de oxidación primaria para el aceite de girasol de alto oleico a 232 nm (hidroperóxidienos) y los de los compuestos de oxidación secundaria a 268 nm (cetodienos) (ver flechas en la figura Figura 6.9).



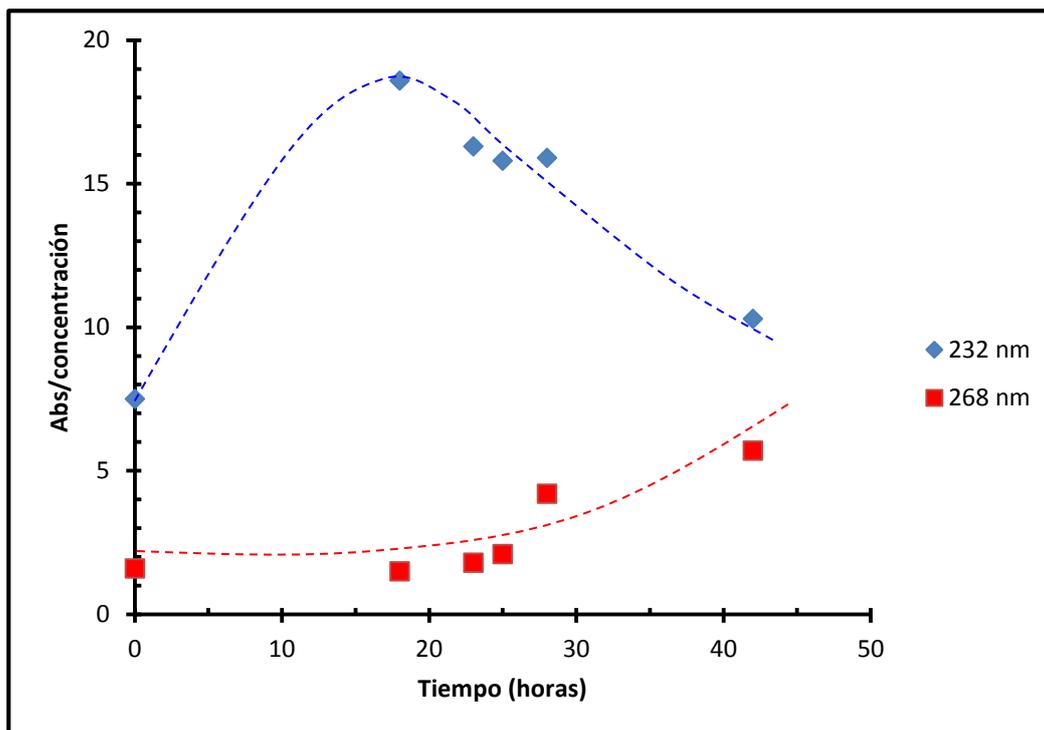
**Figura 6.9.-** Espectro de absorción (expresado en absorbancia/concentración de aceite en mg/mL) para el aceite de girasol de alto oleico con agregado de orizanoles, a diferentes períodos de termo-oxidación (en horas).

En la tabla 6.8 se muestran las absorbancias normalizadas a 232 nm y 268 nm a diferentes tiempos de termo-oxidación. La absorbancia normalizada a

232 nm inicialmente aumentó pero luego de unas 18 horas disminuyó, mientras que la absorbancia a 268 nm al principio permanece constante y luego de las 23 h de oxidación aumenta en forma continua. La disminución de la absorbancia a 232 nm a partir de las 18 horas coincide con el aumento de la absorbancia a 268 nm. Esto está de acuerdo con el hecho de que luego de la acumulación inicial de los compuestos de oxidación primaria (232 nm) y como consecuencia de la descomposición de los mismos, se comienzan a formar los compuestos de oxidación secundaria (268 nm). Esto se verifica en la Figura 6.10, donde se grafican los valores de la Tabla 6.7, observándose además que la velocidad de formación de los compuestos de oxidación que absorben a 232 nm es menor que la velocidad de descomposición posterior de los mismos (figura 6.10).

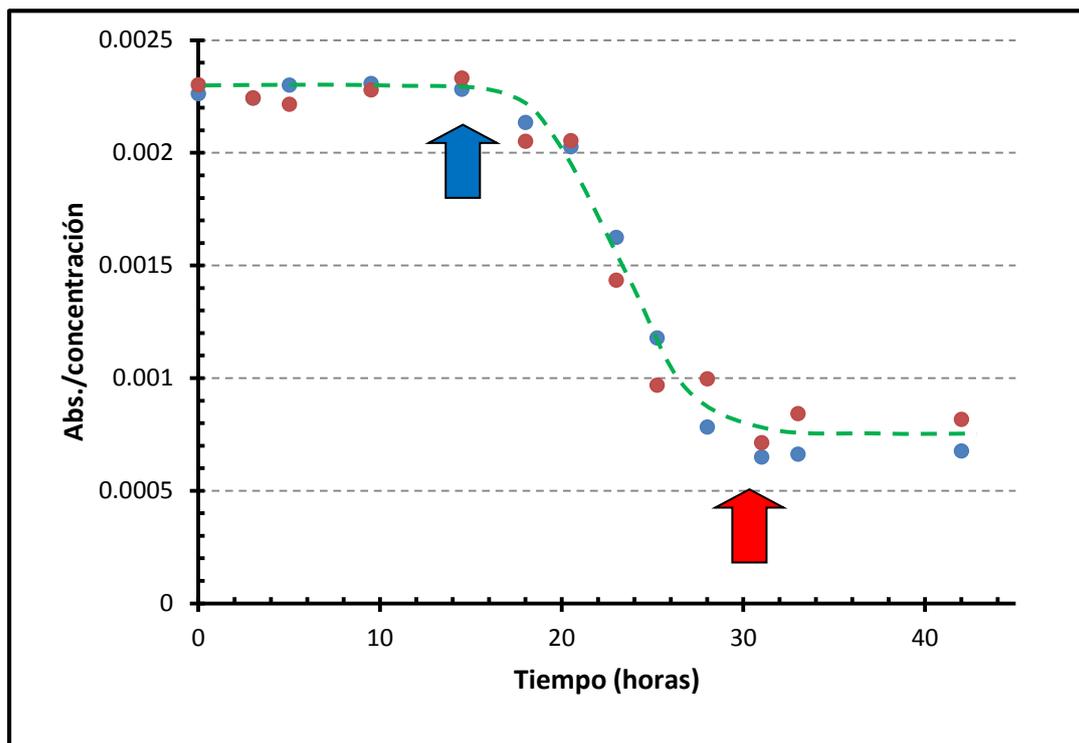
**Tabla 6.8.-** Absorbancia normalizada (absorbancia/concentración de aceite en mg/mL) a 232 nm y a 268 nm para el aceite de girasol de alto oleico purificado con el agregado de orizanoles, en función del tiempo de termo-oxidación.

Tiempo (horas)	Abs./conc. (x 1000)	
	232 nm	268 nm
0	7,5	1,6
18	18,6	1,5
23	16,3	1,8
25	15,8	2,1
28	15,9	4,2
42	10,3	5,7



**Figura 6.10.-** Absorbancia normalizada (absorbancia/concentración de aceite en mg/mL) a 232 nm y a 268 nm para el aceite de girasol de alto oleico purificado con el agregado de orizanoles, en función del tiempo de termo-oxidación.

La Figura 6.11 muestra la variación de la absorbancia normalizada a 315 nm (máximo del pico de los orizanoles) para los tiempos de termo-oxidación a los cuales se extrajo la muestra (por duplicado). La muestra y su duplicado mostraron un comportamiento similar. Al inicio de la termo-oxidación (primeras 14 horas) el contenido de orizanoles no presentó cambios significativos. Pasadas las 14 horas (flecha azul en la Figura 6.11), la concentración de los orizanoles comenzó a disminuir hasta cumplirse aproximadamente las 30 horas de termo-oxidación (flecha roja en la Figura 6.11), a partir del cual la absorbancia normalizada se mantuvo constante.



**Figura 6.11.-** Absorbancia normalizada a 315 nm en función del tiempo de termo-oxidación a 98.7 °C del girasol de alto oleico purificado conteniendo orizanoles en una concentración  $3 \times 10^{-3}$  M.

Entre las 28 horas y las 30 horas el espectro de absorbancia (Figura 6.9) perdió el perfil característico de los orizanoles, lo que significa que no se encuentran presentes en cantidad significativa.

## 5. Conclusiones.

Los orizanoles poseen un muy bajo poder antioxidante y, por lo tanto, un bajo poder protector si se los compara con los otros antioxidantes estudiados, tanto de origen natural como sintético.

El concentrado de orizanoles BM posee un poder antioxidante levemente superior al de los orizanoles puros. Esto podría deberse a que entre los compuestos no-orizanoles contenidos en el mismo existe una pequeña proporción de tocoferoles (75 ppm) que pudieron contribuir al efecto protector global de este concentrado. Esto también indica que las otras especies químicas presentes no poseen un efecto mayormente negativo en el poder antioxidante de los orizanoles.

El seguimiento de la pérdida de orizanoles durante la termo-oxidación a 97.8 °C demostró que, cuando se llega a aproximadamente el tiempo de inducción del método OSI, su pérdida es completa. En este momento la velocidad de oxidación se incrementa notoriamente, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante el método OSI.

## 6. Bibliografía.

- Allam S. S. M.; Mohamed H. M. A. Thermal stability of some commercial natural and synthetic antioxidants and their mixtures. *J. Food Lipids* (2002) 9: 277-293.
- AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society Fourth Edition, Second Printing and Revisions, American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, USA (1990).
- Augustin M. A.; Berry S. K. Stability of tapioca chips fried in RBD palm olein treated with antioxidants. *J. Am. Oil Chem.* (1984) 61: 873-877.

- Barrera-Arellano D.; Ruiz-Mendez V.; Velazco J.; Marquez-Ruiz G.; Dobarganes C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *J. Sci. Food Agric.* (2002) 82: 1696-1702.
- Frankel E. N. Lipid oxidation. *The Oily Press.* (1998) Dundee (UK).
- Gordon M. H.; Kourimska L. The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. *J. Sci. Food Agric.* (1995) 68: 347-353.
- Hammama A. A.; Nawar W. W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* (1991) 39: 1063-1069.
- Kurechi T.; Kato T. Studies on the antioxidants XI. Oxidation products of concomitantly butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1980) 57: 220-223.
- Marmesat S.; Morales A.; Velasco J.; Dobarganes M. C. Action and fats of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas y Aceites* (2010) 61(4): 333-340.
- Moltini M.; Ferreira N., Estudio del poder antioxidante de un concentrado de orizanoles obtenido a partir de borras industriales, Trabajo práctico de la Carrera Ingeniería de Alimentos, Montevideo (Uruguay), 2009.
- Morales A.; Dobarganes C.; Marquez Ruiz G.; Velazco J. Quantitation of Hydroperoxy-, Keto- and Hydroxy-Dienes During Oxidation of FAMES from High-Linoleic and High-Oleic Sunflower Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2010) 87: 1271-1279.
- Perkins E. G. and Erickson M. D. "Deep Frying, Chemistry, Nutrition, and Practical Applications," Edited by E. G. Perkins and M. D. Erickson. AOCS Press. (1996) Champaign (USA).

- Shahidi F.; Wanasundara U. N. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. Natural antioxidant. *ed. Fereidoon Shahidi*, AOCS Press. (1997) Champaign (USA).
- Simic M. G.; Jovanovic S. V.; Niki E. Mechanism of lipid oxidative processes and their inhibition. Lipid oxidation in food. *Ed. Allen J. St. Angelo*, ACS Symposium Series 500. (1992) Washington (USA).
- Verleyen T.; Kamal-Eldin A.; Dobarganes C.; Verhe R.; Dewenttinck K.; Huyghebaert A. Modeling of  $\alpha$ -tocopherol loss and oxidation products formed during thermoxidation in triolein and tripalmitin mixtures. *Lipids* (2001) 36(7): 719-726.
- Yoshida H.; Kondo I.; Kajimoto G. Participation of Free Fatty Acids in the Oxidation of Purified Soybean Oil During Microwave Heating. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1992) 69:11 1136-1140.
- Wan P. J. Accelerated stability Methods. Method to asses quality and stability of oils and fat-containing foods. Ed. Kathleen Warner and N. A. Michael Eskin. AOCS Press. (1995) Champaign (USA).

# **Capítulo 7**

## **Aplicación de los orizanoles a la estabilización de aceites comestibles:**

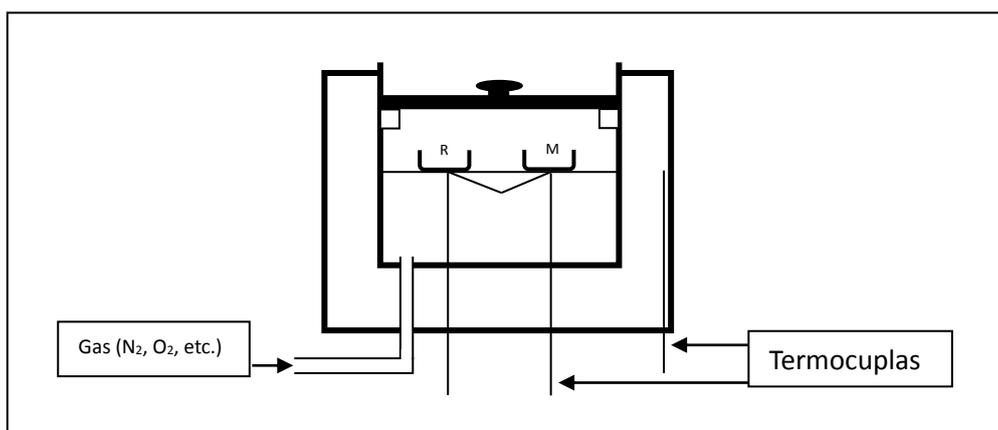
### **B.- Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

# Índice

- 1.- Introducción
- 2.- Materiales y métodos
- 3.- Resultados
  - 3.1.- Estudio isotérmico
    - 3.1.1.- Aceites refinados purificados
    - 3.1.2.- Aceites refinados purificados con agregado de diferentes antioxidantes
      - 3.1.2.1.- Aceite de soja
      - 3.1.2.2.- Aceite de girasol común
      - 3.1.2.3.- Aceite de salvado de arroz
      - 3.1.2.4.- Aceite de girasol de alto oleico
    - 3.1.3.- Comparación de los resultados para los diferentes aceites
  - 3.2.- Estudio no isotérmico
    - 3.2.1.- Aceites refinados purificados
    - 3.2.2.- Aceites refinados purificados con agregado de diferentes antioxidantes
      - 3.2.2.1.- Aceite de soja
      - 3.2.2.2.- Aceite de girasol común y aceite de salvado de arroz
      - 3.2.2.3.- Aceite de girasol de alto oleico
    - 3.2.3.- Comparación de los resultados para los diferentes aceites
- 4.- Conclusiones
- 5.- Bibliografía

## 1. Introducción.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC por su sigla en inglés) es una técnica de análisis térmico basada en la determinación de flujos de calor cuando una muestra se somete a un calentamiento o enfriamiento a velocidad controlada. Permite estudiar aspectos vinculados a diferentes fenómenos como transiciones de fases (cristalización, fusión y evaporación), reacciones químicas (hidrólisis, oxidación, etc.), en función del tiempo y de la temperatura (Jiménez *et al.*, 2003).



**Figura 7.1.-** Representación esquemática de un horno correspondiente a un calorímetro diferencial de barrido de tipo flujo de calor.

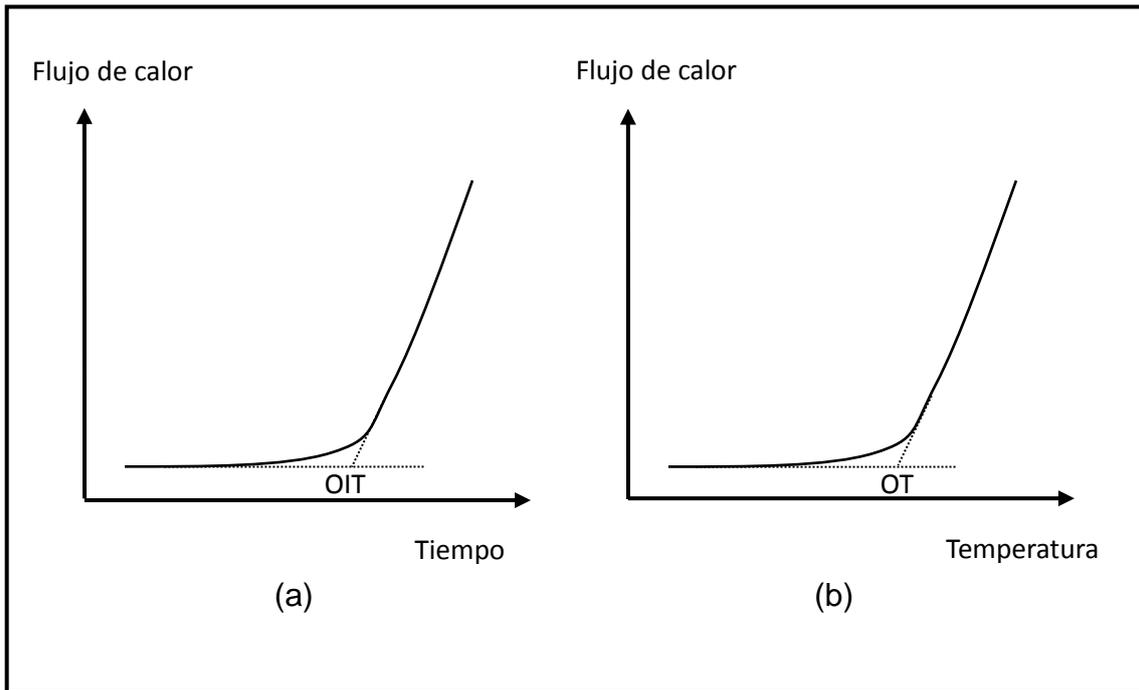
R= referencia, M= muestra

Dentro de las aplicaciones dadas a la DSC se ha indicado su utilización para el estudio de la cinética de oxidación y de la estabilidad oxidativa de

diversas grasas (Tan *et al.*, 2002; Rudnik *et al.*, 2000). Esto es posible dado que el proceso de oxidación de los lípidos es exotérmico, por lo que la cantidad de calor liberado por una muestra sometida a dicho proceso se puede vincular con la velocidad a la cual transcurre el mismo (Litwinienko *et al.*, 1998; Litwinienko *et al.*, 1999; Thurgood *et al.*, 2007).

El fundamento teórico original de este método fue descrito por Ozawa (1965) y posteriormente por diversos autores como Shadidi *et al.* (1997), Simon (2006).

En la Figura 7.1 se muestra el esquema de un horno de un calorímetro de flujo de calor. En el horno se colocan dos cápsulas, una conteniendo la muestra (M) y otra vacía que se utiliza como referencia (R). La oxidación de la muestra se inicia ingresando un flujo de aire u oxígeno puro al interior del horno. El equipo determina la diferencia de temperatura entre ambas cápsulas mediante las termocuplas que se encuentran por debajo del platillo que las soporta. Mediante la ecuación de Biot-Fourier (Höhne *et al.*, 2003), se relaciona la potencia suministrada con la temperatura de la muestra, lo que en general lo hace en forma automática el software del equipo. Para el análisis por calorimetría diferencial de barrido de la oxidación de grasas y aceites se cuenta con dos tipos de técnicas: la oxidación isotérmica y la no isotérmica.



**Figura 7.2.-** Análisis isotérmico y no isotérmico de la oxidación de materiales grasos por DSC.

Cuando la metodología de análisis es isotérmica, la muestra se coloca en el interior del horno, se lleva rápidamente a la temperatura de análisis y se mantiene a esa temperatura constante. Dado que el fenómeno en estudio, al igual que en el caso de los métodos AOM automatizados (OSI o Rancimat), es la oxidación lipídica, las curvas que se obtienen por el método DSC isotérmico son similares a las obtenidas por aquellos. A diferencia de dichos métodos (donde se mide la conductividad contra el tiempo), en el caso del DSC isotérmico se grafica el flujo de calor en función del tiempo. Una vez alcanzado el período de inducción el proceso se acelera y en consecuencia el flujo de calor se dispara, como muestra la Figura 7.2a. A partir de la curva de flujo de calor contra tiempo se determina el OIT (Oxidation Induction Time) (Simon, 2006), parámetro análogo al período de inducción del método AOM.

En el caso del análisis por DSC no isotérmico, la muestra es sometida a un calentamiento constante en presencia de oxígeno y se realiza al igual que en el caso anterior el seguimiento del flujo de calor en función del tiempo. La principal diferencia entre este método y el DSC isotérmico o el método AOM la constituye la variación de temperatura durante el análisis, por lo que el análisis cinético de los resultados resulta extremadamente complejo ya que además se debe considerar los fenómenos de transferencia de calor aplicados a un sistema de temperatura variable. Las curvas que se obtienen son del tipo de la Figura 7.2b, donde el flujo de calor se representa en este caso en función de la temperatura. Se observa también una primera etapa “lag”, donde el proceso de oxidación no-isotérmico no ha alcanzado una velocidad apreciable y una segunda etapa donde la oxidación se dispara, incrementándose notoriamente el flujo de calor (Figura 7.2b).

El cambio abrupto del flujo de calor permite obtener el valor de la temperatura a la cual se desencadena la oxidación, la cual se denomina “temperatura de inicio de la oxidación” o, en inglés, “oxidation onset temperature” y se representa como “OT u OOT” (Moser, 2009; Dunn, 2005). Algunos autores prefieren continuar con el proceso de oxidación y trabajar en base a otros parámetros, como los máximos de los picos que se obtienen si se continúa el calentamiento hasta temperaturas más elevadas (Litwinienko *et al.*, 1998; Litwinienko *et al.*, 1999). Según la bibliografía este método no isotérmico se puede emplear para el estudio del poder protector de los antioxidantes agregados a diferentes materiales grasos (Litwinienko *et al.*, 1998; Litwinienko *et al.*, 1999; Polavka *et al.*, 2005; Thurgood *et al.*, 2007).

En este capítulo se estudió el poder antioxidante de los orizanoles cuando se los adicionó a aceites de diferente origen y se los comparó con el de diferentes antioxidantes naturales y sintéticos mediante oxidación en DSC isotérmico y no isotérmico. Si bien en el capítulo anterior ya se abordó este análisis comparativo, mediante estos métodos se espera poder determinar algunos parámetros cinéticos del proceso, a los efectos de aportar información que podrá complementar los resultados obtenidos por el método OSI.

A continuación, se muestran los estudios realizados con diferentes aceites (soja, girasol común, salvado de arroz y girasol de alto oleico) con agregado de diferentes antioxidantes (orizanoles puros, concentrado de orizanoles BM, BHT, etc.).

## **2. Materiales y métodos.**

Los materiales (aceites, antioxidantes, etc) fueron los mismos que se indican en el Capítulo 6.

Las determinaciones se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido marca Shimadzu, modelo DSC-50, provisto del software "TASYS" para el procesamiento de los datos. Al igual que en el método OSI se estudiaron los aceites de soja, girasol común, salvado de arroz y girasol de alto oleico con el agregado de diferentes antioxidantes (BHT, BHA, ácido ferúlico, estándar de orizanoles puro, extracto rico en orizanoles, TBHQ, tocoferoles). La adición de los antioxidantes se realizó de la misma manera que en el método OSI, con

una concentración molar equivalente a 500 ppm de TBHQ ( $3 \times 10^{-3}$  M) para cada uno de ellos.

Con una pipeta Pasteur se agregó cuidadosamente una gota de la muestra de aceite (aprox. 15 mg) dentro de una cápsula de aluminio; ésta se colocó, sin tapa, en el compartimiento para muestras del horno del DSC. También se colocó una cápsula idéntica vacía en el compartimiento de referencia.

Este análisis se realizó de acuerdo con dos modalidades: a) no isotérmica y b) isotérmica.

El estudio no isotérmico se realizó de acuerdo al siguiente programa: se colocó la cápsula conteniendo la muestra a 40 °C bajo corriente de oxígeno (50 mL/min) y se calentó a diferentes velocidades ( $\beta = 7.5$  °/min, 10 °/min, 15 °/min o 20 °C/min) hasta alcanzar los 250 °C. Durante el calentamiento se registró la variación del flujo de calor.

Para el análisis isotérmico se colocó la cápsula conteniendo la muestra a 40 °C bajo corriente de oxígeno (50 mL/min) y se calentó a 20 °C/min hasta alcanzar la temperatura de oxidación deseada, la cual permaneció constante durante el resto del análisis.

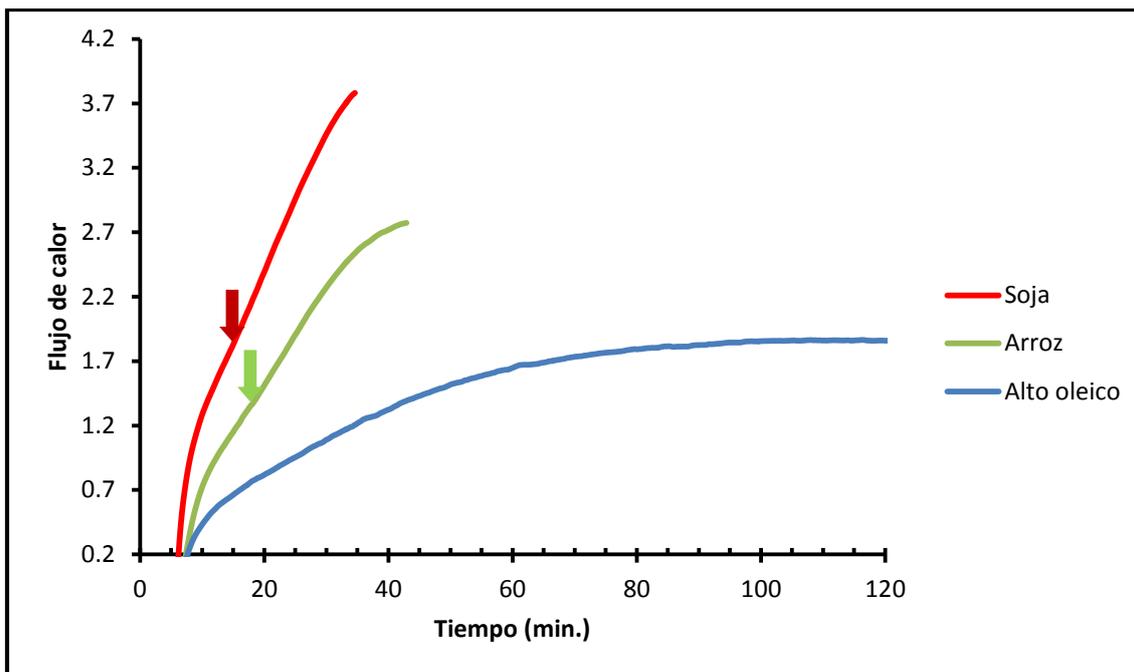
En ambos casos se registró la variación del flujo de calor con el transcurso del tiempo. Las temperaturas de oxidación utilizadas o las velocidades de calentamiento se eligieron de acuerdo al comportamiento obtenido de ensayos previos con las diferentes muestras de interés y el tipo de antioxidante utilizado.

### **3. Resultados.**

#### **3.1. Estudio isotérmico.**

##### **3.1.1. Aceites refinados purificados.**

En la Figura 7.3 se presentan las curvas de flujo de calor contra tiempo obtenidas a 130 °C para los aceites refinados comerciales purificados (sin antioxidantes) con flujo de oxígeno. Se observa que todas las curvas presentaron un aumento continuo, sin detectarse un cambio tal que permita determinar un período de inducción (OIT) claro. Sin embargo las curvas correspondientes a los aceites como los de soja y de salvado de arroz, más insaturados que el de girasol de alto oleico, presentaron un cambio de pendiente (lo que indica un cambio muy pequeño en la velocidad de oxidación) que permitieron determinar, con mucha incertidumbre, el valor de los OIT correspondientes (Figura 7.3). Para el aceite de girasol de alto oleico no se detectó un cambio en la pendiente de la curva por lo que en este caso no se pudo estimar su OIT. De acuerdo con estos resultados no se realizaron más ensayos de oxidación isotérmica mediante DSC para otros aceites purificados, ya que los OIT determinados presentaron una elevada incertidumbre.



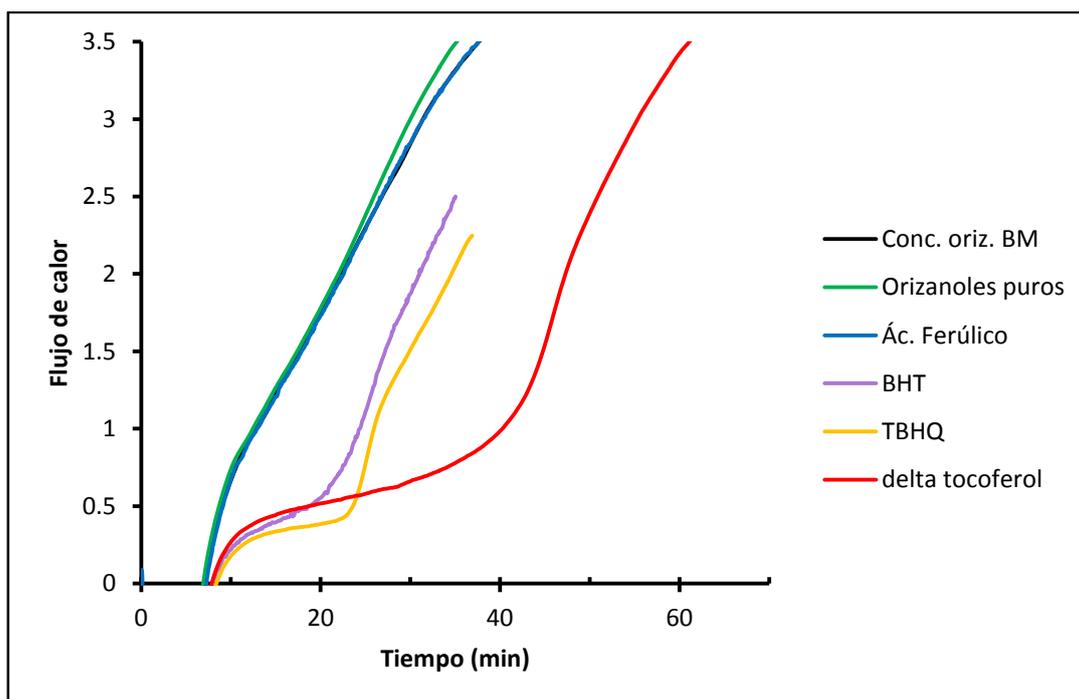
**Figura 7.3.-** Curvas de flujo de calor obtenidas mediante la oxidación isotérmica en DSC a 130 °C y flujo de O<sub>2</sub> de los diferentes aceites comerciales purificados.(las flechas indican los “posibles” valores de OIT).

### 3.1.2. Aceites refinados purificados con agregado de diferentes antioxidantes.

#### 3.1.2.1. Aceite de soja.

En el caso del aceite de soja se estudió el efecto del agregado de los siguientes antioxidantes:  $\delta$ -tocoferol, TBHQ, BHT, orizanoles puros y el concentrado de orizanoles BM. Además, se ensayó el ácido ferúlico ya que es a la molécula que se atribuye el poder antioxidante de los orizanoles. Al igual

que en los análisis anteriormente mencionados, los antioxidantes fueron agregados al aceite en la misma concentración molar ( $3 \times 10^{-3}$  M, equivalente a 500 ppm de TBHQ). La Figura 7.4 muestra las curvas para cada uno de los antioxidantes a 130 °C y con flujo de oxígeno.



**Figura 7.4.-** Curvas de flujo de calor obtenidas mediante la oxidación isotérmica en DSC a 130 °C y flujo de O<sub>2</sub> del aceite de soja conteniendo diferentes antioxidantes a una concentración  $3 \times 10^{-3}$  M.

El aceite de soja purificado pero con el agregado del concentrado de orizanoles obtenido mediante modificación química de las borras (Conc. oriz. BM) presentó una curva similar al de dicho aceite pero con el agregado de orizanoles puros (Figura 7.4). En la Tabla 7.2 se muestran los tiempos de inducción para el aceite de soja con estos antioxidantes. El OIT para el aceite con ácido ferúlico es de 15 minutos mientras para el aceite con orizanoles

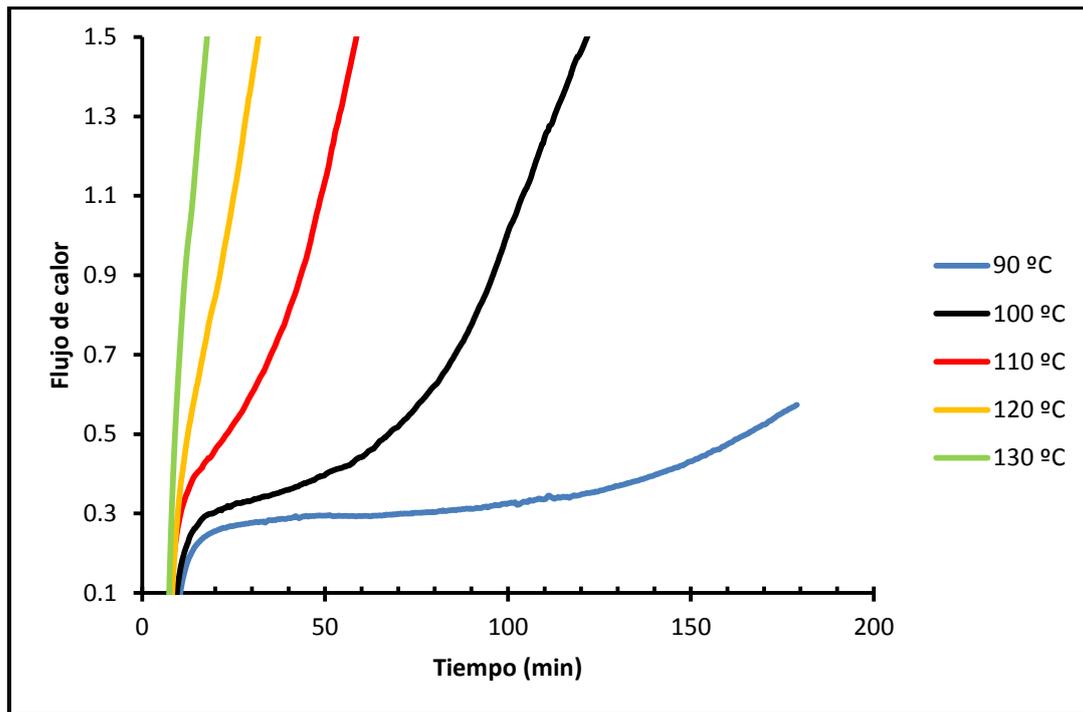
puros fue de alrededor de 12 minutos. Debe considerarse que esta diferencia en los valores de OIT no es muy significativa considerando que las curvas obtenidas con la adición de ambos antioxidantes presentaron una inflexión muy leve, a diferencia de lo que se observó con otros antioxidantes. El aceite de soja purificado con el agregado del concentrado de orizanoles BM presentó un OIT superior en aproximadamente 3 minutos respecto al del aceite con los orizanoles puros pero similar al del aceite con ácido ferúlico. La similitud entre los resultados obtenidos con la adición de orizanoles y la de ácido ferúlico al aceite está de acuerdo con que la presencia de la molécula de ferúlico en la estructura de los mismos sea la causa de su poder antioxidante (Akiyama *et al.*, 2005).

**Tabla 7.2.-** Valores de OIT correspondientes a la oxidación isotérmica en DSC a 130°C y flujo de O<sub>2</sub> del aceite de soja conteniendo diferentes antioxidantes a una concentración 3x10<sup>-3</sup> M (correspondientes a las curvas en la Figura 7.4.).

<b>Antioxidante</b>	<b>OIT (minutos)</b>
<b>Orizanoles puros</b>	12.0 ± 0.5
<b>Ácido ferúlico</b>	15.0 ± 0.6
<b>Conc. oriz. BM</b>	14.0 ± 0.6
<b>BHT</b>	22.0 ± 0.9
<b>TBHQ</b>	23.7 ± 0.9
<b>δ-tocoferol</b>	41.0 ± 1.5

El aceite de soja conteniendo BHT, TBHQ y  $\delta$ -tocoferol presentó tiempos de inducción notoriamente superiores (llegando a triplicarlos aproximadamente, para el caso del  $\delta$ -tocoferol) al del aceite con el concentrado de orizanoles BM.

A los efectos de estimar parámetros cinéticos vinculados al proceso de oxidación se estudió la variación del OIT en función de la temperatura de oxidación para el aceite de soja con el concentrado de orizanoles BM y con el  $\delta$ -tocoferol. En la Figura 7.5 se muestran las curvas correspondientes a la oxidación del aceite de soja con el mismo agregado del concentrado de orizanoles BM a diferentes temperaturas. Se observa que el incremento abrupto de potencia se produjo a tiempos menores a medida que la temperatura de oxidación se incrementó, lo cual indica la reducción en los períodos de inducción. En la Tabla 7.3 se muestran los valores de OIT obtenidos del análisis de las curvas para cada una de las temperaturas, donde efectivamente se observa la disminución de los mismos con el incremento de la temperatura.



**Figura 7.5.-** Curvas de flujo de calor obtenidas mediante la oxidación isotérmica en DSC a 130 °C y flujo de O<sub>2</sub> del aceite de soja con el agregado del concentrado BM a una “concentración efectiva” de orizanoles de  $3 \times 10^{-3}$  M.

**Tabla 7.3.-** Valores de OIT obtenidos a partir del análisis de las curvas de la Figura 7.5.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	OIT (minutos)
90	363	134.0 ± 4.0
100	373	73.5 ± 2.2
110	383	40.5 ± 1.2
120	393	20.4 ± 0.8
130	403	14.0 ± 0.6

La Figura 7.6 muestra la variación de los tiempos de inducción (Tabla 7.3) con la temperatura y la curva de mejor ajuste obtenida (con un  $r^2$  de 0.996), correspondiente a una exponencial, que vincula la variación de la constante específica de la velocidad de reacción con la temperatura, la energía de activación y la constante de los gases R.

$$k = A * e^{\frac{-E_a}{R*T}} \quad [7.1]$$

A.- factor pre-exponencial.

E<sub>a</sub>.- energía de activación (kJ/mol).

R.- 8.3143 kJ/°mol

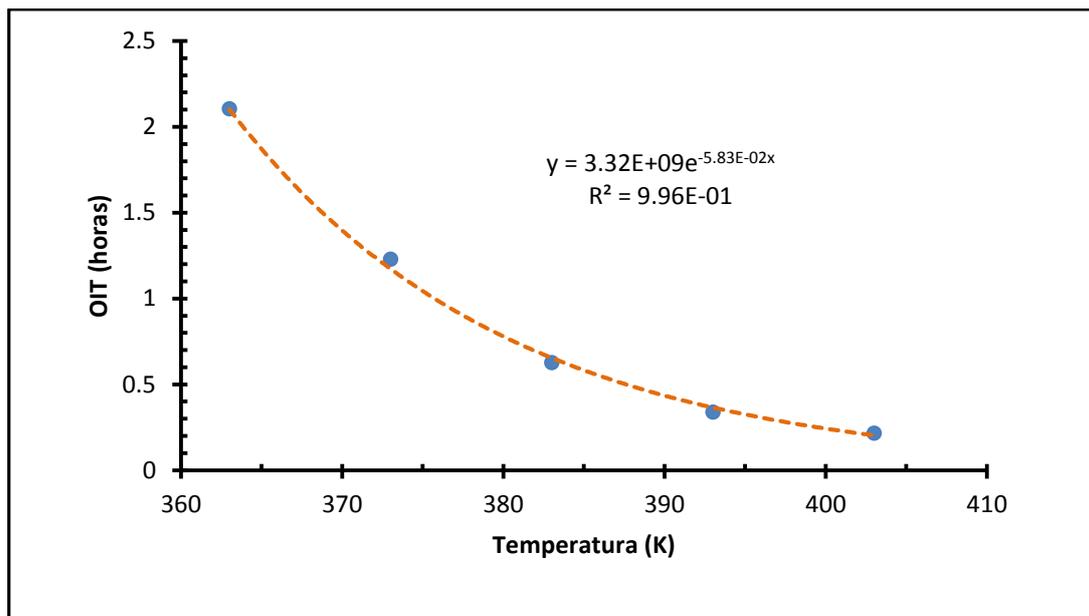
T.- temperatura (K)

Si a la ecuación de Arrhenius se aplica el logaritmo neperiano, la ecuación anterior queda de la siguiente manera:

$$\ln k = \ln(A * e^{\frac{-E_a}{R*T}}) \quad [7.2]$$

Reordenando:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R*T} \quad [7.3]$$



**Figura 7.6.-** Variación de los valores de OIT con la temperatura de oxidación para el aceite de soja con el agregado del concentrado BM a una “concentración efectiva” de orizanoles de  $3 \times 10^{-3}$  M.

El período de inducción o tiempo de inducción de la oxidación (OIT) está directamente vinculado con la constante específica de la velocidad de reacción. Para la etapa inicial de la oxidación, antes de alcanzarse el OIT, la cinética puede considerarse de orden 0, por lo que:

$$\frac{d[A]}{d[t]} = k \quad [7.4]$$

$$[A]_t - [A]_0 = k * t \quad [7.5]$$

Donde:  $[A]_t$  .- concentración del reactivo a un tiempo t.

$[A]_0$  .- concentración del reactivo a tiempo 0.

k.- constante de la velocidad de reacción

Cuando se alcanza el tiempo de inducción para la oxidación ( $t=OIT$ ) la ecuación [7.5] queda expresada de la siguiente manera:

$$[A]_{OIT} - [A]_0 = k * (OIT) \quad [7.6]$$

Si se considera que al alcanzar el OIT se cumple que:

$$[A]_{OIT} - [A]_0 = constante = k * (OIT) \quad [7.7]$$

Entonces:

$$k * (OIT) = cte. \quad [7.8]$$

Por lo tanto:

$$k \propto \frac{1}{OIT} \quad [7.9]$$

Sustituyendo en la ecuación [7.3] tenemos la siguiente expresión:

$$\ln \frac{1}{OIT} \propto \ln A - \frac{E_a}{R*T} \quad [7.10]$$

$$\ln \frac{1}{OIT} = B \left[ \ln A - \frac{E_a}{R*T} \right] = \ln A' - \frac{E'_a}{R*T} \quad [7.11]$$

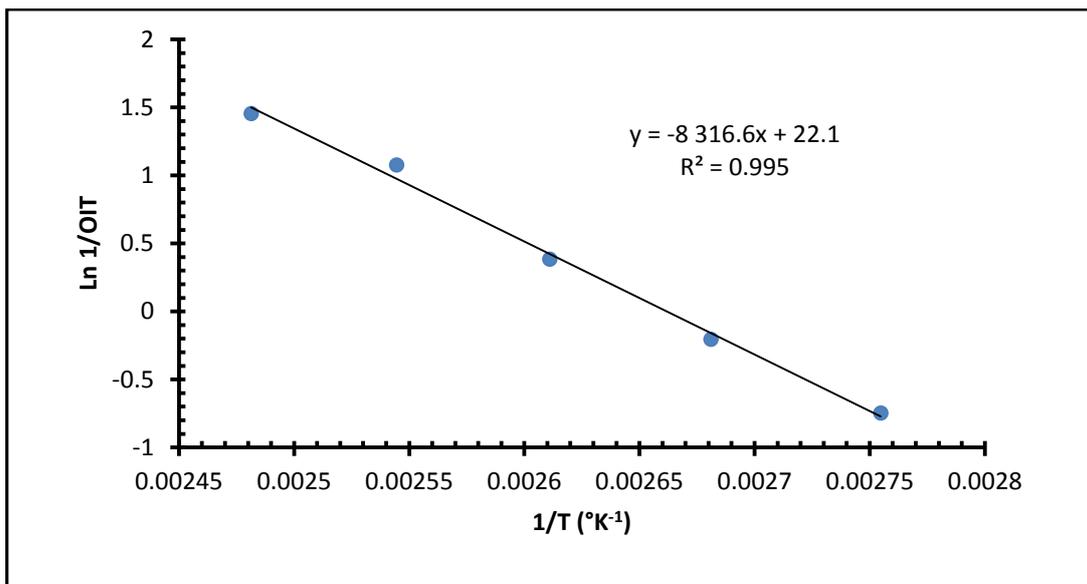
Donde:

OIT- es el tiempo de inducción de la oxidación determinado a partir de los termogramas.

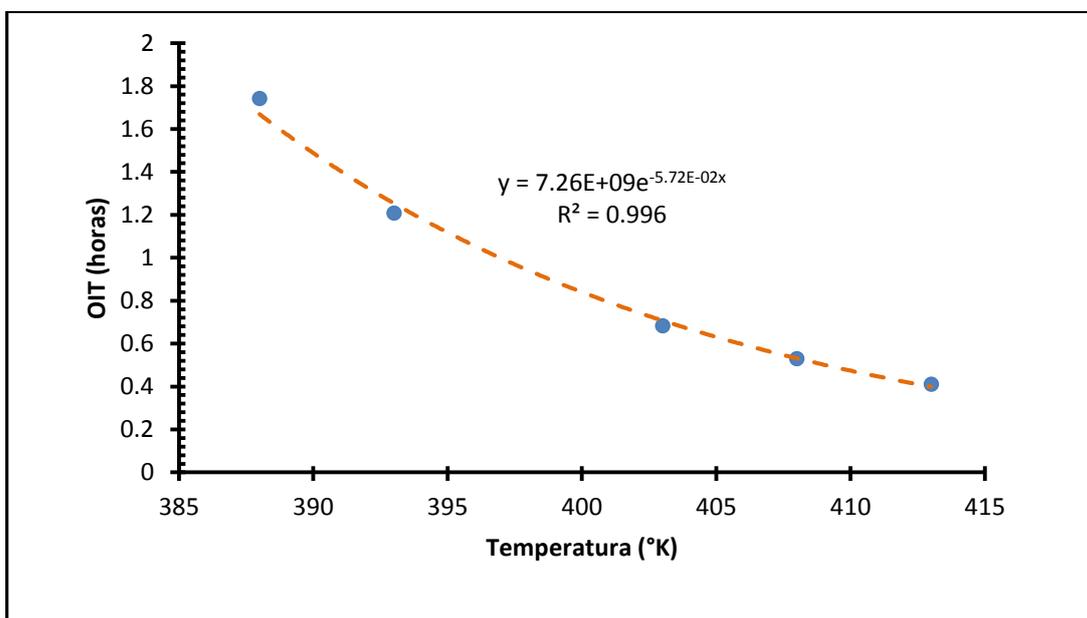
A'.- es el factor pre-exponencial “aparente”.

E'.- es la energía de activación “aparente”.

Por lo tanto es posible graficando el logaritmo neperiano del inverso del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función del inverso de la temperatura absoluta determinar de la pendiente de la recta el valor de la energía de activación aparente para la reacción de oxidación del material graso (con o sin antioxidante). En la Figura 7.7 se muestra dicha gráfica y la regresión lineal correspondiente, la cual dió un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.995. La energía de activación aparente ( $E'_a$ ) obtenida de la pendiente de la recta fue de 67.7 kJ/mol.



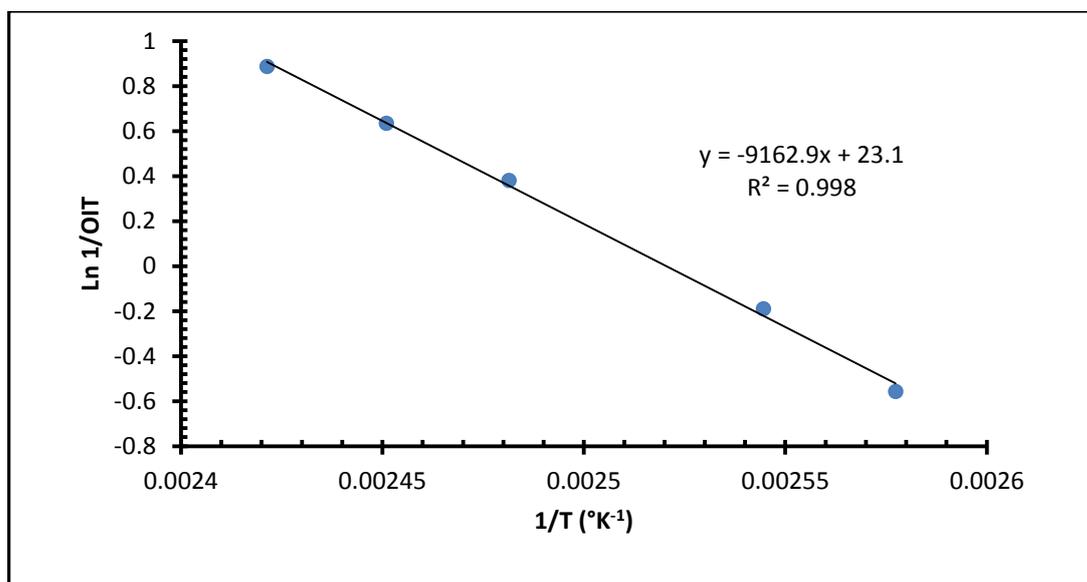
**Figura 7.7.-** Logaritmo del inverso del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función del inverso de la temperatura absoluta para el aceite de soja purificado con el agregado del concentrado de orizanoles BM.



**Figura 7.8.-** Variación del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) con la temperatura para el aceite de soja sin antioxidantes pero con el agregado de  $\delta$ -tocoferol.

El mismo estudio también se realizó para el aceite de soja purificado con el agregado de  $\delta$ -tocoferol ya que fue el que presentó mayor poder antioxidante a 130 °C. La Figura 7.8 muestra la curva obtenida para el aceite de soja sin antioxidantes pero con agregado de  $\delta$ -tocoferol. El coeficiente de correlación es similar al caso anterior (la recta se trazó con cinco puntos en lugar de cuatro).

La Figura 7.9 muestra la correlación lineal correspondiente al aceite de soja con  $\delta$ -tocoferol; su coeficiente de correlación es 0.998. De su pendiente se calculó la energía de activación aparente para la reacción de oxidación del aceite del aceite de soja con agregado de  $\delta$ -tocoferol. El valor fue de 76.2 kJ/mol, superior al determinado para el concentrado de orizanoles BM.



**Figura 7.9.-** Logaritmo del inverso del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función del inverso de la temperatura absoluta para el aceite de soja purificado con el agregado de  $\delta$ -tocoferol.

Según la Ec. (7.11), a partir de la ordenada en el origen de la recta  $\ln(1/OIT)$  contra  $\ln(1/T)$  es posible calcular el factor pre-exponencial “aparente” de Arrhenius ( $A'$ ).

$$\ln \frac{1}{OIT} = \ln A' - \frac{E'_a * R}{T}$$

En la Tabla 7.4 se presentan los valores de la energía de activación aparente y del factor pre-exponencial “aparente” correspondiente a cada uno de los antioxidantes estudiados.

**Tabla 7.4.-** Energía de activación “aparente” y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de soja purificado con el agregado de dos antioxidantes.

Antioxidante	$E'_a$ (kJ/mol)	$A'$ (min. <sup>-1</sup> )
Conc. oriz. BM	68 ± 3	(3.89 ± 0.16) x 10 <sup>9</sup>
δ-tocoferol	76 ± 4	(1.05 ± 0.04) x 10 <sup>10</sup>

Ingresando estos valores de  $E'_a$  y  $A'$  en la ecuación de Arrhenius es posible calcular la constante específica “aparente” de velocidad de oxidación ( $k'$ ) a diferentes temperaturas. Para dicho cálculo obviamente se considera que el mecanismo de la oxidación no varía en el intervalo de temperatura considerado

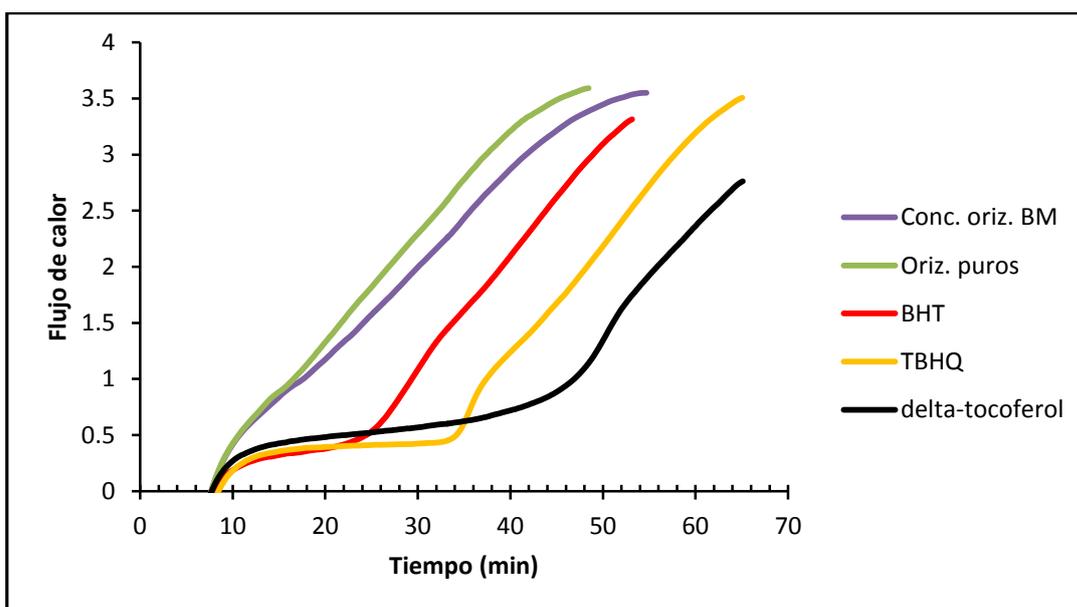
para la determinación de los parámetros cinéticos de interés ( $E'_a$  y  $A'$ ). De esta manera, si se extrapola a una temperatura de 30 °C (próxima a la temperatura ambiente) el aceite de soja con  $\delta$ -tocoferol correspondería una constante “aparente” de la velocidad de reacción de  $8.66 \times 10^{-3} \text{ min.}^{-1}$  mientras que para el aceite con el concentrado de orizanoles BM sería de  $1.62 \times 10^{-2} \text{ min.}^{-1}$ . Ello quiere decir que el aceite de soja se oxidaría casi 2 veces más lentamente con el  $\delta$ -tocoferol que con el concentrado de orizanoles BM.

### **3.1.2.2. Aceite de girasol común.**

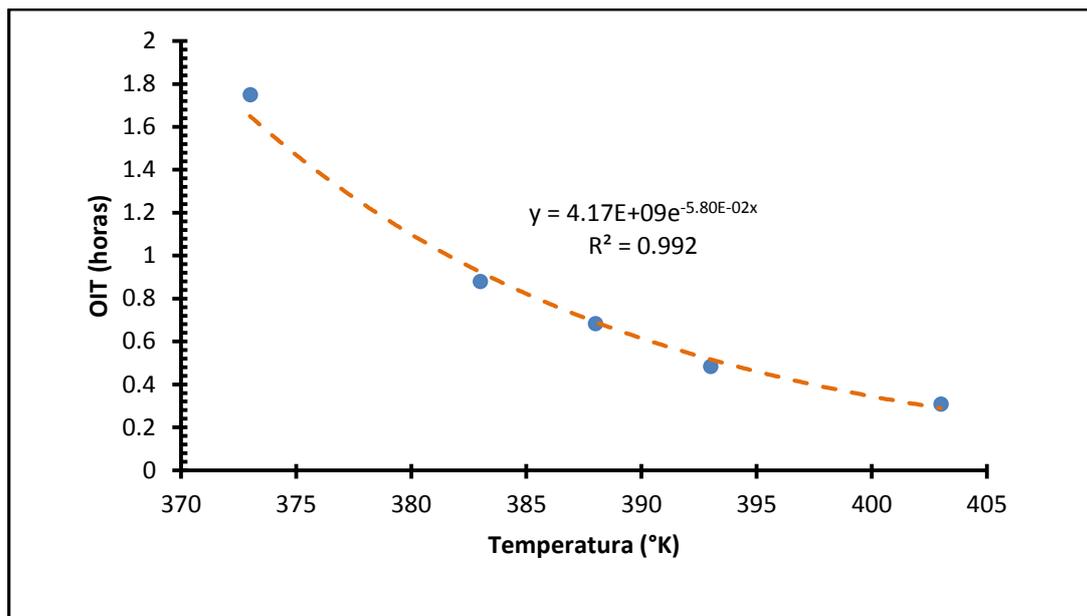
Se estudió el poder protector de diversos antioxidantes sintéticos y naturales sobre el aceite refinado comercial de girasol común purificado (sin sus antioxidantes). La Figura 7.10 muestra los termogramas correspondientes. Las curvas obtenidas con la adición de orizanoles al aceite se encuentran desplazadas a tiempos menores que las correspondientes a los otros antioxidantes (BHT, TBHQ y  $\delta$ -tocoferol). En la Tabla 7.5 se presentan los valores de OIT obtenidos. El aceite de girasol común con orizanoles, tanto puros como el concentrado BM, presentó el menor OIT y, por ende, éstos aportan el menor poder antioxidante. Este comportamiento es similar al encontrado con el método OSI. El poder protector de los diferentes antioxidantes en el aceite de girasol común, fue similar que en el aceite de soja (que tiene un mayor grado de insaturación), ya que los tiempos de oxidación para cada tipo de antioxidante, son del mismo orden (Tabla 7.2).

**Tabla 7.5.-** Tiempos de inducción de la oxidación (OIT) para un aceite de girasol común purificado y con el agregado de diferentes antioxidantes.

Antioxidante	OIT (minutos)
Orizanoles puros	16.5 ± 0.7
Conc. BM	18.5 ± 0.7
BHT	24.8 ± 1.0
TBHQ	34.0 ± 1.1
δ-tocoferol	46.0 ± 1.6

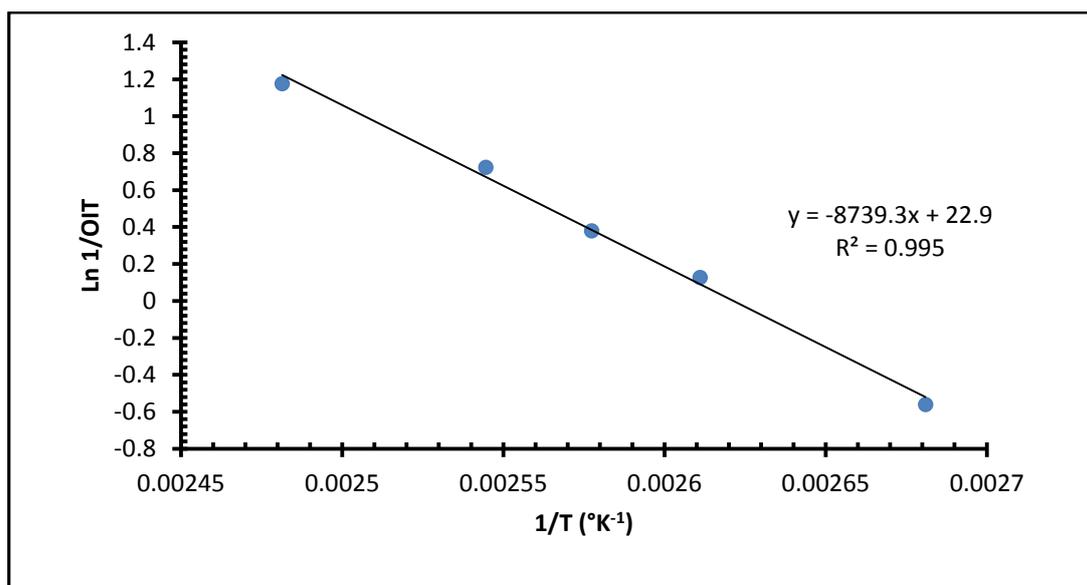


**Figura 7.10.-** Análisis isotérmico a 130 °C del aceite de girasol común purificado (sin antioxidantes) y con el agregado de diferentes antioxidantes.



**Figura 7.11.-** Variación del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) con la temperatura para el aceite de girasol común sin antioxidantes y con el agregado del concentrado de orizanoles BM.

Se estudió la cinética de la reacción de oxidación para el aceite de girasol común con el agregado del concentrado de orizanoles BM. La Figura 7.11 muestra la variación del OIT en función de la temperatura: el ajuste a una exponencial tiene un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.992. La Figura 7.12 muestra el gráfico para el  $\ln(1/\text{OIT})$  en función de la inversa de la temperatura absoluta.



**Figura 7.12.-** Logaritmo de la inversa del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol común sin antioxidantes y con el agregado del concentrado de orizanoles BM.

Suponiendo que se cumple la ecuación de Arrhenius y de acuerdo con la deducción ya hecha para el aceite de soja, se puede calcular la energía de activación “aparente” y factor “aparente” de Arrhenius ( $E'_a$  y  $A'$  respectivamente). La Tabla 7.6 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 7.6.-** Energía de activación “aparente” y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de girasol común sin antioxidantes pero con el agregado del concentrado de orizanoles BM.

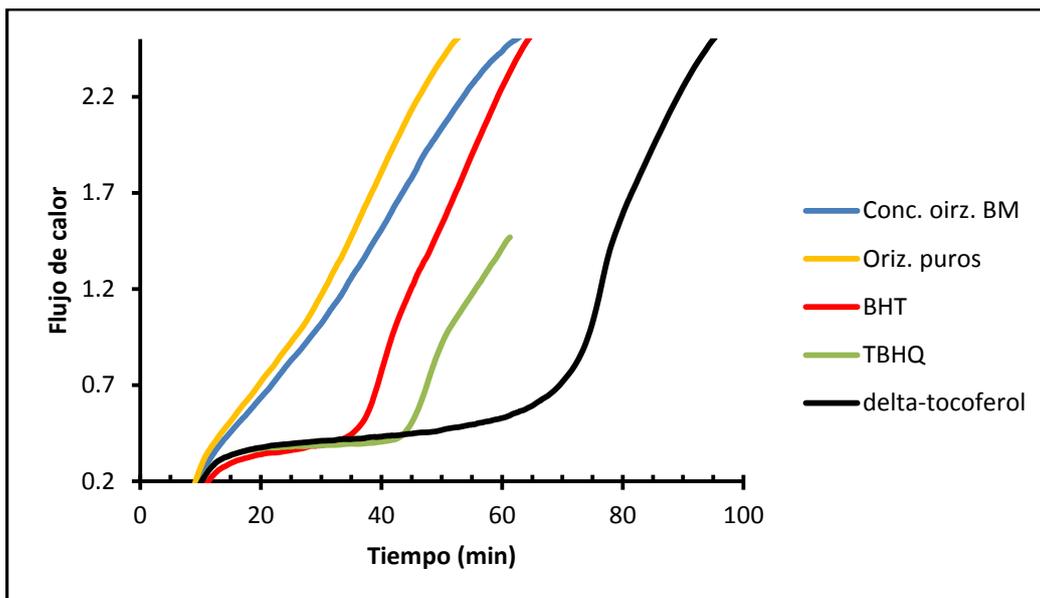
Antioxidante	$E'_a$ (kJ/mol)	$A'$ (min. <sup>-1</sup> )
Conc. oriz. BM	73 ± 4	(8.74 ± 0.35) x 10 <sup>9</sup>

Los valores de  $E'_a$  y  $A'$  obtenidos para el aceite de girasol común con el agregado del concentrado de orizanoles BM fueron superiores respecto a los obtenidos para el aceite de soja con el agregado de este concentrado (Tabla 7.4).

### **3.1.2.3. Aceite de salvado de arroz.**

La Figura 7.13 muestra los termogramas para el aceite de salvado de arroz purificado (sin sus antioxidantes) pero con el agregado de diferentes antioxidantes. Al igual que con los otros aceites, este aceite con el concentrado de orizanoles BM y con los orizanoles puros presentó curvas muy similares, aunque con el concentrado de orizanoles BM presenta un ligero corrimiento a tiempos mayores respecto a los orizanoles puros. Los otros antioxidantes presentan el mismo comportamiento que para los aceites de soja y de girasol común, con curvas desplazadas a tiempos superiores que para los orizanoles, en el siguiente orden: primero BHT, luego TBHQ y por último, el  $\delta$ -tocoferol.

La Tabla 7.7 muestra los tiempos de inducción correspondientes a estos antioxidantes. El aceite de salvado de arroz con los orizanoles es el que presenta menor OIT, seguido por el BHT, TBHQ y el  $\delta$ -tocoferol.

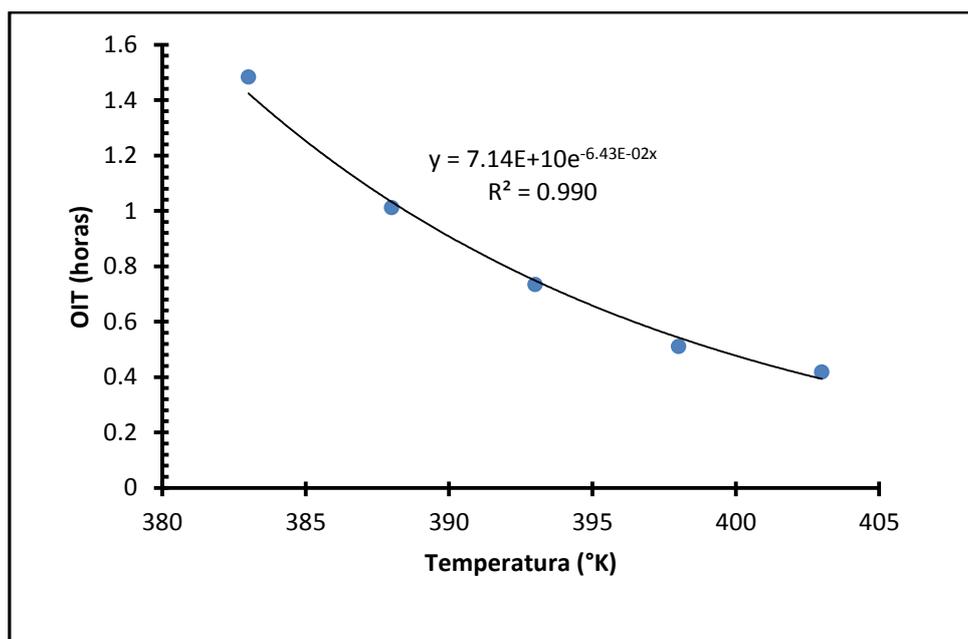


**Figura 7.13.-** Análisis isotérmico a 130 °C del aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado de diferentes antioxidantes.

**Tabla 7.7.-** Tiempos de inducción de la oxidación (OIT) para el aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado de diferentes antioxidantes.

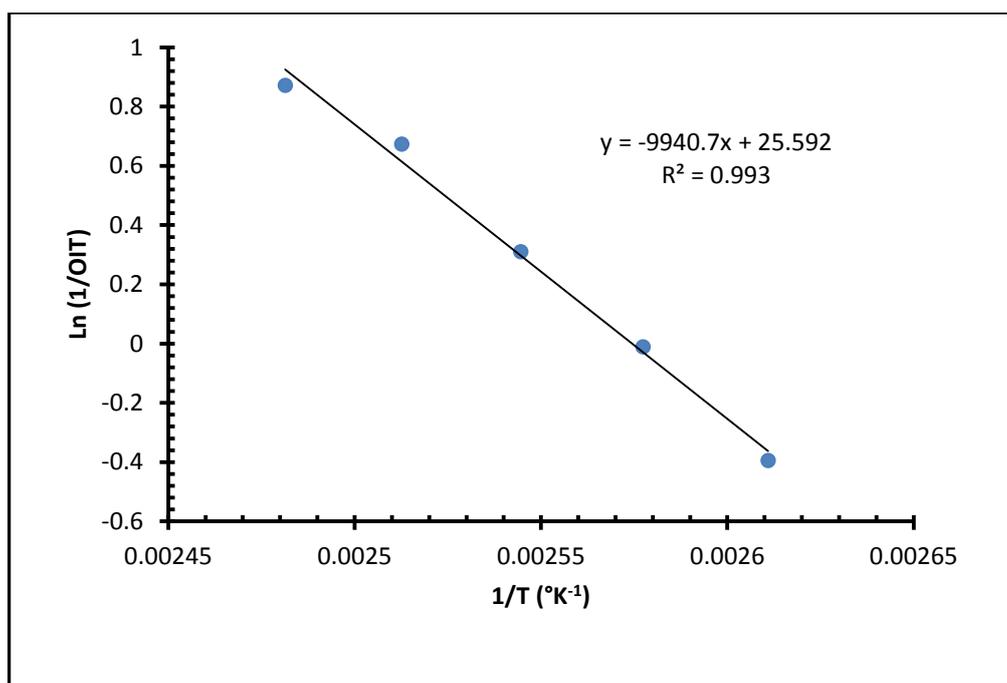
Antioxidante	OIT (minutos)
Orizanoles puros	27.8 ± 0.9
Conc. BM	29.4 ± 1.1
BHT	36.3 ± 1.2
TBHQ	44.0 ± 1.3
δ-tocoferol	70.6 ± 2.0

Se realizó el estudio de la cinética de oxidación para el aceite de salvado de arroz con  $\delta$ -tocoferol y con el concentrado de orizanoles BM. Se eligieron estos dos antioxidantes ya que el aceite de salvado de arroz naturalmente los contiene; además, es el aceite con una estabilidad inherente intermedia entre el aceite de soja y el aceite de girasol de alto oleico. En las Figuras 7.14 y 7.15 se muestra la variación del OIT con la temperatura para el aceite de salvado de arroz con el concentrado de orizanoles BM. Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) para ambas curvas (exponencial y lineal) fueron 0.99 al igual, que para los otros aceites anteriormente analizados.

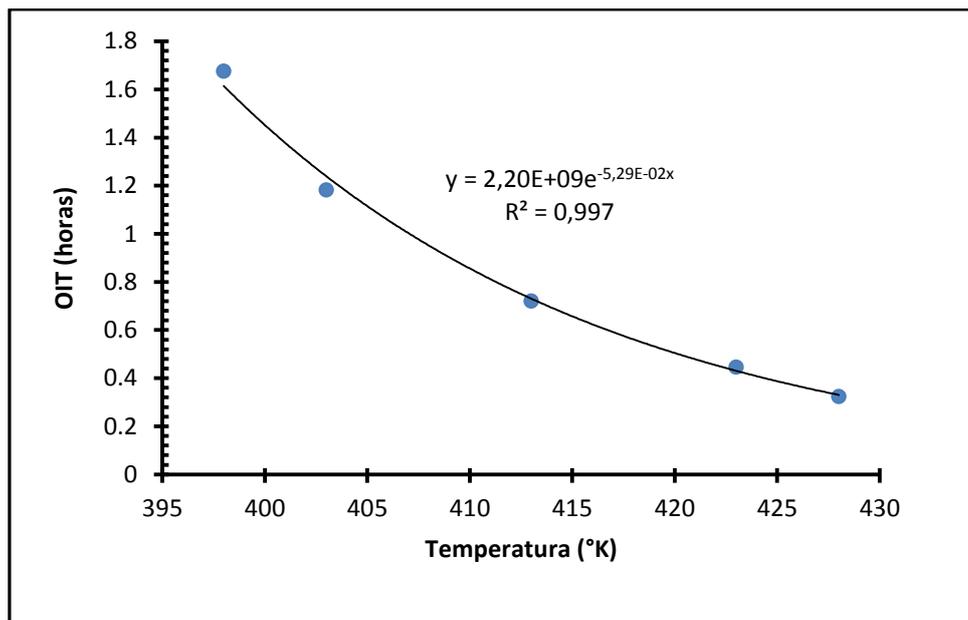


**Figura 7.14.-** Variación del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) con la temperatura para el aceite de salvado de arroz purificado pero con agregado del concentrado de orizanoles BM.

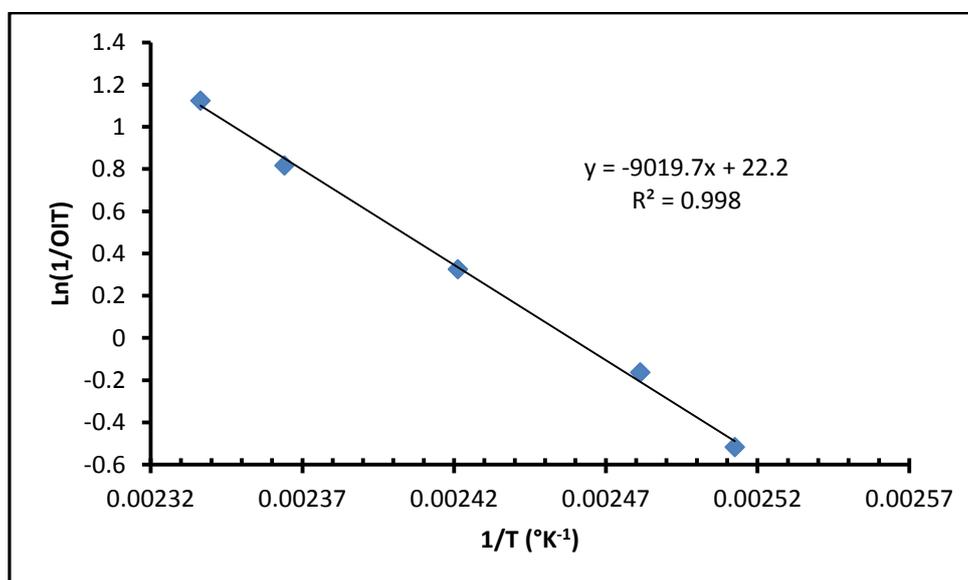
La Figuras 7.16 y 7.17 muestran las curvas obtenidas para el aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado de  $\delta$ -tocoferol. También dichas curvas presentan coeficientes de correlación aceptables.



**Figura 7.15.-** Logaritmo de la inversa del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado de concentrado de orizanoles BM.



**Figura 7.16.-** Variación del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) con la temperatura para el aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado de  $\delta$ -tocoferol agregado.



**Figura 7.17.-** Logaritmo de la inversa del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado de  $\delta$ -tocoferol.

En la Tabla 7.8 se muestra los valores calculados para la energía de activación “aparente” y el factor pre-exponencial “aparente” de Arrhenius para el aceite de salvado de arroz con estos dos antioxidantes.

**Tabla 7.8.-** Energía de activación “aparente” y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de salvado de arroz purificado pero con el agregado del concentrado de orizanoles BM y de  $\delta$ -tocoferol.

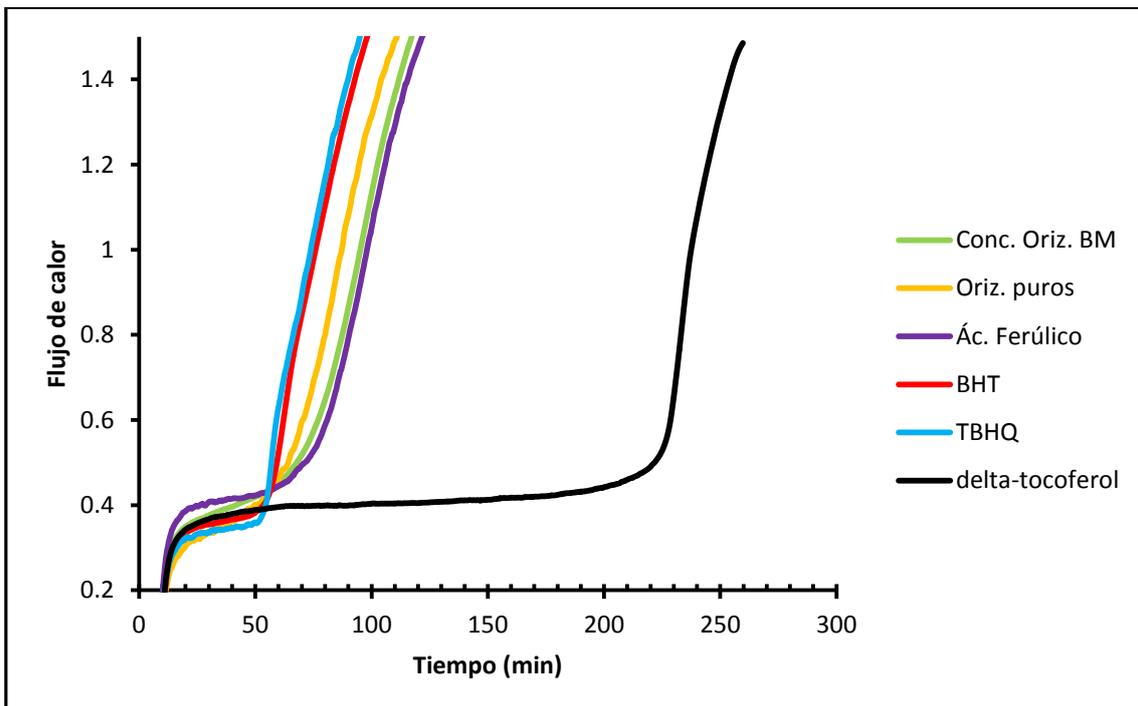
Antioxidante	$E'_a$ (kJ/mol)	$A'$ (min. <sup>-1</sup> )
Conc. oriz. BM	$83 \pm 4$	$(1.27 \pm 0.05) \times 10^{11}$
$\delta$ -tocoferol	$75 \pm 3$	$(4.17 \pm 0.17) \times 10^9$

La energía de activación “aparente” para el aceite de salvado de arroz con el agregado del concentrado de orizanoles BM es superior a la correspondiente al  $\delta$ -tocoferol. Ello significa que una variación de temperatura afecta mucho más a la velocidad de reacción del aceite de salvado de arroz aditivado con el concentrado de orizanoles que con  $\delta$ -tocoferol.

#### 3.1.2.4. Aceite de girasol de alto oleico.

Al igual que para los casos anteriores, se realizó un estudio de los diversos antioxidantes en el aceite de girasol de alto oleico. En la Figura 7.18

se muestran los termogramas obtenidos a 130 °C en atmósfera de oxígeno. En dicho gráfico se puede observar un comportamiento similar al de los anteriores aceites donde el  $\delta$ -tocoferol es el que presenta un mayor poder protector. Ello se puede ver en la Tabla 7.9 donde, al igual que con los aceites anteriormente analizados, se presentan los tiempos de inducción para el aceite de girasol de alto oleico con cada uno de los antioxidantes. El aceite con  $\delta$ -tocoferol presenta un OIT de 225 minutos mientras que para el concentrado de orizanoles BM el OIT fue de 74.0 minutos. El poder protector del concentrado de orizanoles BM fue similar al del ácido ferúlico y al del concentrado de orizanoles puros, aunque este último presentó un tiempo un poco menor (68.7 minutos).



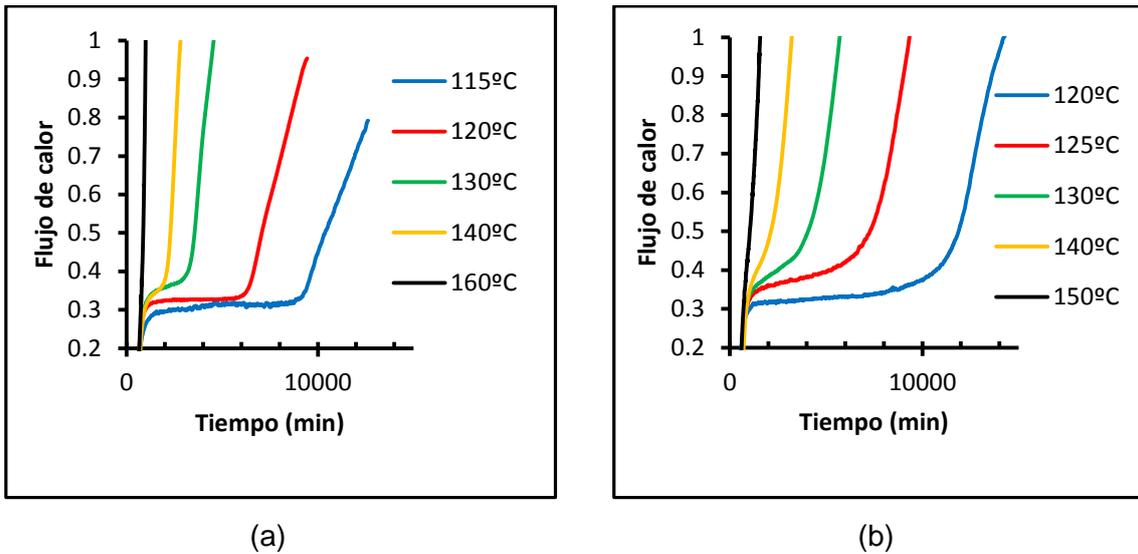
**Figura 7.18.-** Análisis isotérmico a 130 °C para la oxidación del aceite de girasol de alto de oleico purificado y con el agregado de diversos antioxidantes.

**Tabla 7.9.-** Tiempos de inducción de la oxidación (OIT) a 130 °C para un aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado de diferentes antioxidantes.

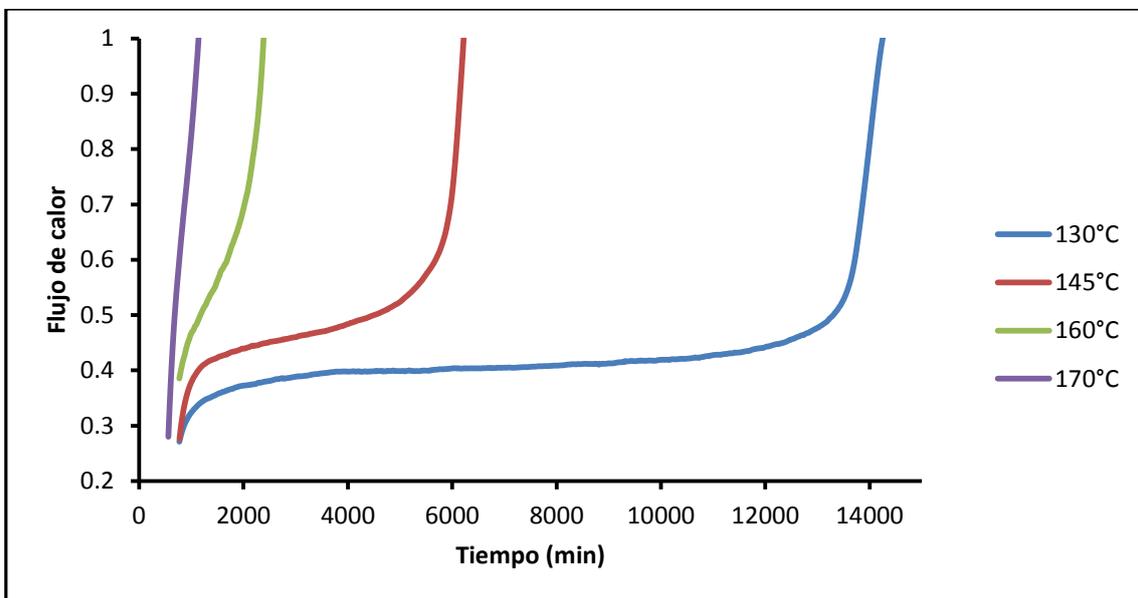
<b>Antioxidante</b>	<b>OIT (minutos)</b>
<b>Orizanoles puros</b>	68.7 ± 1.9
<b>Conc. oriz. BM</b>	74.0 ± 2.0
<b>Ác. ferúlico</b>	75.0 ± 2.0
<b>BHT</b>	56.0 ± 1.7
<b>TBHQ</b>	52.7 ± 1.6
<b>δ-tocoferol</b>	225.0 ± 3.2

La Figuras 7.19 y 7.20 muestran los termogramas a diferentes temperaturas para el aceite de girasol de alto oleico con tres de los antioxidantes anteriores: el concentrado de orizanoles BM, el BHT y el δ-tocoferol.

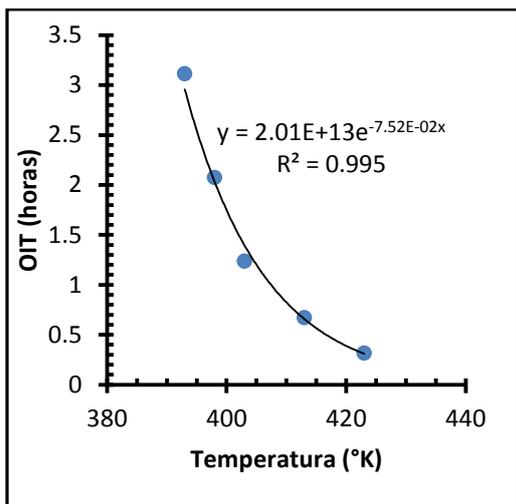
Estos termogramas muestran que a medida que la temperatura disminuye, el OIT aumenta. A partir de los tiempos de inducción determinados de estos termogramas se construyeron los gráficos para la determinación de la energía de activación “aparente” del aceite con los diferentes antioxidantes. La Figura 7.21 muestra la variación del OIT en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico con cada uno de los antioxidantes.



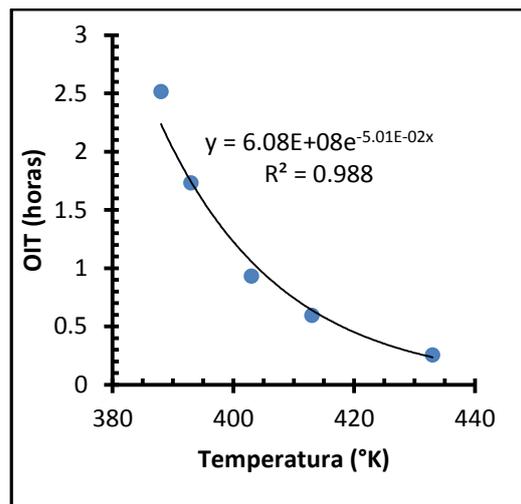
**Figura 7.19.-** Análisis isotérmico para la oxidación del aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado de BHT (a) y con el agregado del concentrado de orizanoles BM (b), a diferentes temperaturas.



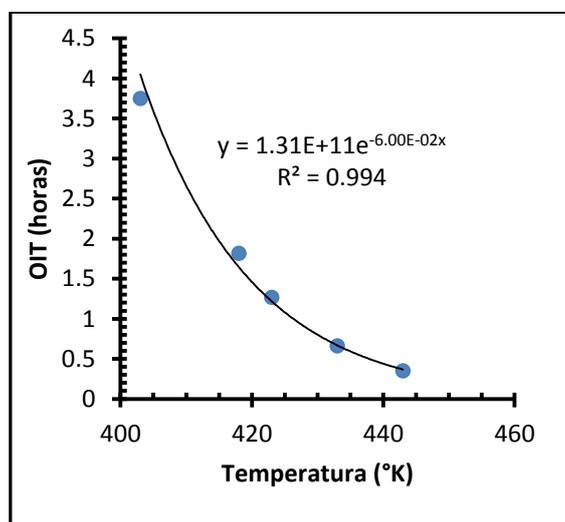
**Figura 7.20.-** Análisis isotérmico para la oxidación del aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado de  $\delta$ -tocoferol, a diferentes temperaturas.



(a)



(b)

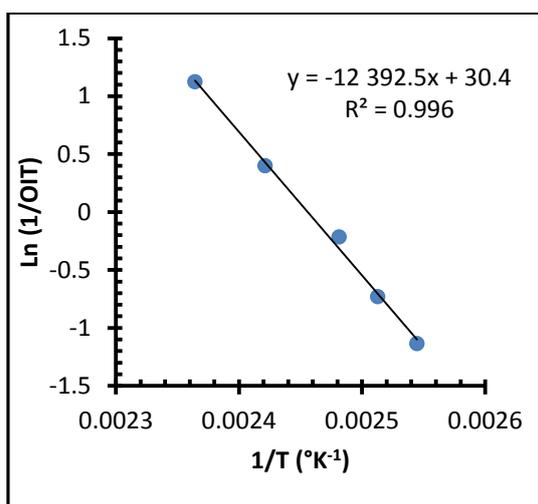


(c)

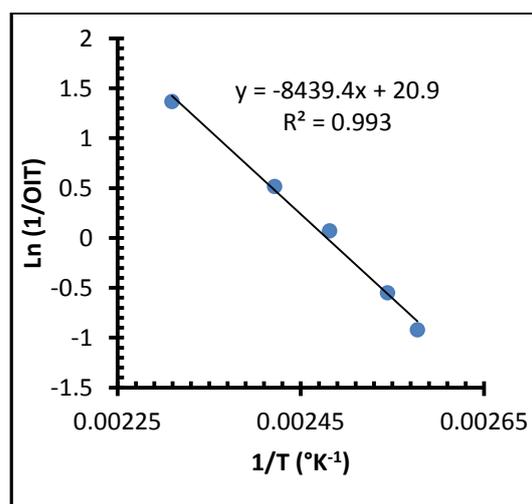
**Figura 7.21.-** Variación del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) con la temperatura para el aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado del concentrado de orizanoles BM (a), de BHT (b) y de  $\delta$ -tocoferol (c).

Al igual que para los otros aceites, los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) son mayores o iguales a 0.99. En la Figura 7.22 se presentan las gráficas del logaritmo neperiano de la inversa del OIT en función del inverso de la temperatura absoluta. De la pendiente de la recta para cada uno de los

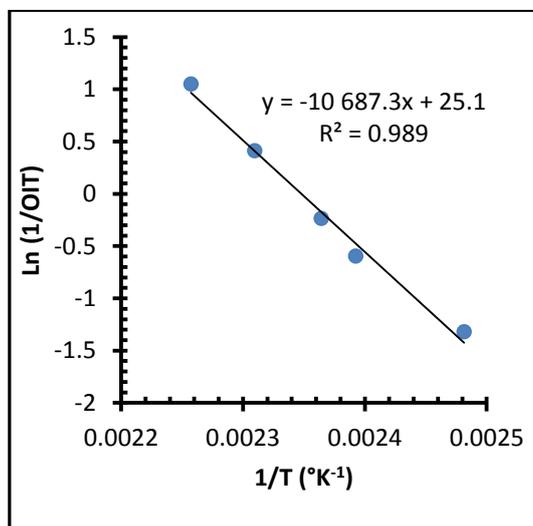
antioxidantes se determinó la energía de activación “aparente” y de la ordenada en el origen, el factor pre-exponencial “aparente” de Arrhenius, de acuerdo con lo visto anteriormente. La Tabla 7.10 muestra dichos valores.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.22.-** Logaritmo de la inversa del tiempo de inducción de la oxidación (OIT) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado de concentrado de orizanoles BM (a), de BHT (b) y de  $\delta$ -tocoferol (c).

**Tabla 7.10.-** Energía de activación y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de girasol de alto de oleico sin antioxidantes con el agregado del concentrado de orizanoles BM, de BHT y de  $\delta$ -tocoferol.

Antioxidante	$E'_a$ (kJ/mol)	$A'$ (min. <sup>-1</sup> )
Conc. oriz. BM	103 ± 4	(1.60 ± 0.05) x 10 <sup>13</sup>
BHT	70 ± 3	(1.18 ± 0.05) x 10 <sup>9</sup>
$\delta$ -tocoferol	89 ± 4	(7.71 ± 0.31) x 10 <sup>10</sup>

Para una misma diferencia de temperatura el aceite conteniendo el antioxidante que le confiere una mayor energía de activación “aparente” es el que presenta un mayor cambio en el Ln (1/OIT) y por ende un menor cambio en el OIT. Por lo tanto, un mayor cambio en el OIT implica una menor resistencia del aceite con agregado de antioxidante a los cambios de temperatura. El concentrado de orizanoles BM es el que presentó la energía de activación “aparente” más elevada, seguido del  $\delta$ -tocoferol y por último, del BHT.

### 3.1.3. Comparación de los resultados para los diferentes aceites.

Los resultados obtenidos para los aceites comerciales refinados y purificados (sin antioxidantes) y con agregado de diferentes antioxidantes se muestran en la Tabla 7.11. Comparando los OIT obtenidos a una temperatura de 130 °C mediante el método DSC-isotérmico, se concluye que el  $\delta$ -tocoferol

fue el que protegió más eficientemente a todos los aceites. El TBHQ fue el que siguió al  $\delta$ -tocoferol para los aceites comerciales refinados y purificados de soja, de girasol común y de salvado de arroz. El aceite de girasol de alto oleico no presentó la misma tendencia: el BHT presentó un leve pero mayor poder antioxidante que el TBHQ. Los orizanoles fueron los que presentaron el menor poder antioxidante de todos los antioxidantes ensayados. Sin embargo, para todos los aceites el concentrado BM presentó un poder antioxidante superior al de los orizanoles puros. Esto puede atribuirse a que el concentrado de orizanoles BM contiene, además de los orizanoles, una pequeña cantidad de tocoferoles y de tocotrienoles (en total 75 ppm), los que eventualmente pueden contribuir favorablemente con su efecto antioxidante.

**Tabla 7.11.-** Tiempos de inducción de la oxidación (OIT) a 130 °C de los aceites sin antioxidantes y con el agregado de diferentes antioxidantes.

Antioxidante	OIT (horas)			
	Soja	Girasol común	Salvado de arroz	Girasol de alto oleico
<b>Sin antioxidante</b>	15.7 ± 0.6	-	18.0 ± 0.7	-
<b>Orizanoles puros</b>	12.0 ± 0.5	16.5 ± 0.7	27.8 ± 0.9	68.7 ± 1.9
<b>Conc. oriz. BM</b>	14.0 ± 0.6	18.5 ± 0.7	29.4 ± 1.1	74.0 ± 2.0
<b>BHT</b>	22.0 ± 0.9	24.8 ± 1.0	36.3 ± 1.2	56.0 ± 1.7
<b>TBHQ</b>	23.7 ± 0.9	34.0 ± 1.1	44.0 ± 1.3	52.7 ± 1.6
<b><math>\delta</math>-tocoferol</b>	41.0 ± 1.5	46.0 ± 1.6	70.6 ± 2.0	225.0 ± 3.2

La energía de activación “aparente” ( $E'_a$ ) y el factor pre-exponencial “aparente” ( $A'$ ) solo fueron estudiadas para algunos aceites con algunos antioxidantes (Tabla 7.12). Para el aceite de girasol de alto oleico conteniendo al concentrado de orizanoles BM presentó mayores  $E'_a$  y  $A'$  que cuando se les adicionó  $\delta$ -tocoferol y BHT (estudiado solamente en el aceite de girasol de alto oleico). Sin embargo, para el aceite de soja los valores correspondientes a  $E'_a$  y  $A'$ , fueron menores cuando se adicionó el concentrado de orizanoles BM que cuando se adicionó el  $\delta$ -tocoferol. Se observa también que en el caso del concentrado de orizanoles BM ambos parámetros se incrementaron con la disminución de la insaturación del aceite siendo en algunos casos diferencias no significativas (aceite de soja y aceite de girasol común). Por lo tanto, debe existir una diferencia importante en el grado de insaturación para poder observar cambios significativos en la energía de activación. Sin embargo, para el  $\delta$ -tocoferol esta tendencia no fue tan marcada no existiendo una diferencia significativa en la  $E'_a$  del aceite de soja y del aceite de salvado de arroz. Estos parámetros pueden ser utilizados para comparar la velocidad “aparente” de oxidación de los diferentes aceites con el agregado de antioxidantes (Tan *et al.*, 2001). De acuerdo con estos resultados no es posible concluir sobre el poder antioxidante comparando estos parámetros por separado. Por lo tanto, es necesario calcular la constante de velocidad “aparente” como se verá más adelante.

**Tabla 7.12.-** Energía de activación “aparente” y coeficiente pre-exponencial “aparente” de los aceites purificados pero con agregado de diferentes antioxidantes.

Antioxidante	Aceite							
	Soja		Girasol común		Salvado de arroz		Girasol de alto oleico	
	$E'_a$ (1)	$A'$ (2)	$E'_a$ (1)	$A'$ (2)	$E'_a$ (1)	$A'$ (2)	$E'_a$ (1)	$A'$ (2)
<b>Conc. oriz.</b>	68±3	(3.89±0.16)	73±4	(8.74±0.35)	83±4	(1.27±0.05)	103±4	(1.60±0.05)
<b>BM</b>		x10 <sup>9</sup>		x10 <sup>9</sup>		x10 <sup>11</sup>		x10 <sup>13</sup>
<b>BHT</b>	-	-	-	-	-	-	70±3	(1.18±0.05)
								x10 <sup>9</sup>
<b>δ-tocoferol</b>	76±4	(1.05±0.04)	-	-	75±3	(4.17±0.17)	89±4	(7.71±0.31)
		x10 <sup>10</sup>				x10 <sup>9</sup>		x10 <sup>10</sup>

(1) valores expresados en kJ/mol, (2) valores expresados en min.<sup>-1</sup>

En la Tabla 7.13 se presentan los valores de la constante “aparente” de velocidad de reacción a 130 °C ( $k'_{130°C}$ ) para los aceites conteniendo los diferentes antioxidantes, cuyos valores se determinaron a partir de los datos de la Tabla 7.12. Se observa que el concentrado de orizanoles BM protegió más eficientemente al aceite de girasol de alto oleico que al resto de los aceites, ya que éste presentó un valor de  $k'_{130°C}$  de 9.6, 4.9 y 3.6 veces menor que la correspondiente al mismo concentrado adicionado a los aceites de soja, girasol común y salvado de arroz, respectivamente.

**Tabla 7.13.-** Constante de velocidad “aparente” a 130 °C para los aceites purificados pero con agregado de diferentes antioxidantes.

Antioxidante	Constante “aparente” de velocidad (min. <sup>-1</sup> )			
	Soja	Girasol común	Salvado de arroz	Girasol de alto oleico
<b>Conc. oriz. BM</b>	6.7	3.4	2.5	0.7
<b>BHT</b>	-	-	-	1.0
<b>δ-tocoferol</b>	1.4	-	0.8	0.2

El agregado de los diferentes antioxidantes sobre el aceite de girasol de alto oleico tuvo distintos efectos: la mayor protección la presentó el  $\delta$ -tocoferol, seguido del concentrado de orizanoles BM y por último, del BHT. Sin embargo, la mayor  $E'_a$  correspondió al concentrado de orizanoles BM, seguida del  $\delta$ -tocoferol y por último al BHT (Tabla 7.12). Es claro que la energía de activación es un indicador de cuan “sensible” es la cinética de una reacción a la variación de temperatura, pero no se puede vincular directamente a la velocidad del proceso, por lo que para definir cuál antioxidante es el más eficaz al momento de proteger un determinado aceite a una cierta temperatura deben analizarse los valores de constante de velocidad a dicha temperatura.

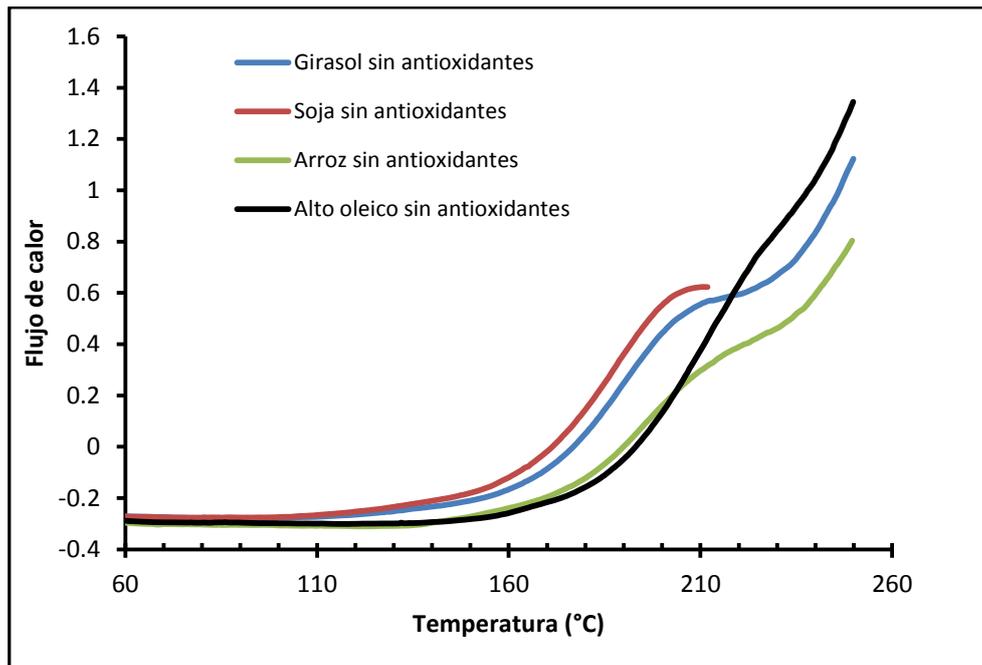
Estos resultados no coinciden con los obtenidos mediante el método OSI, donde el concentrado de orizanoles BM fue el que otorgó la menor en todos los aceites purificados. El  $\delta$ -tocoferol otorgó mayor protección al aceite de girasol de alto oleico que el BHT, determinado tanto por este método como por

el método OSI. Sin embargo, por este método el BHT presentó un menor poder protector que el concentrado de orizanoles BM, a diferencia de lo determinado por el método OSI. Por lo tanto, los resultados obtenidos por el método OSI y DSC no son comparables y ello se justifica debido a que ambos métodos determinan el poder antioxidante en condiciones analíticas diferentes.

### **3.2. Estudio no isotérmico.**

#### **3.2.1. Aceites refinados purificados.**

En la Figura 7.23 se muestran las curvas obtenidas a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min para los aceites refinados comerciales de soja, girasol común, salvado de arroz y girasol de alto oleico, todos ellos previamente purificados para eliminar sus antioxidantes. En la Tabla 7.14 se muestran las temperaturas de oxidación (OT) correspondientes. El aceite de soja presenta la menor temperatura oxidación (158.8 °C), lo que está de acuerdo con su mayor grado de insaturación. Lo siguen el aceite de girasol común y el aceite de salvado de arroz con valores de 160.8 °C y 168.4 °C respectivamente siendo el aceite de girasol de alto oleico es el más estable (OT=181.1 °C).



**Figura 7.23.-** Análisis no isotérmico de cuatro aceites comerciales refinados sin antioxidantes, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos para los períodos de inducción de los mismos aceites mediante el método OSI (Tabla 6.4 del capítulo 6), ya que tanto el período de inducción (PI) como la temperatura de oxidación (OT) disminuyen a medida que el aceite posee mayor grado de insaturación (o aumenta su estabilidad inherente, según la Tabla 6.3 del Capítulo 6).

**Tabla 7.14.-** Temperaturas de oxidación (Figura 7.23) para los aceites de soja, de girasol común, de salvado de arroz y de girasol de alto oleico, sin antioxidantes. Velocidad de oxidación = 10 °C/min.

<b>Aceite</b>	<b>OT (K)</b>
<b>Soja</b>	431.8 ± 0.5
<b>Girasol común</b>	433.4 ± 0.5
<b>Salvado de arroz</b>	441.4 ± 0.5
<b>Girasol de alto oleico</b>	454.1 ± 0.5

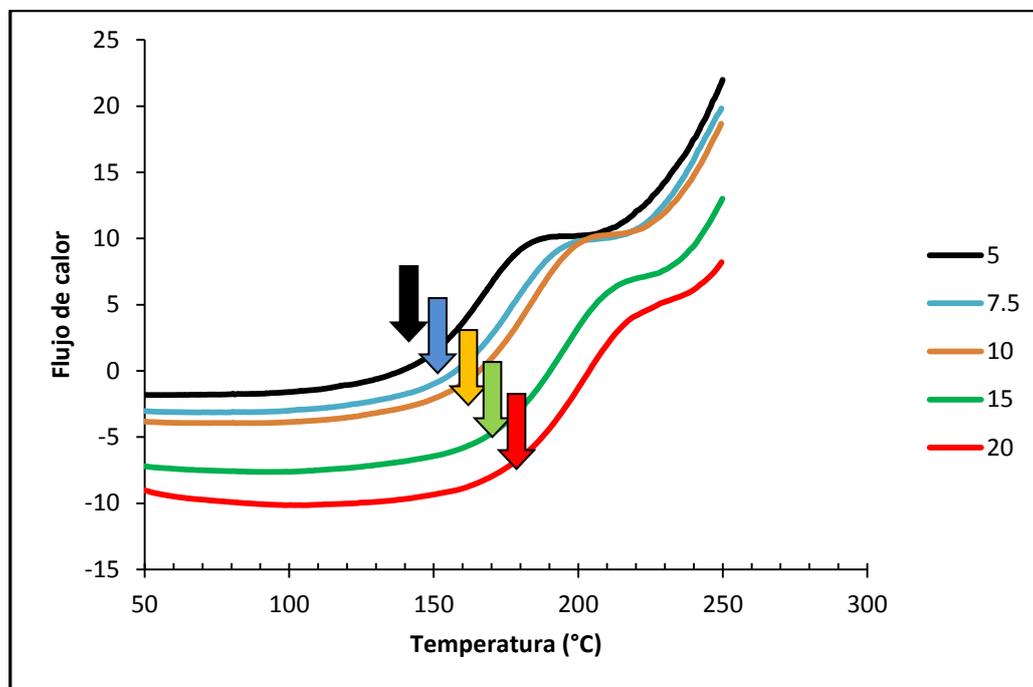
A cada uno de los aceites sin antioxidantes se les agregó antioxidantes naturales y sintéticos, al igual a lo ya visto en el estudio isotérmico, en una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M. Estos ensayos se muestran a continuación.

### **3.2.2. Aceites refinados purificados con agregado de diferentes antioxidantes.**

#### **3.2.2.1. Aceite de soja.**

En la Figura 7.24 se muestran los termogramas para el aceite de soja a cinco velocidades de calentamiento diferentes. El aumento de la velocidad de

calentamiento aumenta la temperatura de oxidación (indicado con flechas en la Figura 7.24).



**Figura 7.24.-** Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para el aceite de soja sin antioxidantes.

Para explicar este comportamiento se debe tener en cuenta que para alcanzar el cambio de pendiente se debe exponer la muestra a una atmósfera oxidativa durante un determinado tiempo, a medida que aumenta la temperatura. Por lo tanto, el momento de cambio en la pendiente estará relacionado con un determinado tiempo total de oxidación a una determinada velocidad de calentamiento. A una velocidad de calentamiento de 10 °C/min tardará un cierto tiempo en llegar al cambio de pendiente y ello estará relacionado con una temperatura de oxidación (OT) obtenida del termograma. Si se aumenta la velocidad de calentamiento a 15 °C/min, para alcanzar la

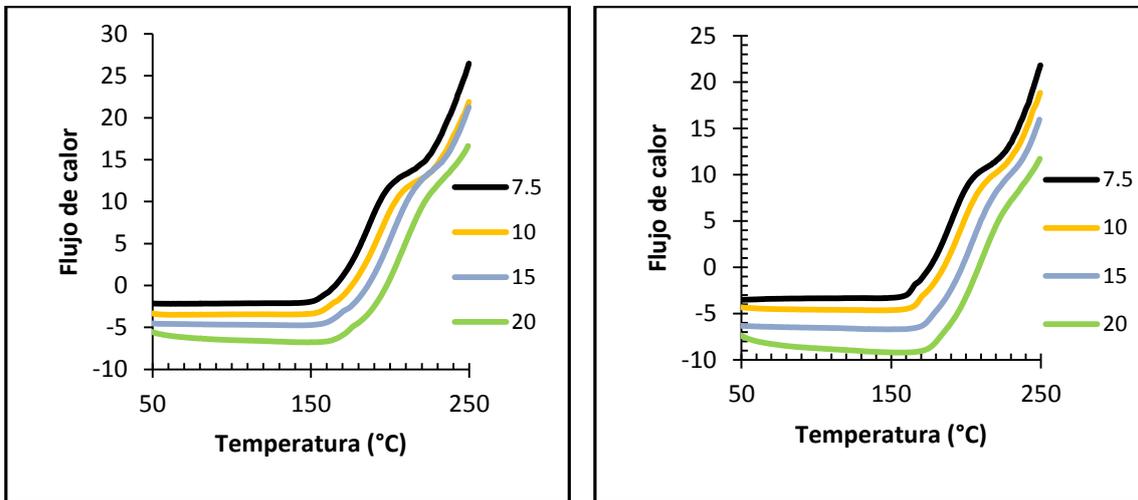
temperatura de oxidación (OT) determinada a la velocidad de calentamiento de 5 °C/min tardará menos tiempo y, por ende, la muestra habrá alcanzado un grado de oxidación menor. Por lo tanto, para alcanzar el mismo grado de oxidación a la velocidad de calentamiento de 15 °/min que a la velocidad de 5 °C/min, se tardará un poco más de tiempo y la temperatura de oxidación se desplazará a un valor superior. La Tabla 7.15 muestra los valores de OT para las velocidades de calentamiento utilizadas.

**Tabla 7.15.-** Temperaturas de oxidación (OT) para el aceite de soja sin antioxidantes, a diferentes velocidades de calentamiento.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	OT (K)
5.0	417.5 ± 0.5
7.5	425.5 ± 0.5
10.0	431.8 ± 0.5
15.0	442.4 ± 0.5
20.0	448.3 ± 0.5

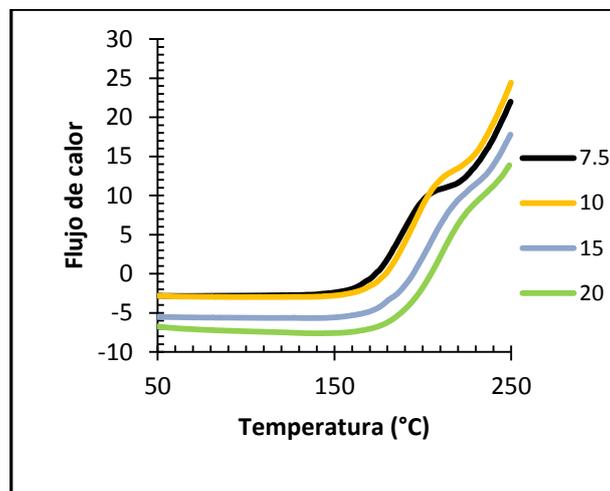
La Figuras 7.25 y 7.26 muestran los termogramas para el aceite de soja purificado (sin antioxidantes) con el agregado de BHT, TBHQ y δ-tocoferol. De acuerdo con lo esperado, a medida que se incrementa la velocidad de calentamiento, el cambio de pendiente en las curvas ocurre a temperaturas

mayores, al igual que se observó con el aceite de soja sin antioxidantes (Figura 7.24).



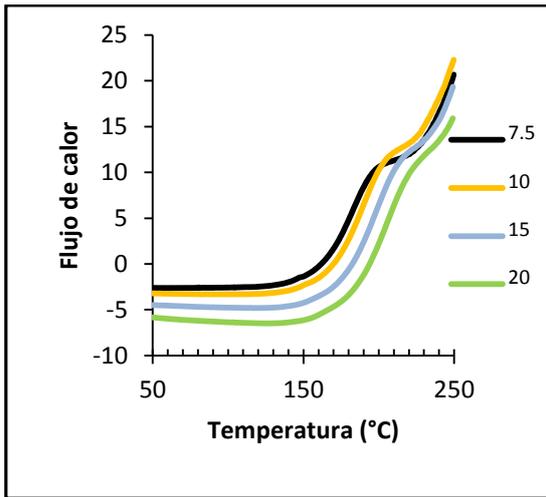
(a)

(b)

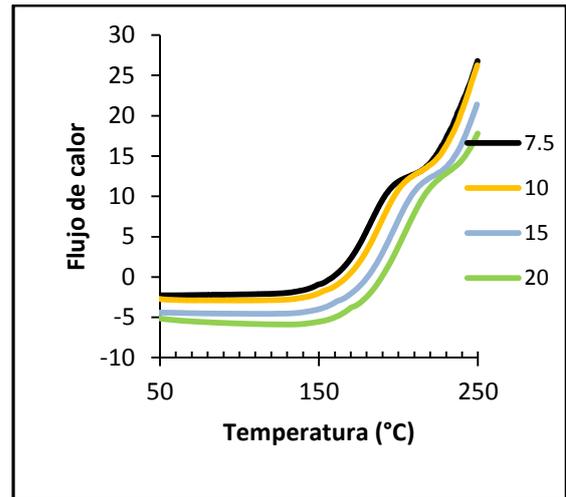


(c)

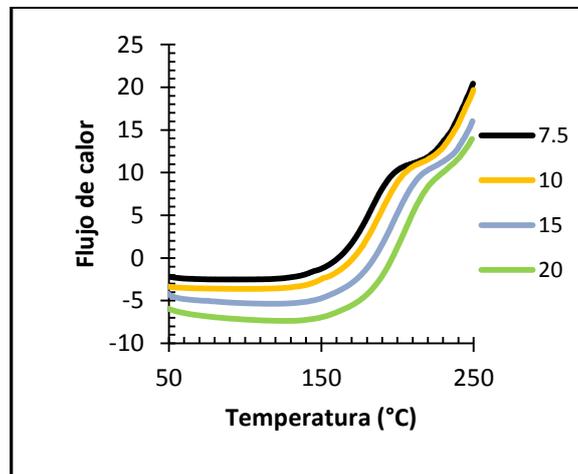
**Figura 7.25.-** Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para el aceite de soja purificado pero con el agregado de igual concentración molar de los siguientes antioxidantes: a) BHT, b) TBHQ y c)  $\delta$ -tocoferol.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.26.-** Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para el aceite de soja purificado pero con el agregado de igual concentración molar de los siguientes antioxidantes: a) orizanoles puros, b) concentrado de orizanoles BM y c) ácido ferúlico.

Los termogramas para el aceite de soja sin antioxidantes y con el agregado de antioxidantes (Figura 7.24, 7.25 y 7.26) presentan dos inflexiones, por lo que a los efectos del cálculo de la temperatura de oxidación se tuvo en cuenta solamente la pendiente en el primer proceso de oxidación.

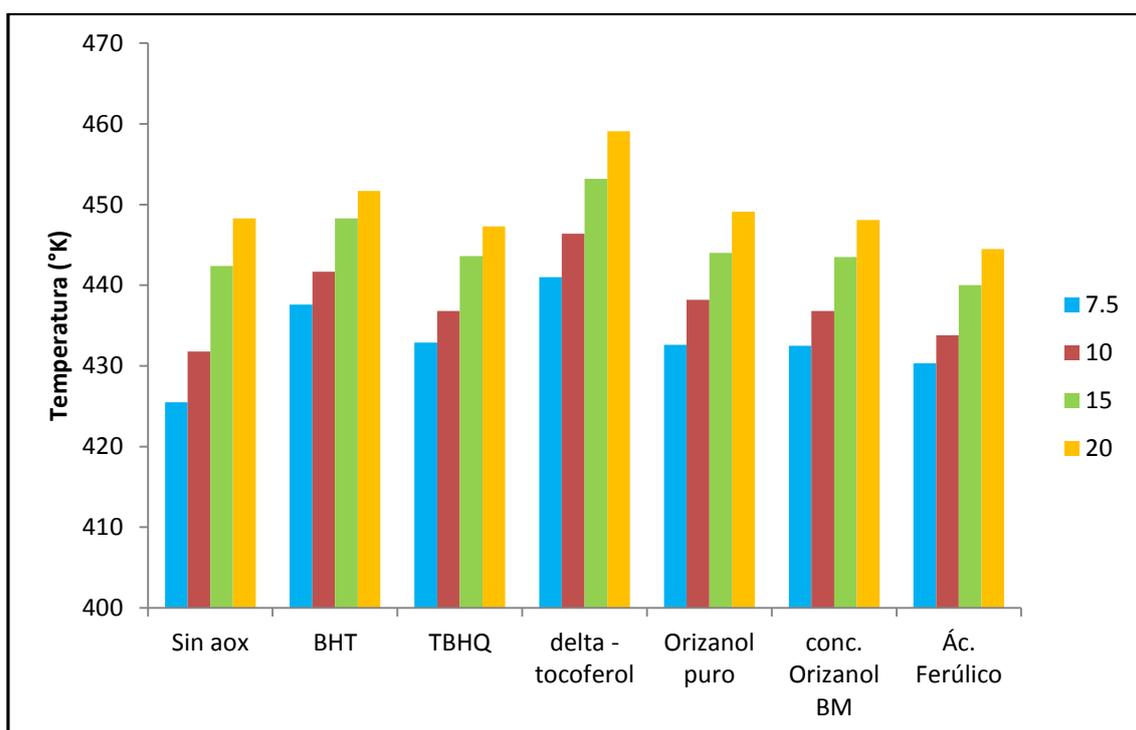
En la Tabla 7.16 se presentan las temperaturas de oxidación para el aceite de soja purificado y con cada uno de los antioxidantes, a diferentes velocidades de calentamiento. Los mismos valores se representan en la Figura 7.27.

**Tabla 7.16.-** Temperaturas de oxidación (OT) para el aceite de soja purificado (sin antioxidantes) y con el agregado de diferentes antioxidantes.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	OT (K)						
	BHT	TBHQ	δ-tocoferol	Oriz. puros	Conc. Oriz. BM	Ac. Ferúlico	Sin antioxidantes
7.5	437.6± 0.5	432.9± 0.5	441.0± 0.5	432.6± 0.5	432.5± 0.5	430.3± 0.5	425.5± 0.5
10.0	441.7± 0.5	436.8± 0.5	446.4± 0.5	438.2± 0.5	436.8± 0.5	433.8± 0.5	431.8± 0.5
15.0	448.3± 0.5	443.6± 0.5	453.2± 0.5	444.0± 0.5	443.5± 0.5	440.0± 0.5	442.4± 0.5
20.0	451.7± 0.5	447.3± 0.5	459.1± 0.5	449.1± 0.5	448.1± 0.5	444.5± 0.5	448.3± 0.5

En general, y como era de esperarse, los valores de OT fueron más bajos para el aceite de soja purificado sin antioxidantes que para éste aditivado con cualquiera de los antioxidantes estudiados, sin embargo a velocidades de calentamiento altas ocurrieron algunas excepciones. Este fue el caso del ácido ferúlico, con el cual a velocidades 15 y 20 °C/min el aceite presentó valores de OT inferiores al del aceite sin antioxidantes. Lo mismo ocurrió con la adición de TBHQ en el caso del calentamiento a 20 °C/min. Ello se debe a que la variación de temperatura está relacionada con el valor de la energía de activación “aparente” tal como se verá más adelante. Por lo tanto, a una determinada

velocidad de calentamiento la OT para el aceite sin antioxidante puede ser menor a la del aceite con agregado de antioxidante. Sin embargo, si cambia la velocidad de calentamiento el valor de OT cambiará de acuerdo al valor de la energía de activación “aparente” con lo cual el orden de OT mencionado anteriormente puede llegar a revertirse.



**Figura 7.27.-** Temperaturas de oxidación (OT) para el aceite de soja purificado y con agregado de diferentes antioxidantes, a diferentes velocidades de calentamiento.

Litwinienko *et al.* (1998 y 1999) proponen un desarrollo que permite determinar a partir de éste método analítico las energías de activación del proceso de oxidación en DSC no-isotérmico. Este método se basa en el descrito por Osawa-Flynn-Wall; y que ha sido aplicado en numerosos trabajos de investigación en ésta área (Kasprzycka-Guttman, 1992).

El método de Osawa-Flynn-Wall se refiere a una reacción ocurriendo en un medio cuya temperatura se incrementa a una velocidad ( $\beta$ ) constante:

$$\beta = \frac{dT}{dt} \quad [7.13]$$

Combinando expresiones cinéticas en sistemas no-isotérmicos con las correspondientes a los fenómenos de transferencia de calor, diferentes investigadores han contribuido mediante un desarrollo muy complejo a la deducción de ecuaciones prácticas aplicables a la determinación de los parámetros cinéticos de una reacción ocurriendo en estas condiciones (Kasprzycka-Guttman *et al.*, 1995; Litwinienko *et al.*, 1998; Thurgood *et al.*, 2007). Dado que dicho desarrollo escapa al alcance y objetivo de esta tesis, aquí únicamente se presenta el resultado del mismo y se utilizan las herramientas que el mismo ofrece, como ser la relación entre la velocidad de calentamiento con la temperatura de oxidación de una muestra lipídica (OT):

$$\log \beta = \frac{a}{T} + b \quad [7.14]$$

donde:

$\beta$ .- velocidad de calentamiento.

T.- temperatura de inicio de la oxidación, OT (° K).

a y b.- parámetros de la ecuación

Litwinienko *et al.* (1998, 1999) y Thurgood *et al.* (2007) relacionaron la energía de activación con el valor de la pendiente de la curva logaritmo de la velocidad de calentamiento versus  $1/T$ , según la siguiente ecuación:

$$a = -\frac{E'_a}{2.19 * R} \quad [7.15]$$

donde:

$E'_a$ .- energía de activación “aparente” (kJ/mol).

R.- constante de los gases (KJ/mol K)

Litwinienko *et al.* (1999) y Ulkowski *et al.* (2005) entre otros investigadores describieron la relación existente entre la ordenada en el origen “b” y el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius, mediante la siguiente ecuación:

$$b = -2.315 + \log \frac{A' * E'_a}{R} \quad [7.16]$$

donde:

$E'_a$ .- energía de activación “aparente” (kJ/mol).

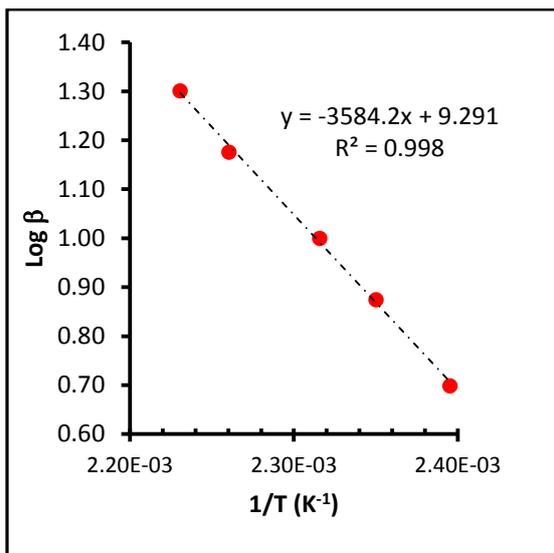
R.- constante de los gases.

$A'$ - factor pre-exponencial “aparente” de Arrhenius.

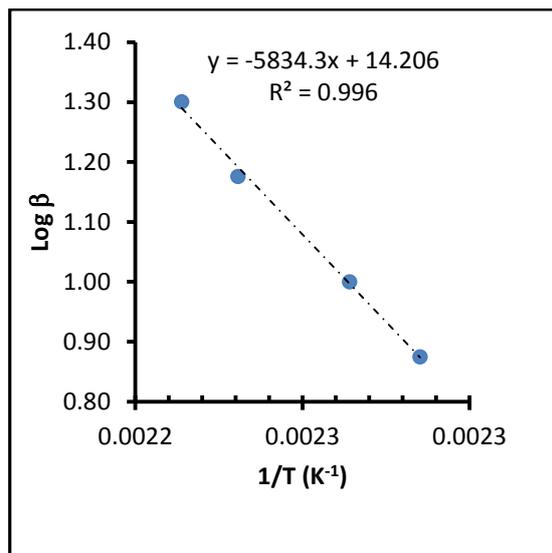
b.- ordenada en el origen.

Luego, determinada la energía de activación “aparente” y el factor pre-exponencial “aparente” se puede calcular la constante “aparente” de velocidad de la oxidación aplicando la ecuación de Arrhenius directamente.

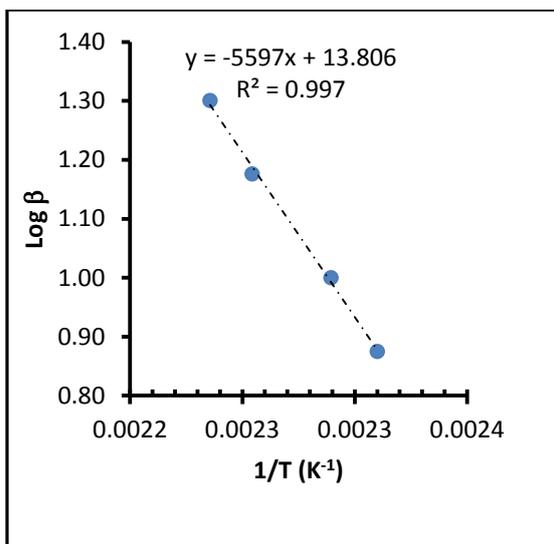
Las Figuras 7.28 y 7.29 muestran las gráficas del  $\log \beta$  en función de la inversa de la temperatura para el aceite de soja purificado y con el agregado de diferentes antioxidantes. Los coeficientes de correlación lineal obtenidos son muy buenos (0,997), lo que demuestra un buen ajuste entre el modelo descrito y los resultados experimentales.



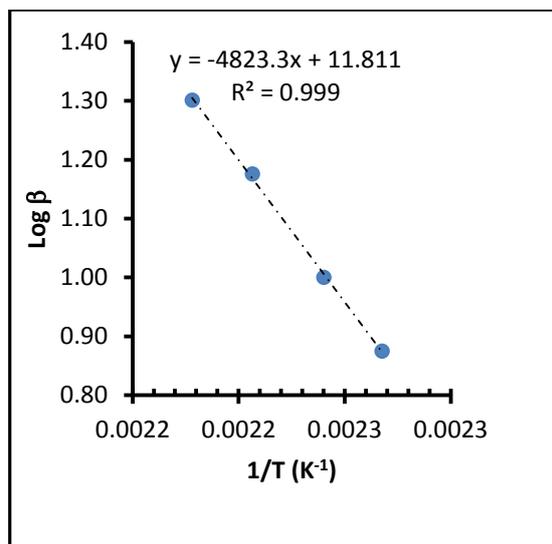
(a)



(b)

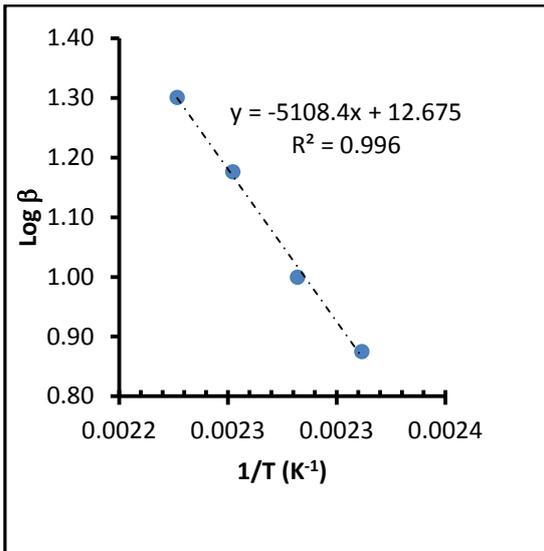


(c)

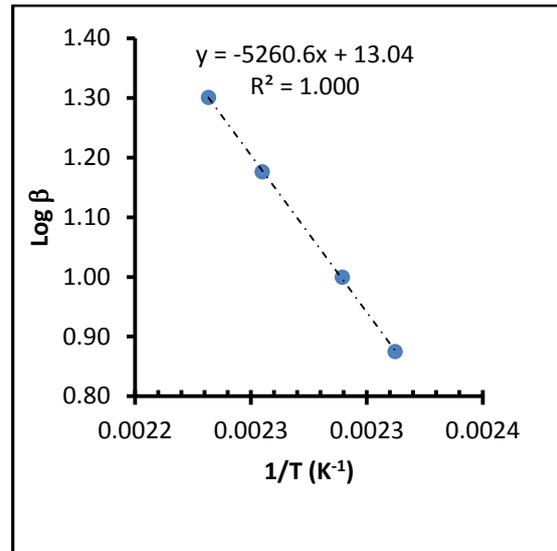


(d)

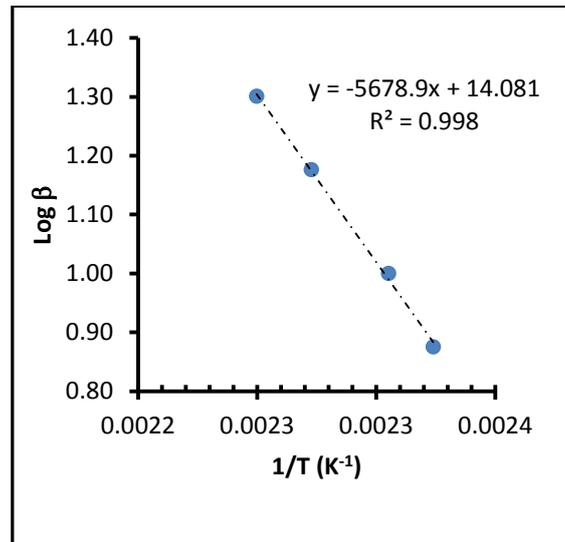
**Figura 7.28.-** Logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de soja: a) sin antioxidantes, b) con BHT, c) con TBHQ y d) con  $\delta$ -tocoferol.



(a)



(b)



(c)

**Figura 7.29.-** Logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de soja con agregado de: a) orizanoles puros, b) conc. de orizanoles BM y c) ácido ferúlico.

La Tabla 7.17 muestra los valores de la energía de activación “aparente” y del factor pre-exponencial “aparente” calculados de acuerdo con las ecuaciones anteriormente detalladas.

**Tabla 7.17.-** Energías de activación “aparente” y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de soja purificado (sin antioxidantes) y con agregado de diferentes antioxidantes.

	$E'_a$ (kJ/mol)	$A'$ (min. <sup>-1</sup> )
<b>sin antioxidantes</b>	65 ± 3	(5.1 ± 0.2) x10 <sup>7</sup>
<b>δ-tocoferol</b>	88 ± 4	(1.3 ± 0.05) x10 <sup>10</sup>
<b>Orizanoles puros</b>	93 ± 4	(8.7 ± 0.35) x10 <sup>10</sup>
<b>Conc. oriz. BM</b>	96 ± 4	(2.0 ± 0.08) x10 <sup>11</sup>
<b>TBHQ</b>	102 ± 4	(1.1 ± 0.05) x10 <sup>12</sup>
<b>Ácido ferúlico</b>	103 ± 4	(2.0 ± 0.08) x10 <sup>12</sup>
<b>BHT</b>	106 ± 4	(2.6 ± 0.10) x10 <sup>12</sup>

Los valores de  $E'_a$  determinados por el método isotérmico para el δ-tocoferol (76 kJ/mol) y para el concentrado de orizanoles BM (68 kJ/mol) son claramente diferentes a los calculados por el método no isotérmico (88 kJ/mol y 96 kJ/mol respectivamente). Esto no es llamativo ya que cada modelo resulta de suposiciones y desarrollos matemáticos diferentes, por lo que los parámetros resultantes no necesariamente coinciden. Esta discrepancia fue

advertida también por varios de los autores (Litwinienko *et al.*, 1999) que participaron en el desarrollo de estas metodologías.

Como era de esperar, se observan diferencias importantes en los valores de  $E'_a$  del aceite purificado sin y con el agregado de antioxidantes, confirmando el efecto de los mismos sobre la cinética de la oxidación. El aceite con agregado de  $\delta$ -tocoferol fue el que presentó la menor  $E'_a$  mientras que el aceite con agregado de BHT, de TBHQ y de ácido ferúlico presentó valores similares (teniendo en cuenta sus respectivas incertidumbres).

Por otra parte, la  $E'_a$  obtenida para el aceite con orizanoles puros fue similar a la del aceite con el concentrado de orizanoles BM fue similar. El factor pre-exponencial “aparente” del aceite purificado presentó un valor por lo menos de tres órdenes inferior al del aceite con agregado de antioxidantes, lo cual se reflejará posteriormente en el cálculo de la velocidad de oxidación “aparente”.

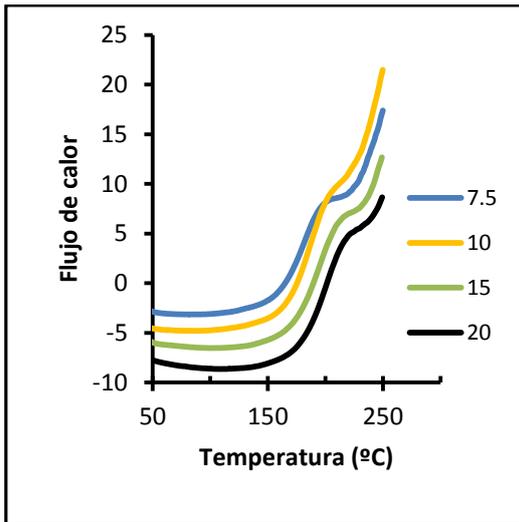
Los valores de la constante de velocidad “aparente” a 130 °C ( $k'_{130^\circ\text{C}}$ ) se presentan en la Tabla 7.18. El valor de  $k'_{130^\circ\text{C}}$  obtenido para el aceite de soja sin antioxidantes fue el mayor. Para el aceite aditivado con el concentrado de orizanoles puro, con el concentrado de orizanoles BM y con el ácido ferúlico se obtuvieron los mayores valores de  $k'_{130^\circ\text{C}}$ , siendo además todos muy similares. La constante para el aceite con el agregado de ácido ferúlico fue la más alta de todos los antioxidantes estudiados seguida de la de los orizanoles (puros y del concentrado de orizanoles BM), del TBHQ, del  $\delta$ -tocoferol y por último de la del BHT. En consecuencia, el ácido ferúlico y los orizanoles son los que presentan el menor poder protector a 130 °C mientras que el BHT presenta el mayor poder protector de todos los antioxidantes estudiados.

**Tabla 7.18.-** Constante de velocidad “aparente” a 130 °C para el aceite de soja purificado (sin antioxidantes) y para el aceite con agregado de diferentes antioxidantes.

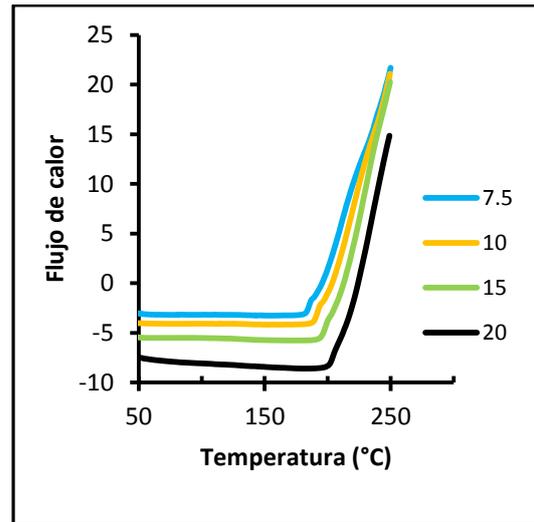
<b>Constante de velocidad “aparente” (min.<sup>-1</sup>)</b>	
<b>sin antioxidantes</b>	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
<b>Ácido ferúlico</b>	$(8.1 \pm 0.4) \times 10^{-2}$
<b>Orizanoles puros</b>	$(7.9 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
<b>Conc. oriz. BM</b>	$(7.7 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
<b>TBHQ</b>	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
<b>δ-tocoferol</b>	$(5.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$
<b>BHT</b>	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^{-2}$

### 3.2.2.2. Aceite de girasol común y aceite de salvado de arroz.

La Figura 7.30 muestra los termogramas obtenidos a cuatro velocidades de calentamiento para el aceite de girasol común y para el aceite de salvado de arroz, ambos sin antioxidantes.



(a)



(b)

**Figura 7.30.-** Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para dos aceites sin antioxidantes: a) girasol común y b) salvado de arroz.

La Tabla 7.19 muestra las temperaturas de oxidación para cada uno de los aceites, obtenidas a diferentes velocidades de calentamiento.

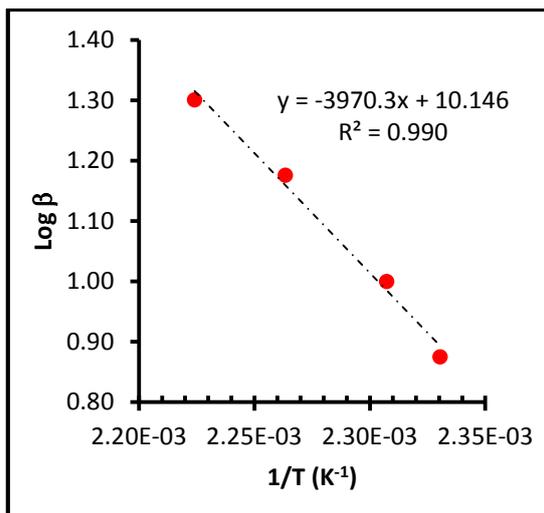
Para todas las velocidades de calentamiento la temperatura de oxidación del aceite de girasol común sin antioxidantes es inferior a la del aceite de salvado de arroz sin antioxidantes. Ello era esperable ya que el aceite de salvado de arroz por tener menor cantidad de ácidos grasos poli-insaturados, presenta una estabilidad mayor que la del aceite de girasol común.

**Tabla 7.19.-** Temperaturas de oxidación para el aceite de girasol común y para el aceite de salvado de arroz sin antioxidantes, a diferentes velocidades de calentamiento.

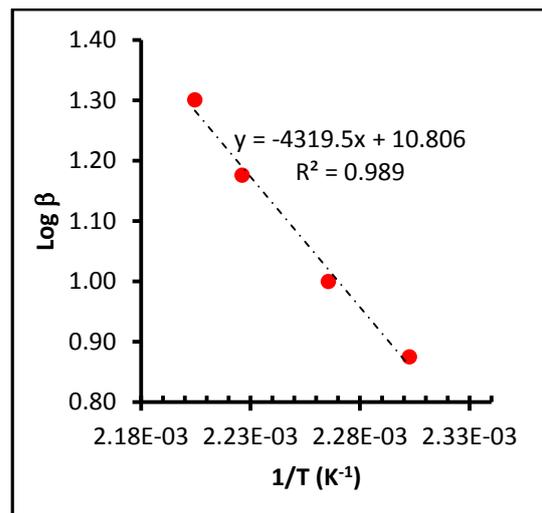
Velocidad de calentamiento (°C/min)	OT (° K)	
	Girasol común	Salvado de arroz
7.5	429.1 ± 0.5	434.3 ± 0.5
10.0	433.4 ± 0.5	441.4 ± 0.5
15.0	441.8 ± 0.5	449.2 ± 0.5
20.0	449.6 ± 0.5	453.6 ± 0.5

La Figura 7.31 muestra el logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta. Los coeficientes de correlación de las rectas son de 0.990 y 0.998, aceptables al igual que en el caso del aceite de soja.

El aceite de girasol común presenta una mayor pendiente que el aceite de soja pero inferior que el aceite de salvado de arroz. Ello se justifica porque, de acuerdo con la ecuación 7.15, la pendiente es proporcional a la energía de activación “aparente”.



(a)



(b)

**Figura 7.31.-** Logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para: a) aceite de girasol común sin antioxidantes y b) aceite de salvado de arroz sin antioxidantes.

En La Tabla 7.20 se presenta la energía de activación “aparente” así como el factor pre-exponencial “aparente” para ambos aceites.

**Tabla 7.20.-** Energía de activación “aparente” y su incertidumbre ( $\Delta E_a$ ) y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de girasol común purificado y para el aceite de salvado de arroz purificado.

Aceite	$E'_a$ (kJ/mol)	$A'$ (min. <sup>-1</sup> )
Girasol común	$72 \pm 3$	$(3.3 \pm 0.1) \times 10^8$
Salvado de arroz	$79 \pm 4$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^9$

Las diferencias entre las energías de activación “aparentes” para ambos aceites no son significativas, de acuerdo con su incertidumbre. Sin embargo, son diferentes a la del aceite de soja purificado (65 kJ/mol).

Las constantes de velocidad “aparente” se presentan en la Tabla 7.21. El aceite de girasol común sin antioxidantes presentó una constante mayor que la del aceite de salvado de arroz sin antioxidantes. Sin embargo, el aceite de girasol común presentó una constante de velocidad “aparente” levemente menor que la del aceite de soja sin antioxidantes, lo cual no está de acuerdo con su grado de insaturación.

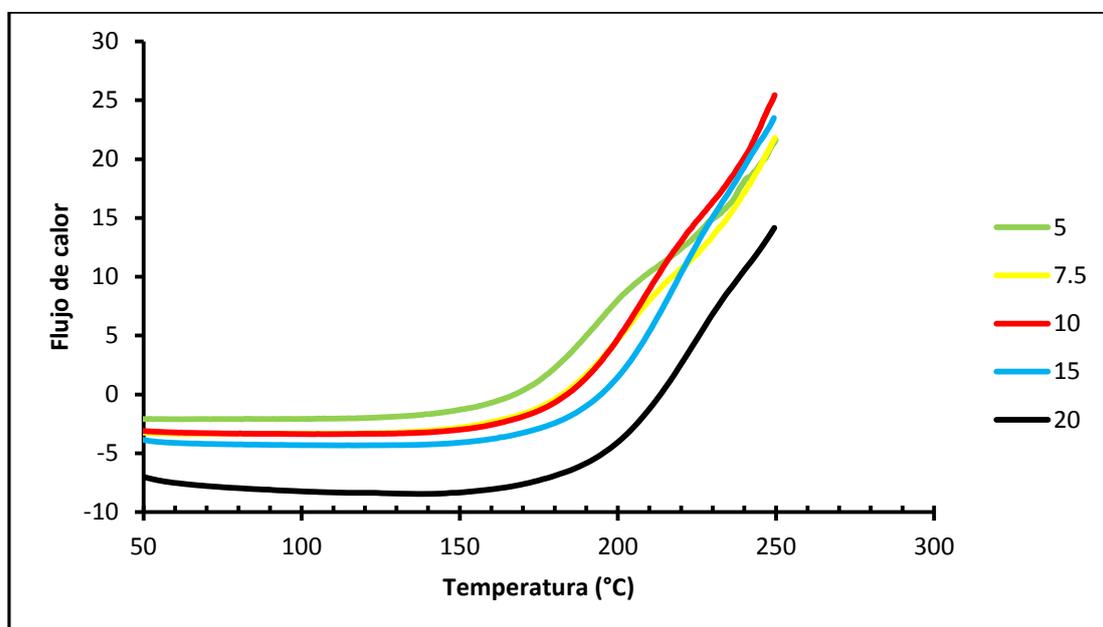
**Tabla 7.21.-** Constante de velocidad “aparente” a 130 °C para los aceites purificados (sin antioxidantes) de girasol común y de salvado de arroz.

Aceite	Constante de velocidad (min. <sup>-1</sup> )
Girasol común	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-1}$
Salvado de arroz	$(9.1 \pm 0.4) \times 10^{-2}$

De acuerdo con los resultados de constante de velocidad de oxidación el aceite de girasol común posee un comportamiento similar al de soja y el aceite de arroz posee un comportamiento intermedio al de soja, girasol común y de girasol de alto oleico. Por ello se centró en el estudio del poder antioxidante, de todos los antioxidantes incluyendo los orizanoles, sobre los aceites con mayores diferencias de estabilidad oxidativa (el aceite de soja y el aceite de alto oleico).

### 3.2.2.3. Aceite de girasol de alto oleico.

El aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes fue oxidado a cuatro velocidades de calentamiento. La Figura 7.32 muestra los termogramas obtenidos para cada una de dichas velocidades y la Tabla 22 muestra los valores de la temperatura de oxidación correspondientes.



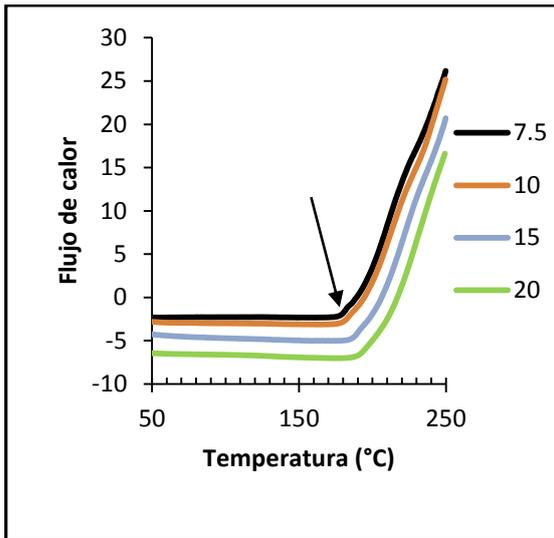
**Figura 7.32.-** - Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para el aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes.

**Tabla 7.22.-** Temperaturas de oxidación para el aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes, para diferentes velocidades de calentamiento.

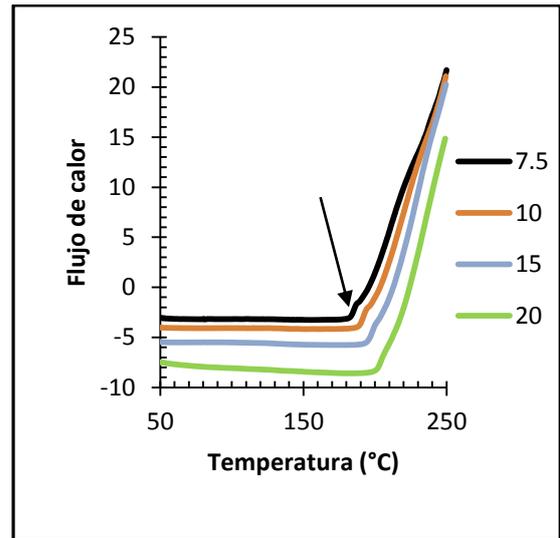
<b>Velocidad de calentamiento (°C/min)</b>	<b>OT (K)</b>
<b>5.0</b>	<b>442.4 ± 0.5</b>
<b>7.5</b>	<b>449.6 ± 0.5</b>
<b>10.0</b>	<b>453.7 ± 0.5</b>
<b>15.0</b>	<b>462.5 ± 0.5</b>
<b>20.0</b>	<b>468.0 ± 0.5</b>

Al aceite de girasol de alto oleico se le agregó diferentes antioxidantes: BHT, TBHQ,  $\delta$ -tocoferol, orizanoles puros, concentrado de orizanoles BM y ácido ferúlico. Las Figuras 7.33 y 7.34 muestran los correspondientes termogramas.

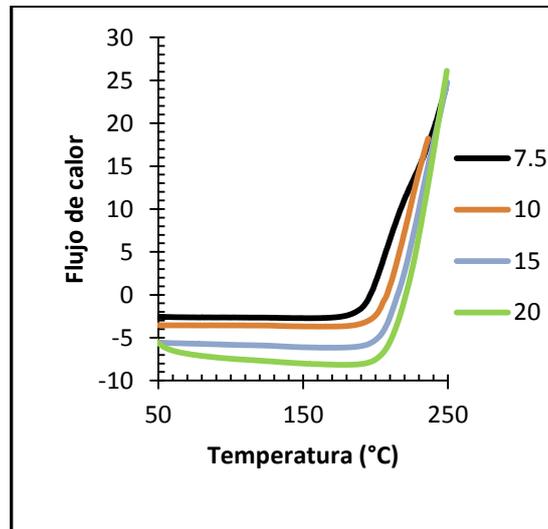
Estos termogramas son similares a los del aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes pero desplazados a temperaturas mayores. Para el aceite con agregado de BHT y de TBHQ, los termogramas presentan una zona muy pequeña donde comienza a incrementar la potencia (en el gráfico aparece señalado con una flecha), luego aparece una inflexión y posteriormente sigue aumentando. Algo similar ocurre en el termograma del aceite con el concentrado de orizanoles BM pero mucho menos marcado.



(a)

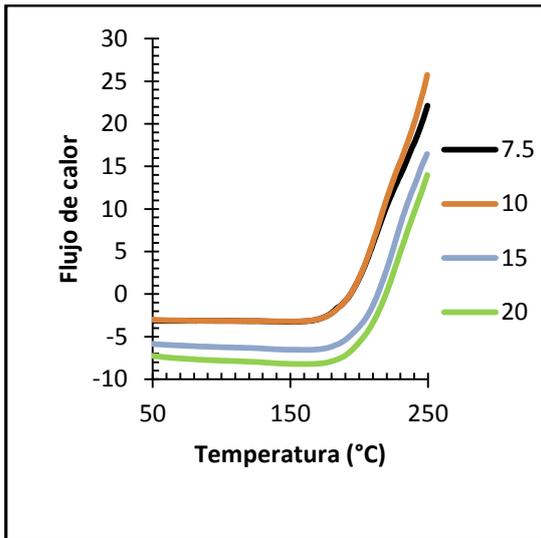


(b)

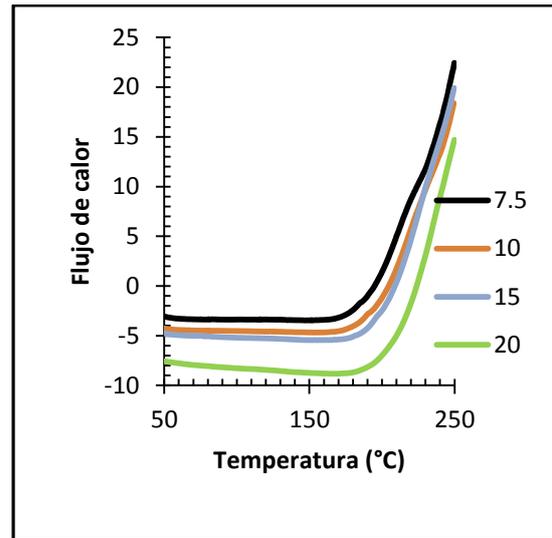


(c)

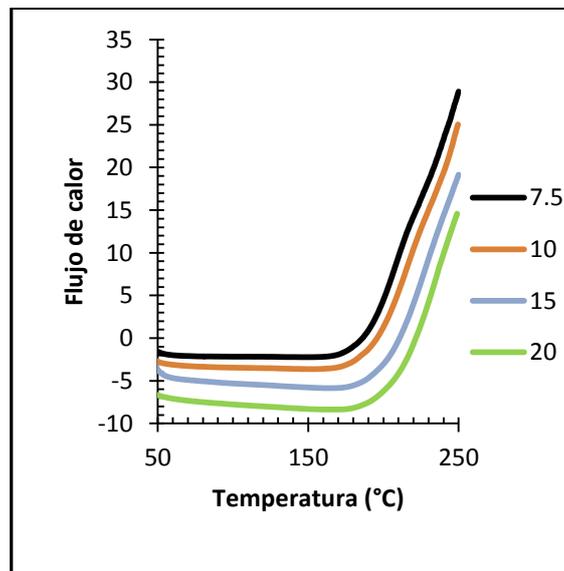
**Figura 7.33.-** Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para el aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes pero con el agregado de una cantidad molar igual de los siguientes antioxidantes: a) BHT, b) TBHQ y c)  $\delta$ -tocoferol.



(a)



(b)



(c)

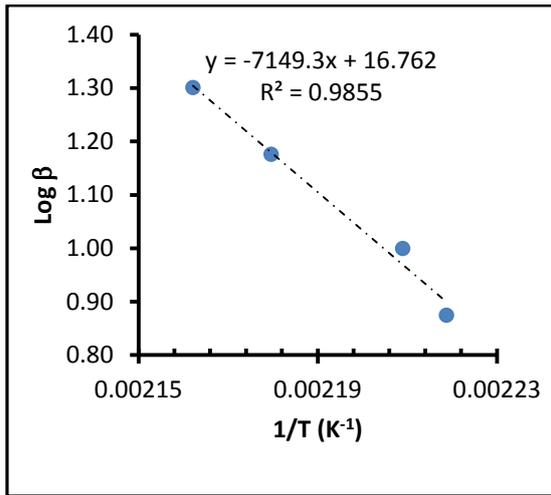
**Figura 7.34.-** Termogramas a diferentes velocidades de calentamiento para el aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes pero con el agregado de una cantidad molar igual de los siguientes antioxidantes: a) orizanoles puros, b) conc. de orizanol BM y c) ácido ferúlico.

Para estos antioxidantes se determinó la temperatura de oxidación considerando la primera inflexión y la segunda inflexión por separado (Tabla 7.23). Sólo en los casos que la primer inflexión está bien definida (aceite de soja, de girasol común y de salvado de arroz) se consideró sólo la temperatura correspondiente a ésta como la temperatura de inicio de la oxidación.

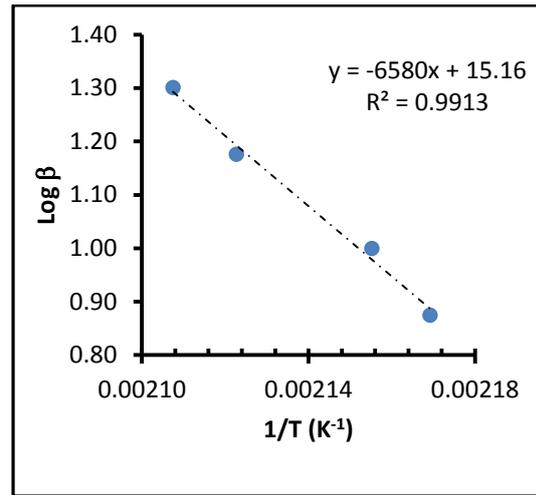
**Tabla 7.23.-** Temperaturas de oxidación considerando la primera inflexión (1) y considerando la segunda inflexión (2) para el aceite de girasol de alto oleico purificado (sin antioxidantes) pero con el agregado de BHT y de TBHQ.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	OT (K)			
	BHT <sup>(1)</sup>	BHT <sup>(2)</sup>	TBHQ <sup>(1)</sup>	TBHQ <sup>(2)</sup>
7.5	450.7 ± 0.5	461.0 ± 0.5	456.0 ± 0.5	463.5 ± 0.5
10.0	452.7 ± 0.5	464.0 ± 0.5	461.9 ± 0.5	469.5 ± 0.5
15.0	458.8 ± 0.5	471.1 ± 0.5	467.4 ± 0.5	474.9 ± 0.5
20.0	462.5 ± 0.5	474.5 ± 0.5	473.0 ± 0.5	482.1 ± 0.5

Las Figuras 7.35 y 7.36 muestran las gráficas del logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado de BHT y de TBHQ, teniendo en cuenta la primera inflexión y la segunda inflexión.

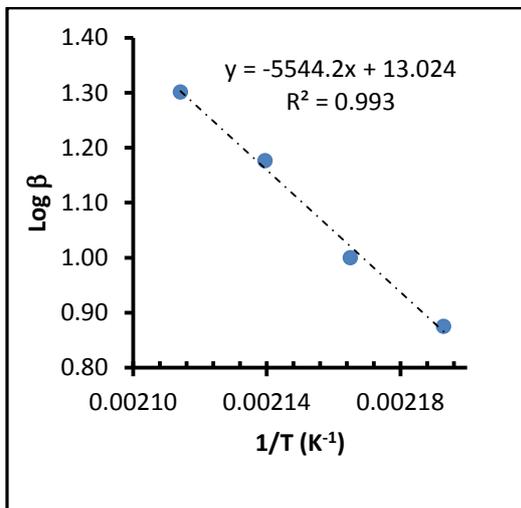


(a)

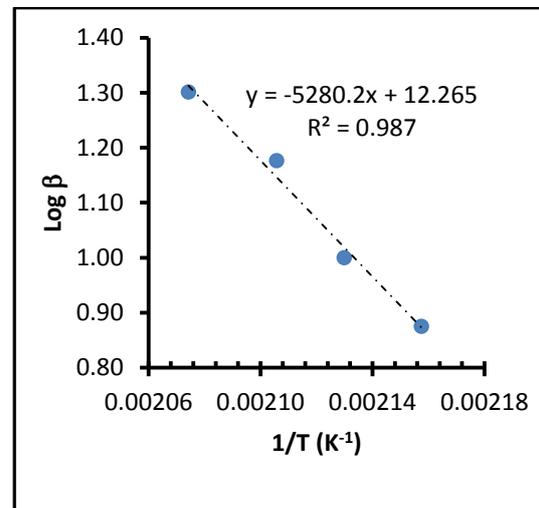


(b)

**Figura 7.35.-** Logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de BHT: a) considerando la primera inflexión b) considerando la segunda inflexión.



(a)



(b)

**Figura 7.36-** Logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de TBHQ: a) considerando la primera inflexión b) considerando la segunda inflexión.

La pendiente para las rectas considerando la temperatura de la primera inflexión y la de la segunda inflexión presentó una mayor diferencia para el agregado de BHT que para el agregado de TBHQ. La Tabla 7.24 muestra la energía de activación y el factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de girasol de alto oleico con ambos antioxidantes calculados en base a la primera inflexión y en base a la segunda inflexión.

**Tabla 7.24.-** Energías de activación “aparente” y factor pre-exponencial “aparente” para el aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes pero con el agregado de BHT y de TBHQ.

1.- considerando la primer inflexión / 2.- considerando la segunda inflexión.

	$E'_a$ (kJ/mol)		$A'$ (min. <sup>-1</sup> )	
	1	2	1	2
<b>BHT</b>	130 ± 5	120 ± 4	(7.6 ± 0.3) x10 <sup>14</sup>	(2.1 ± 0.1) x10 <sup>13</sup>
<b>TBHQ</b>	101 ± 4	96 ± 3	(1.8 ± 0.1) x10 <sup>11</sup>	(3.3 ± 0.2) x10 <sup>10</sup>

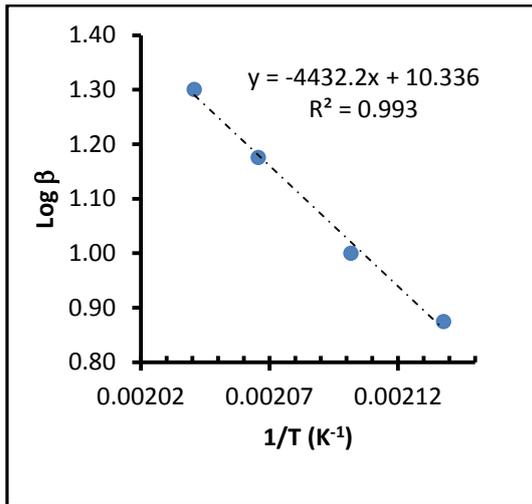
La energía de activación “aparente” presentó una diferencia notoria entre ambos casos aunque en el factor pre-exponencial “aparente” la diferencia es más notoria para el BHT: alrededor de 36 veces mayor cuando se consideró la temperatura de la primera inflexión. Ello implica que debe fijarse un criterio para determinar la OT ya que ello puede llevar a diferencias marcadas en la constante de velocidad.

En la Tabla 7.25 se muestran las temperaturas de oxidación para el aceite de girasol de alto oleico con los otros antioxidantes.

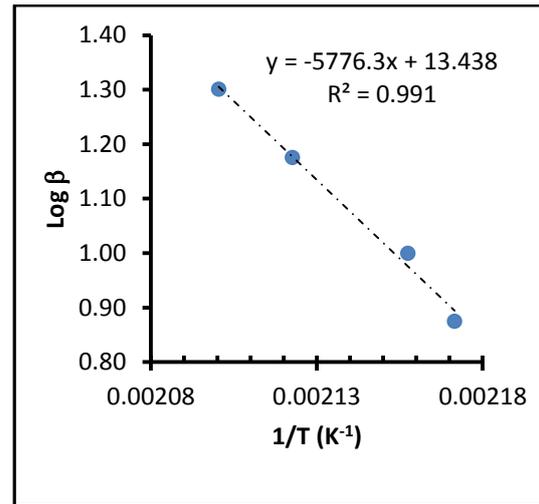
**Tabla 7.25.-** Temperaturas de oxidación para el aceite de girasol de alto oleico purificado (sin antioxidantes) pero con el agregado de diferentes antioxidantes.

Velocidad de calentamiento (°C/min)	Temperatura de oxidación (K)			
	$\delta$ -tocoferol	Orizanoles puros	Conc. oriz. BM	Ac. Ferúlico
7.5	467.8 $\pm$ 0.5	460.5 $\pm$ 0.5	462.1 $\pm$ 0.5	459.8 $\pm$ 0.5
10.0	475.8 $\pm$ 0.5	463.5 $\pm$ 0.5	466.6 $\pm$ 0.5	464.5 $\pm$ 0.5
15.0	484.1 $\pm$ 0.5	471.1 $\pm$ 0.5	473.3 $\pm$ 0.5	470.2 $\pm$ 0.5
20.0	490.0 $\pm$ 0.5	476.1 $\pm$ 0.5	479.0 $\pm$ 0.5	477.2 $\pm$ 0.5

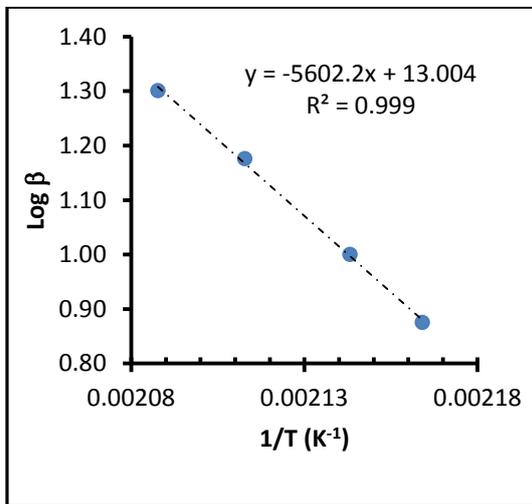
La Figura 7.37 muestra las gráficas del logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico con el agregado de cada uno de los antioxidantes. Los ajustes para las rectas son satisfactorios. Las rectas para el aceite con los orizanoles puros, con el concentrado de orizanoles y con el ácido ferúlico tienen pendientes similares. La recta para el aceite con  $\delta$ -tocoferol presentó la menor pendiente.



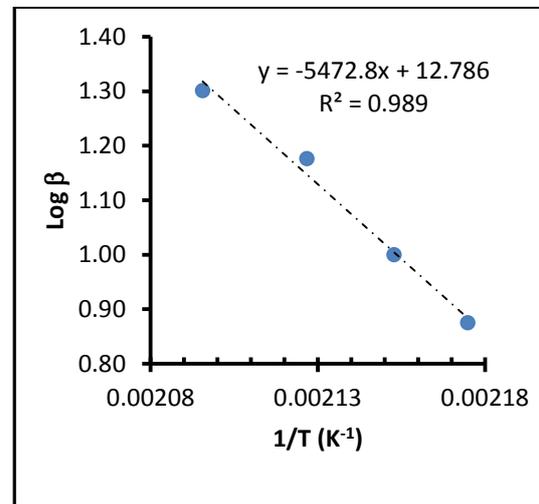
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 7.37.-** Logaritmo de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aceite de girasol de alto oleico purificado pero con el agregado de los siguientes antioxidantes: a)  $\delta$ -tocoferol, b) orizanoles puros, c) conc. orizanoles y d) ácido ferúlico.

La Tabla 7.26 muestra los valores para la energía de activación “aparente” y para el factor pre-exponencial para el aceite de girasol de alto oleico con los antioxidantes (de acuerdo con la Figura 7.37). El aceite con el agregado de  $\delta$ -tocoferol presentó la menor energía de activación. La energía de activación para el aceite con el agregado del concentrado de orizanoles BM es similar a la obtenida para los orizanoles puros y para el ácido ferúlico.

**Tabla 7.26.-** Energías de activación “aparente” y factor pre-exponencial “aparente” calculados para el aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes pero con agregado de cuatro antioxidantes diferentes ( $\delta$ -tocoferol, orizanoles puros, conc. de orizanoles BM y ácido ferúlico).

	<b>E'a (kJ/mol)</b>	<b>A' (min.<sup>-1</sup>)</b>
<b><math>\delta</math>-tocoferol</b>	81 $\pm$ 3	(4.6 $\pm$ 0.2) x10 <sup>8</sup>
<b>Orizanoles puros</b>	105 $\pm$ 4	(4.5 $\pm$ 0.2) x10 <sup>11</sup>
<b>Conc. orizanoles BM</b>	102 $\pm$ 4	(1.7 $\pm$ 0.1) x10 <sup>11</sup>
<b>Ácido ferúlico</b>	100 $\pm$ 4	(1.1 $\pm$ 0.1) x10 <sup>11</sup>

Las constantes de velocidad “aparentes” a 130 °C para el aceite de girasol de alto oleico se presentan en la Tabla 7.27. Los valores de la constante de velocidad “aparente” para el aceite con el concentrado de orizanoles BM, con los orizanoles puros y con el ácido ferúlico fueron similares. La constante de velocidad “aparente” para el aceite con BHT presentó una variación notoria cuando se consideró la primera inflexión y cuando se consideró la segunda inflexión; esto fue menos notorio en el caso del TBHQ. Por lo tanto, como ya

fue mencionado anteriormente es importante definir un criterio para determinar el OT y así poder comparar las constantes de velocidad “aparente” para los diferentes antioxidantes. De acuerdo con los criterios anteriormente planteados y considerando la primera inflexión para el aceite con BHT y con TBHQ, se encuentra que los valores de la constante de velocidad “aparente” variaron entre  $1.0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para el aceite con el concentrado de orizanoles BM y  $1.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para el aceite con  $\delta$ -tocoferol. Estos resultados muestran que a una temperatura de 130 °C el concentrado de orizanoles BM presentó el mejor comportamiento antioxidante.

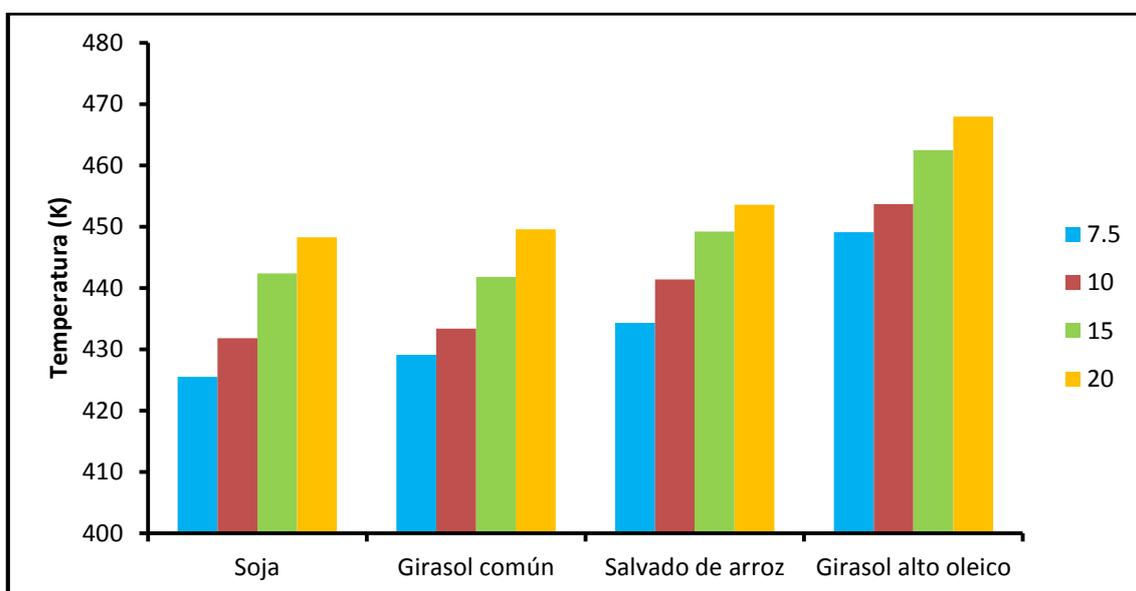
**Tabla 7.27.-** Constante de velocidad “aparente” a 130 °C para el aceite de girasol de alto oleico purificado (sin antioxidantes) pero con agregado de diferentes antioxidantes.

1.- considerando la primer inflexión / 2.- considerando la segunda inflexión.

	Constante de velocidad “aparente” ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>sin antioxidantes</b>	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-2}$
<b>BHT (1)</b>	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>BHT (2)</b>	$(6.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$
<b>TBHQ (1)</b>	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>TBHQ (2)</b>	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b><math>\delta</math>-tocoferol</b>	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>Orizanoles puros</b>	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>Conc. oriz. BM</b>	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>Ácido ferúlico</b>	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$

### 3.2.3. Comparación de los resultados para los diferentes aceites.

En la figura 7.38 se muestran los valores de OT para todos los aceites estudiados sin antioxidantes. El aceite de girasol de alto oleico es el menos insaturado de todos los estudiados; esto justifica que presente una mayor temperatura de oxidación (OT) para cada velocidad de calentamiento (Figura 7.38).



**Figura 7.38.-** Temperaturas de oxidación para diferentes velocidades de calentamiento para los aceites de soja, de girasol común, de salvado de arroz y de girasol de alto oleico, todos sin antioxidantes.

La Tabla 7.28 muestra los valores de las constantes de velocidad “aparente” para todos los aceites y antioxidantes ensayados.

**Tabla 7.28.-** Constante de velocidad “aparente” a 130 °C para los aceites purificados (sin antioxidantes) pero con agregado de diferentes antioxidantes.

Antioxidante	Constante de velocidad “aparente” (min. <sup>-1</sup> )			
	Soja	Girasol común	Salvado de arroz	Girasol de alto oleico
<b>Sin antioxidantes</b>	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(9.1 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-2}$
<b>Conc. oriz. BM</b>	$(7.7 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	-	-	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>Orizanoles puros</b>	$(7.9 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	-	-	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>Ácido ferúlico</b>	$(8.1 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	-	-	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>BHT</b>	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	-	-	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>TBHQ</b>	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	-	-	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
<b>δ-tocoferol</b>	$(5.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	-	-	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-2}$

Las constantes de velocidad “aparentes” para el aceite de soja con todos los antioxidantes, fueron superiores que las correspondientes al aceite de girasol de alto oleico. Las constantes de velocidad de oxidación para los aceites purificados (sin antioxidantes) relativas al aceite con el agregado de diferentes antioxidantes se muestran en la Tabla 7.29.

**Tabla 7.29.-** Constantes de la velocidad de oxidación relativas ( $k_{\text{sin antioxidante}}/k_{\text{con antioxidante}}$ ) para los aceites de soja y girasol de alto oleico purificados.

Antioxidante	Constante de velocidad relativa ( $k_{\text{sin antioxidante}}/k_{\text{con antioxidante}}$ )	
	Soja	Girasol de alto oleico
Sin antioxidantes	1	1
Conc. oriz. BM	2.3 ± 0.2	3.4 ± 0.3
Orizanoles puros	2.3 ± 0.2	3.1 ± 0.3
Ácido ferúlico	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2
BHT	4.0 ± 0.4	3.1 ± 0.2
TBHQ	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2
δ-tocoferol	3.4 ± 0.3	2.1 ± 0.2

Cuanto mayor sea la constante relativa, mejor protege el antioxidante. De la Tabla 7.29 se deduce que el BHT y el δ-tocoferol protegen más al aceite de soja que al aceite de girasol de alto oleico, mientras que el concentrado de orizanoles BM, los orizanoles puros y el ácido ferúlico tienen el efecto opuesto. La constante de velocidad relativa para el TBHQ no presentó una diferencia significativa entre ambos aceites y por lo tanto los protege de forma similar. El concentrado de orizanoles BM no protege más que los orizanoles puros, tanto al aceite de soja como al aceite de girasol de alto oleico. Ello no puede justificarse teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, que el

concentrado de orizanoles posee también una pequeña cantidad de tocotrienoles y tocoferoles, que pueden contribuir a su poder antioxidante.

#### 4. Conclusiones.

Kowalski, 1989 informa valores de energía de activación “aparente” determinados para la oxidación de diversos aceites con sus antioxidantes por calorimetría diferencial de barrido. Entre ellos se encuentran el aceite de soja y el aceite de girasol común ambos con antioxidantes y ellos presentaron energías de activación “aparente” de 67.4 y 84.6 kJ/mol respectivamente. Tan *et al.*, 2001 informó valores para la energía de activación “aparente” para un aceite de aceite de soja con sus antioxidantes. Dicho valor fue de  $80.4 \pm 2.4$  KJ/mol. Los datos encontrados durante esta tesis fueron  $73 \pm 4$  kJ/mol para el aceite de girasol común con agregado del concentrado de orizanoles BM y de  $68 \pm 3$  kJ/mol y  $76 \pm 4$  kJ/mol para el aceite de soja con agregado del concentrado de orizanoles BM y con delta tocoferol respectivamente, en una concentración molar de  $3 \times 10^{-3}$  M. Cabe destacar, que se desconoce el tipo de antioxidantes así como su concentración para los aceites utilizados por Kowalski. Los valores del factor preexponencial calculados por Kowalski, 1989 para estos aceites se encontraron entre  $2.8 \times 10^7$  y  $1.4 \times 10^{10}$  siendo del orden a los encontrados durante la tesis. Es posible concluir que los valores son del orden a los encontrados por otros investigadores.

El estudio de la oxidación de aceites por el método de calorimetría diferencial de barrido no isotérmico presentó también coincidencias con los

datos informados en bibliografía. Según Kowalski *et al.*, 1991 el aceite de soja presentó una energía de activación del orden de 62 kJ/mol siendo este valor similar al encontrado para el aceite de soja sin antioxidantes estudiado en la tesis ( $65 \pm 3$  kJ/mol). Para el aceite de girasol común el valor de energía de activación “aparente” encontrado por Kowalski fue de 64 kJ/mol un poco más bajo al encontrado en esta tesis  $72 \pm 3$  kJ/mol.

Mediante la calorimetría diferencial de barrido se puede estudiar la cinética de oxidación de un aceite utilizando pequeñas cantidades de muestra y sin requerir una preparación especial de ellas siendo los tiempos de análisis más cortos que en el caso del OSI y Rancimat (Tan *et al.*, 2001; Parduil *et al.*, 2011). Otra ventaja a destacar es que a través de estos métodos es posible estudiar la cinética de oxidación de los lípidos sin la utilización de reactivos químicos que puedan implicar ciertos riesgos para la salud.

Sin embargo, basándose en las variaciones encontradas de energía de activación y factor preexponencial “aparente” se concluye que para sacar conclusiones acerca del poder protector de un antioxidante se debe considerar la energía de activación y el factor pre-exponencial “aparentes” para de esa manera calcular la velocidad de oxidación “aparente”. Los métodos OSI y DSC-no isotérmico no arrojaron resultados coincidentes respecto a la evaluación de algunos antioxidantes, seguramente debido a las diferencias en ambas metodologías.

## 5. Bibliografía.

- Akiyama Y.; Hori K.; Takahashi T.; Yoshiki Y. Free Radical Scavenging Activities of  $\gamma$ -Oryzanol Constituents. *Food Sci. Technol. Res.* 11 (3): 295-297 (2005).
- Dunn R. O. Effect of Antioxidants on the Oxidative Stability of Methyl Soyate (biodiesel). *Fuel Proces. Technol.* (2005) 86: 1071– 1085.
- Höhne G. W. H.; Hemminger W. F.; Flammersheim H. J. Differential Scanning Calorimetry, Chapter 3, *Springer-Verlag*, Berlin, p. 33 (2003).
- Jiménez A.; Beltrán G. Aplicación de la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) en la Caracterización del Aceite de Oliva Virgen. *Grasas y Aceites* (2003) 54 (4): 403-409.
- Kasprzycka-Guttman T.; Odzeniak D. Thermoanalytical Investigation of Edible Oils. *Thermochim. Acta* (1992) 204 (2): 303-310.
- Kasprzycka-Guttman T.; Jaorsz-Jarszewska M.; Litwinienko G. Specific Heats and Kinetic Parameters of Thermo-Oxidative Decomposition of Peanut Oil. *Thermochim. Acta* (1995) 250: 197-205.
- Kowalski B. Determination of Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils by Pressure Differential Scanning Calorimetry. *Thermochim. Acta* (1989) 156: 347-358.
- Kowalski B. Thermal-Oxidative Decomposition of Edible Oils and Fats. DSC Studies. *Thermochim. Acta* (1991) 184: 49-57.
- Litwinienko G.; Daniluk A.; Kasprzycka-Guttman T. A Differential Scanning Calorimetry Study on the Oxidation of C12-C18 Saturated

- Fatty Acids and their Esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1999) 76 (6): 655-657.
- Litwinienko G.; Kasprzycka-Guttman T. A DSC Study on Thermo-oxidation Kinetics of Mustard Oil. *Thermochim. Acta* (1998) 319: 185-191.
  - Moser B. R. Comparative Oxidative Stability of Fatty Acid Alkyl Esters by Accelerated Methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2009) 86: 699–706.
  - Ozawa T. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. *Bull. Chem. Soc. Japan* (1965) 38 (11): 1881-1886.
  - Parduil J. J. R.; Souza L. K. C.; Molfetta F. A.; Zamian J. R.; Rocha Filho G. N.; da Costa C. N. F. Determination of the Oxidative Stability by DSC of Vegetable Oils from the Amazonian Area. *Bioresource Technology* (2011) 102: 5873-5877.
  - Polavka J.; Paligová J.; Cvengros J.; Simon P. Oxidation Stability of Methyl Esters Studied by Differential Thermal Analysis and Rancimat. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (2005) 82 (7): 519-524.
  - Rudnik E.; Szczucinska A.; Gwardiak H.; Szulc A.; Winiarska A. Comparative Study of Oxidative Stability of Linseed Oil. *Thermochim. Acta* (2000) 370 (1-2).135-140.
  - Shadidi F.; Wanasundara U. N. Measurements of Lipid Oxidation and Evaluation of Antioxidant Activity, in: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*, Chapter 24, AOCS Press, Champaign, Illinois, p. 379 (1997).
  - Simon P. Induction Periods Theory and Applications. *J. Therm. Anal. Calorimetry*, (2006) 84 (1): 263–270.

- Tan C. P.; Che Man Y. B.; Selamat J.; Yusoff M. S. A. Comparative Studies of Oxidative Stability of Edible Oils by Differential Scanning Calorimetry and Oxidative Stability Index Methods. *Food Chem.* (2002) 76 (3): 385-389.
- Tan C. P.; Che Man Y. B.; Selamat J.; Yusoff M. S. A. Application of Arrhenius Kinetics to Evaluate Oxidative Stability in Vegetable Oils by Isothermal Differential Scanning Calorimetry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2001) 78(11): 1133-1138.
- Thurgood J.; Ward R.; Martini S. Oxidation Kinetics of Soybean Oil/Anhydrous Milk Fat Blends: A differential Scanning Calorimetry Study. *Food Res. Int.* (2007) 40: 1030–1037.
- Ulkowski M.; Malgorzata M.; Litwinienko G. Use of Differential Scanning Calorimetry to Study Lipid Oxidation. 1. Oxidative Stability of Lecithin and Linolenic Acid. *J. Agric. Food Chem.* (2005) 53: 9073-9077.

# **Capítulo 8**

## **Eficiencia de los orizanoles en la protección de linoleato de metilo a temperatura moderada y estudio de los productos de oxidación**

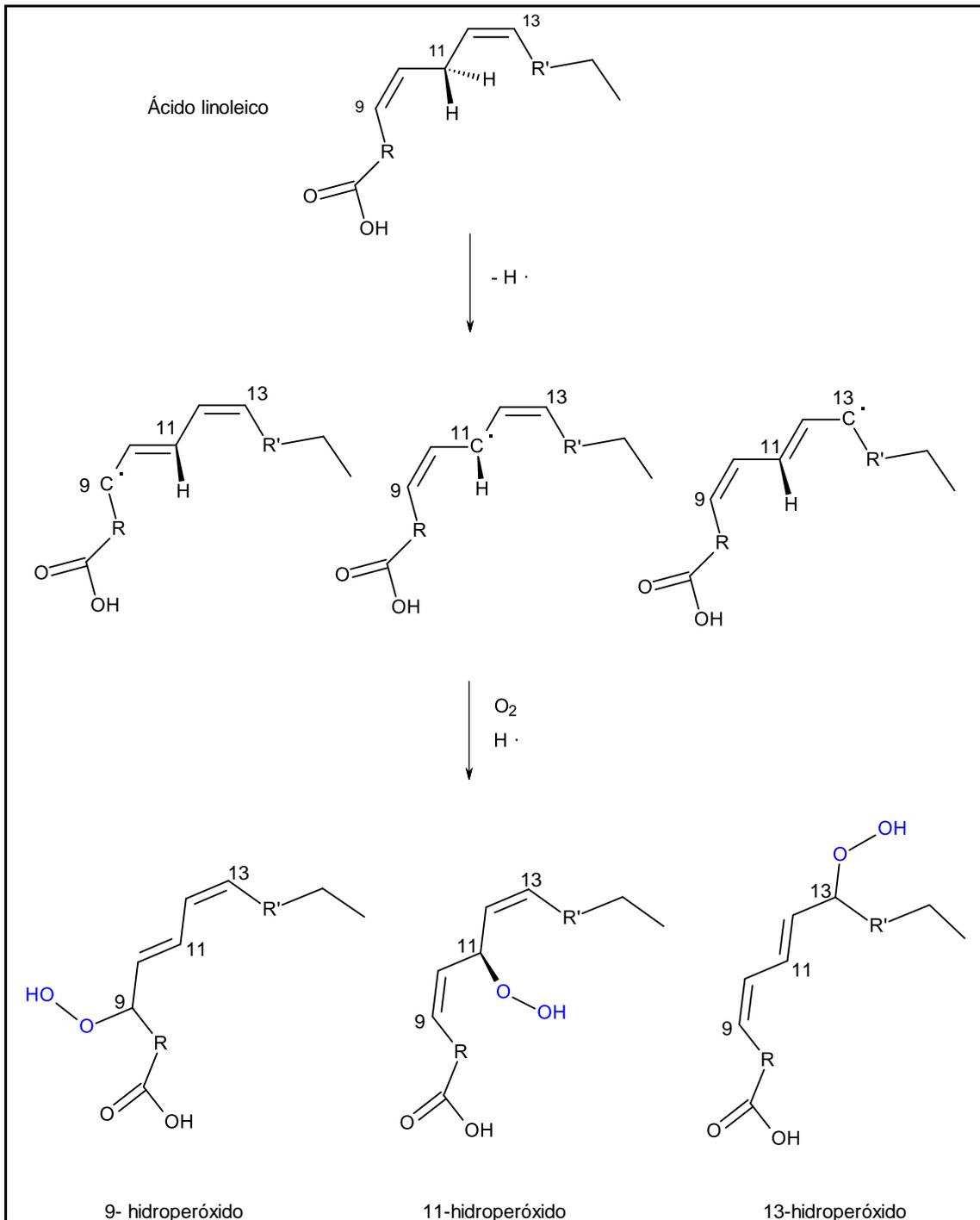
# Índice

- 1.- Introducción
- 2.- Materiales y métodos
  - 2.1.- Preparación de los ésteres metílicos
  - 2.2.-Oxidación de los ésteres metílicos
  - 2.3.-Análisis por HPLC
- 3.- Resultados y discusión
  - 3.1.- Velocidad de formación de hidroperóxidos
  - 3.2.- Composición de los hidroperóxidos formados
- 4.- Conclusiones
- 5.- Bibliografía

## 1. Introducción

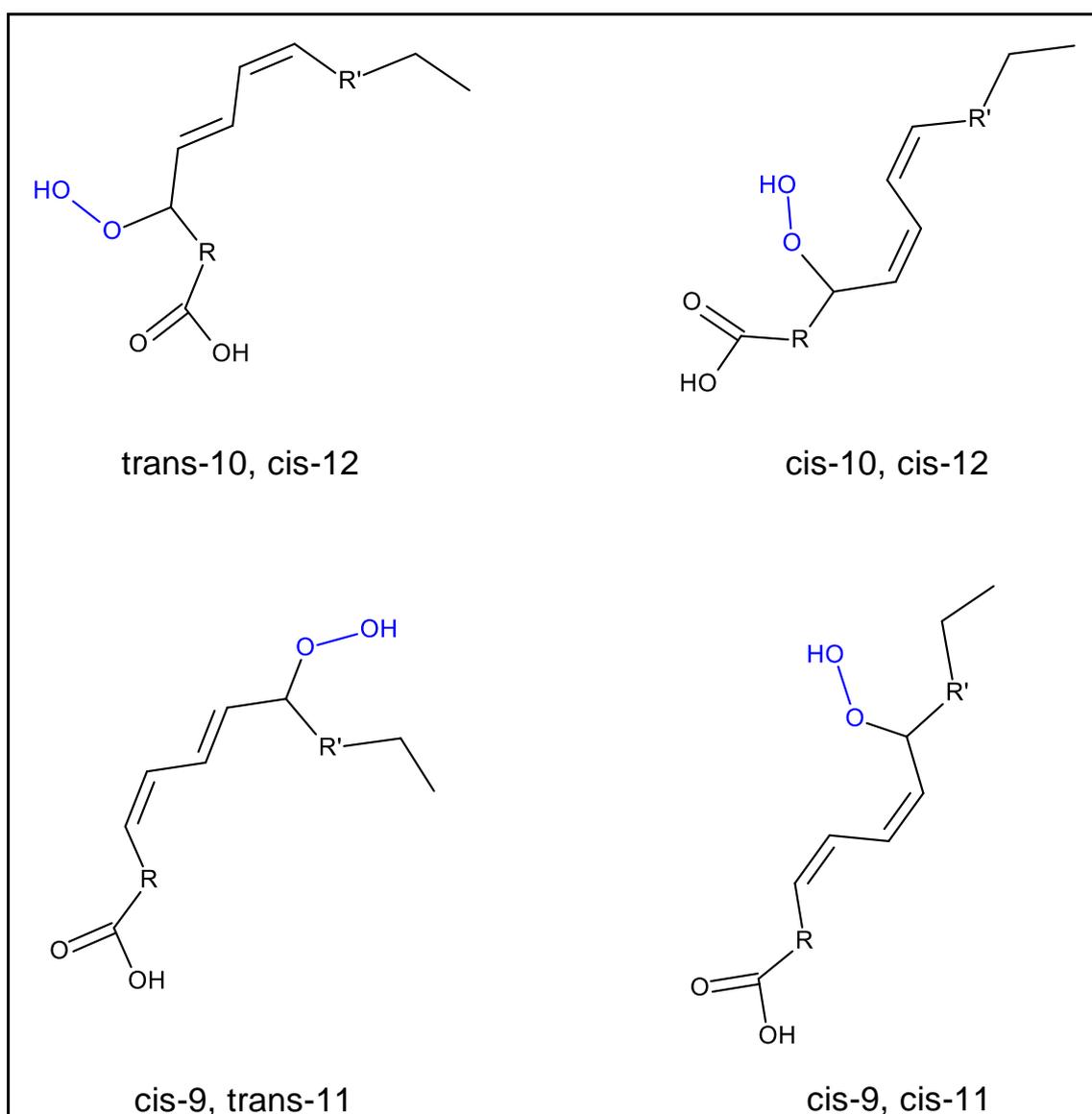
Resulta interesante estudiar la evolución de la composición de un sistema sometido a un proceso de enranciamiento oxidativo y comparar las variaciones que se producen en presencia de un antioxidante cuyo poder protector se desea analizar. Existen antecedentes relativos al seguimiento de la concentración de productos de oxidación primaria (hidroperóxidos del ácido linoleico) en función del tiempo de oxidación. Xu *et al.* (2001) estudiaron la oxidación del ácido linoleico de pureza elevada a 37 °C sometido a una atmósfera de oxígeno en presencia de orizanoles, ácido ferúlico y  $\alpha$ -tocoferol. En trabajos similares se estudió la formación de hidroperóxidos a partir de los ésteres metílicos del ácido linoleico (Chan *et al.*, 1976; Brash, 2000; Mäkinen *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2010).

En el caso del ácido linoleico existen tres carbonos con mayor probabilidad de generar hidroperóxidos, estos son los ubicados en las posiciones 9, 11 y 13 (Figura 8.1). El estudio de los productos formados a partir del ácido linoleico mostró que predominan los hidroperóxidos en las posiciones 9 y 13 mientras que el hidroperóxido en la posición 11 no se forma en cantidad apreciable (Bergström, 1945; Bergström *et al.*, 1950). Ello se debe a que la formación del doble enlace conjugado le confiere al radical libre una mayor estabilidad termodinámica y, por ende, los radicales libres disponibles para la posterior reacción con el oxígeno y con el radical libre hidrógeno se encontrarán ubicados en el carbono 9 y en el carbono 13 de la molécula de ácido linoleico (Bascetta *et al.*, 1983; Brash, 2000).



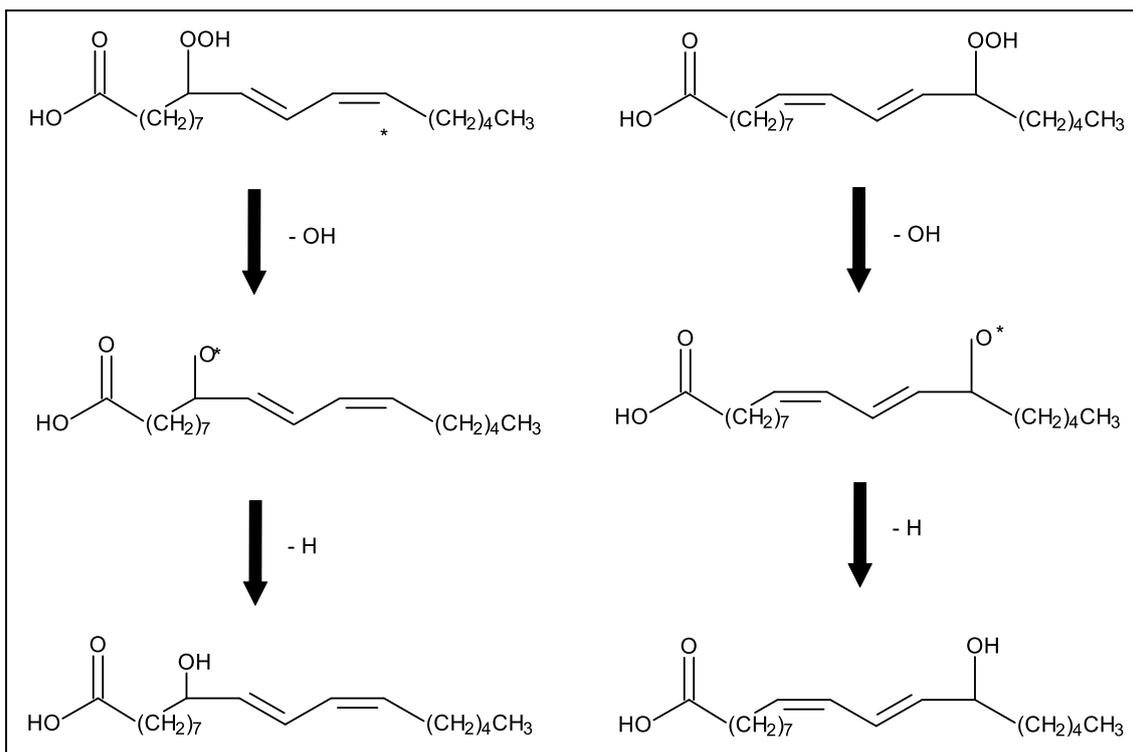
**Figura 8.1.-** Reacción del ácido linoleico con el oxígeno molecular para formar el 9, el 11 y el 13-hidroperóxido.

El 9 y el 13-hidroperóxido del ácido linoleico presentan isomería geométrica, por lo que se pueden formar los isómeros *cis* y *trans* en cada una de esas posiciones. Ello se explica porque al formarse dobles enlaces conjugados, debido a su resonancia la cadena hidrocarbonada puede ubicarse en posición *cis* o *trans* respecto al otro extremo hidrocarbonado (Figura 8.2).



**Figura 8.2.-** Isómeros geométricos de los hidroperóxidos del ácido linoleico.

Mäkinen y *et al.* (2000) y Morales *et al.* (2010) describieron la formación e identificación de los cuatro isómeros de los hidroperóxidos del ácido linoleico: el ácido 13-hidroperóxido cis-9 trans-11 octadecenoico, el ácido 13-hidroperóxido trans-9 trans-11 octadecenoico, el ácido 9 hidroperóxido cis-10 trans-12 octadecenoico y el ácido 9 hidroperóxido trans-10 trans-12 octadecenoico. Estos compuestos fueron separados mediante cromatografía líquida de alta resolución en columna de sílice y detectados mediante análisis por HPLC equipado con detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 234 nm. Estos autores identificaron también (a 234 nm) otros productos de oxidación, como los hidroxiperóxidos del ácido linoleico (Figura 8.3). Cuando se alcanza un estado de oxidación superior es posible determinar, mediante esta técnica, algunos compuestos de oxidación secundaria derivados del ácido linoleico como los cetodienos provenientes de los hidroperóxidos anteriormente mencionados, los que se identificaron a una longitud de onda de 268 nm. Es posible estudiar la formación de los hidroxiperóxidos tanto sobre ácido linoleico (Gardner *et al.*, 1972; Xu *et al.*, 2001; Fukushige *et al.*, 2005) como sobre los ésteres metílicos de dicho ácido (Chan *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 1999; Brash, 2000; Mäkinen *et al.*, 2000; Pajunen *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010). El aceite de girasol común contiene aproximadamente un 60 % de ácido linoleico, además de ser un material graso de bajo costo y fácil acceso. Por eso se suele utilizar para este tipo de estudio.



**Figura 8.3.-** Formación del 9· y del 13· hidroxiperóxido del ácido linoleico a partir de los correspondientes hidroperóxidos.

En este capítulo se estudió la evolución del contenido de hidroperóxidos en una muestra de ésteres metílicos obtenida por derivatización del aceite de girasol común comercial (SFOME), el cual fue previamente purificado para eliminar la presencia de antioxidantes. Se optó por trabajar con ésteres metílicos ya que ensayos previos realizados con ácidos grasos no mostraron resultados satisfactorios.

Para ello se puso a punto el método analítico mediante HPLC a los efectos de no solamente determinar el incremento total de hidroperóxidos del linoleato de metilo, sino también de diferenciar los diferentes hidroperóxidos formados.

Luego se compararon los resultados con los obtenidos en idénticas condiciones pero con el agregado de orizanoles. Esto permitirá obtener más información con respecto a la actividad antioxidante de estos compuestos, mediante un procedimiento diferente a los utilizados en los capítulos precedentes, que involucra el análisis de los productos formados durante la oxidación de una muestra lipídica y el efecto de la presencia de los orizanoles en la misma. Entre este procedimiento y los anteriores existen algunas diferencias que deben considerarse: se estudiarán ésteres metílicos en lugar de triacilgliceroles y la oxidación se realizará a temperaturas moderadas (50 °C) en lugar de las altas temperaturas propias de los métodos de enranciamiento acelerado. Esto resulta particularmente interesante ya que es conocido que los estudios de enranciamiento acelerado utilizados en capítulos previos requieren la utilización de temperaturas muy elevadas, lo que suele inducir mecanismos de oxidación diferentes a los que ocurren a temperaturas moderadas más próximas a temperatura ambiente.

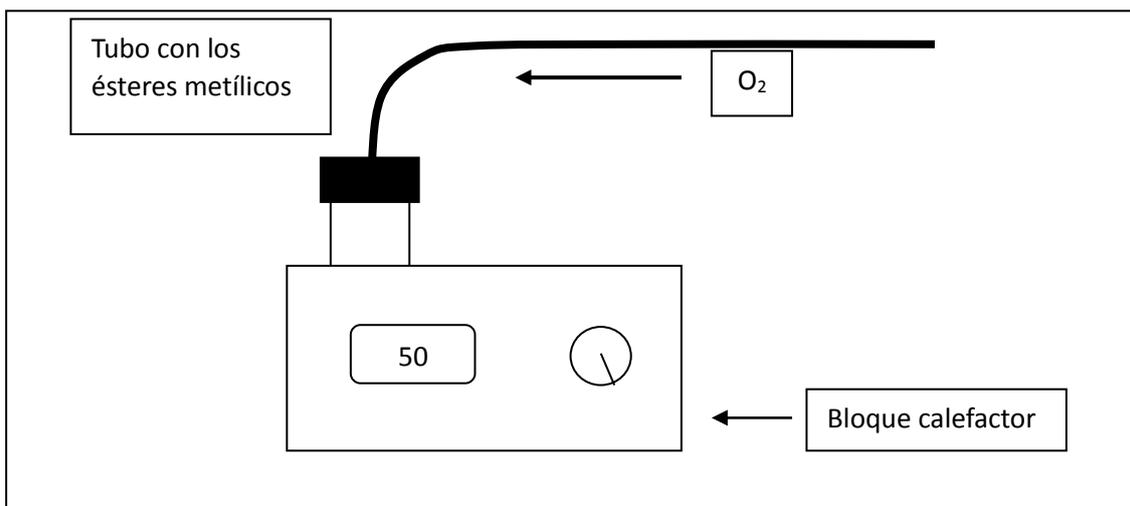
## **2. Materiales y métodos.**

### **2.1. Preparación de los ésteres metílicos.**

Se utilizó un aceite de girasol común refinado comercial (COUSA, Camino al Paso de la Arena 2460) el cual se purificó en columna de alúmina (Morales *et al.*, 2010), como ya se describió en el Capítulo 6.

Se colocaron 2 gramos de aceite purificado sin antioxidantes en un tubo con tapa de rosca y se adicionó 12.5 mL de solución de KOH 2N en metanol. Se agitó la solución durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se adicionó 5 mL de éter de petróleo y se agitó durante aproximadamente 1 minuto. La separación de fases se realizó centrifugando a 3000 rpm. Se pasó la capa orgánica a un segundo tubo y se lavó con 5 mL de agua destilada, lavado que se repitió tres veces y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el solvente con corriente de nitrógeno hasta peso constante. Los SFOME se almacenaron hasta su uso bajo atmósfera de nitrógeno, a temperatura de freezer (-20 °C) y protegidos de la luz.

## 2.2. Oxidación de los ésteres metílicos



**Figura 8.4.-** Esquema del sistema utilizado para estudiar la oxidación de los ésteres metílicos.

La oxidación de los SFOME se realizó en el equipo esquematizado en la Figura 8.4. El mismo consiste en un tubo de ensayo con tapa de rosca, provisto de un tubo capilar (0.25 mm de diámetro interno x 400 cm de largo) para el suministro de O<sub>2</sub> y de un bloque calefactor para el control de su temperatura.

Una vez termostatzado el bloque calefactor a 50 °C, se colocó en el mismo el tubo de ensayo conteniendo 1.5 g de muestra de SFOME y se aplicó a través del capilar un flujo de oxígeno de 6 mL/min (el que se mantuvo constante mediante la regulación de la presión a la entrada del capilar en 2 Kg/cm<sup>2</sup>. El capilar se prolongó hasta la base del tubo de manera que el flujo gaseoso burbujeó a través de la muestra lipídica. A determinados intervalos de tiempo se retiró una pequeña porción de muestra (aproximadamente 7 mg), sobre la que se adicionó 1 mL de hexano y se destinó al análisis por HPLC de los hidroperóxidos del linoleato de metilo.

Alternativamente se ensayó este procedimiento con los SFOME aditivados con antioxidantes a una concentración 3x10<sup>-3</sup> M (BHT, orizanoles puros y el concentrado de orizanoles BM). Para la adición de los antioxidantes se procedió de la misma manera que se describió en el Capítulo 6.

### **2.3. Análisis por HPLC**

El análisis por HPLC se realizó según el método informado por Morales *et al.* (2010). Se utilizó el cromatógrafo ya mencionado en el Capítulo 2, equipado con una columna Lichrospher-Si de 25 cm de largo, de 4.6 mm de sección y un tamaño de partícula de 5 µm. La temperatura del horno se ajustó

a 40 °C y se aplicó el programa de solventes descrito en la Tabla 8.1, a un flujo de 1 mL/min.

**Tabla 8.1.-** Programa de solventes utilizado para la determinación de los hidroperóxidos del linoleato de metilo por HPLC.

Tiempo (min)	Hexano	Dietileter
0	82	18
15	82	18
15.5	50	50
18	50	50
18.5	82	18
24	82	18

Los cromatogramas se registraron a una longitud de onda de 232 nm y 268 nm para determinar los compuestos de oxidación primaria y secundaria del éster metílico del ácido linoleico. Se identificó los picos correspondientes a cada uno de los hidroperóxidos del ácido linoleico y se determinó las áreas correspondientes.

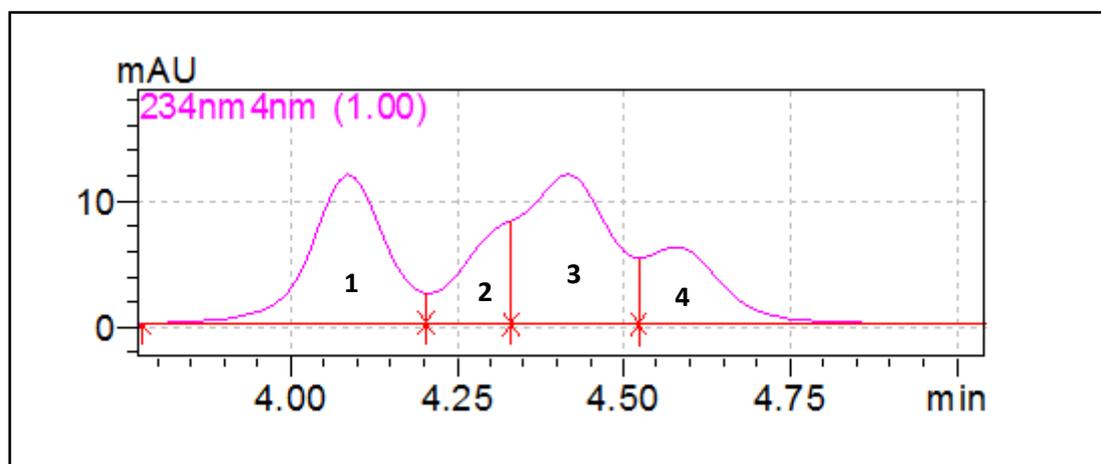
El proceso de oxidación se desarrolla en forma similar a lo descrito anteriormente en los Capítulos 6 y 7, por lo que se inicia con una cinética relativamente lenta hasta que se alcanza cierto grado de avance a partir del cual la cinética se acelera. Por lo tanto, la variación del área correspondiente a

los picos de los compuestos de interés en función del tiempo permite comparar la cinética del proceso de oxidación en diferentes condiciones (sin la adición de antioxidantes o con la presencia de antioxidantes de diferente naturaleza).

### 3. Resultados y discusión.

#### 3.1. Velocidad de formación de hidroperóxidos.

La Figura 8.5 muestra un cromatograma a 234 nm para los ésteres metílicos del aceite de girasol común (SFOME) purificado, sin oxidar.



**Figura 8.5.-** Cromatograma a 234 nm para la muestra sin oxidar de SFOME purificado.

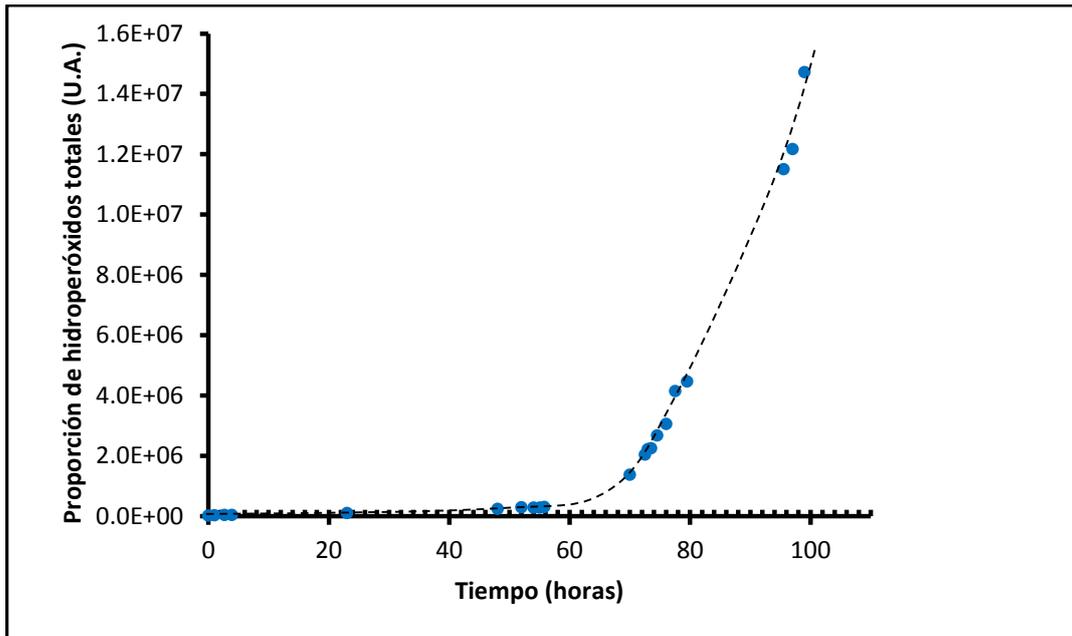
Mäkinen *et al.* (2000) y Morales *et al.* (2010) identificaron los cuatro picos que aparecen en este cromatograma: el pico 1 corresponde al 13-

hidroperóxido cis-9 trans-11 octadecenoato de metilo (13H cis-9 trans-11), el pico 2 corresponde al 13-hidroperóxido trans-9 trans-11 octadecenoato de metilo (13H trans-9 trans-11), pico 3 corresponde al 9-hidroperóxido cis-10 trans-12 octadecenoato (9H cis-10 trans-12) de metilo y el pico 4 corresponde al 9-hidroperóxido trans-10 trans-12 octadecenoato de metilo (9H trans-10 trans-12). El cromatograma de la Figura 8.5 indica que, pese a que el aceite utilizado para la obtención de los ésteres metílicos fue un aceite refinado (por lo tanto desodorizado) y fue manipulado a temperaturas moderadas y bajo atmósfera de nitrógeno, el mismo contenía una pequeña cantidad de compuestos de oxidación antes de ser utilizado para el análisis.

La Figura 8.6 muestra la evolución de la proporción de hidroperóxidos totales en los ésteres durante el transcurso de la oxidación a 50 °C de los SFOME sin antioxidantes. El eje de las ordenadas se indica en “unidades arbitrarias” (UA), ya que los valores se determinaron como al área total (suma de las áreas de los cuatro hidroperóxidos mencionados) “normalizada” respecto a la concentración de ésteres metílicos (g/mL) en la muestra analizada. Esta normalización permite comparar los resultados obtenidos de diferentes análisis.

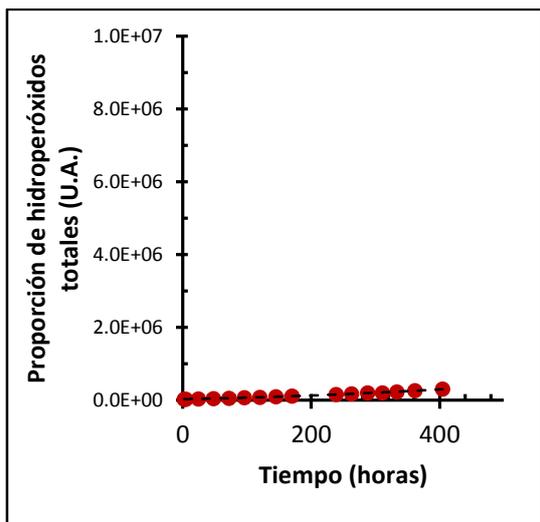
Como se mencionó, la evolución de la concentración de hidroperóxidos presentó un comportamiento análogo al proceso estudiado por los métodos de enranciamiento acelerado vistos en capítulos anteriores.

En forma análoga al análisis de los resultados de enranciamiento acelerado, a partir del gráfico de la Figura 8.6 es posible determinar un tiempo de inducción de la oxidación, correspondiente al corte de las pendientes entre la etapa inicial y la etapa final. El valor del tiempo de inducción para los SFOME purificado fue de 64 minutos.

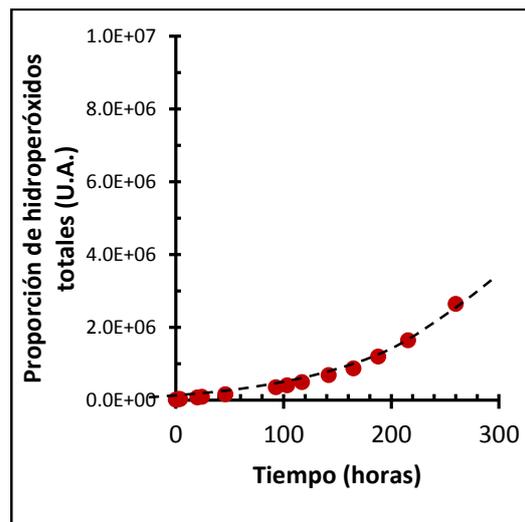


**Figura 8.6.-** Proporción de hidroperóxidos totales en los SFOME sometidos a oxidación en corriente de oxígeno a 50 °C (U.A.: unidades arbitrarias).

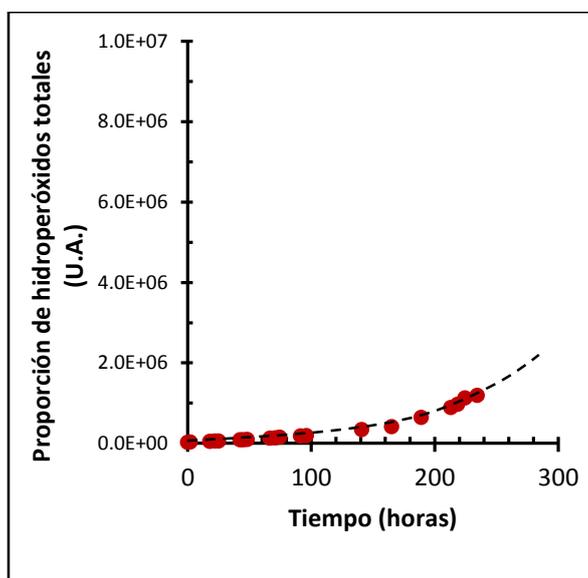
La Figura 8.7 muestra las curvas, construidas de la manera descrita para la figura anterior, correspondientes a la oxidación de los SFOME aditivados con BHT, orizanoles puros o concentrado de orizanoles BM.



(a)



(b)



(c)

**Figura 8.7.-** Proporción de hidroperóxidos totales en los SFOME aditivado con diferentes antioxidantes durante la oxidación en corriente de oxígeno a 50 °C: a) BHT, b) orizanoles puros y c) concentrado de orizanoles BM, todos en concentración  $3 \times 10^{-3}$  M (U.A.: unidades arbitrarias).

Los SFOME con agregado de BHT presentaron un leve aumento del contenido de hidroperóxidos en función del tiempo, sin que fuera posible determinarse un período de inducción, como ocurrió con la muestra sin antioxidantes. Esto indica que el grado de avance de la oxidación no fue suficiente para alcanzar la etapa de aceleración en la formación de los hidroperóxidos. Para los SFOME sin antioxidantes (Figura 8.6) se encontró una proporción de hidroperóxidos de  $2 \times 10^6$  U.A. inmediatamente después del período de inducción, mientras que en el caso de los SFOME aditivados con BHT a una concentración  $3 \times 10^{-3}$  (Figura 8.7a) nunca alcanzan dicha proporción.

Las curvas correspondientes a los SFOME aditivados con orizanoles puros o con el concentrado de orizanoles BM (Figuras 8.7 b y c, respectivamente), mostraron un incremento más importante en la proporción de hidroperóxidos que el caso de la muestra con BHT. Pero pese a que la oxidación se prolongó por casi 250 h, no se observó un aumento importante en la velocidad de formación de hidroperóxidos que permita la determinación de un período de inducción.

En la Figura 8.8 se muestran en el mismo par de ejes las curvas para los SFOME sin antioxidantes y con agregado de antioxidantes. De las mismas se observa que para alcanzar una proporción de hidroperóxidos de  $1.2 \times 10^6$  U.A. (marcado con una flecha en la Figura 8.8) se necesitó un tiempo de 60, 188 y 235 h en el caso del SFOME sin antioxidantes, aditivado con orizanoles puros y aditivado con el concentrado BM, respectivamente. Mientras que dicho nivel de hidroperóxidos no se alcanzó con el BHT después de 230 h de oxidación.

Estos resultados indican que efectivamente todos los antioxidantes protegieron a los SFOME en las condiciones del análisis y que el BHT fue el que presentó el efecto más potente.

También se observa que el concentrado de orizanoles BM protegió a los SFOME con más eficiencia que los orizanoles puros, lo que, al igual que se comentó en capítulos anteriores, puede vincularse con su contenido de una pequeña proporción de tocoferoles y tocotrienoles en el mismo.

La mayor eficiencia del BHT también coincide con lo observado a partir de los métodos de enranciamiento acelerado en capítulos precedentes, si bien es necesario tener en cuenta que dichos métodos se realizan en diferentes condiciones.

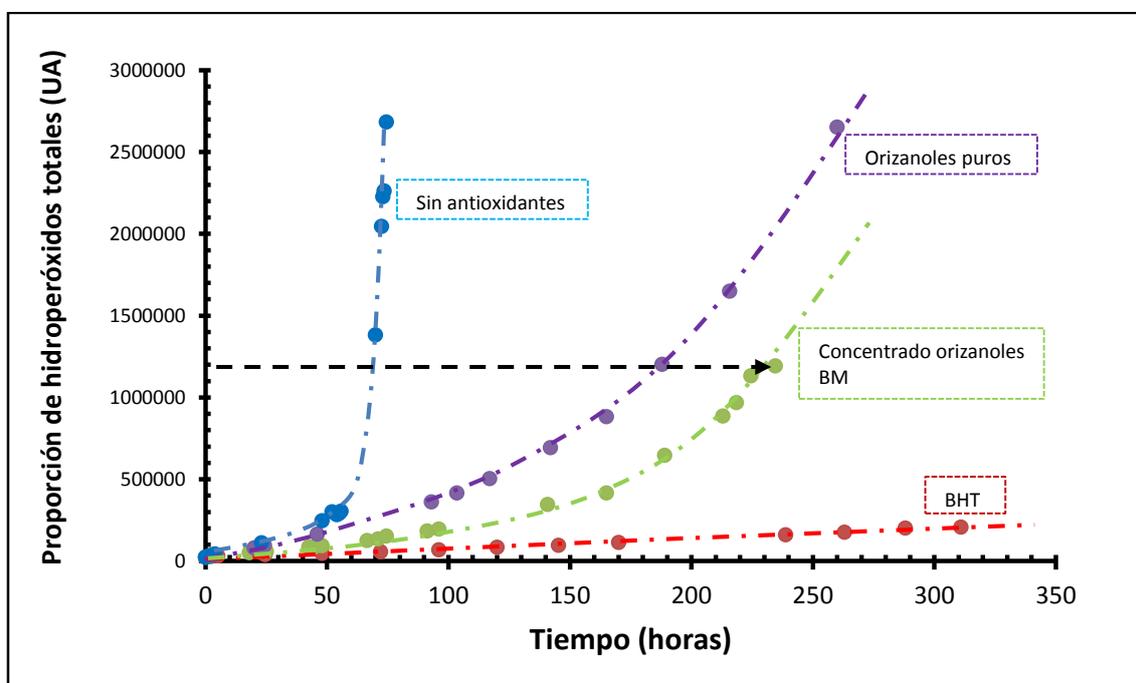


Figura 8.8.- Curvas de las Figuras 8.6 y 8.7 mostradas en un mismo par de ejes.

### 3.2.- Composición de los hidroperóxidos formados.

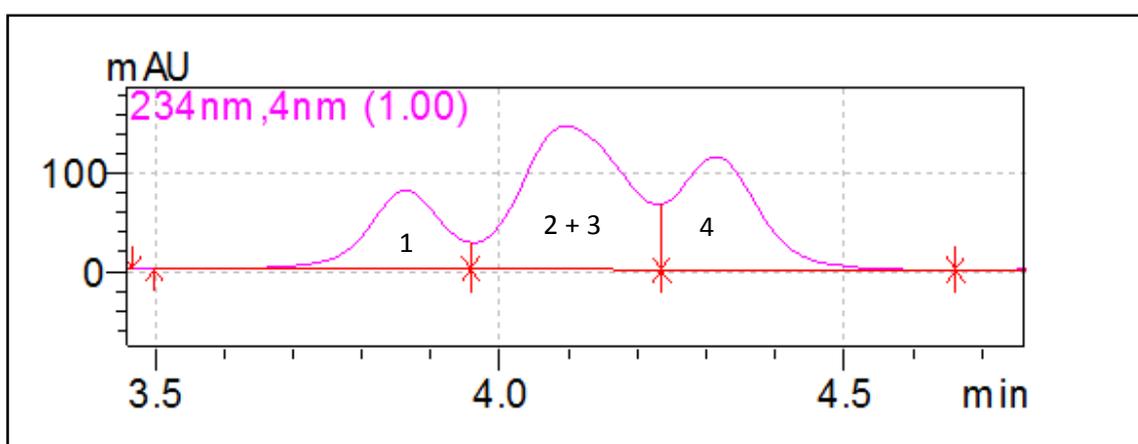
Comparando los resultados obtenidos con lo informado por otros investigadores fue posible identificar cada uno de los cuatro hidroperóxidos del linoleato de metilo (Mäkinen y *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2010), como se mostró en la Figura 8.2. La correspondencia de cada hidroperóxido con cada uno de los picos se presenta en la tabla 8.3. A los efectos de simplificar el nombre de los hidroperóxidos, se agregó una columna con una nomenclatura abreviada. En la discusión de los resultados se mencionará a los diferentes hidroperóxidos de acuerdo a esto.

**Tabla 8.3.-** Identificación de los cuatro picos del cromatograma correspondiente al análisis por HPLC de los hidroperóxidos formados en la oxidación del linoleato de metilo (Figura 8.5)

Pico	Hidroperóxido	Nombre abreviado
1	Metil 13-hidroperóxido 9-cis 11-trans octadecenoato	13H 9-cis 11-trans
2	Metil 13-hidroperóxido 9-trans 11-trans octadecenoato	13H 9-trans 11-trans
3	Metil 9-hidroperóxido 10-cis 12-trans octadecenoato	9H 10-cis 12-trans
4	Metil 9-hidroperóxido 10-trans 12-trans octadecenoato	9H 10-trans 12-trans

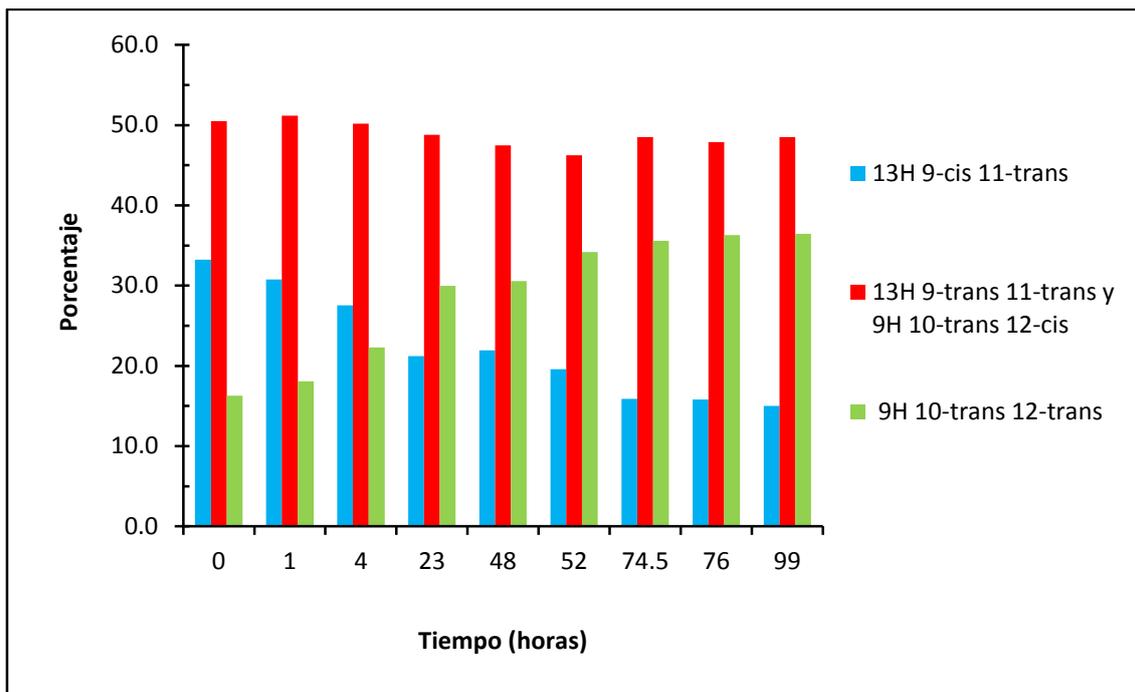
La Figura 8.9 muestra el cromatograma correspondiente al análisis de la muestra de SFOME sin antioxidantes luego de oxidación. Se observa que los picos correspondientes al 13H 9-trans 11-trans (pico 2) y al 9H 10-cis 12-trans

(pico 3) se solaparon dificultando la cuantificación por separado de cada uno. Este fenómeno ocurrió con frecuencia, por lo que en adelante se considerará el área total correspondiente a la suma de ambos picos.



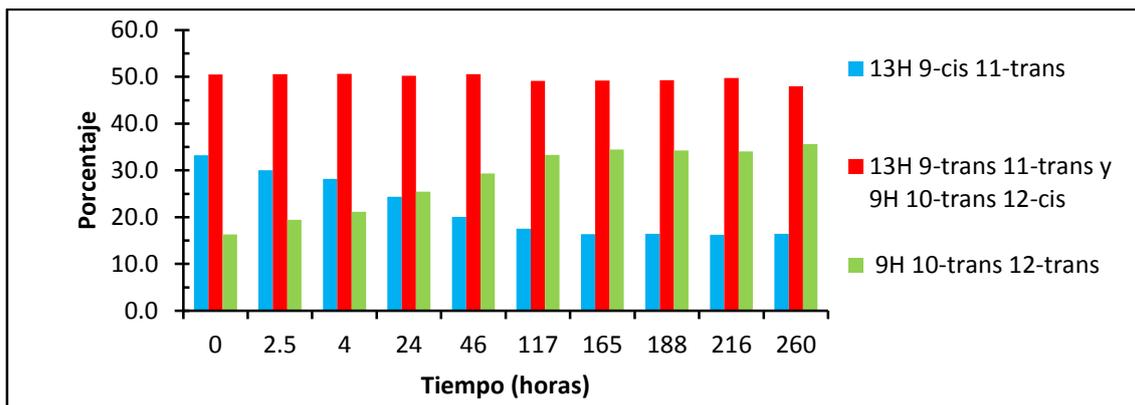
**Figura 8.9.-** Cromatograma correspondiente al análisis de los SFOME sin antioxidantes, luego de 55 h de oxidación a 50°C bajo corriente de O<sub>2</sub>.

En la Figura 8.10 se muestra el porcentaje de cada hidroperóxido (calculado como el porcentaje del área del pico correspondiente respecto a la suma de áreas de los cuatro picos) durante la oxidación del SFOME sin antioxidantes en función del tiempo de oxidación a 50 °C. Al inicio de la oxidación el porcentaje de 13H 9-trans 11-trans sumado al 9H 10-cis 12-trans es mayoritario, seguido por el del 13H 9-cis 11-trans y luego, por el del 9H 10-trans 12-trans.

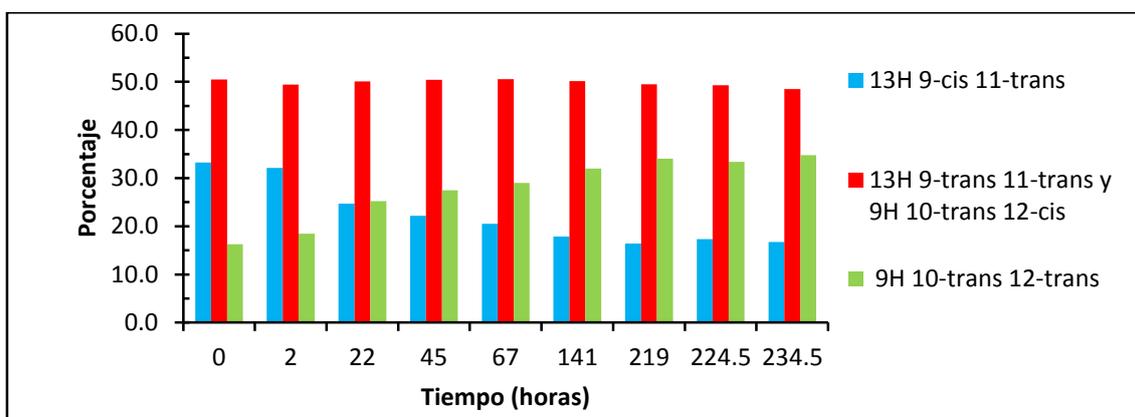


**Figura 8.10.-** Variación del porcentaje de cada hidroperóxido durante la oxidación de los SFOME sin adición de antioxidantes.

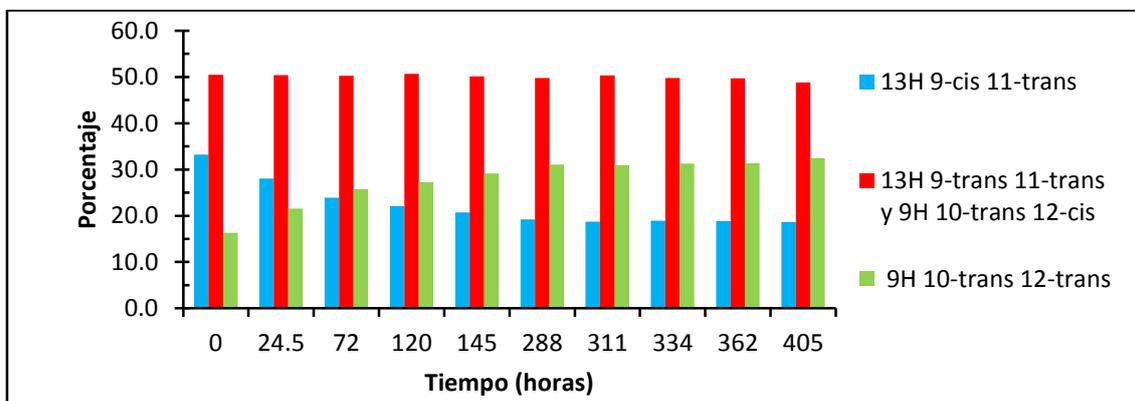
La suma de los porcentajes del 13H 9-trans 11-trans y del 9H 10-trans 12-trans se mantuvo entre el 46 y el 51 % a lo largo de todo el período de oxidación estudiado. El contenido porcentual del 9H trans-10 trans-12 presentó un aumento continuo desde 16 a 37 %, a expensas de la disminución gradual y continua del 13H cis-9 trans-11 disminuyó de manera continua, desde 33 a 15 %, si bien luego de 74,5 h de oxidación no cambió significativamente.



(a)



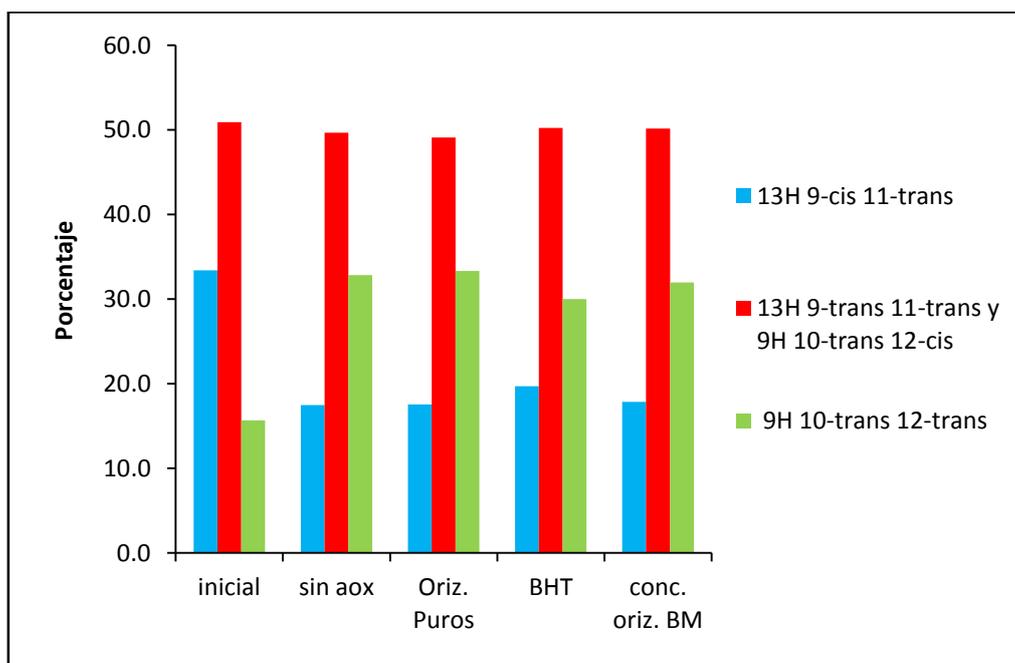
(b)



(c)

**Figura 8.11.-** Variación del porcentaje de cada hidroperóxido durante la oxidación de los SFOME aditivados con: a) orzanols puros, b) concentrado de orzanols BM y c) BHT.

En la Figura 8.11 se presenta el mismo análisis para los casos en que la oxidación se realizó sobre los SFOME conteniendo los diferentes antioxidantes. El comportamiento fue similar al caso sin antioxidantes: el 9H trans-10 trans-12 aumenta hasta llegar a un máximo y el 13H cis-9 trans-11 disminuye hasta alcanzar un valor mínimo, a partir de los cuales permanecen constantes. Los tiempos correspondientes a dichos máximos y mínimos fueron de 117 horas, 141 horas y 288 horas para los orizanoles puros, para el concentrado de orizanoles BM y para el BHT, respectivamente.



**Figura 8.12.-** Porcentaje de los hidroperóxidos iniciales y de cada hidroperóxido formados a partir de los SFOME común para el mismo grado de avance de la oxidación.

En la Figura 8.12 se comparan los contenidos porcentuales de los diferentes hidroperóxidos de los SFOME común sin oxidar (inicial) y oxidados

(con y sin antioxidantes) para un tiempo de oxidación al cual se alcanzó una concentración total de hidroperóxidos (expresada como área total de hidroperóxidos vs. concentración) similar. En la muestra inicial, el contenido porcentual del 13H trans-9 trans-11 y del 9H 10-trans 12-cis no cambió luego de un cierto tiempo de oxidación, tanto en los ésteres metílicos sin antioxidantes como con agregado de antioxidantes. Sin embargo, el 13H 9-cis 11-trans disminuyó a la mitad en relación al valor inicial y el 9H 10-trans 12-trans aumentó al doble. Ello refleja que el mecanismo de oxidación favorece la formación del 9H 10-trans 12-trans respecto al 13H 9-cis 11-trans. Por otra parte, se observó que los ésteres metílicos sin antioxidantes presentan una variación similar en el contenido porcentual de los hidroperóxidos que los ésteres metílicos con el agregado de antioxidantes. Esto indica que el mecanismo por el cual transcurre la oxidación no varía demasiado con o sin agregado de antioxidantes.

#### **4. Conclusiones.**

Los resultados obtenidos muestran que a 50 °C el proceso de oxidación de los SFOME con agregado de antioxidantes es relativamente lento ya que no se pudo lograr un aumento importante en la formación de hidroperóxidos. Sin embargo, a lo largo del período de oxidación fue posible observar un incremento sostenido de los compuestos de oxidación que en algunos casos permitió calcular un período de inducción “aparente” que permitió la comparación entre los ésteres metílicos sin antioxidantes y con agregado de

ellos. Este método puede ser útil para la comparación de la eficiencia de los antioxidantes en la oxidación de aquellos aceites que contengan un cierto contenido de ácido linoleico aunque se debe tener en cuenta que se requiere un tiempo elevado para lograr avances importantes en la oxidación, cuando a los ésteres metílicos se les agrega algunos antioxidantes. Debe tenerse en cuenta que dicho estudio involucra los ésteres metílicos y no el propio aceite.

Al igual a lo encontrado con los métodos de enranciamiento acelerado, calorimetría diferencial de barrido y OSI, el concentrado de orizanoles BM presentó un poder antioxidante levemente superior a los orizanoles puros. Si bien la matriz lipídica y las condiciones de oxidación fueron diferentes a las utilizadas en los capítulos 6 y 7, el poder antioxidante del concentrado de orizanoles BM presentó el mismo comportamiento. Los resultados obtenidos para el BHT respecto a los orizanoles respecto al poder antioxidante también fueron concordantes con los encontrados en los capítulos anteriores.

En conclusión, estos resultados confirman que el poder antioxidante de los orizanoles es relativamente bajo respecto al BHT pero similar a los orizanoles puros cuando se lo somete a oxidación a baja temperatura.

## **5. Bibliografía.**

- Bascetta E.; Gunstone F.D.; Walton J. C. An electron spin resonance study of fatty acids and esters. Part 1. Hydrogen abstraction from olefinic and acetylenic long-chain esters. *J. Chem. Soc.* (1983) Perkin Trans. II: 603-613.

- Brash A. R. Autoxidation of Methyl Linoleate: Identification of the Bis-allylic 11-hydroperoxide. *Lipids* (2000) 35(9): 947-952.
- Bergström S. Autoxidation of Linoleic Acid, *Nature* (1945)156: 717–718.
- Bergström S.; Blomstrand R.; Laurell S. On the Autoxidation of Linoleic Acid in Aqueous Colloidal Solution, *Acta Chem. Scand.* (1950) 4: 245–250.
- Chan H. W. S.; Gordon L. Autoxidation of Methyl Linoleate. Separation and Analysis of Isomeric Mixtures of Methyl Linoleate Hydroperoxides and Methyl Hydroxylinoleates. *Lipids* (1976) 12(1): 99-104.
- Fukushige H.; Wang C.; Simpson T. D.; Gardner H. W.; Hildebrand D. F. Purification and Identification of Linoleic Acid Hydroperoxides Generated by Soybean Seed Lipoxygenases 2 and 3. *J. Agric. Food Chem.* (2005) 53: 5691-5694.
- Gardner H. W.; Weisleder D. Hydroperoxides from Oxidation of Linoleic and Linolenic Acids by Soybean Lipoxygenase: Proof of the trans-11 Double Bond. *Lipids* (1972) 7(3): 191-193.
- Mäkinen Marjukka E.; Hopia Anu I. Effects of  $\alpha$ -Tocopherol and Ascorbyl Palmitate on the Isomerization and Decomposition of Methyl Linoleate Hydroperoxides. *Lipids* (2000) 35 (11): 1215-1223.
- Morales A.; Dobarganes C.; Marquez Ruiz G.; Velazco J. Quantitation of Hydroperoxy-, Keto- and Hydroxy-Dienes During Oxidation of FAMES from High-Linoleic and High-Oleic Sunflower Oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (2010) 87: 1271-1279.
- Pajunen T. I.; Johansson M. P.; Hase T.; Hopia A. Autoxidation of Conjugated Linoleic Acid Methyl Ester in the Presence of  $\alpha$ -Tocopherol: The Hydroperoxide Pathway. *Lipids* (2008) 43: 599–610.

- Wang X. H.; Ohshima T.; Ushio H.; Koizumi Ch. Proportion of Geometrical Hydroperoxide Isomers Generated by Radical Oxidation of Methyl Linoleate in Homogeneous Solution and in Aqueous Emulsion. *Lipids* (1999) 34(7): 675-679.
- Xu Z.; Godber S. Antioxidant Activities of Major Components of  $\gamma$ -Oryzanol from Rice Bran Using a Linoleic Acid Model. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (2001) 78 (6): 645-649.

# **Capítulo 9**

## **Aplicación de los orizanoles a la estabilización de ésteres metílicos**

# Índice

- 1.- Introducción
- 2.- Materiales y métodos
  - 2.1.- Aceites empleados
  - 2.2.- Obtención de los FAME
  - 2.3.- Estabilidad oxidativa (método Rancimat)
- 3.- Resultados y Discusión
  - 3.1. Control del grado de conversión de los FAME
  - 3.2.- Estabilidad oxidativa de los FAME de los diferentes aceites
  - 3.3. Efecto del BHT y de los orizanoles sobre la estabilidad oxidativa de los FAME de los diferentes aceites
  - 3.4. Efecto de la concentración de orizanoles sobre la estabilidad oxidativa de los FAME de girasol de alto oleico
    - 3.4.1 Concentrado de orizanoles BM
- 4.- Conclusiones
- 5.- Bibliografía

## 1. Introducción

Los ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAAE), obtenidos mediante la transesterificación de triglicéridos con el alcohol correspondiente, se han constituido en los derivados de uso no comestible más importantes de los aceites vegetales y las grasas animales a escala industrial. Si bien los volúmenes de producción de estos derivados se han incrementado drásticamente en los últimos años debido a la utilización de los mismos (fundamentalmente los ésteres metílicos) como combustibles diesel, también se ha incrementado su uso como intermediarios en varios procesos de producción de derivados de la industria oleoquímica, sustituyendo en forma creciente a los ácidos grasos utilizados tradicionalmente para dicho fin.

Si bien históricamente los ácidos grasos han jugado un rol fundamental como materia prima para la producción de oleoquímicos, los ésteres alquílicos los han ido reemplazando gradualmente en varias aplicaciones como ser la producción de alcoholes grasos, alcanolamidas, alquilésteres sulfonados y muchas otras.

Esto se debe a las numerosas ventajas que involucra la sustitución de los ácidos grasos por ésteres alquílicos como intermediarios para la producción de este tipo de derivados, siendo las más importantes las siguientes (Gervasio, 1996):

- 1.- Menor consumo energético. La producción de ésteres alquílicos requiere de menor suministro energético que el método de producción de ácidos grasos

(conocido como "fat splitting"), que se desarrolla en condiciones drásticas de temperatura y presión.

2.- Menor costo de equipamiento: A diferencia de los ácidos grasos, sus ésteres alquílicos no son corrosivos, por lo que el equipamiento requerido para su manipulación no necesita ser de acero inoxidable. También, dado que para la fabricación de ésteres no se requiere de la utilización de las elevadas presiones que se utilizan para fabricar ácidos grasos, el costo de equipamiento se reduce en forma muy significativa.

3.- Se obtiene como subproducto una glicerina muy concentrada. La transesterificación transcurre en medio prácticamente anhidro, a diferencia del "fat splitting" que requiere de la presencia de un exceso de agua. Por este motivo la glicerina que se obtiene como subproducto de éste último contiene aproximadamente un 80% de agua y requiere de un alto suministro de energía para su recuperación, a diferencia de la glicerina proveniente de la transesterificación.

4.- Destilación y fraccionamiento más simples. Dado que son más volátiles y a la vez más estables que los ácidos grasos correspondientes, los ésteres alquílicos se destilan con más facilidad que éstos últimos.

5.- Superiores como intermediarios para varias aplicaciones. En varias aplicaciones los ésteres alquílicos son muy superiores como intermediarios dado que permiten alcanzar mayores rendimientos que cuando se parte de ácidos grasos. Por ejemplo en la producción de alcanolamidas a partir de ésteres metílicos se alcanzan rendimientos superiores al 90%, mientras que

cuando se producen a partir de ácidos grasos únicamente se alcanzan purezas de entre el 60 y el 70%.

6.- Facilidad de transporte y almacenamiento. Dado su mayor estabilidad química y menor corrosividad, los ésteres se transportan y almacenan más fácilmente que los ácidos grasos libres.

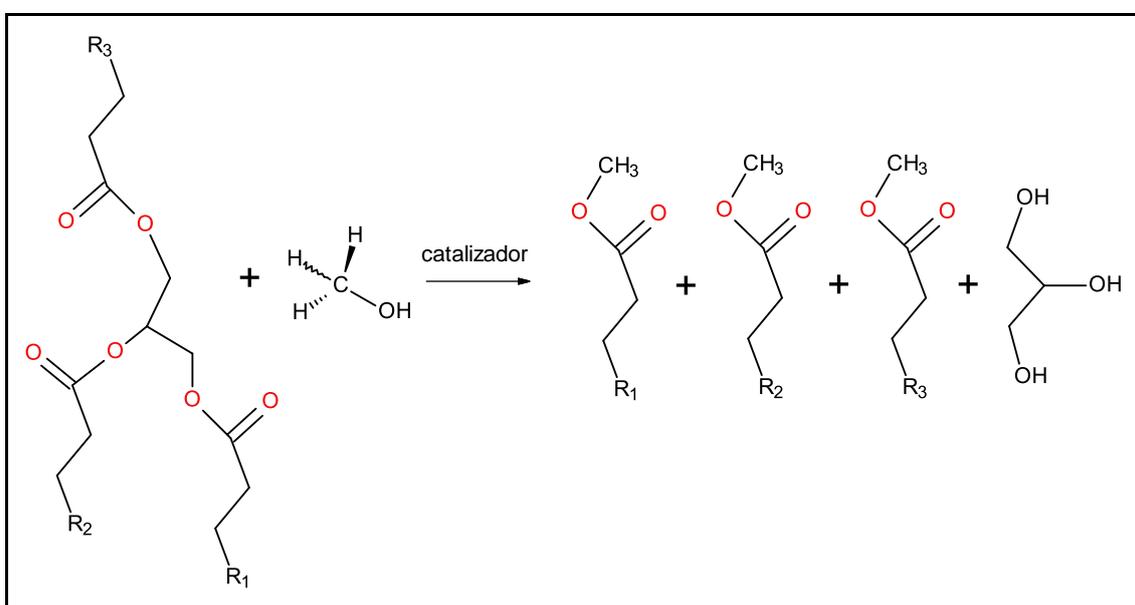
Como se mencionó anteriormente, además de su uso como intermediarios para la industria oleoquímica, el principal uso al que se destinan actualmente los FFAE como tales es en el área de los biocombustibles, área en la que se los identifica como "biodiesel" (fundamentalmente los ésteres metílicos y, en menor grado, etílicos). El uso de los FFAE como combustible renovable ha ganado interés en forma creciente como consecuencia de la disminución de las reservas de combustibles fósiles y del conocido impacto ambiental negativo del uso indiscriminado de los mismos (Mittelbach, 1990; Nouredini *et al.*, 1997). El Biodiesel, además de ser un combustible derivado de materias primas de origen vegetal y por lo tanto su combustión no representa un incremento neto en los niveles de anhídrido carbónico atmosférico, presenta propiedades muy similares a la del gasoil convencional y alta compatibilidad al ser mezclado con el mismo (Yuan *et al.*, 2005), motivos por los cuales se lo ha identificado como una de las alternativas más atractivas a los combustibles derivados del petróleo.

Por este motivo la mayoría de los países ha optado por la incorporación del biodiesel en su matriz energética por ser una de las alternativas más convenientes para la reducción del consumo de combustibles fósiles y dar cumplimiento a compromisos internacionales asumidos en este sentido (como el protocolo de Kyoto), para lo cual se ha fijado metas y plazos relativos a la

gradual incorporación de este biocombustible. Uruguay no es ajeno a esta tendencia mundial y en el año 2007 el parlamento aprobó la Ley sobre Agrocombustibles, donde se establecen las metas nacionales para la incorporación de biodiesel al gasoil comercializado en el país: un 2% obligatorio desde el 1º de enero de 2009 al 31 de diciembre de 2011, porcentaje que se eleva a un 5% a partir del 1º de enero de 2012. Para cumplir con el primero de estos mandatos la empresa ALUR, en asociación con la aceitera COUSA S.A., ha instalado recientemente una planta productora de biodiesel de 16.000 Ton/año de capacidad, cantidad equivalente al 2% de lo que se consume de gasoil en nuestro país (González, 2009).

Independiente del uso al que se destinen, la fabricación FFAE a escala industrial se realiza mediante la transesterificación (o alcoholisis) de un aceite vegetal con un alcohol de cadena corta. Este proceso consiste en hacer reaccionar los triacilgliceroles con un alcohol de bajo peso molecular (habitualmente se utiliza metanol) con un catalizador adecuado (Figura 9.1). Es posible realizar esta reacción mediante catálisis química o enzimática (Watanabe *et al.*, 2000; Van-Gerpen *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Soetaredjo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). La catálisis química puede ser ácida o básica, dependiendo de la composición del material graso. En materiales grasos con elevada acidez se utiliza la catálisis ácida a temperatura moderada ya que una catálisis básica no sería efectiva debido a la formación de jabones. Cuando se utiliza metanol, los productos de esta reacción son los ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos presentes en el material de partida; como subproducto queda glicerol (Bournay *et al.*, 2005; Singhabhandhu *et al.*, 2010; McNeil *et al.*, 2012).

Generalmente los ésteres metílicos poseen menor estabilidad oxidativa que los triglicéridos de los cuales provienen. Por lo tanto, se deben estabilizar mediante el agregado de antioxidantes (Lapuerta *et al.*, 2012). Es por ello que en esta tesis también se estudió el efecto de diferentes antioxidantes, incluyendo el concentrado de orizanoles obtenido, sobre un biodiesel preparado a partir de diferentes materiales grasos.



**Figura 9.1.-** Reacción de formación de los ésteres metílicos a partir de los triacilgliceroles.

Así como ya fue estudiado en capítulos anteriores el poder antioxidante sobre materiales grasos constituidos mayoritariamente por triacilgliceroles, en este capítulo el objetivo fue obtener información respecto al poder antioxidante de los orizanoles frente a ésteres metílicos (FAME) de materiales grasos con diferente grado de insaturación.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Aceites empleados

Se utilizaron tres tipos de aceites refinados: a) girasol de alto oleico, b) girasol común y c) chía (*Salvia hispanica*). Se eligieron estos aceites para estudiar el comportamiento del biodiesel con diferente proporción de ácido oleico/ácido linoleico/ácido linolénico. La Tabla 9.1 muestra la estabilidad inherente y la composición en ácidos grasos principales para los aceites estudiados.

Los aceites elegidos para comparar el poder antioxidante de los orizanoles son muy diferentes en composición. En el aceite de girasol de alto oleico el 86.9 % de los ácidos grasos es ácido oleico mientras en el aceite de girasol común solamente un 31.8 % corresponde al ácido oleico y en el aceite de chía, alrededor del 6 %. El ácido graso mayoritario del aceite de girasol común es el linoleico (aproximadamente el 57 %) mientras en el aceite de chía lo es el ácido linolénico 63 %. Esta diferencia en el contenido de ácidos grasos poli-insaturados determina que estos aceites sean muy diferentes en su estabilidad inherente.

**Tabla 9.1.-** Estabilidad inherente y composición en ácidos grasos principales de los aceites de chía, de girasol común y de girasol de alto oleico.

Ácido graso	Chía	Girasol	Girasol de alto oleico
<b>16:0</b>	6.2	5.3	3.3
<b>18:0</b>	2.5	3.8	2.8
<b>18:1</b>	6.3	31.8	86.9
<b>18:2</b>	20.3	56.9	5.4
<b>18:3</b>	63.0	0.2	-
<b>Estabilidad inherente</b>	17.8	6.1	1.4

## 2.2. Obtención de los FAME

Al igual que en el Capítulo 6, se emplearon aceites comerciales de calidad comestible, los que suelen contener diversos antioxidantes (naturales o incorporados por el fabricante), por este motivo se procedió a realizar la purificación en columna de alúmina activada a los efectos de eliminar completamente todos los antioxidantes presentes en los mismos, como se describió previamente (Capítulo 6).

Posteriormente se procedió a la transesterificación química de los aceites. Para ello se pesó 5 gramos de aceite purificado en un tubo con tapa de rosca, se agregó 35 mL de una solución metanólica de hidróxido de potasio 2 N

(relación aceite/alcohol/catalizador fue de 1:4.8:0.8) y se dejó agitando durante 40 minutos a temperatura ambiente (20 °C), finalmente se adicionó 15 mL de éter de petróleo para la extracción de los FAME. La solución de FAME se lavó 5 veces con 5 mL de agua destilada, luego se trasvasó a otro tubo y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno. Los ésteres se guardaron en freezer a -20 °C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> hasta el momento de su uso.

### **2.3. Estabilidad oxidativa (método Rancimat).**

Para el estudio de la estabilidad oxidativa de los diferentes ésteres metílicos se utilizó el método Rancimat, aplicándolo de la misma manera que se describió anteriormente (Capítulo 6).

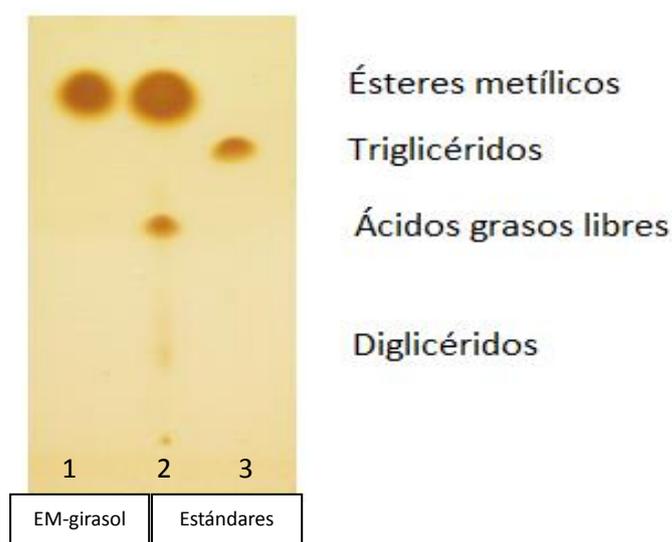
En relación a la temperatura de oxidación, a diferencia de lo descrito en el Capítulo 6 donde se utilizó 98.7 °C, en este caso la estabilidad oxidativa de los FAME se estudió a 110 °C dado que esta temperatura es la que se recomienda para estudiar la estabilidad oxidativa de los FAME en el caso en que se los destine a usarse como biodiesel (técnica oficial UNE-EN 14112 para el control de la estabilidad oxidativa del biodiesel).

Para estudiar el efecto de los orizanoles y del BHT sobre la estabilidad oxidativa de los FAME, se procedió a la adición de los antioxidantes de la misma forma que se describió anteriormente (Capítulo 6), en una concentración igual a  $3 \times 10^{-3}$  M y  $4.5 \times 10^{-3}$  M.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Control del grado de conversión de los FAME

Para el control cualitativo de la conversión en biodiesel se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC) (Figura 9.2).



**Figura 9.2.-** Cromatografía en capa delgada de 1) muestra de ésteres metílicos del aceite de girasol purificado, 2) estándar de ésteres metílicos y ácidos grasos libres y 3) estándar de triglicéridos.

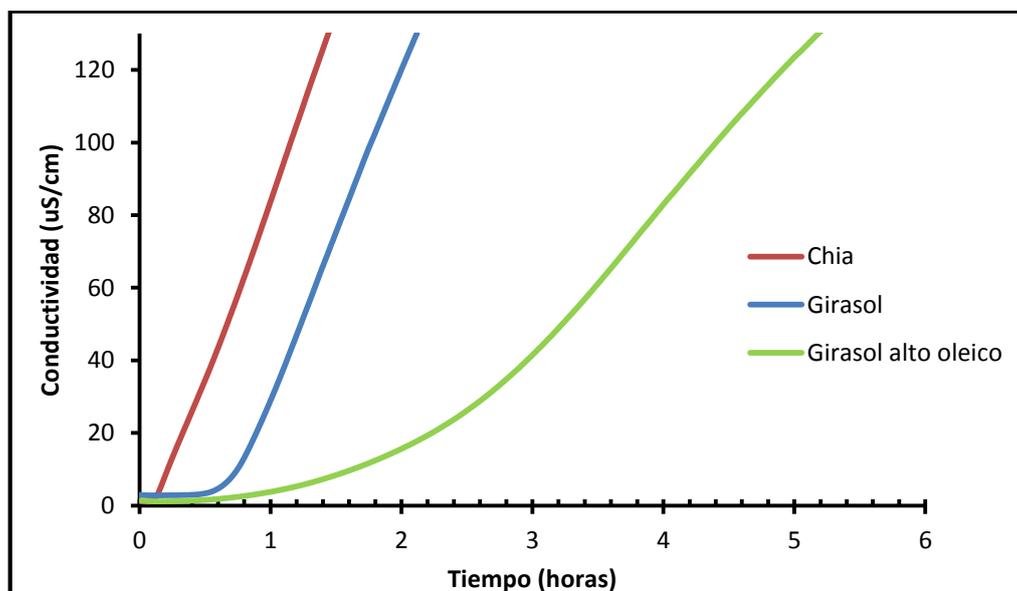
La cromatografía en capa delgada se desarrolló con una mezcla de éter de petróleo/dietileter/ácido acético (80:20:1).

En la placa no se observaron clases lipídicas intermedias en la muestra de biodiesel, lo que asegura que el grado de conversión fue muy elevado. El rendimiento cuantitativo de esta reacción no se controló porque el objetivo era

la obtención de los ésteres metílicos para realizar los estudios de oxidación con el agregado de antioxidantes.

### 3.2. Estabilidad oxidativa de los FAME de los diferentes aceites

La Figura 9.3 muestra las curvas de enranciamiento acelerado a 110 °C obtenidas para los ésteres metílicos de los aceites sin antioxidantes.



**Figura 9.3.-** Curvas de enranciamiento acelerado a 110 °C (Rancimat) para los ésteres metílicos preparados a partir de los aceites sin antioxidantes.

En la Tabla 9.2 se muestran los tiempos de inducción correspondientes a la Figura 9.3. Los ésteres metílicos del aceite de chía (EM-chía) presentaron el menor tiempo de inducción seguido de los ésteres metílicos del aceite de girasol común (EM-girasol común) y de los ésteres metílicos del aceite de

girasol alto oleico (EM-girasol alto oleico). Los EM-girasol alto oleico aunque presentan el tiempo de inducción más elevado (2.7 horas) no llegan al mínimo de 6 horas exigido por la normativa vigente en Uruguay para calidad de biodiesel (norma UNIT 1100).

**Tabla 9.2.-** Tiempos de inducción a 110 °C para los ésteres metílicos de los diferentes aceites sin antioxidantes.

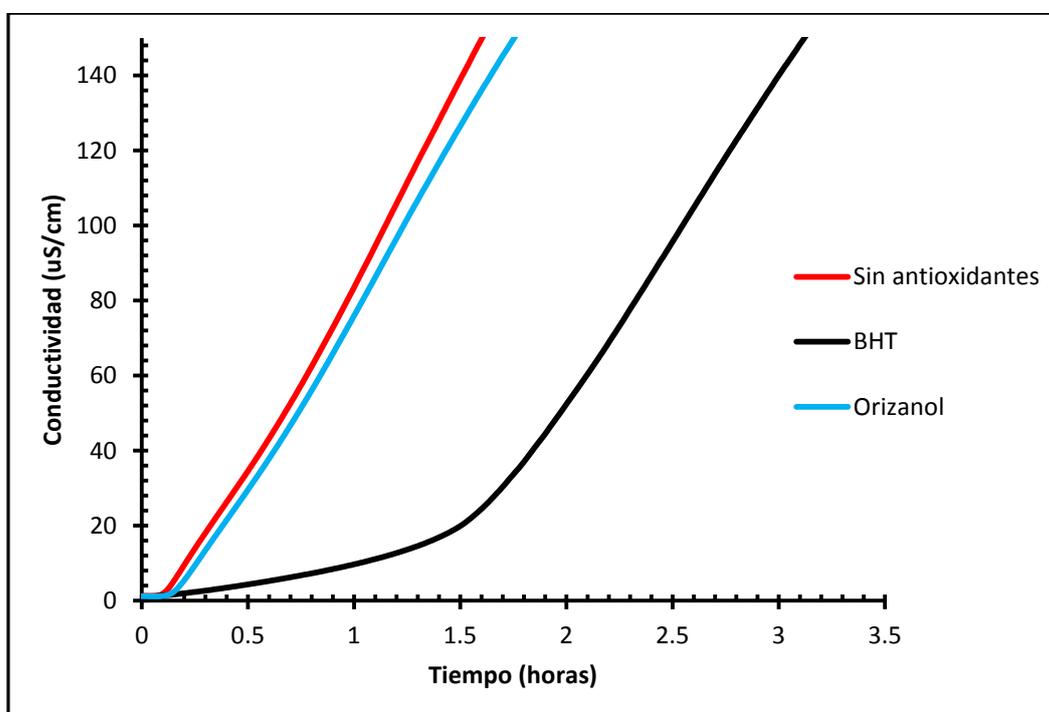
Ésteres metílicos	Tiempo de inducción (horas)
<b>EM-chía</b>	0.1 ± 0.0
<b>EM-girasol común</b>	0.7 ± 0.1
<b>EM-girasol alto oleico</b>	2.7 ± 0.2

El período de inducción a 110 °C para los ésteres metílicos del aceite de chía sin antioxidantes es muy bajo, lo cual condice con su alto contenido de 18:3.

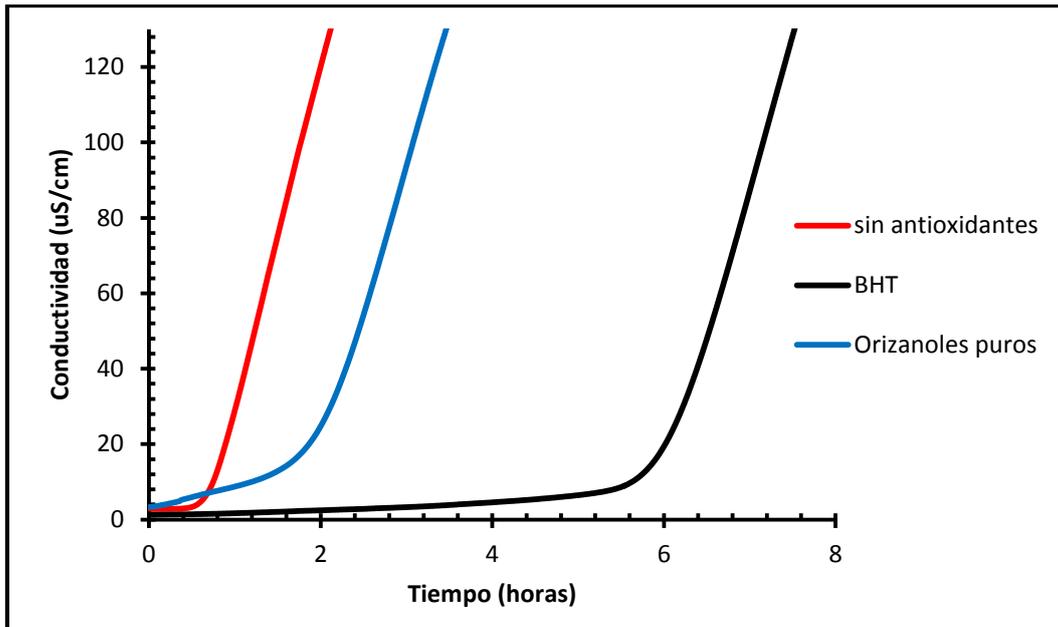
### **3.3. Efecto del BHT y de los orizanoles sobre la estabilidad oxidativa de los FAME de los diferentes aceites.**

Las Figuras 9.3, 9.4 y 9.5 muestran las curvas Rancimat a 110 °C para los ésteres metílicos de los diferentes aceites con el agregado de BHT y de orizanoles puros. Como era de esperar se observó un corrimiento de las curvas

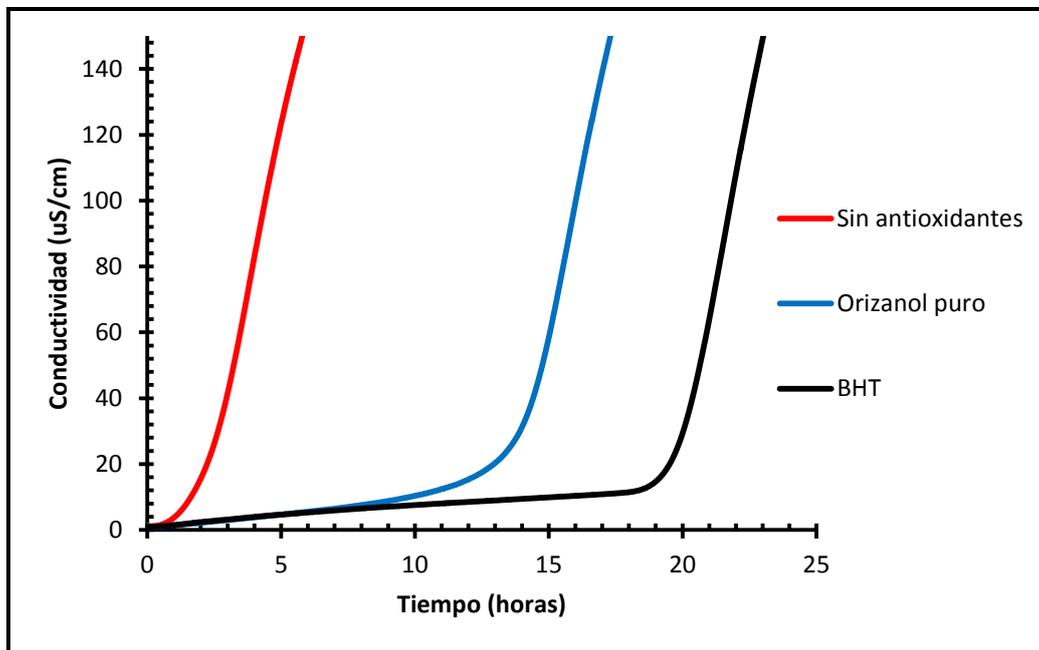
a tiempos mayores cuando se agregaron los antioxidantes. Para los ésteres metílicos de los tres aceites con agregado de los orizanoles puros, las curvas presentaron un corrimiento menos marcado que para los correspondientes al agregado de BHT. A pesar de que se trata de ésteres metílicos, el comportamiento es similar al encontrado para los aceites de girasol común y de girasol de alto oleico (Figura 6.5 y 6.6).



**Figura 9.3.-** Curvas Rancimat a 110 °C para los ésteres metílicos preparados a partir de aceite de chía sin antioxidantes y con el agregado de BHT u orizanoles puros (ambos a una concentración  $3 \times 10^{-3}$  M).

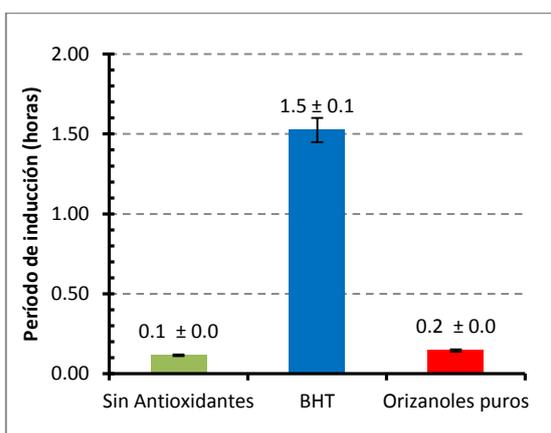


**Figura 9.4.-** Curvas Rancimat a 110 °C para los ésteres metílicos preparados a partir de aceite de girasol común sin antioxidantes y con el agregado de BHT u orizanoles puros (ambos a una concentración  $3 \times 10^{-3}$  M).

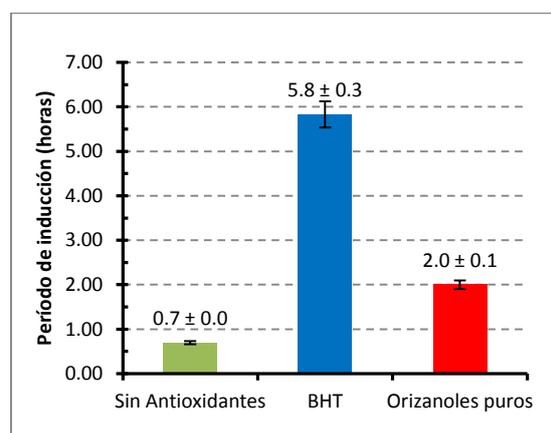


**Figura 9.5.-** Curvas Rancimat a 110 °C para los ésteres metílicos preparados a partir de aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes y con el agregado de BHT u orizanoles puros (ambos a una concentración  $3 \times 10^{-3}$  M).

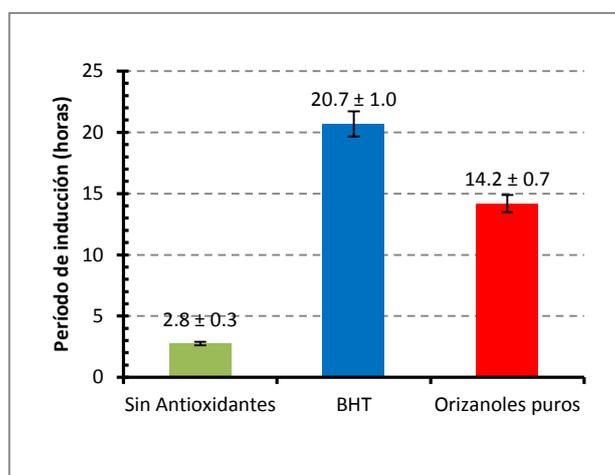
La Figura 9.6a-c muestra los tiempos de inducción a 110 °C para los ésteres metílicos de cada uno de los aceites con antioxidantes y sin antioxidantes (correspondientes a las Figuras 9.3 a 9.5, respectivamente).



(a)



(b)



(c)

**Figura 9.6.-** Períodos de inducción a 110 °C para los ésteres metílicos (EM) de los aceites de: a) chía, b) girasol común y c) girasol de alto oleico, sin antioxidantes y con el agregado de antioxidantes (BHT u Orizanoles a una concentración  $3 \times 10^{-3}$  M).

El agregado de orizanoles puros a los FAME de Chía (Figura 9.6 a) no provocó un cambio apreciable en su  $PI_{110^{\circ}C}$ , mientras que el agregado de igual cantidad molar de BHT lo aumentó considerablemente: aproximadamente 10 veces respecto al de los ésteres sin antioxidantes. En el caso de los FAME de girasol común y los de girasol de alto oleico (Figuras 9.6a y b, respectivamente), también el BHT fue el que mostró el mayor poder antioxidante, sin embargo la diferencia entre éste y los orizanoles no fue tan marcada como en el caso de los FAME de Chía. Efectivamente se puede observar que los orizanoles presentaron un poder antioxidante 3 veces menor que el BHT en el caso de su adición a los FAME de girasol común y solamente 1.5 veces menor para el caso de los FAME de girasol de alto oleico. Esto sugiere que los orizanoles poseen un mayor poder antioxidante en el caso de su adición a los ésteres metílicos de los aceites con menor grado de insaturación. En la Tabla 9.3 se muestran los factores de protección a  $110^{\circ}C$  ( $FP = (PI_{110^{\circ}C})_{con\ antioxidant} / (PI_{110^{\circ}C})_{sin\ antioxidant}$ ), correspondientes a cada antioxidante adicionado a cada tipo de FAME. Se observa que el BHT disminuyó su poder protector a medida que disminuyó el grado de insaturación de los lípidos, pasando de un valor de 13.3 en los FAME de chía a 7.5 en los FAME de girasol de alto oleico.

La Tabla 6.6 (Capítulo 6) muestra los factores de protección para algunos aceites obtenidos de sus PI determinados en Rancimat a  $98.7^{\circ}C$ . Para el aceite de girasol común purificado con agregado de BHT, el factor de protección fue 5.2 y con agregado de orizanoles puros, 1.6. Para el aceite de girasol de alto oleico purificado, fue 10.6 para el BHT y 5.7 para los orizanoles puros.

Comparando los factores de protección para los aceites y para sus correspondientes FAME (a pesar que los primeros se determinaron a 98.7 °C y los segundos a 110 °C), se concluye que el comportamiento de los orizanoles es similar tanto en el aceite como en los ésteres metílicos. Sin embargo, con el BHT se observó que protege más a los FAME del aceite de girasol común que a los del girasol de alto oleico.

**Tabla 9.3.-** Factores de protección correspondientes a los orizanoles y al BHT adicionados a FAME de diferentes aceites.(calculados como  $(PI_{110^{\circ}C})_{con\ antioxidant}/(PI_{110^{\circ}C})_{sin\ antioxidant}$ )

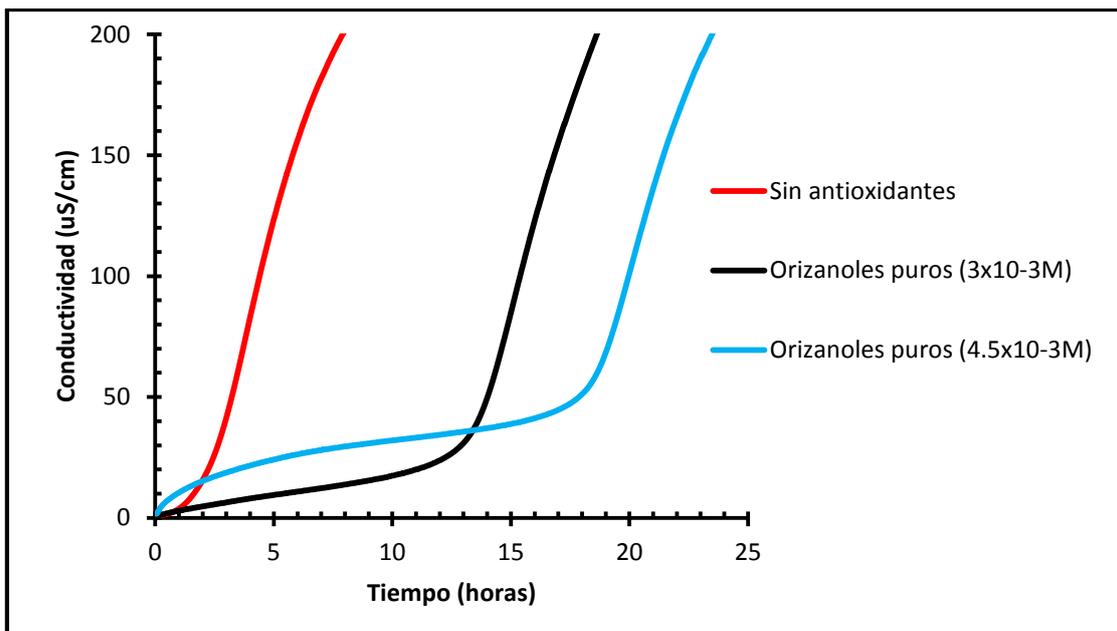
Antioxidante	Factor de Protección (FP <sub>110°C</sub> )		
	EM-chía	EM-girasol común	EM-girasol de alto oleico
<b>Orizanoles puros</b>	1.3	2.9	5.2
<b>BHT</b>	13.3	8.4	7.5

**Tabla 9.4.-** Factores de protección correspondientes a los orizanoles y al BHT adicionados a los aceites sin antioxidantes (calculados como  $(PI_{97.8^{\circ}C})_{con\ antioxidant}/(PI_{97.8^{\circ}C})_{sin\ antioxidant}$ ).

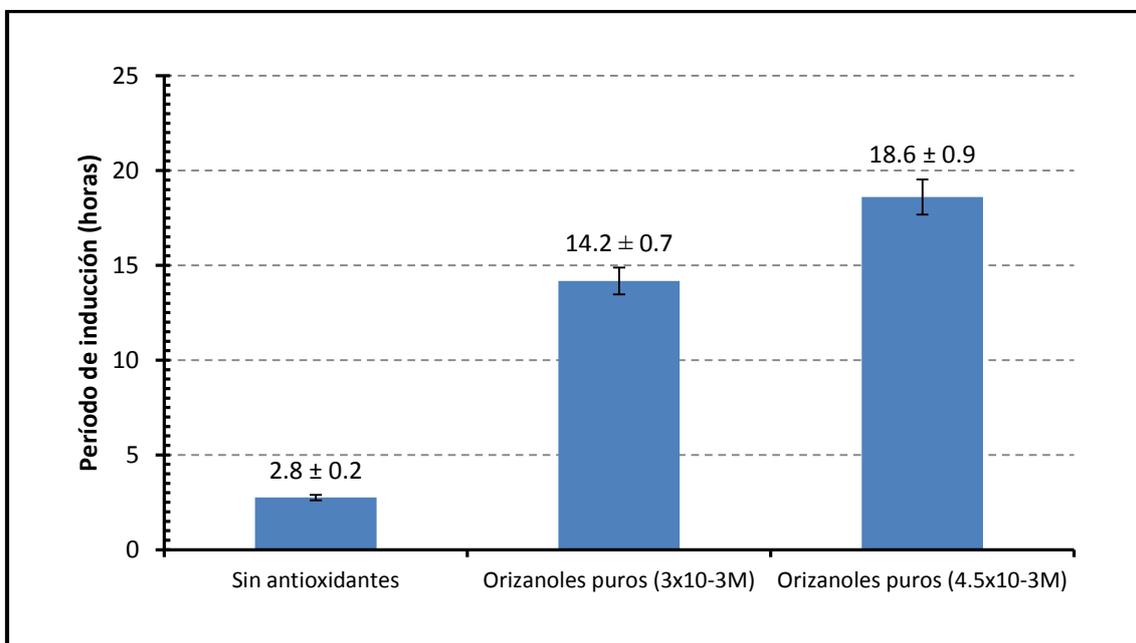
Antioxidante	Factor de Protección (FP <sub>98.7 °C</sub> )	
	Aceite de girasol común	Aceite de girasol de alto oleico
<b>Orizanoles puros</b>	1.6	5.7
<b>BHT</b>	5.2	10.6

### **3.4. Efecto de la concentración de orizanoles sobre la estabilidad oxidativa de los FAME de girasol de alto oleico.**

Para estudiar la influencia de la concentración de antioxidante, a los EM-girasol de alto oleico se le realizó un agregado 1.5 veces mayor que la cantidad de orizanoles estudiada anteriormente. La Figura 9.7 muestra las curvas Rancimat a 110 °C para este nuevo agregado ( $4.5 \times 10^{-3}$  M) así como para el anterior ( $3 \times 10^{-3}$  M) y para los EM-girasol de alto oleico sin antioxidantes. En la Figura 9.8 se indican los correspondientes períodos de inducción. El agregado de  $4.5 \times 10^{-3}$  M de orizanoles aumentó el período de inducción 1.3 veces respecto al del agregado de  $3 \times 10^{-3}$  M. Por lo tanto, el aumento del período de inducción es menor al aumento de la concentración. El período de inducción de los FAME de girasol de alto oleico conteniendo una concentración de orizanoles de  $4.5 \times 10^{-3}$  M (18.6 h) fue algo menor que el obtenido con BHT adicionado a una concentración de  $3 \times 10^{-3}$  M (20.7 h) de BHT, lo que indica que con una concentración de orizanoles puros algo superior a  $4.5 \times 10^{-3}$  M es factible igualar este efecto protector del BHT.



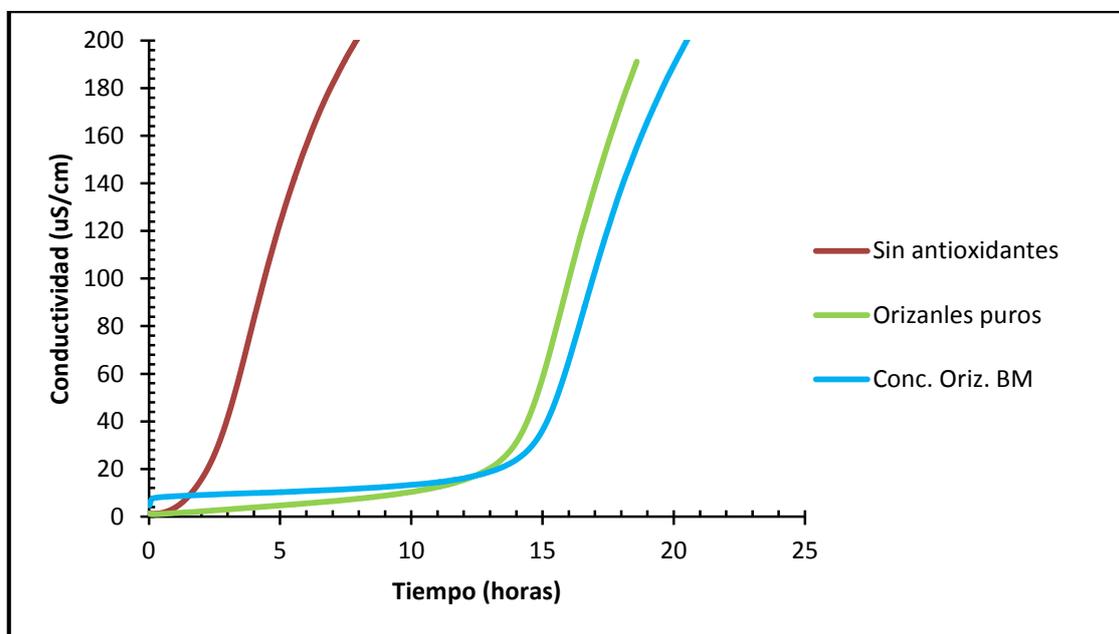
**Figura 9.7.-** Curvas Rancimat a 110 °C de los ésteres metílicos del aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes y con el agregado de orizanoles puros a dos concentraciones diferentes.



**Figura 9.8.-** Períodos de inducción a 110 °C de los ésteres metílicos del aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes y con diferentes agregados de orizanoles puros.

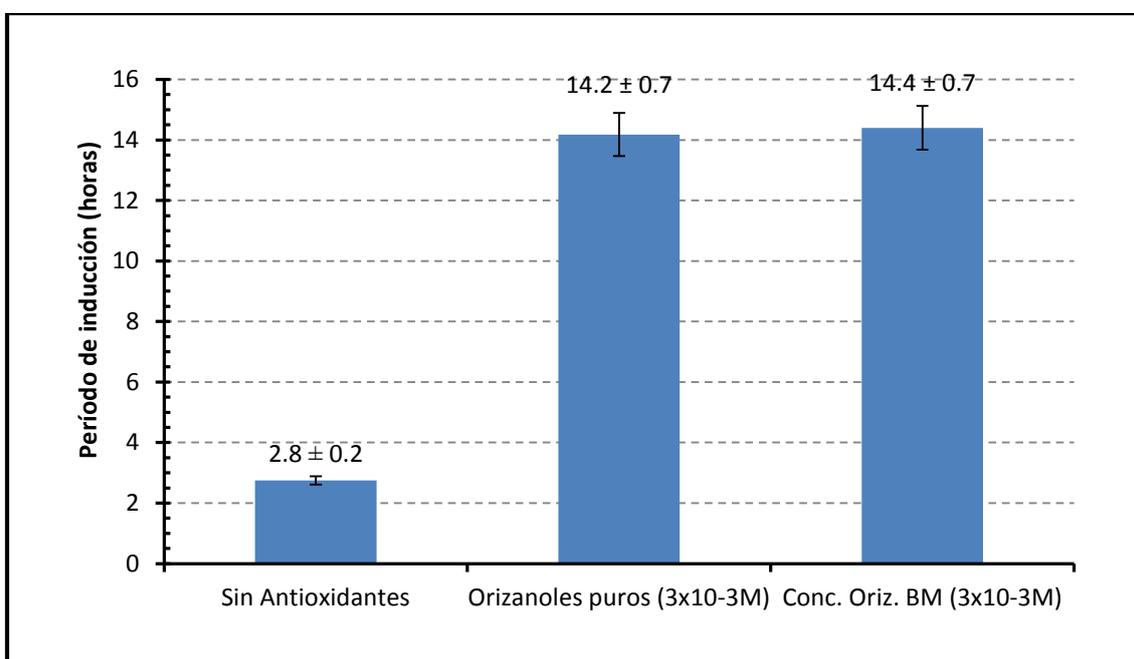
### 3.4.1. Concentrado de orizanoles BM

A los efectos de comparar el efecto antioxidante mostrado por los orizanoles puros frente a los FAME de aceite de alto oleico con el que presenta un extracto obtenido a partir de las borras de neutralización, se estudió la estabilidad oxidativa de dichos esteres aditivados con el concentrado de orizanoles BM. La Figura 9.9 muestra las curvas a 110 °C para los FAME del aceite de girasol alto oleico, para el agregado de  $3 \times 10^{-3}$  M de orizanoles puros y para dichos FAME conteniendo el concentrado de orizanoles BM a una concentración tal que se aporta una concentración molar neta de orizanoles de  $3 \times 10^{-3}$  M.



**Figura 9.9.-** Curvas Rancimat a 110 °C para los FAME del aceite de girasol de alto oleico con el agregado de orizanoles puros y con agregado del concentrado de orizanoles BM (ambos agregados a una concentración molar neta de  $3 \times 10^{-3}$  M en orizanoles).

La Figura 9.10 muestra los períodos de inducción a 110 °C para los ésteres metílicos del aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes y con el agregado de orizanoles puros y del concentrado de orizanoles BM (ambos a una concentración neta de  $3 \times 10^{-3}$  M). El período de inducción para los ésteres metílicos del aceite de girasol de alto oleico con el concentrado de orizanoles BM fue de 14.4 horas, levemente superior al correspondiente con los orizanoles puros (14.2 horas). Estos valores no son significativamente diferentes al considerar los errores correspondientes. Por lo tanto, a diferencia de lo observado anteriormente el concentrado de orizanoles BM no presentó un incremento significativo del valor del período de inducción pese a tener una pequeña cantidad de tocoferoles y tocotrienoles.



**Figura 9.10.-** Períodos de inducción determinados en Rancimat a 110 °C para los ésteres metílicos del aceite de girasol de alto oleico sin antioxidantes, con el agregado de orizanoles puros y con agregado del concentrado de orizanoles BM (ambos antioxidantes fueron agregados en concentración molar neta de  $3 \times 10^{-3}$  M).

Es interesante notar que en ambos casos los períodos de inducción superaron ampliamente el valor mínimo de 6 horas requerido para ésteres alquílicos que se vayan a destinar a ser usados como biodiesel (norma UNIT 1100).

#### **4. Conclusiones.**

Los orizanoles puros protegen más a los ésteres metílicos que provienen de un aceite menos insaturado. En cambio, en aquellos que provienen de aceites muy insaturados, como por ejemplo el aceite de chía, prácticamente no existe cambio respecto a los ésteres metílicos del aceite sin antioxidantes. El BHT presentó un factor de protección de 13.3, 8.4 y 7.5 mientras para los orizanoles fue de 1.3, 2.9 y 5.2 para los FAME de los aceites de chía, girasol y girasol alto oleico respectivamente. Por lo tanto, el BHT es claramente más eficiente que los orizanoles para la estabilización de los ésteres metílicos de los tres aceites estudiados. El concentrado de orizanoles BM no tuvo un efecto protector significativamente superior al del concentrado de orizanoles puro. Ello no concuerda con los resultados obtenidos para los propios aceites, mediante los métodos estudiados anteriormente. Sin embargo, el concentrado de orizanoles BM presentó un valor del orden de los orizanoles puros confirmando que el resto de las especies químicas presentes no afectan el poder antioxidante de los orizanoles en el concentrado BM. En conclusión, este capítulo confirma los resultados encontrados en capítulos anteriores acerca del bajo poder

antioxidante que presentan los orizanoles cuando son utilizados como antioxidantes para la protección de un material graso.

## 5. Bibliografía.

- Bournay L.; Casanave D.; Delfort B.; Hillion G.; Chodorge J. A. New Heterogeneous Process for Biodiesel Production: A Way to Improve the Quality and the Value of the Crude Glycerine produced by Biodiesel Plants. *Catalysis Today* (2005) 106(1–4): 190-192.
- Chen K. S.; Lin Y. Ch.; Hsu K. H.; Wang H. K. Improving Biodiesel Yields from Waste Cooking Oil by Using Sodium Methoxide and a Microwave Heating System. *Energy* (2012) 38(1): 151-156.
- Gervasio G.C. Fatty Acids and Derivatives from Coconut Oil. *Bailey's Industrial Oil & Fat Products*. 5º Ed., John Wiley & Sons, Inc., (1996).
- González M. Gerente de la Unidad de Negocios de Biodiesel, ALUR, Alcoholes del Uruguay S.A., comunicación personal, (2009).
- Lapuerta M.; Rodríguez-Fernández J.; Ramos Á.; Álvarez B. Effect of the Test Temperature and Anti-oxidant Addition on the Oxidation Stability of Commercial Biodiesel Fuels. *Fuel* (2012) 93: 391–396.
- McNeil J.; Day P.; Sirovski F. Glycerine from Biodiesel: The perfect Diesel Fuel. *Process Safety and Environmental Protection* (2012) 90: 180–188.
- Mittelbach M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1990) 67:168-170.

- Norma Europea UNE-EN 14112, Determinación de la estabilidad a la oxidación (ensayo de oxidación acelerada) (2003).
- Nouredini H.; Zhu D. Kinetics of transesterification of soybean oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (1997) 74:1457-1463.
- Rashid U.; Anwar F.; Knothe G. Evaluation of Biodiesel Obtained from Cottonseed Oil. *Fuel Proces. Technol.* (2009) 90: 1157–1163.
- Singhabhandhu A.; Tezuka T. A Perspective on Incorporation of Glycerin Purification Process in Biodiesel Plants using Waste Cooking Oil as Feedstock. *Energy* (2010) 35: 2493-2504
- Soetaredjo F. E.; Ayucitra A.; Ismadji S.; Maukar A. L. KOH/bentonite Catalysts for Transesterification of Palm Oil to Biodiesel. *Appl. Clay Sci.* (2011) 53(2): 341-346.
- Van Gerpen J.; Shanks B.; Pruszko R.; Clements D.; Knothe G. Biodiesel Production Technology. *NREL (National Renewable Energy Laboratory)*, (2004).
- Watanabe Y.; Shimada Y.; Sugihara A.; Noda H.; Fukuda H. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil using Immobilized *Candida Antarctica* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2000) 77(4): 355-360.
- Yuan W.; Hansen A. C.; Zhang Q.; Tan Z. Temperature-Dependent Kinematic Viscosity of Selected Biodiesel Fuels and Blends with Diesel Fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2005) 82:195-99.
- Zhang Z.; Guan Ch. A Promising Alternate Lipase for Biodiesel Fuel Production. *Frontiers of Agriculture in China* (2010) 4(2): 129-136.

# Apéndice 1

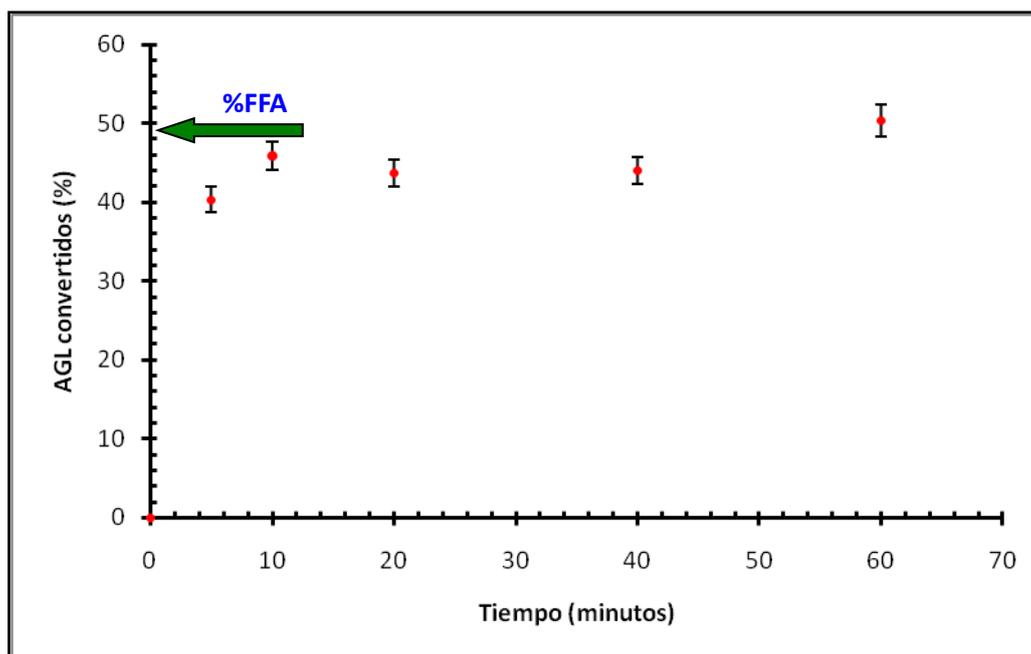
## **1. Puesta a punto del método de etilación de las borras de neutralización**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el método 2 el concentrado con un 17.6% de orizanoles posee un elevado contenido de ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos libres compiten seguramente en el reparto con los orizanoles cuando se utiliza como solvente dietileter en las condiciones del método 2. Por ello se implementó un nuevo método donde los ácidos grasos libres fueron convertidos en ésteres metílicos para de esa manera poder concentrar aún más los orizanoles en el extracto final.

## **2. Etilación selectiva de los ácidos grasos libres**

El procedimiento de etilación de los ácidos grasos libres ya fue descrito en el capítulo 4 (punto 2.2.4). La reacción se llevó a cabo diferentes tiempos de reacción y se realizó un seguimiento del grado de conversión de los ácidos grasos libres de manera de determinar el tiempo óptimo. Para ello se utilizó la técnica descrita en el capítulo 2 (punto 2.3).

La Figura A.1.1 muestra la evolución con el tiempo de reacción del grado de conversión a ésteres etílicos de los FFA en las borras. Se puede observar que aproximadamente a los 10 minutos de reacción no existen grandes cambios en la conversión de los ácidos grasos libres.

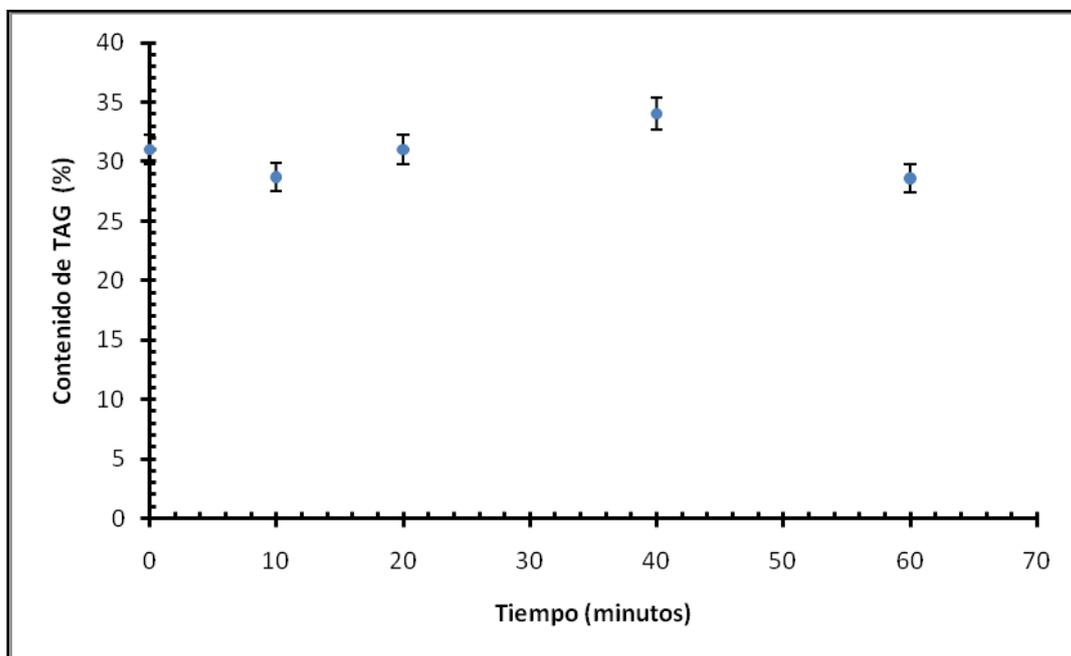


**Figura A.1.1.-** Avance de la conversión a ésteres etílicos de los ácidos grasos libres presentes en las borras de neutralización en función del tiempo de reacción (errores determinados por propagación). La flecha indica el porcentaje de FFA inicial en las borras

Dado que la reacción en medio ácido pudo introducir modificaciones en algunos de los demás compuestos presentes en las borras, se realizó también un seguimiento de la concentración de los triacilgliceroles y de los orizanoles para cada uno de los tiempos ensayados. El método utilizado para la determinación de los triacilgliceroles y de los orizanoles se describe en el capítulo 2 (punto 2.4 y 2.5.1).

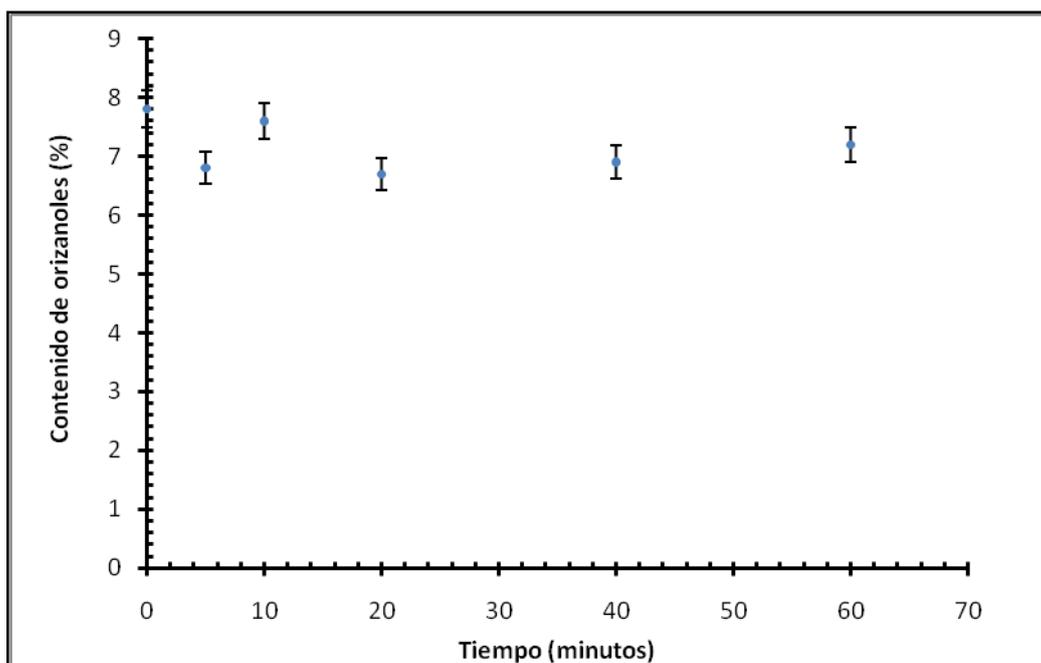
La Figura A.1.2 muestra el contenido de TAG a diferentes períodos de reacción, donde se observa que, si bien existe alguna dispersión, no existió un descenso significativo del contenido de TAG en las borras. Esto permite suponer que en las condiciones de reacción la esterificación ocurrió con una alta selectividad,

sin que ocurriera en forma simultánea una significativa transesterificación de los TAG a ésteres etílicos luego de 60 minutos de reacción.



**Figura A.1.2.-** Porcentaje de triacilgliceroles en las borras de neutralización en función del tiempo, durante la conversión a ésteres etílicos de los ácidos grasos libres (errores determinados por propagación).

La Figura A.1.3 muestra el contenido de orizanoles, donde se puede observar que luego de 60 minutos de reacción no hubo un efecto significativo sobre la concentración de los mismos.



**Figura A.1.3.-** Contenido de orizanoles en las borras de neutralización en función del tiempo, durante la conversión a ésteres etílicos de los ácidos grasos libres (errores determinados por propagación).

En función de estos resultados se decidió realizar la esterificación selectiva de los FFA presentes en las borras mediante la catálisis ácida en las condiciones descritas (40°C, relación alcohol (mL)/borras (g)= 7, etanol conteniendo 10 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y prolongándola durante 20 minutos. Ya que dicho tiempo es suficiente para la conversión total de los FFA sin que se verifique una pérdida significativa de los compuestos de interés (orizanoles) ni la modificación de otros compuestos mayoritarios de las borras como los TAG.

## **Conclusiones Generales.**

- Las borras de neutralización del aceite de salvado de arroz que produce la empresa ARROZUR S.A., contienen alrededor del 2.4 % en base húmeda de orizanoles, por lo que constituyen un material con un potencial interesante para la obtención de productos de alto valor agregado.
- Mediante métodos relativamente simples aplicados sobre dichas borras, como el Soxhlet convencional o diferentes métodos de partición con solventes, fue posible obtener extractos enriquecidos en orizanoles, alcanzándose concentraciones de orizanoles de entre 5.3 y 31.3 %, según el método utilizado. Entre éstos, el más eficiente desde el punto de vista del factor de concentración de los orizanoles resultó ser el que previo a la partición con solventes incluyó la modificación química de las borras, ya que permitió alcanzar una concentración de orizanoles del 31.3 %. Dicha modificación química constó de un esterificación de los jabones de los ácidos grasos con etanol mediante catálisis ácida y posteriormente se realizó una partición con solventes usando dietileter y una solución acuosa. Este método permite además recuperar el 93 % de los orizanoles presentes en las borras, bajo forma de un concentrado denominado BM que contiene más de 8 veces la cantidad de las borras de partida. Además contiene tocoferoles y tocotrienoles en una concentración total de 75 ppm, lo cual le aporta valor agregado al mismo.
- El concentrado de orizanoles BM tiene un poder antirradicalario (determinado por el método del DPPH) comparable al que presentó un

estándar de orizanoles puros, lo que permite deducir que el resto de especies químicas presentes en el mismo no ejercen ningún efecto adverso sobre esta propiedad.

- Tanto el concentrado de orizanoles BM como el estándar puro de orizanoles mostraron ser efectivos en la protección de diferentes aceites comerciales (soja, girasol, salvado de arroz y girasol de alto oleico) sometidos a un proceso de enranciamiento acelerado (equipo OSI, 98.7°C). El poder antioxidante levemente superior del concentrado se puede atribuir a que, como se mencionó anteriormente, además de lo orizanoles presentó una pequeña concentración de tocoferoles y tocotrienoles. Sin embargo, tanto los orizanoles puros como el concentrado BM presentaron un poder antioxidante menor que varios antioxidantes sintéticos ensayados (BHA, BHT y TBHQ).
- Estudios de enranciamiento acelerado en DSC (isotérmico y no-isotérmico) de los mismos aceites aditivados con el concentrado de orizanoles BM permitió determinar algunos parámetros cinéticos del proceso de oxidación en atmósfera de oxígeno: como la energía de activación aparente  $E^a = 68$  kJ/mol, y el factor pre-exponencial aparente de la ecuación de Arrhenius  $A' = 3.89 \times 10^9 \text{ min}^{-1}$ . para el aceite de soja con el agregado del concentrado de orizanoles BM. Estos resultados demostraron que el concentrado BM presentó un poder antioxidante levemente superior al de los orizanoles puros, resultado coincidente con lo obtenido por el método OSI. La oxidación en DSC confirmó también el menor poder antioxidante del concentrado BM frente al demostrado por varios antioxidantes sintéticos y naturales ( $\delta$ -tocoferol, BHA, BHT y TBHQ).

- El efecto antioxidante de los orizanoles puros y del concentrado de orizanoles BM se estudió determinando el contenido y tipo de hidroperóxidos formados durante la oxidación de los ésteres metílicos del aceite de girasol (bajo flujo de O<sub>2</sub> y a 50°C, una temperatura moderada. Al igual a lo encontrado en los métodos OSI y DSC (a pesar de usar una matriz lipídica diferente y a las diferentes condiciones de oxidación), el concentrado de orizanoles presentó un poder antioxidante levemente superior al de los orizanoles puros y menor al del BHT. Debido a la baja temperatura los tiempos necesarios para alcanzar un nivel de oxidación importante son demasiado elevados, por ejemplo el BHT luego de transcurridas las 320 horas de oxidación no se logró observar un cambio drástico en la velocidad de formación de los hidroperóxidos. A su vez, para un mismo estado de oxidación el contenido porcentual de los hidroperóxidos formados para cada uno de los antioxidantes ensayados fue similar concluyendo que el mecanismo por el cual transcurre la oxidación es similar para cada uno de ellos.
- Los resultados obtenidos demuestran que las borras de neutralización industriales obtenidas por la empresa ARROZUR SA durante la refinación del aceite de salvado de arroz son un subproducto sub-valorado a partir del cual se pueden obtener extractos enriquecidos en orizanoles, los cuales manifiestan las propiedades antioxidantes propias de esta familia de compuestos. Estos extractos mostraron por diferentes métodos que pueden ser eficientemente utilizados en la protección de diferentes aceites comestibles o de otras clases lipídicas de interés tecnológico (como los ésteres metílicos). Si bien el concentrado de orizanoles BM obtenido

mostró en dichos ensayos un poder antioxidante menor que el de otros antioxidantes sintéticos de uso frecuente en la industria alimentaria, su uso en esta área resulta muy atractivo ya que se trata de un antioxidante “natural”. Además, por provenir de un subproducto industrial de bajo valor, su explotación resulta altamente atractiva como forma de valorizar un subproducto de un sector relevante para nuestro país como el arrocero, el cual generalmente se utiliza para alimentación animal.