

## **08TCA. ANTIOXIDANTES NATURALES: EFECTO SOBRE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE NUEZ (*JUGLANS REGIA* L.)**

**MARTINEZ M.L.<sup>a\*</sup>, PENCI C.<sup>b</sup>, IXTAÍNA V.<sup>c</sup>, HADAD L.<sup>d</sup>, RIBOTTA P.D.<sup>e</sup>, MAESTRI D.M.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV. CONICET – UNC). Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA). Av. Vélez Sársfield 1611 - CU. X5016GCA Córdoba, Argentina.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFyN), Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA). Av. Vélez Sársfield 1611 - CU. X5016GCA Córdoba, Argentina.

<sup>c</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), (CCT La Plata – CONICET,) Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, 47 y 116, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina y Facultad de Ingeniería, Dpto. de Ingeniería Química (TECSE), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA, Av. del Valle 5737, B7400JWI, Olavarría, Argentina.

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFyN), Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Av. Vélez Sársfield 1611 - CU. X5016GCA Córdoba, Argentina.

<sup>e</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (CONICET-UNC) - Universidad Nacional de Córdoba (UNC)- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

\*E-mail: [mmartinez@efn.uncor.edu](mailto:mmartinez@efn.uncor.edu)

**Resumen:** Por su elevado nivel de insaturación (> 68%), el aceite de nuez es altamente susceptible al deterioro termo y foto-oxidativo. En este trabajo se propone analizar el efecto de algunas sustancias naturales y sintéticas sobre la estabilidad oxidativa y la conservación del aceite de nuez. Las condiciones de iluminación empleadas (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) promovieron la formación de productos de oxidación primarios, aún en los aceites aditivados; los antioxidantes evaluados resultaron poco eficaces como inhibidores de oxidación fotosensibilizada. En ausencia de luz, todos los tratamientos con agregado de antioxidantes fueron igualmente eficaces para inhibir la formación de productos de oxidación durante el periodo de almacenamiento. La valoración de la capacidad antirradicalaria de los aceites aditivados permitió determinar que: a) TBHQ es un efectivo inhibidor de radicales libres en el aceite de nuez, b) su actividad no resulta afectada por la luz, pero es dependiente de la concentración, c) el extracto de romero y el palmitato de ascorbilo no ejercen un efecto aditivo sobre la actividad del TBHQ.

### **1. Introducción**

Las reacciones de oxidación de los lípidos constituyen una de las causas de mayor importancia comercial en la industria alimentaria. Los sustratos de estas reacciones son fundamentalmente los ácidos grasos no saturados que, cuando están libres, se oxidan por lo general más rápidamente que cuando son parte de moléculas de triglicéridos o fosfolípidos (Frankel, 2005).

El aceite de nuez constituye un sustrato altamente susceptible a reacciones oxidativas que deterioran su calidad química y organoléptica. Este hecho hace necesario que para su conservación debe ser protegido mediante el empleo de sustancias o condiciones de almacenamiento que puedan inhibir o retardar los procesos de oxidación mencionados. La adición de antioxidantes, en su mayor parte sintéticos, es un procedimiento tecnológico habitual en la industria alimentaria ya que mejora la estabilidad de los lípidos y prolonga la vida útil de los alimentos que los contienen. Los mecanismos por los cuales estas sustancias ejercen su actividad son diversos y su eficacia se ve influenciada notablemente por las características del sustrato (Yanishlieva y Marinova, 2001; Decker et al., 2005; Frankel, 2005). Si bien la mayor parte de los antioxidantes de grado alimentario son sustancias sintéticas, la presencia de ellos está siendo cuestionada cada vez en mayor grado. Entre las sustancias de origen natural, el palmitato de ascorbilo ha mostrado actividad antioxidante frente a la termo-oxidación del aceite de canola, pero tiene un efecto limitado sobre el deterioro foto-oxidativo (McMullen et al., 1991). Hras et al. (2000) compararon la actividad antioxidante de un extracto de romero (rico en ácido carnósico),  $\alpha$ -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico, solos y en combinación, sobre aceite de girasol almacenado a 60 °C. Estos autores observaron un efecto sinérgico del extracto de romero cuando se combina con palmitato de ascorbilo o con ácido cítrico, disminuyendo la formación de peróxidos y productos de oxidación secundarios.

Una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible hasta el momento, da cuenta de la carencia de estudios científicos en donde se evalúen alternativas para la conservación del aceite de nuez. En este trabajo se propone analizar el efecto de algunas sustancias naturales y sintéticas sobre la estabilidad oxidativa y la conservación del aceite de nuez.

## 2. Objetivo:

Analizar la eficacia de sustancias naturales (extracto de romero y palmitato de ascorbilo) y sintéticas (2,5-diterbutil hidroquinona), solas y en diferentes combinaciones, sobre la estabilidad oxidativa y la conservación del aceite de nuez en condiciones de almacenamiento prolongado.

## 3. Materiales y métodos

Se utilizó aceite de nuez (variedad Franquette) obtenido mediante prensa de tornillo escala piloto (Martínez et al., 2008). Sustancias empleadas como antioxidantes: extracto de romero (ER) Guardian y palmitato de ascorbilo (PA) Grindox 562 ambos de Danisco, 2,5-diterbutil hidroquinona (TBHQ, Sigma Aldrich).

### **Ensayo de almacenamiento prolongado: estabilidad frente a la foto-oxidación.**

Se utilizó una cámara con iluminación permanente (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) y temperatura controlada (25 °C). Mediante un estudio de termo-oxidación preliminar se definió la cantidad de ER a incorporar al aceite. Las cantidades de PA y TBHQ se definieron según lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA) para aditivos antioxidantes en aceites (Tabla 1). La condición de almacenamiento en oscuridad se logró recubriendo los envases con una lámina de aluminio. Los aceites se almacenaron durante un periodo de 6 meses. Con una periodicidad quincenal se extrajeron muestras de cada uno de los tratamientos a fin de evaluar posibles cambios en la calidad química de los aceites.

**Tabla 1:** Aditivaciones realizadas al aceite de nuez (AN).

Tratamiento	Antioxidante
-------------	--------------

---

1	Control
2	TBHQ 200 ppm
3	TBHQ 100 ppm
4	TBHQ 100 ppm + PA 100 ppm
5	PA 100 ppm
6	ER 800 ppm
7	ER 800 ppm + PA 100 ppm
8	ER 800 ppm + TBHQ 100 ppm
9	ER 800 ppm + TBHQ 100 ppm + PA 100 ppm
10	PA 200 ppm
11	ER 800 ppm + PA 200 ppm
12	ER 800 ppm + TBHQ 200 ppm

---

### Métodos analíticos

Se determinaron el índice de peróxidos (IP), grado de acidez (GA), p-anisidina (IA) y la estabilidad oxidativa (Rancimat, tiempo de inducción (TI)) de los aceites según metodología descripta en los métodos oficiales AOCS (2009). La actividad antirradicalaria y la composición ácida de los aceites se evaluaron de acuerdo a Martínez et al. (2008).

### Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las diferencias entre los tratamientos se estimaron mediante análisis de la varianza (ANAVA) y un test a posteriori de comparaciones múltiples (LSD).

### 4. Resultados y discusión:

La composición química del AN obtenido por prensado en frío se muestra en la Tabla 2. Los AN expuestos a la luz mostraron incrementos significativos en IP y TI a lo largo del periodo de almacenamiento. En condiciones de luz, ER y PA resultaron poco eficaces para evitar la formación de compuestos de oxidación primaria. Luego de 180 días de almacenamiento se observó una reducción del 78,2 % en el TI respecto de su valor inicial en el AN control. Los aceites expuestos a la luz también presentaron un incremento significativo del IA, alcanzando valores superiores a 3 luego de 180 días de almacenamiento. Por otra parte, los valores de GA mostraron un leve incremento (0,22 g ácido oleico /100 g aceite) luego de 180 días de almacenamiento, indicando que el AN es estable frente a la degradación hidrolítica, aún en condiciones de exposición a la luz.

En función de la valoración de la actividad antirradicalaria (DPPHr) de las sustancias utilizadas como antioxidantes, los tratamientos se asociaron en tres grupos: tratamientos control, tratamientos aditivados con ER y PA (solos o combinados), tratamientos aditivados con TBHQ (sólo o combinado). Estos últimos presentaron los valores más elevados de DPPHr, confirmando que esta sustancia es un efectivo inhibidor de radicales libres manteniendo su actividad al menos durante un periodo de 6 meses. Dicha actividad no fue afectada por la luz, pero resultó dependiente de la concentración. Los tratamientos adicionados con 100 ppm TBHQ, sólo o en combinación con ER o PA, no se diferenciaron significativamente entre sí demostrando que estas dos últimas sustancias no ejercen un efecto aditivo sobre la actividad antirradicalaria del TBHQ.

Del análisis conjunto de los datos obtenidos surge que la condición lumínica ejerce un efecto significativo sobre la generación de productos de oxidación primarios en el AN. Los aceites adicionados con ER, PA y TBHQ, solos o combinados, cuando fueron almacenados en presencia de luz, no se diferenciaron significativamente del tratamiento control (aceite

sin aditivos), indicando que las sustancias ensayadas fueron poco eficaces para prolongar el periodo de inducción. Estas reacciones de oxidación fotosensibilizadas, al igual que las que ocurren durante la auto-oxidación, conducen a la formación de peróxidos pero, a diferencia de estas últimas, no presentan un periodo de inducción apreciable puesto que no son inhibidas ni retardadas por sustancias inhibitoras de la propagación en cadena de radicales libres, como los antioxidantes añadidos (ER, PA y TBHQ) o los que están presentes naturalmente en el aceite (tocoferoles).

**Tabla 2:** Caracterización del AN

Parámetro	Valor <sup>a</sup>
Distribución de ácidos grasos (% relativo)	
Ácido Palmítico (16:0)	7.20 ± 0.04
Ácido Palmitoleico (16:1)	0.08 ± 0.01
Ácido Esteárico (18:0)	2.14 ± 0.01
Ácido Oleico (18:1)	22.92 ± 0.02
Ácido Linoleico (18:2)	52.40 ± 0.02
Ácido Linolénico (18:3)	15.24 ± 0.03
Tocoferoles Totales (µg/g oil)	289 ± 14.6
Carotenoides (µg/g oil)	0.93 ± 0.25
Clorofilas (µg/g oil)	0.52 ± 0.02

<sup>a</sup> Valores medios ± DE (desvío estándar) n=3

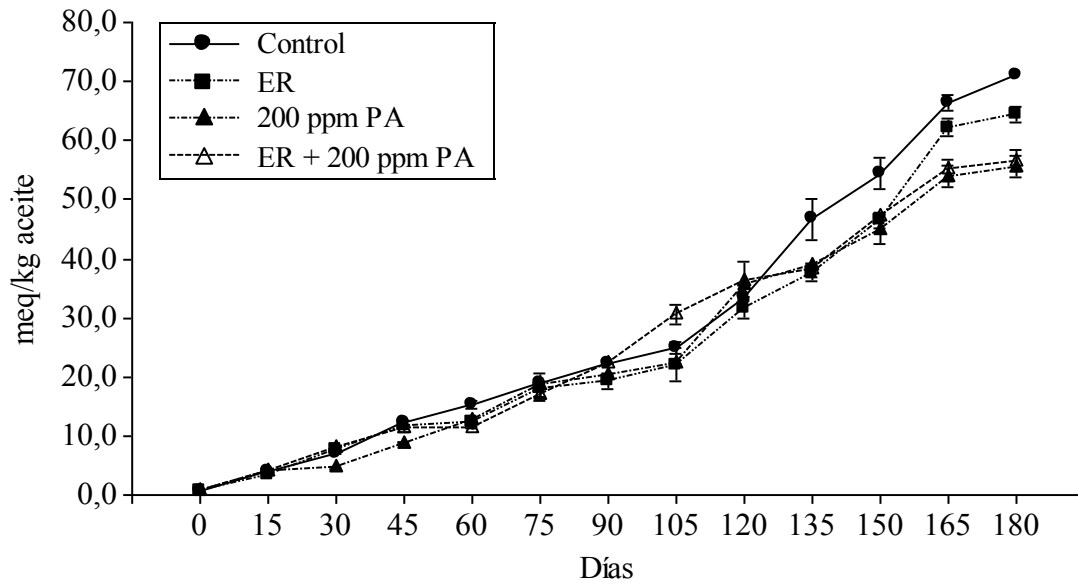
## 5. Conclusiones:

El análisis de la estabilidad del aceite de nuez frente a la foto-oxidación, permitió determinar la eficacia antioxidante de algunas sustancias (ER, PA y TBHQ) bajo condiciones de almacenamiento que simulan las utilizadas en el comercio. Las condiciones de iluminación empleadas (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) promueven rápidamente la formación de productos de oxidación primarios, aún en los aceites aditivados. En consecuencia, los antioxidantes evaluados resultan poco eficaces como inhibidores de oxidación fotosensibilizada en el AN. En ausencia de luz, todos los tratamientos con agregado de antioxidantes fueron igualmente eficaces para inhibir la formación de productos de oxidación durante el periodo de almacenamiento. La valoración de la capacidad antirradicalaria de los aceites aditivados permitió determinar que: a) TBHQ es un efectivo inhibidor de radicales libres en AN, b) su actividad no resulta afectada por la luz, pero es dependiente de la concentración, c) ER y PA no ejercen un efecto aditivo sobre la actividad del TBHQ.

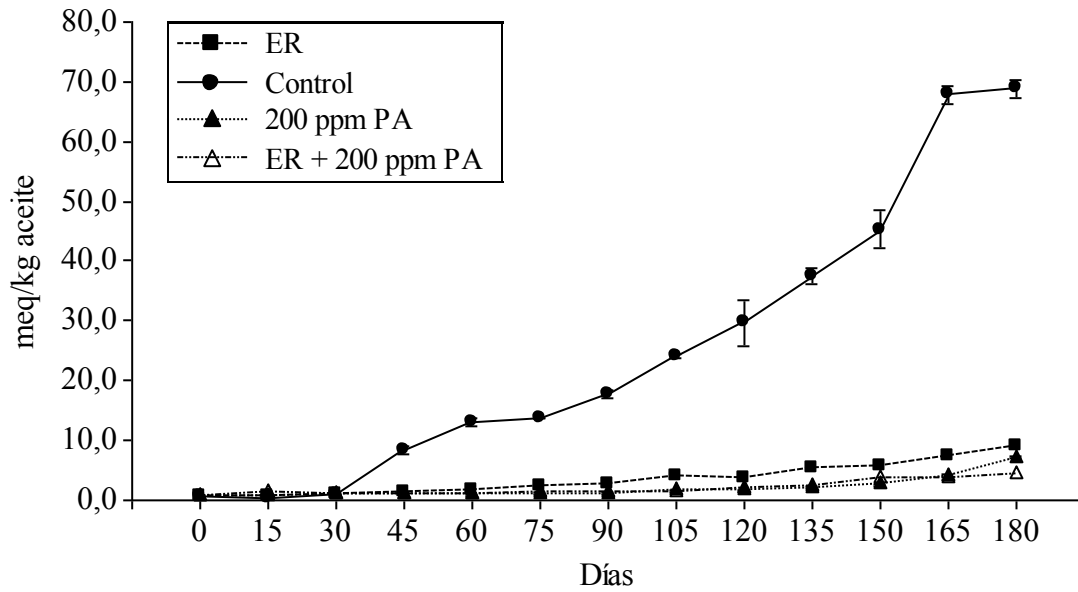
**Tabla 3:** IP (meq/kg aceite) y TI (h) para AN y sus aditivaciones durante el ensayo de almacenamiento.

Tratamientos	Parámetros					
	IP (meq/kg aceite)			TI (h)		
	Tiempo (días)			Tiempo (días)		
	0	90	180	0	90	180
<i>LUZ</i>						
Control	0.55±0.06	22.25 <sup>bcd</sup> ±0.06	70.92 <sup>gh</sup> ±0.01	2.75 <sup>a</sup> ±0.07	1.85 <sup>a</sup> ±0.07	0.60 <sup>a</sup> ±0.14
ER		19.31 <sup>a</sup> ±1.41	64.37 <sup>e</sup> ±1.44	5.35 <sup>bc</sup> ±0.07	2.90 <sup>cd</sup> ±0.14	1.30 <sup>b</sup> ±0.14
ER + 100 ppm PA		22.33 <sup>cd</sup> ±0.01	72.26 <sup>h</sup> ±1.04	6.15 <sup>c</sup> ±0.21	3.15 <sup>d</sup> ±0.21	1.75 <sup>bc</sup> ±0.07
ER + 200 ppm PA		22.29 <sup>bcd</sup> ±0.01	56.54 <sup>bc</sup> ±1.92	6.05 <sup>c</sup> ±0.21	3.15 <sup>d</sup> ±0.21	1.95 <sup>c</sup> ±0.21
ER + 100 ppm TBHQ		25.36 <sup>ef</sup> ±1.46	69.33 <sup>fg</sup> ±2.11	12.10 <sup>d</sup> ±0.57	5.45 <sup>e</sup> ±0.07	3.40 <sup>d</sup> ±0.01
ER + 200 ppm TBHQ		27.03 <sup>f</sup> ±0.01	67.04 <sup>ef</sup> ±0.01	17.10 <sup>e</sup> ±0.01	7.20 <sup>f</sup> ±0.01	4.40 <sup>e</sup> ±0.01
ER + 100 ppm PA + 100 ppm TBHQ		19.21 <sup>a</sup> ±0.06	49.10 <sup>a</sup> ±0.21	12.90 <sup>d</sup> ±0.57	6.65 <sup>f</sup> ±0.49	3.15 <sup>d</sup> ±0.64
100 ppm PA		23.86 <sup>de</sup> ±0.71	59.11 <sup>cd</sup> ±0.90	4.00 <sup>abc</sup> ±0.01	2.35 <sup>ab</sup> ±0.07	1.25 <sup>b</sup> ±0.07
200 ppm PA		20.37 <sup>ab</sup> ±0.04	55.52 <sup>b</sup> ±1.77	3.50 <sup>ab</sup> ±0.01	2.50 <sup>bc</sup> ±0.42	1.55 <sup>bc</sup> ±0.07
100 ppm TBHQ		20.69 <sup>abc</sup> ±0.49	58.53 <sup>cd</sup> ±1.04	10.90 <sup>d</sup> ±2.26	5.20 <sup>e</sup> ±0.28	3.10 <sup>d</sup> ±0.42
200 ppm TBHQ		20.86 <sup>abc</sup> ±0.66	53.86 <sup>b</sup> ±1.03	16.45 <sup>e</sup> ±2.62	8.45 <sup>g</sup> ±0.07	4.75 <sup>e</sup> ±0.07
100 ppm PA + 100 ppm TBHQ		22.43 <sup>cd</sup> ±1.81	59.50 <sup>d</sup> ±0.17	11.90 <sup>d</sup> ±0.42	5.30 <sup>e</sup> ±0.14	3.35 <sup>d</sup> ±0.35
<i>OSCURIDAD</i>						
Control	0.55±0.06	17.69 <sup>e</sup> ±0.66	68.87 <sup>h</sup> ±1.53	3.00 <sup>a</sup> ±0.28	1.80 <sup>a</sup> ±0.28	0.90 <sup>a</sup> ±0.14
ER		2.53 <sup>d</sup> ±0.39	8.97 <sup>f</sup> ±1.13	5.15 <sup>b</sup> ±0.07	4.55 <sup>c</sup> ±0.07	3.45 <sup>cd</sup> ±0.35
ER + 100 ppm PA		1.62 <sup>bcd</sup> ±0.43	5.75 <sup>de</sup> ±0.54	6.50 <sup>c</sup> ±0.28	5.20 <sup>c</sup> ±0.01	4.55 <sup>d</sup> ±0.07
ER+ 200 ppm PA		1.43 <sup>abc</sup> ±0.01	4.50 <sup>bcd</sup> ±0.56	6.25 <sup>bc</sup> ±0.07	5.60 <sup>c</sup> ±0.01	4.60 <sup>d</sup> ±0.28
ER + 100 ppm TBHQ		1.95 <sup>cd</sup> ±0.11	3.19 <sup>abc</sup> ±0.16	11.70 <sup>de</sup> ±0.14	11.95 <sup>d</sup> ±1.06	10.35 <sup>ef</sup> ±0.07
ER + 100 ppm PA + 100 ppm TBHQ		1.71 <sup>bc</sup> ±0.13	4.75 <sup>cd</sup> ±0.47	12.60 <sup>e</sup> ±0.85	11.65 <sup>d</sup> ±0.21	10.00 <sup>ef</sup> ±0.28
100 ppm PA		1.77 <sup>bc</sup> ±0.18	54.11 <sup>g</sup> ±1.52	3.95 <sup>a</sup> ±0.49	3.05 <sup>b</sup> ±0.35	1.35 <sup>ab</sup> ±0.49
200 ppm PA		1.16 <sup>ab</sup> ±0.07	7.20 <sup>e</sup> ±0.33	3.75 <sup>a</sup> ±0.07	3.10 <sup>b</sup> ±0.28	2.70 <sup>bc</sup> ±0.42
100 ppm TBHQ		1.47 <sup>abc</sup> ±0.07	2.31 <sup>a</sup> ±0.06	11.00 <sup>d</sup> ±0.85	12.20 <sup>d</sup> ±1.13	10.80 <sup>f</sup> ±0.57
200 ppm TBHQ		1.31 <sup>ab</sup> ±0.03	2.55 <sup>a</sup> ±0.03	18.25 <sup>f</sup> ±0.78	17.90 <sup>e</sup> ±0.71	16.75 <sup>g</sup> ±1.34
100 ppm PA + 100 ppm TBHQ		1.01 <sup>a</sup> ±0.16	2.86 <sup>ab</sup> ±0.01	11.85 <sup>de</sup> ±0.64	11.45 <sup>d</sup> ±0.49	8.95 <sup>e</sup> ±1.91

Media ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p ≤ 0,05).



**Figura 1:** Evolución del IP (meq/kg aceite) durante el almacenamiento del AN en condiciones de iluminación (800 Lux) y temperatura (25 °C) controladas.



**Figura 2:** Evolución del IP (meq/kg aceite) durante el almacenamiento del AN en condiciones de oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

## **6. Bibliografía:**

AOCS. (2009). Official methods and recommended practices of the AOCS. Champaign, USA.

Decker, E.A., Warner, K., Richards, M.P., Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4303-4310.

Frankel, E.N. (2005). Lipid oxidation. Ed. Barnes & Associates, Bridgwater, England.

Hras, A.R., Hadolin, M., Knez, Z., Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71: 229-233.

Martínez, M.L.; Mattea, M.; Maestri, D.M. (2008). Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *J. Food Eng.* 88: 399-404.

McMullen, L.M., Hawrysh, Z.J., Lin, C., Tokarska, B. (1991). Ascorbyl palmitate efficacy in enhancing the accelerated storage stability of canola oil. *Journal of Food Science*, 56 (6): 1651-1659.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 752-767.