



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Implementación de un método de análisis de la estabilidad oxidativa de margarinas y mejora de la misma mediante adición de productos vegetales

Alumno: Jessica Mura

Tutores: Dra. Gloria Maria Castellano Estornell y Dra. Irene Sarrión Sos

Curso académico: 2019-2020 CAUR septiembre



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Oxidación de lípidos alimentarios.....	1
1.1. ¿Qué son los lípidos?.....	1
1.2. Los AGP en sistemas alimentarios.....	3
1.3. Problema de la oxidación de ácidos grasos en productos alimenticios.....	4
1.4. Características generales de las emulsiones.....	7
1.5. Estabilidad oxidativa en emulsiones alimentarias.....	8
1.6. Las margarinas y su estabilidad oxidativa.....	8
1.7. Productos secundarios de oxidación y posibles efectos tóxicos en el organismo.....	10
2. Antioxidantes procedentes de especies vegetales y estabilidad oxidativa.....	12
2.1. Antioxidantes sintéticos y consecuencias para la salud humana.....	12
2.2. Compuestos fenólicos: antioxidantes de origen natural.....	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
3.1. Hipótesis de partida.....	15
3.2. Objetivos.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1. Plan de trabajo.....	17
4.2. Fundamento del método: test de Rancimat.....	18
4.3. Material.....	20
4.4. Parte experimental.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1. Estudio de la cantidad óptima de margarina.....	25
5.2. Influencia del contenido de agua en la evaluación del IP mediante el test de Rancimat.....	27
5.3. Estudio de la estabilidad oxidativa de margarinas con diferente composición a distintas temperaturas de ensayo.....	29
5.4. Estudio del efecto antioxidante de <i>C.longa</i> y <i>R.officinalis</i> sobre el tiempo de inducción.....	33
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

AGRADECIMIENTOS

Después de un intenso período de siete meses, hoy es el día: escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi trabajo de fin de grado. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, pero también a nivel personal. Escribir este trabajo ha tenido un gran impacto en mi y es por eso que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante este proceso.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis tutoras, la Dra. Gloria Castellano y la Dra. Irene Sarrión, por el enorme apoyo demostrado durante la realización de este trabajo. Me gustaría agradecer vuestra ayuda y vuestros valiosos consejos, definitivamente me habéis dado todas las herramientas necesarias para completar mi trabajo de fin de grado satisfactoriamente.

También me gustaría agradecer a mis padres, Mario y Alba, por sus sabios consejos y mi hermano, Giovanni. Se sono quí oggi é grazie a voi, grazie al vostro appoggio, grazie ai vostri consigli e grazie alla vostra costante presenza in questo percorso non sempre facile. Mi avete dato la forza di superare momenti difficili con il vostro amore. Grazie per tutto quello che avete fatto per me, grazie per tutti i sacrifici, grazie di esistere. Siete la mia vita!

Alla mia Piccolina, che fino alla fine ha creduto in me e mi ha accompagnato in questo percorso di vita.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura tridimensional de los ácidos grasos saturados (ácido mirístico) e insaturados ω 3 (ácido alfa-linolénico, ALA), ω 6 (ácido linoleico, LA) y ω 9 (ácido oleico, OA).

Figura 2. Principales factores responsables de la oxidación en lípidos.

Figura 3. Proceso de peroxidación lipídica. En la Iniciación, los prooxidantes extraen el hidrógeno formando el radical lipídico; el radical carbono tiende a estabilizarse mediante un reordenamiento molecular para formar un dieno conjugado (1). Durante la fase de propagación, el radical lipídico reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peroxi lipídico (2) que extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica y genera un nuevo radical lipídico e hidroperóxido lipídico (3). En la reacción de terminación, los antioxidantes donan un átomo de hidrógeno a las especies de radicales peroxi lipídicos que dan como resultado la formación de productos no radicales (paso 4) (Ayala, A. *et al.*, 2014).

Figura 4. Formación y descomposición de los hidroperóxidos. La formación de productos secundarios empieza durante la fase de propagación de la cadena y aumenta en la fase de oxidación secundaria proporcionalmente a la descomposición de los hidroperóxidos.

Figura 5. Test de Rancimat. Izquierda: diagrama esquemático del aparato (892 Professional Rancimat Manual, 2017). Derecha: imagen real del Rancimat 892 utilizado para el experimento.

Figura 6. Separador de aceite conectado al recipiente de reacción. El separador de aceite reduce la cantidad de aceite contenida en la fase gaseosa.

Figura 7. Gráfica de barras correspondiente a la variación del tiempo de inducción (IP) frente a los gramos de margarina utilizada para el ensayo. Los resultados se presentan como media \pm SD.

Figura 8. IP de las muestras de margarina Tulipán sometidas a distintos tratamientos: control (sin supresión y sin separador de aceites), supresión de 1,5 h, y supresión de 1,5 h más el separador de aceites. Los resultados se presentan como media \pm SD.

Figura 9. Variación del IP de la muestra Tulipán (curva amarilla) e IP de la muestra Naturlí (curva roja) a 120, 110, 100 y 90 \pm 1,6°C, con un flujo de aire de 20 L/h. Los resultados se presentan como media \pm SD.

Figura 10. Arriba: contenido en AGS/AGI (g) del aceite de maíz y de las margarinas Tulipán y Naturlí utilizadas en el presente estudio. Los valores corresponden a los gramos contenidos en 100 g de muestra. Abajo: variación del IP(h) en relación con los porcentajes entre AGS/AGI del aceite de maíz y de las margarinas Tulipán y Naturlí. Los resultados se expresan como media \pm SD.

Figura 11. Comparativa entre la eficacia antioxidante de la cúrcuma y romero en margarinas a diferentes temperaturas (90, 100, 110, 120°C). Los resultados se presentan como media \pm SD.

Figura 12. Estudio del contenido de fenoles totales (mg GAE/g) de *C. longa* y *R. officinalis*. Los resultados de los IP (h) se presentan como media \pm SD.

Figura 13. Estudio de la capacidad antioxidante (μ M Fe²⁺/g) de *C. longa* y *R. officinalis*. Los resultados de los IP (h) se presentan como media \pm SD.

Figura 14. Incremento del IP (h) en la margarina Tulipán y en el aceite de maíz mediante tratamiento con *C. longa* y *R. officinalis*. Los resultados de los IP se presentan como media \pm SD.

Tabla 1. Ejemplos de ácidos grasos comunes en la alimentación. Se muestra el nombre común, el número de carbonos y de dobles enlaces, la nomenclatura química y posibles fuentes de obtención.

Tabla 2. Antioxidantes más utilizados en la UE. IDA, ingesta diaria admisible.

Tabla 3. Ficha técnica de las margarinas utilizadas.

Tabla 4. Ficha técnica de las especias utilizadas.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal (4-hidroxinonenal)

AG, ácidos grasos

AGI, ácidos grasos insaturados

AGM, ácidos grasos monoinsaturados

AGP, ácidos grasos poliinsaturados o **UFA**, (unsaturated fatty acid)

AGS, ácidos grasos saturados o **SFA**, (saturated fatty acid)

ALA, α -linolenic acid (ácido alfa-linolénico)

ARA, arachidonic acid (ácido araquidónico)

BHA, butylate dhydroxyanisole (butilhidroxianisol)

BHT, butylate dhydroxytoluene (butilhidroxitolueno)

DHA, docosahexaenoic acid (ácido docosahexaenoico)

EE.UU., Estados Unidos de América

EOR, especies reactivas de oxígeno

EPA, eicosapentaenoic acid (ácido eicosapentaenoico)

IDA, ingesta diaria admisible.

IP, induction period (período de inducción) o **OSI**, oxidative stability index (índice de estabilidad oxidativa)

LA, linoleic acid (ácido linoleico)

MDA, malondialdehyde (malondialdehído)

OA, oleic acid (siglas en inglés)

OW, oil in water emulsion (emulsión de aceite en agua)

WO, wáter in oil emulsion (emulsión de agua en aceite)

R•, radical libre o alquilo

RH, sustrato lipídico

ROO•, peróxidos de alquilo

ROOH, hidroperóxidos

SD, standard deviation (desviación estándar)

TAG, triacilglicéridos

UE, Unión Europea

RESUMEN

La oxidación lipídica es el principal proceso de deterioro de los aceites y grasas que afecta negativamente en el sabor de los alimentos y su valor nutricional. Recientes estudios llevados a cabo en aceites, demuestran que la estabilidad oxidativa de los mismos depende del tipo y proporción de ácidos grasos que contienen y también de otros factores que favorecen su estabilidad, como los antioxidantes. Por ello, se han realizado muchos estudios de análisis de estabilidad oxidativa de aceites a diferentes temperaturas midiendo el tiempo de inducción. En esta investigación, se realizó un estudio de implementación de un método de análisis de estabilidad oxidativa de margarinas, que resultan ser emulsiones W/O. El estudio de las margarinas presenta mayor dificultad puesto que la presencia de agua interfiere en el análisis. Por ello, fue necesario optimizar la cantidad de margarina de la muestra, las temperaturas de trabajo, la adaptación del equipo, etc. Se realizó un análisis de dos margarinas de diferente composición en ácidos grasos a 90, 100, 110 y 120 \pm 1,6 °C. Además, se decidió completar la investigación con el estudio de la estabilidad oxidativa de la margarina como respuesta a la adición de dos especias diferentes (*R. officinalis* y *C. longa*) mediante el test de Rancimat.

Los resultados obtenidos, mostraron que la cantidad de margarina óptima a la hora de trabajar con el Rancimat resultó ser de 3,0 \pm 0,001 g, para una temperatura de 120 \pm 1,6°C y un flujo de aire de 20 L/h y que la activación del parámetro de supresión 1,5 h junto con el uso del separador de aceites es esencial para una correcta evaluación del IP. Además, el estudio llevado a cabo con dos margarinas de diferente composición en AGS/AGI demostró como la estabilidad oxidativa en margarinas con mayor contenido en AGS, es significativamente mayor con respecto a margarinas que presentan menor porcentaje de estos. El tiempo que tardó en oxidarse la muestra Naturlí, con un 26% AGS y un 45% AGI (10,415 \pm 0,45 h), fue significativamente más alto que el respectivo a la misma temperatura de la muestra Tulipán (3,65 \pm 0,20 h), con un 15% AGS y 41% AGI. Se completó la presente investigación a través el estudio de la estabilidad oxidativa de la margarina como repuesta al tratamiento con cúrcuma y romero. El romero mostró la máxima eficacia antioxidante en comparación con la cúrcuma. El mayor incremento se mostró a 120 y 110 \pm 1,6 °C con un aumento de 2,25 \pm 0,20 h y 2,54 \pm 0,27 h con respecto a la margarina control.

PALABRAS CLAVE: antioxidante, emulsiones, grasa, oxidación lipídica, margarina, aceite, estabilidad oxidativa, Rancimat, romero, cúrcuma, AGS, AGI.

ABSTRACT

Lipid oxidation is the main process of deterioration of oils and fats that negatively affects the taste of food and its nutritional value. Recent studies carried out on oils, show that their oxidative stability depends on the type and proportion of fatty acids they contain and also on other factors that favor their stability, such as antioxidants. For this reason, many studies have been carried out analyzing the oxidative stability of oils at different temperatures by measuring the induction time. In this research, an implementation study of an oxidative stability analysis method of margarines was carried out, which turn out to be W / O emulsions. The study of margarines is more difficult since the presence of water interferes with the analysis. Therefore, it was necessary to optimize the amount of margarine in the sample, the working temperatures, the adaptation of the equipment, etc. An analysis was made of two margarines of different composition in fatty acids at 90, 100, 110 and 120 ± 1.6 °C. In addition, it was decided to complete the investigation with the study of the oxidative stability of margarine in response to the addition of two different spices (rosemary and turmeric) through the Rancimat test.

The results obtained showed that the optimum margarine quantity when working with the Rancimat was 3.0 ± 0.001 g, for a temperature of 120 ± 1.6 °C and an air flow of 20 L / h and that the activation of the 1.5 h suppression parameter together with the use of the oil separator, is essential for a correct evaluation of the IP. In addition, the study carried out with two margarines of different composition in SFA / UFA demonstrated how the oxidative stability in margarines with higher content in SFA, is significantly higher with respect to margarines that present lower percentage of these. The time it took to oxidize the Naturlí sample, with 26% SFA and 45% UFA ($10,415 \pm 0,45$), was significantly higher than the respective one at the same temperature of the Tulipán sample ($3,65 \pm 0, 20$ h), with 15% SFA and 41% UFA. The present investigation was completed through the study of the oxidative stability of margarine as a response to the treatment with turmeric and rosemary. Rosemary showed maximum antioxidant efficacy compared to turmeric. The greatest increase was shown at 120 and 110 ° C with an increase of 2.25 ± 0.20 h and 2.54 ± 0.27 h compared to the control margarine.

KEY WORDS: antioxidant, emulsions, fat, lipid oxidation, margarine, oil, oxidative stability, Rancimat, rosemary, turmeric, SFA, UFA.

INTRODUCCIÓN

1. Oxidación de lípidos alimentarios

1.1. ¿Qué son los lípidos?

Un lípido es una molécula la cual es insoluble en solventes polares como el agua y soluble en solventes orgánicos, como son el cloroformo o el metanol (Moss, G. P. *et al.*, 1995).

La clasificación de los lípidos resulta ser problemática debido a la heterogeneidad que presenta este grupo respecto a sus características. En general, se pueden dividir en dos clases principales: lípidos saponificables y no saponificables. Los lípidos saponificables contienen ácidos grasos carboxílicos de cadena larga, que están vinculados a un grupo funcional alcoholico a través de un enlace éster y pueden sufrir reacciones de saponificación (hidrólisis en condiciones básicas).

Los lípidos saponificables se dividen en dos grupos: simples y complejos. Los lípidos simples (ceras, grasas y aceites) contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, mientras que los complejos (fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos), también contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre o biomoléculas como por ejemplo los glúcidos (fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos).

Los lípidos insaponificables por el contrario, al no contener enlaces ésteres en su estructura molecular, no pueden producir reacciones de saponificación (terpenos, esteroides, prostaglandinas) (Stoker, H.S., 2011).

Los ácidos grasos (AG) (tabla 1) son ácidos carboxílicos compuestos por una cadena alifática y se pueden presentar de forma saturada (sin dobles enlaces) o insaturada (con uno o más dobles enlaces). Pueden presentar cadenas cortas y medias, que varían entre los 4 y 14 carbonos de longitud, y cadenas más largas, con más de 14 carbonos de longitud (Gil, 2013). Los ácidos grasos saturados (AGS) son más comunes en los animales. Tienen un punto de fusión más elevado que sus homólogos insaturados por lo que son sólidos a temperatura ambiente. Algunos ejemplos de AGS pueden ser el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido mirístico o el ácido lignocérico.

Tabla 1. Ejemplificación de ácidos grasos comunes en la alimentación. Se muestra el nombre común, el número de carbonos y de dobles enlaces, la nomenclatura química y las posibles fuentes de obtención.

Ácidos Grasos Comunes				
Nombre común	Carbonos	Enlaces dobles	Nomenclatura química	Fuentes
Ácido Butírico	4	0	Ácido butanoico	Mantequilla
Ácido Caproico	6	0	Ácido hexanoico	Mantequilla
Ácido Caprílico	8	0	Ácido octanoico	Aceite de coco
Ácido Cáprico	10	0	Ácido decanoico	Aceite de coco
Ácido Láurico	12	0	Ácido dodecanoico	Aceite de coco
Ácido Mirístico	14	0	Ácido tetradecanoico	Aceite de palmiste
Ácido Palmítico	16	0	Ácido hexadecanoico	Aceite de palma
Ácido Palmitoleico	16	1	Ácido 9-hexadecenoico	Grasas animales
Ácido Esteárico	18	0	Ácido octadecanoico	Grasas animales
Ácido Oleico	18	1	Ácido 9-octadecenoico	Aceite de oliva
Ácido Ricinoleico	18	1	Ácido 12-hidroxi- 9-octadecenoico	Aceite de ricino
Ácido Vaccénico	18	1	Ácido 11-octadecenoico	Mantequilla
Ácido Linoleico	18	2	Ácido 9,12-octadecadienoico	Aceite de semilla de uva

Las grasas saturadas son triglicéridos formados por tres moléculas de ácidos grasos saturados y una molécula de glicerol. Los ácidos grasos insaturados (AGI) se denominan monoinsaturados (AGM) cuando contienen un doble enlace por molécula (p. ej. ácido oleico), y poliinsaturados (AGP) cuando contienen más de un doble enlace (p. ej. ácido linoleico).

Tanto los AGM como los AGP pueden clasificarse en familias dependiendo de la posición del doble enlace en el extremo del terminal metilo. Las familias más comunes presentes en los alimentos son los ácidos grasos ω 3, ω 6 y ω 9 (fig.1). Además, la configuración de cada doble enlace en un AGI puede tomar dos conformaciones (isómeros): la forma predominante que ocurre naturalmente es *cis*, en la que ambos

átomos de hidrógeno están en el mismo lado de la cadena; o bien, puede ocurrir un isómero *trans*, en el que los átomos de hidrógeno están ubicados en lados opuestos del doble enlace.

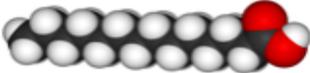
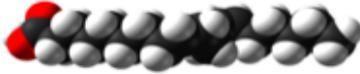
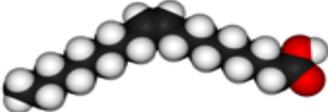
<p><i>Ácidos grasos saturados</i></p> 	<p><i>Ácido mirístico (C14:0)</i></p>
<p><i>Ácidos grasos insaturados</i></p> 	<p><i>Ácido alfa-linolénico (ALA)</i> <i>18:3 ω3</i></p>
	<p><i>Ácido linoleico (LA)</i> <i>C18:2 ω6</i></p>
	<p><i>Ácido oleico (OA)</i> <i>18:1 ω9</i></p>

Figura 1. Estructura tridimensional de los ácidos grasos saturados (ácido mirístico) e insaturados ω3 (ácido alfa-linolénico, ALA), ω6 (ácido linoleico, LA) y ω9 (ácido oleico, OA).

1.2. Los AGP en sistemas alimentarios

Los lípidos son un componente importante de los alimentos y de la mayoría de los sistemas biológicos, además de ser utilizados en una amplia serie de aplicaciones industriales. Sirven como una fuente de condensación de energía y constituyen los componentes estructurales principales de las membranas celulares, a la vez que funcionan como importantes agentes de señalización en los sistemas biológicos. Los lípidos en los productos alimenticios, ya sean naturales u agregados de forma exógena, proporcionan un medio de transferencia de calor idóneo para el procesamiento de

alimentos y dan una textura y sabor deseables a los productos (Vallerio Rios, R. *et al.*, 2014).

Los AGI desempeñan funciones importantes como componentes y nutrientes de los alimentos y contribuyen a sus propiedades sensoriales, como la textura y el sabor. Dentro de los AGI cabe destacar la importancia de los AGP, con particular atención a aquellos ácidos grasos definidos esenciales (AGE), como el ácido linoleico (LA, por su sigla en inglés) (n-6) y el ácido α -linolénico (ALA) (n-3), que al no poder ser sintetizados por el organismo, necesitan ser aportados externamente con la dieta. En el cuerpo humano, estos ácidos grasos dan lugar a diferentes lípidos como: el ácido araquidónico (ARA, n-6), el ácido eicosapentaenoico (EPA, n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA, n-3) y a lípidos de señalización bioactivos llamados eicosanoides, que desempeñan un papel clave en la regulación de diferentes procesos homeostáticos del cuerpo. En general, el ARA da lugar a eicosanoides proinflamatorios, mientras que el EPA y el DHA dan lugar a los eicosanoides antiinflamatorios. Muchos estudios demuestran como un consumo constante y proporcionalmente correcto de AGP n-3 y n-6 puede protegernos contra enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas (Akadiri, Y. *et al.*, 2015; Bazinet, R.P. *et al.*, 2014; Calder, PC, 2015; Dennis, E.A. *et al.*, 2015; Del Gobbo, L.C. *et al.*, 2016; DiNicolantonio *et al.*, 2017; Fredman, G. *et al.*, 2017; Kevin, L Fritsche, 2015).

1.3. Problema de la oxidación de ácidos grasos en productos alimenticios

Para abordar algunos de los principales problemas de salud actuales y seguir las recomendaciones nutricionales más recientes, en los últimos años ha sido siempre más creciente la incorporación adicional de AGP en los alimentos (Ganesan, B *et al.*, 2014). Sin embargo, muchos estudios demuestran que la estabilidad oxidativa de alimentos que contienen grasas depende del tipo y proporción de AG que componen sus triglicéridos, cuanto mayor es la saturación de los ácidos grasos, mayor es su estabilidad (Siefarth, C. *et al.*, 2014; Tao, L., 2015). Por ello, la velocidad de oxidación depende del grado de insaturación y aumenta con el aumento del doble enlace de los AG.

Los productos de oxidación de lípidos tienen propiedades mutagénicas, carcinogénicas y citotóxicas y se consideran factores de riesgo para la salud humana (Hosseini, H *et al.*, 2016). Estos metabolitos causan problemas de salud graves, como el crecimiento de células tumorales a través de la peroxidación lipídica, ya que los hidróxidos de los ácidos grasos son citotóxicos.

Se reconocen diferentes factores responsables de la oxidación de los lípidos en alimentos (fig. 2): la oxidación, la hidrólisis de triglicéridos y la alteración térmica (Ayala, A. *et al.*, 2014; Budilarto, E.S. *et al.*, 2015).

1. Oxidación:

- La autooxidación es el proceso espontáneo provocado por un agente iniciador,

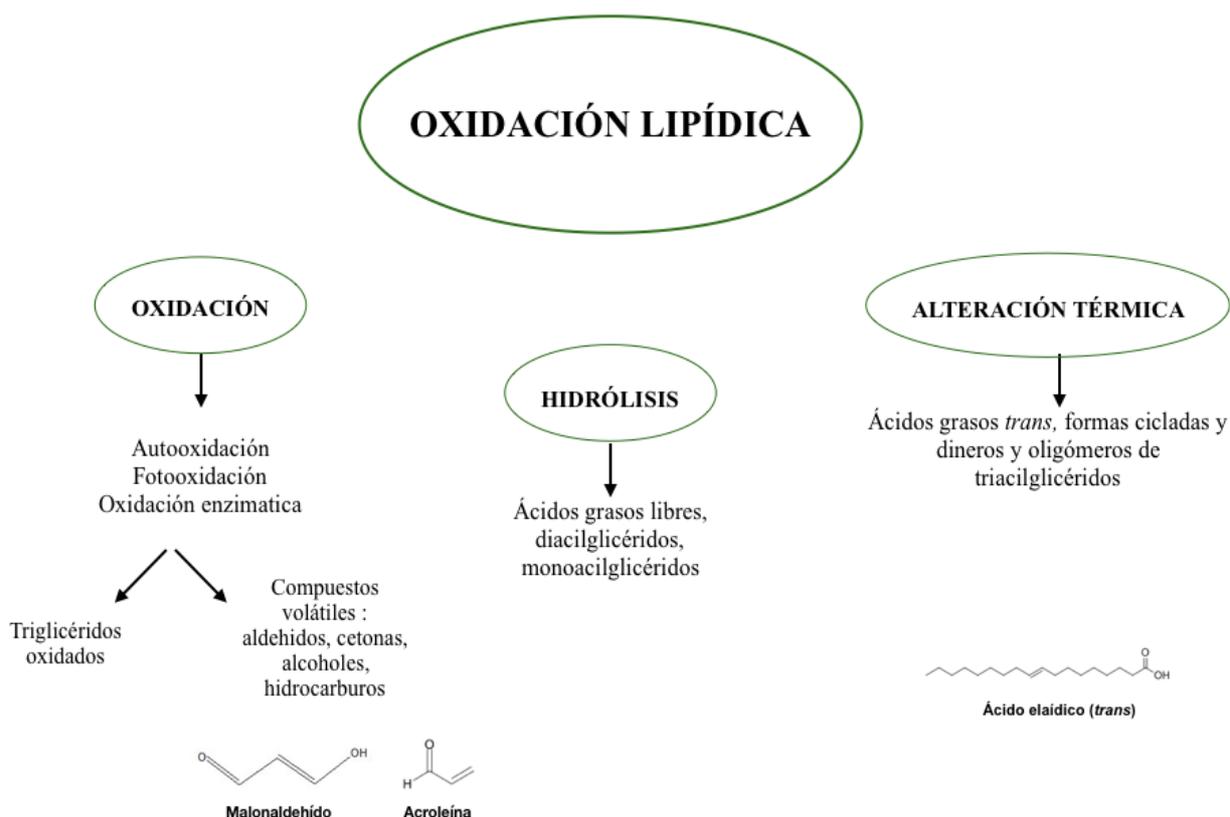


Figura 2. Principales factores responsables de la oxidación en lípidos.

(EOR), que atacan a los ácidos grasos insaturados produciendo compuestos que generan la llamada rancidez oxidativa. El esquema clásico de autooxidación (fig.3) de lípidos procede a través de una cadena compleja de reacciones, que generalmente se separa en las etapas de iniciación, propagación y terminación. Cuando el sustrato lipídico (RH) se expone al iniciador, este elimina un átomo de H del ácido, que se transforma en radical libre o alquilo (R•). La fase de propagación, ocurre cuando un nivel crítico de R• reacciona con el oxígeno para generar una reacción en cadena y producir peróxidos de alquilo (ROO•). Los ROO• reaccionan aún más con nuevas moléculas de sustrato para generar hidroperóxidos (ROOH) y más radicales libres. Los peróxidos lipídicos son relativamente estables pero se

descomponen rápidamente en presencia de calor o en presencia de iones de metales de transición. En la última etapa, la reacción de terminación, los antioxidantes donan un átomo de hidrógeno a las especies de radicales peroxi lipídicos que dan como resultado la formación de productos no radicales.

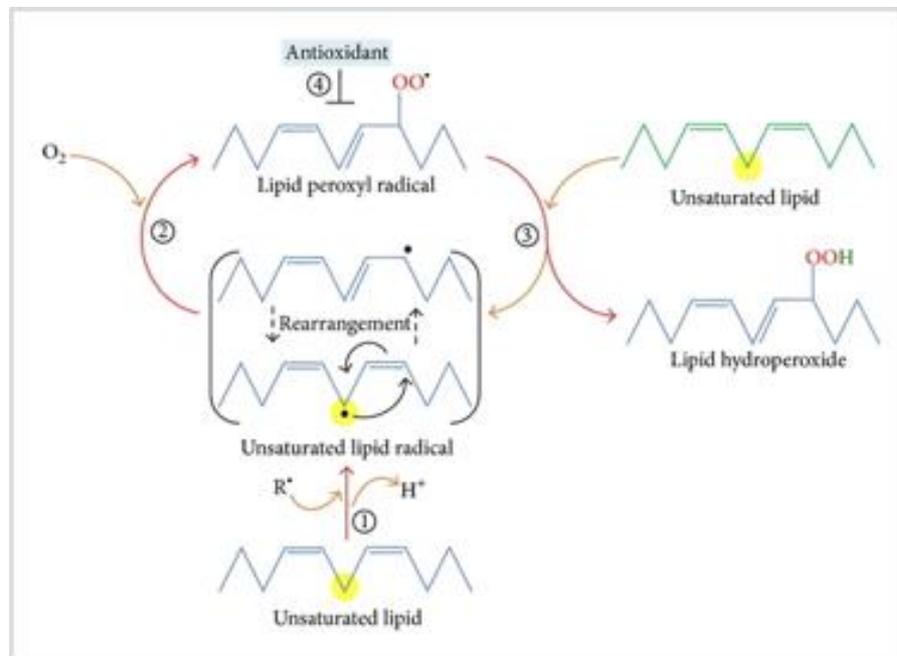


Figura 3. Proceso de peroxidación lipídica. En la Iniciación, los prooxidantes extraen el hidrógeno formando el radical lipídico; el radical carbono tiende a estabilizarse mediante un reordenamiento molecular para formar un dieno conjugado (1). Durante la fase de propagación, el radical lipídico reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peroxi lipídico (2) que extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica y genera un nuevo radical lipídico e hidroperóxido lipídico (3). En la reacción de terminación, los antioxidantes donan un átomo de hidrógeno a las especies de radicales peroxi lipídicos que dan como resultado la formación de productos no radicales (paso 4) (Ayala, A. *et al.*, 2014).

- La fotooxidación es una reacción de un doble enlace con oxígeno en presencia de luz y de un “sensibilizador” adecuado. Esta se debe a los radicales libres producto de la irradiación con luz UV, la cual cataliza la descomposición de los hidroperóxidos, peróxidos, compuestos carbonílicos u otros complejos de oxígeno de lípidos insaturados. La fotooxidación proporciona una importante manera de producir hidroperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados y ésteres con la presencia de oxígeno, energía luminosa y un fotosensibilizador. Los pigmentos en los alimentos pueden servir como fotosensibilizadores al absorber la luz visible o casi UV para poder excitarse electrónicamente. Los pigmentos que propician la

oxidación fotosensibilizada en alimentos incluyen la clorofila, las hemoproteínas y la riboflavina (Mukhtiar, A. *et al.*, 2016).

- La oxidación enzimática de los lípidos en los aceites y grasas es causada principalmente por las lipoxigenasas. Las lipoxigenasas de los alimentos pueden incorporar oxígeno en los ácidos grasos para producir hidroperóxidos, por lo que pueden iniciar las primeras etapas del proceso de oxidación.

2. Hidrólisis de los triacilglicéridos

Implica la descomposición de los triglicéridos en presencia de agua. Produce monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol, eventualmente. La hidrólisis es preferible en aceites con ácidos grasos cortos e insaturados que los ácidos grasos largos y saturados. Por ejemplo, el aceite de coco contiene altos niveles de ácidos grasos con menos de la longitud de la cadena de carbono C14 y provoca la hidrólisis de los triacilglicéridos (TAG) (Gertz, C., 2014). El grado de hidrólisis también depende de la temperatura del aceite, el área de contacto entre el aceite y la fase acuosa, las cantidades de agua y vapor.

3. Alteración térmica

Se generan ácidos grasos *trans*, formas cicladas, y dímeros y oligómeros de triacilglicéridos. Este proceso se estimula con la temperatura.

1.4. Características generales de las emulsiones

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles, uno disperso en la otra en forma de gotitas esféricas. Convencionalmente, las emulsiones se clasifican como emulsiones de aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés), en las que el aceite forma la fase dispersa y el agua forma la fase continua (p. ej., leche y salsas), y emulsiones de agua en aceite (W/O), en las que el agua forma la fase dispersa y el aceite forma la fase continua (p. ej., mantequilla y margarinas) (McClements, D.J. *et al.*, 2017). Una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable debido a la energía libre positiva necesaria para aumentar el área de superficie entre las fases de aceite y agua.

Con el tiempo, las emulsiones tienden a separarse en un sistema que consiste en una capa de aceite sobre una capa de agua. Para formar emulsiones que son cinéticamente estables durante un período de tiempo razonable (unas pocas semanas, meses o años), se utilizan sustancias químicas conocidas como emulsionantes. Los emulsionantes comúnmente utilizados en aplicaciones alimentarias incluyen surfactantes de bajo peso

molecular, proteínas, fosfolípidos, polisacáridos y sus derivados. La elección de un emulsionante específico para una aplicación particular es fundamental para crear productos exitosos, y depende de la formulación del producto, las condiciones de procesamiento y las propiedades finales deseadas (McClements, D.J., 2017).

1.5. Estabilidad oxidativa en aceites y en emulsiones alimentarias

La oxidación de los lípidos ha sido ampliamente estudiada en grasas y aceites, y ahora existe una comprensión bastante buena de los factores que afectan la oxidación en tales sistemas. En una tesis doctoral llevada a cabo por miembros del grupo de investigación que dirigen este proyecto realizó el estudio comparativo de la composición de 22 aceites vírgenes y refinados, en relación con la estabilidad oxidativa, midiendo el periodo de inducción (IP, por sus siglas en inglés) de los mismos y se demostró mediante un análisis multifactorial que el IP depende del contenido de AGS, AGM y AGP según la ecuación 1 (Redondo, L. *et al.*, 2018):

$$\mathbf{IP = -904 + 9.49 [SFA] + 9.16 [MUFA] + 8.94 [PUFA], r^2 = 0.670} \quad (1)$$

Sin embargo, la comprensión de los factores que afectan la oxidación lipídica en determinados tipos de sistemas como las emulsiones alimentarias son todavía bastante pobres considerando la gran cantidad de alimentos que consisten total o parcialmente en emulsiones (leche, crema, queso, mayonesa, margarina, mantequilla, helados, sopas, salsas, licores de crema, alimentos para bebés *etc.*). Cuando se agregan AGP a los alimentos, las reacciones de oxidación pueden verse afectadas por muchos factores diferentes relacionados con la composición, el procesamiento y la estructura física resultante del sistema alimentario (Jacobsen, C., 2015).

1.6. Las margarinas y su estabilidad oxidativa

- Margarinas

Las margarinas son emulsiones de aceites vegetales refinados con agua. Suelen contener un aceite vegetal o mezclas de aceites vegetales de palma, soja, girasol, maíz, oliva, linaza o coco, en combinaciones variadas.

Según el artículo 6 de la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de grasa comestible (vegetales y animales), margarinas, minarinas y preparados grasos, publicado en el BOE 1 junio 1981. La margarina se define como una emulsión plástica del tipo agua en aceite, obtenida principalmente de

la leche, con un porcentaje mínimo de grasa del 80% y un contenido máximo de agua del 16%.

Los principales componentes de las margarinas son: sal, emulgentes, vitaminas liposolubles añadidas (A, B y D), colorantes naturales (caroteno, betacaroteno, curcumina y anato), conservantes o antioxidantes (sorbato de potasio, benzoato sódico) y esteroides.

- **Estabilidad oxidativa**

La estabilidad oxidativa de las margarinas depende, además, de factores externos como la temperatura, la exposición a la luz, el contacto con el oxígeno y el tipo y proporción de AG que componen sus triglicéridos. Además, al ser una emulsión, es importante considerar su contenido de agua a la hora de evaluar los factores responsables de la oxidación, debido a que la fase acuosa promueve la formación de reacciones de hidrólisis.

Diferentes estudios han enfatizado notablemente que la región interfacial, que es la región de contacto entre la fase oleaginosa y la fase acuosa, representa un área particularmente crítica en el sistema con respecto al desarrollo de la oxidación de lípidos. Esta suposición se basa en la capacidad observada de factores como el tamaño de las gotitas de aceite (y, por lo tanto, el área interfacial) o el tipo de emulsionante (y, por lo tanto, la composición interfacial) para afectar sustancialmente la oxidación de lípidos en las emulsiones. Sin embargo, se pueden encontrar muchas contradicciones con respecto al papel de la interfaz en la literatura relacionada, que puede atribuirse a la complejidad estructural de los sistemas de emulsión, al comportamiento complejo y la partición de los compuestos anfifílicos. La oxidación de lípidos en aceites y en emulsiones O/W se describe en muchas publicaciones (Miyagawa, Y. *et al.*, 2017; Katsuki, K *et al.*, 2017; Yukihiro, Y. *et al.*, 2018).

No obstante, la información sobre la oxidación de lípidos en emulsiones de tipo W/O como las margarinas o sistemas dispersivos como mezclas de grasas no es suficiente (Pokorná, I. *et al.* 2004). Varios estudios muestran que la cinética de las reacciones oxidativas en aceites y en lípidos emulsionados difiere mucho. En los alimentos, dependiendo de la composición y temperatura de almacenamiento, los lípidos pueden existir, en fase líquida, sólida o en diferentes relaciones sólido/líquido. Además, a temperaturas de almacenamiento bajo cero, puede ocurrir la cristalización del agua además de la de los lípidos (Chiranjib, B. *et al.*, 2017). Aunque en los últimos años han habido avances significativos, todavía hay muchas preguntas con respecto a la oxidación de los lípidos en los sistemas emulsionados. Por ejemplo, el impacto de la fase acuosa dispersa sobre la velocidad y los mecanismos de oxidación de los AGP es

controvertido. Algunos estudios demostraron que la velocidad de oxidación en emulsiones W/O era similar a la de los aceites. En contraste, otros estudios revelaron que incluso una pequeña cantidad de agua dispersada en aceite de oliva crudo afecta al proceso de oxidación (McClements, D.J., 2017).

1.7.Productos secundarios de oxidación y posibles efectos tóxicos en el organismo

Durante la oxidación de los lípidos, se producen simultáneamente varias reacciones de descomposición de los peróxidos (fig.4), lo que conduce a la formación de una mezcla compleja de productos de reacción, como aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos, que son responsables de las propiedades físico-químicas características de los aceites oxidados (Tiroshet *al.*, 2015). El desarrollo de sabores y olores desagradables son característicos de una condición conocida como "rancidez oxidativa". Cantidades muy pequeñas de productos de degradación pueden tener un efecto muy significativo sobre el olor de una grasa o de una matriz que la contenga. Los diferentes aldehídos que pueden formarse como productos secundarios durante la peroxidación de lípidos son, el malondialdehído (MDA), el propanal, el hexanal y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), los cuales han sido estudiados ampliamente por su elevada toxicidad. El proceso de autooxidación da lugar también a componentes orgánicos volátiles de bajo peso molecular, como el ácido acético y el ácido fórmico.

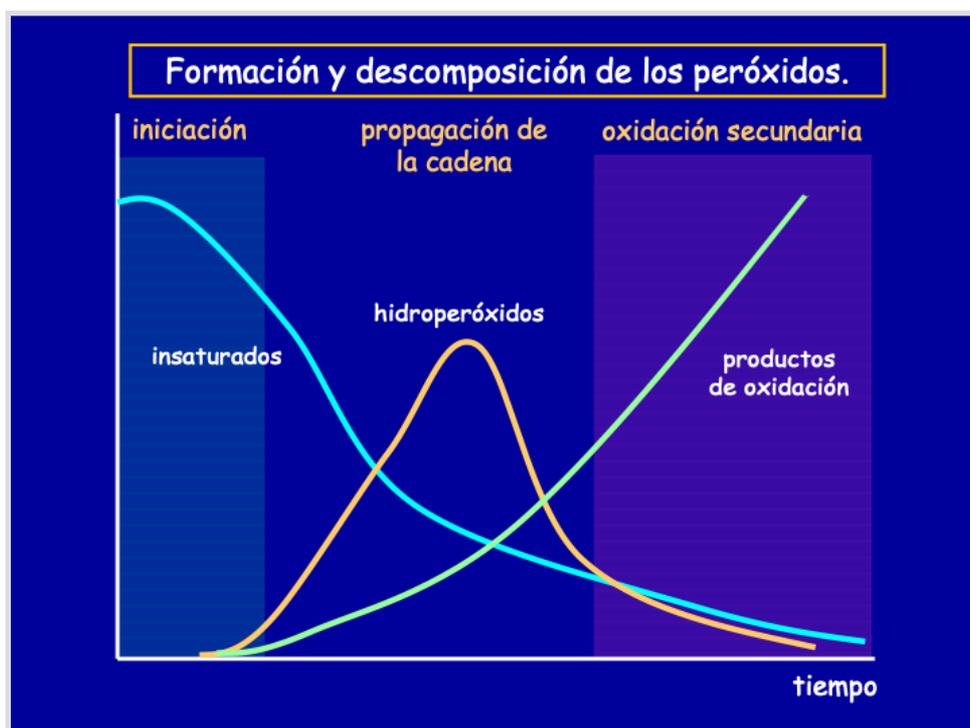


Figura 4. Formación y descomposición de los hidroperóxidos. La formación de productos secundarios empieza durante la fase de propagación de la cadena y aumenta en la fase de oxidación secundaria proporcionalmente a la descomposición de los hidroperóxidos.

Entre los productos más estudiados encontramos el MDA. En su estado fisiológico, está presente como un anión enolato y tiene una baja reactividad química; sin embargo, esta molécula es capaz de interactuar con bases de ácidos nucleicos para formar varios productos, entre estos el pirimido - [1,2- α] purin -10 (3H) -1 desoxirribosa (M1G). Diferentes estudios indican claramente que M1G tiene efectos mutagénicos y es capaz de inducir mutaciones de desplazamiento de marco dependientes en la secuencia de ADN y sustituciones de pares de bases en bacterias y células de mamíferos (VanderVeen, L. A. *et al.*, 2003). Por otro lado, Niedernhofer *et al.* propusieron un mecanismo de genotoxicidad que involucra la capacidad de la MDA para crear enlaces cruzados entre cadenas en el ADN que tienen potentes efectos biológicos (Niedernhofer, L. J. *et al.*, 2003). Otro ejemplo de producto secundario de oxidación muy estudiado es el 4-HNE, que se considera un marcador importante de estrés oxidativo, un posible agente contribuyente a varias enfermedades como el Alzheimer y un estimulante de vías pato-bioquímicas como la inflamación (Shoeb, M. *et al.*, 2014).

2. Antioxidantes procedentes de especies vegetales y estabilidad oxidativa

2.1. Antioxidantes sintéticos y consecuencias para la salud humana

Con la finalidad de controlar el proceso oxidativo, la industria alimentaria utiliza antioxidantes sintéticos como el terc-butilhidroxianisol, BHA (E-320) y el butilhidroxitolueno, BHT (E-321) (tabla 2). Debido a los informes sobre los posibles efectos tóxicos de estos compuestos antioxidantes sintéticos, en algunos países no están autorizados: prohibidos en Japón, California los clasifica como posibles carcinógenos, Australia y Reino Unido los prohíben en alimentos para niños; son autorizados por la UE y por la EEUU. Greenpeace opina que el BHA es tóxico para el sistema inmunológico y un posible carcinógeno. El BHT puede ser tóxico para el sistema inmunológico, piel, pulmones e hígado. Ambas sustancias podrían causar reacciones alérgicas, disfunciones hormonales y favorecer el desarrollo de tumores.

Por otra parte, hay una creciente demanda de los consumidores por productos naturales y el interés por los antioxidantes naturales ha aumentado en los últimos años. Hace unos años, el término antioxidante se asociaba automáticamente a compuestos tales como el ácido ascórbico, la vitamina C o la vitamina E. Sin embargo, en el año 2010, la Unión Europea autorizó el uso de extracto de romero (E392) como nuevo aditivo alimentario (Directivas 2010/67/EU y 2010/69/EU de la Unión Europea). Con la aprobación del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) como una alternativa natural a los antioxidantes sintéticos, se ha generado una nueva tendencia hacia los “productos naturales”. El romero tiene un alto contenido en una serie de sustancias que se encuentran dentro de un grupo fitoquímicamente conocido como compuestos fenólicos. En realidad, hace mucho tiempo que se reconoce a estos “nuevos” antioxidantes como responsables en gran medida de una enorme variedad de actividades biológicas atribuidas desde siempre a frutas, verduras y plantas, o productos obtenidos a partir de las mismas.

Tabla 2. Antioxidantes más utilizados en la UE. IDA, ingesta diaria admisible.

Nombre	Característica	Aplicación	Efectos y límites
Ácido L-ascórbico	Evita el oscurecimiento de la fruta troceada y evitar la corrosión de los envases metálicos. Inhibe la formación de nitrosaminas	La adición de ácido ascórbico como antioxidante no permite hacer un uso publicitario del enriquecimiento en vitamina C del alimento.	Se absorbe y se metaboliza rápidamente. El exceso se elimina por orina, pero a partir de 6g/día se observa diarrea. IDA: 15 mg/Kg
Butil-hidroxi-anisol (BHA)	Solamente es soluble en grasas	Se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de galletas, sopas deshidratadas, etc.	Actúa en el metabolismo hepático. IDA: 0,3 mg/Kg
Butil-hidroxi-tolueno (BHT)	Las mismas que el BHA	Se utiliza siempre mezclado con el BHA.	Parece incrementar las necesidades de vitamina A. IDA: 0,125 mg/Kg

2.2. Compuestos fenólicos: antioxidantes de origen natural

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se caracterizan por su acción beneficiosa para la salud humana, ya que desempeñan un papel esencial de protección frente a fenómenos de carácter oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en gran número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, arteriosclerosis, alzheimer o el cáncer (Mena, P., 2017; BrglezMojzer, E., 2016). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está íntimamente relacionada con su estructura, es decir con los fragmentos presentes en su molécula, ya que depende de la estabilidad del radical fenóxido que se forma en el proceso de actuación frente a los radicales libres.

En los últimos años se han publicado varios artículos de investigación, en revistas de impacto, clasificando compuestos fenólicos monocíclicos derivados de ácido cinámico y benzoico, flavonoides y estilbenos en base a la relación estructura actividad (Castellano, G. *et al.*, 2012, 2015). En general, los compuestos fenólicos tienen mayor poder antioxidante cuantos más grupos hidroxilo contengan en su estructura y cuanto

mayor sea el grado de planaridad de la molécula para que se favorezca la deslocalización electrónica, y consecuentemente, sea más estable el radical generado. En el caso de los flavonoides, por ejemplo, es importante la presencia de dobles enlaces insaturados conjugados con el anillo aromático o doble enlace conjugado a un grupo carbonilo. Por otra parte, se publicaron varios artículos en los que se estudia la relación estructura-actividad mediante QSAR y estructura-propiedad mediante QSPR por métodos computacionales de diferentes compuestos como por ejemplo isoflavonoides, pesticidas y lactonas sesquiterpénicas (Torrens, F. *et al.*, 2017). También, se han publicado estudios de compuestos polifenólicos en plantas, concretamente goji (*Lycium barbarum*), con propiedades anticancerígenas (Benlloch, M. *et al.*, 2015). Diferentes compuestos polifenólicos de origen natural se han estudiado por sus propiedades antitumorales potenciales tanto in vivo como in vitro donde producen disminución de la viabilidad de las células tumorales aumentando los niveles apoptóticos y la producción de ROS (Estrela, J.M. *et al.*, 2017).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis de partida

Estudios recientes de miembros del grupo de investigación que dirigen este proyecto, han demostrado la importancia de la presencia de compuestos fenólicos como antioxidantes. Se han realizado varias publicaciones de alto impacto en el área de química donde se clasifican estos compuestos por su relación estructura-actividad antioxidante y se deduce por orden jerárquico la importancia de determinados fragmentos en las moléculas de estos compuestos.

Por otra parte, también se realizó el estudio de la estabilidad oxidativa de carne procesada empleando aceites de diferentes vegetales y de la estabilidad oxidativa de 22 aceites de origen vegetal diferentes, vírgenes o refinados, a distintas temperaturas, por parte de G. Castellano y L. Redondo, en colaboración con Rowett Institute of Nutrition and Health (Aberdeen University). Los resultados de estabilidad fueron diferentes según el aceite empleado y mejoraban cuando se adicionaba una porción de polvo de romero, planta con alto contenido en polifenoles.

Esto lleva a plantear las siguientes hipótesis:

- La composición de los aceites es de gran importancia en la estabilidad oxidativa de los mismos, lo cual se ha demostrado con un estudio teórico y experimental; además se han estudiado los compuestos que más influyen en dicha estabilidad y los efectos sinérgicos de los mismos. Esto nos lleva a plantear la investigación de un estudio análogo de las margarinas (que resultan de las emulsiones en agua de los mismos que además contienen estabilizantes, sales y antioxidantes no sintéticos).
- Debido a que las margarinas contienen alrededor de un 16% de agua, cabe pensar que tengan un comportamiento distinto a los aceites en cuanto a la estabilidad oxidativa. Esto nos lleva a plantear un estudio de optimización del método de análisis de estabilidad oxidativa.
- Además, de forma similar pretendemos estudiar la influencia de la adición de diferentes plantas aromáticas o especias con alto contenido en polifenoles (antioxidantes) a la estabilidad oxidativa de las margarinas.

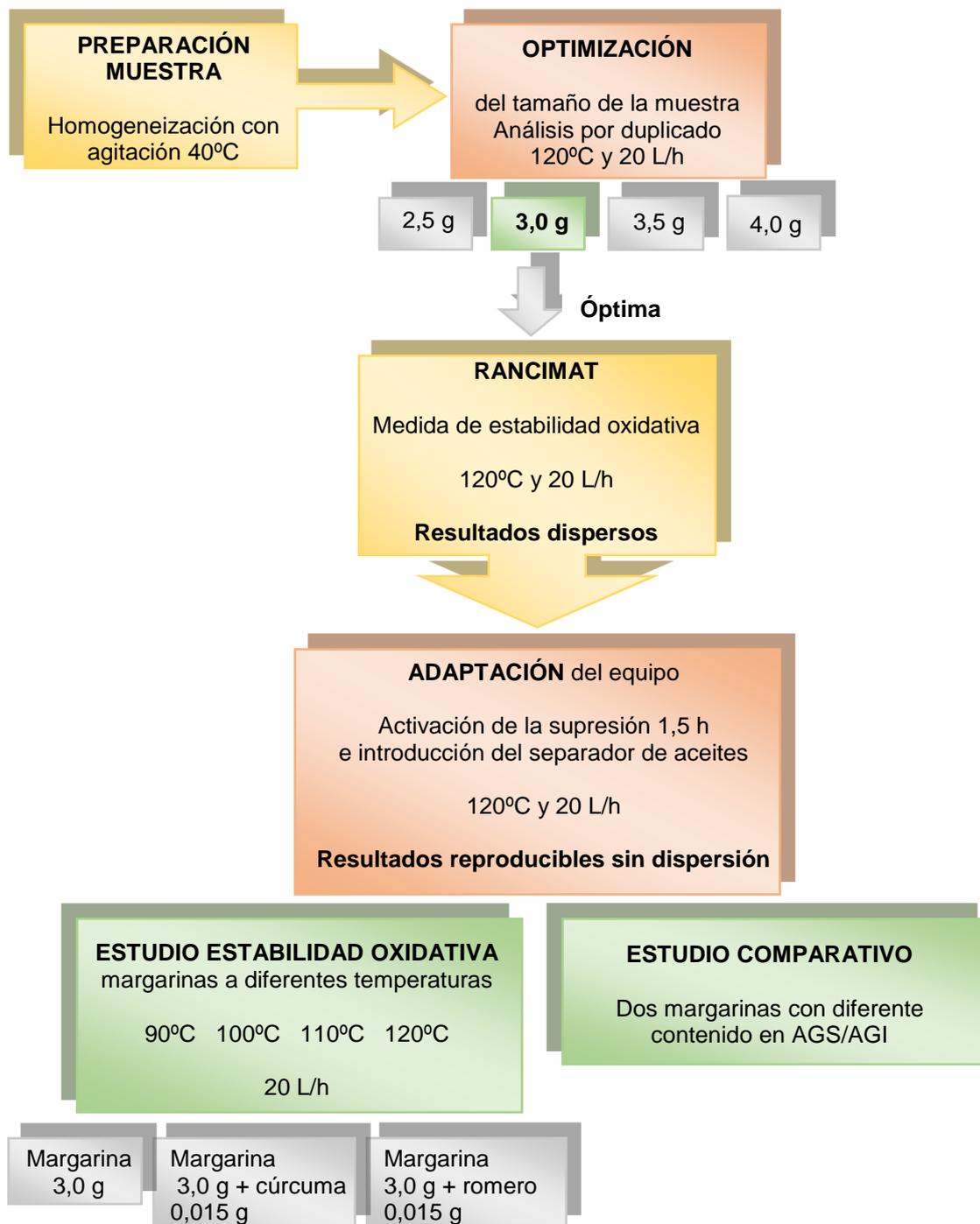
3.2. Objetivos

1. Diseñar y ejecutar un protocolo de análisis de estabilidad oxidativa adecuado a las margarinas que incluye la optimización de la cantidad de muestra, la determinación de la temperatura adecuada de ensayo, la adaptación y la mejora del equipo.
2. Relacionar la composición química de dos margarinas (contenido en ácidos grasos saturados e insaturados) con el periodo de oxidación.
3. Añadir especias seleccionadas por su documentada actividad antioxidante y ver el efecto en la estabilidad oxidativa de las margarinas a distintas temperaturas.
4. Comparar los resultados obtenidos en margarinas con los conseguidos en aceites.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Plan de trabajo

A continuación, se muestra el plan de trabajo seguido en la parte experimental:



4.2. Fundamento del método: test de Rancimat

Históricamente, se han utilizado diferentes métodos tanto para acelerar la oxidación como para medir su evolución:

- *Test de Schaal o de la estufa*: consiste en someter a una grasa a temperaturas de 60-63°C. El cambio de temperatura actúa como un catalizador acelerando las reacciones de oxidación y permitiendo así medir su evolución, tanto mediante el color, olor, sabor, *etc.* como por análisis químicos. Se van haciendo mediciones periódicas del índice de peróxidos y se elabora una gráfica donde se estudia la evolución de dicho índice en el tiempo.
- *Métodos de Absorción de Oxígeno (RapidOxy)*: consiste en la determinación de la estabilidad oxidativa de la muestra mediante un proceso de oxidación acelerada a través del aumento de la presión del oxígeno y de la temperatura.
- *Test AOM o Test de Swift*: se somete a la grasa a una temperatura de 97,8°C en un baño termostático y con un caudal de aire de 2,33 mL/s. Se extrae la grasa periódicamente y se mide su índice de peróxidos.

En este trabajo, el estudio de la estabilidad oxidativa y la determinación del tiempo de inducción se realizó mediante el test de Rancimat.

El Rancimat es un aparato que se basa en la detección conductimétrica de los productos de descomposición de las grasas y permite la determinación automática del tiempo de estabilidad a la oxidación de aceites y grasas, principalmente de origen animal y vegetal. Se somete la muestra a un proceso de oxidación acelerada, a través de la introducción de un flujo de aire continuo y la exposición a altas temperaturas. El ácido fórmico (y otros productos volátiles de la oxidación lipídica) son captados por un sensor conductimétrico en un recipiente con agua destilada que registra continuamente cambios en la conductividad (fig. 5). El tiempo transcurrido hasta la formación de estos productos de reacción secundarios es lo que se denomina «tiempo de inducción», «periodo de inducción» o «índice de estabilidad oxidativa» (IP o OSI, por sus siglas en inglés). Este valor es indicativo de la resistencia de la muestra a la oxidación. Cuanto más largo es el tiempo de inducción, más estable es la muestra (Hadorn, H. *et al.*, 1974).

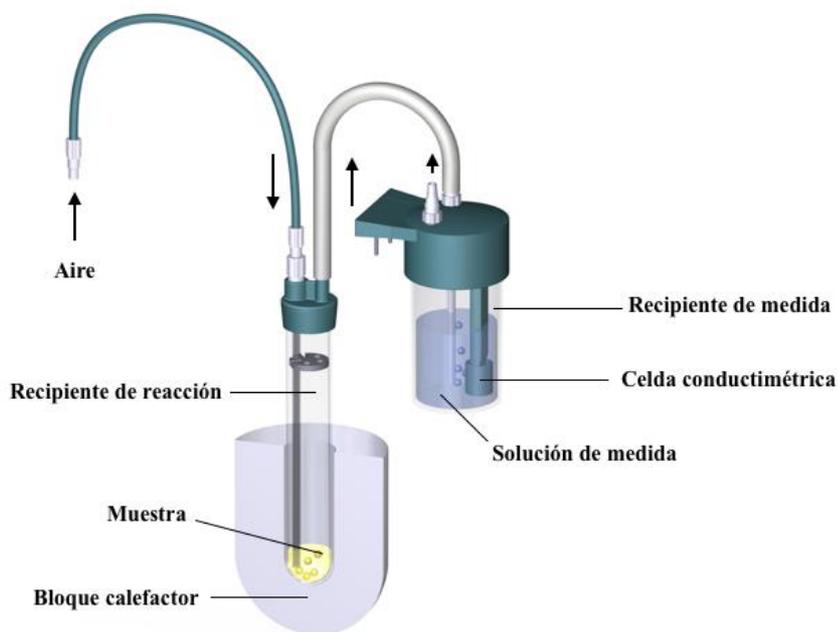


Figura 5: Test de Rancimat. *Izquierda*: diagrama esquemático del aparato (892 Professional Rancimat Manual, 2017). *Derecha*: imagen real del Rancimat 892 utilizado para el experimento.

Las curvas de conductividad-tiempo se muestran en vivo para cada punto de medición en la base de datos. Se determinó el tiempo de inducción automáticamente a partir de la derivada segunda de la curva de medición.

4.3. Material

En las tablas 3 y 4 se muestran las margarinas y las especias utilizadas por el trabajo. Las margarinas se almacenaron en la nevera a una temperatura de 4°C. Las especias se almacenaron a temperatura ambiente (20°C) y en oscuridad.

Tabla 3: Ficha técnica de las margarinas utilizadas para el trabajo

Margarina	Empresa	Número de lote	Información nutricional (por 100 g)	Fecha de caducidad
Tulipán	Unilever España, S.A.	L9011AC099	Grasas saturadas: 15 g Grasas monoinsaturadas: 15 g Grasas poliinsaturadas: 26 g Hidratos de carbono: - de los cuales azúcares: <0,5 g Proteínas: <0,5 g Sal: 0,91 g Vitamina A: 800 µg Vitamina D: 7,5 µg Vitamina E: 16 mg Calcio: 137 mg <hr/> Omega 3 (AAL): 3,0 g Omega 6 (AL): 23 g	25/07/2019
Naturlí	Naturlí Foods A/S	L8743AY098	Grasas saturadas: 26 g Grasas monoinsaturadas: 33 g Grasas poliinsaturadas: 12 g Hidratos de carbono: - de los cuales azúcares: <0,5 g Proteínas: <0,5 g Sal: 0,90 g	20/07/2019

Tabla 4: Ficha técnica de las especias utilizadas para el trabajo

Especias	Empresa	Número de lote	Sede
Cúrcuma polvo	Celeplame SL	F12747	Moncada, Valencia
Romero hoja	Celeplame SL	F12449	Moncada, Valencia

4.4. Parte experimental

4.4.1. Optimización del protocolo para el estudio de margarinas mediante el test de Rancimat

4.4.1.1. Evaluación de la cantidad óptima de margarina

Se empleó el aparato automatizado Rancimat modelo 892 de Metrohm (Metrohm, Switzerland). Los análisis se efectuaron por duplicados.

- **Preparación del Rancimat**

Se introdujeron en el software Stabnet 1.1 (Metrohm, Switzerland) los parámetros del ensayo. Se decidió utilizar una temperatura de $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y un flujo de aire de 20 L/h (892 Professional Rancimat Manual, 2017).

- **Preparación de la muestra de margarina**

Homogeneización: se homogeneizaron aproximadamente 25 g de margarina Tulipán utilizando una placa calefactora OVAN (Suministros Grupo Esper S.L., Barcelona). Se empleó una temperatura de calentamiento de 10°C por encima del punto de fusión de la margarina ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) (892 Professional Rancimat Manual, 2017), teniendo especial cuidado en no calentar excesivamente la muestra para evitar la separación entre las fases oleaginosa y acuosa.

Medida directa: se efectuaron análisis pesando 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g y 4,0 g de margarina directamente en el recipiente de reacción, utilizando una báscula de precisión.

- **Preparación del recipiente de reacción**

Se colocaron los recipientes de reacción en su respectiva posición en el Rancimat. Cada recipiente dispone de una barrera anti-espuma y del tubo de inyección de aire.

- **Preparación del recipiente de medida**

Se llenaron los 8 recipientes de medida con 60 ml de agua destilada desionizada y se colocaron en el Rancimat. La conductividad inicial corresponde a la del agua destilada y se consideran aceptables valores $< 2,4 \mu\text{S/cm}$.

- **Determinación**

Se activó el flujo de aire y se conectaron los tubos. Antes de que pueda iniciarse la determinación, la temperatura del bloque de calentamiento debe ser estable.

- Limpieza del material

La cristalería se limpió rigurosamente entre cada ejecución para evitar (o intentar) minimizar cualquier contaminación que pudiera catalizar la peroxidación. Cada pieza del aparato se limpió con detergente y se enjuagó con agua corriente caliente. Se procedió con el enjuague con etanol 100% y agua destilada. La vajilla limpia se secó completamente en una estufa a 80°C por 2 h.

4.4.1.2. Adaptación y mejora del equipo

Se procedió a través la modificación del criterio de sensibilidad “Evaluation suppression” del software. En nuestro trabajo se eligió utilizar una supresión de 1,5 h.

Se completó el procedimiento de optimización a través el utilizzo de un separador de aceite (Metrohm, 6.2753.200) (fig.6).

Se comprobaron los resultados planteando el experimento por cuadruplicados utilizando el separador de aceite para un bloque y dejando el otro bloque sin el separador. Se compararon los resultados con los obtenidos mediante el ensayo con margarina control, sin supresión de 1,5 h y sin separador de aceite.



Figura 6. Separador de aceite conectado al recipiente de reacción. El separador de aceite reduce la cantidad de aceite contenida en la fase gaseosa.

- Preparación del Rancimat

Se introdujeron en el software Stabnet 1.1 (Metrohm, Switzerland) los parámetros de ensayo. Se decidió utilizar una temperatura de $120 \pm 1,6^\circ\text{C}$ y un flujo de aire de 20 L/h. Se procedió a través la modificación del criterio de sensibilidad "Evaluation suppression" del software. En nuestro trabajo se eligió utilizar una supresión de 1,5 h.

- Preparación de la muestra de margarina

Homogeneización: se homogeneizaron aproximadamente 30 g de margarina Tulipán.

Medida directa: se pesaron 3,0 g de margarina directamente en el recipiente de reacción.

La preparación del recipiente de reacción y de medida siguen los pasos antes mencionados

4.4.2. Efecto del cambio de temperatura sobre el IP de margarinas de diferente composición

Se estudió el efecto del cambio de temperatura sobre la estabilidad oxidativa de la margarina Tulipán y Naturlí, de diferente contenido en ácidos grasos saturados/insaturados. Por esto, se efectuaron ensayos por cuadruplicados a 120, 110, 100 y $90 \pm 1,6^\circ\text{C}$ y el caudal de aire se mantuvo fijo a 20 L/h. Se utilizaron 3,0 g de cada margarina y los ensayos se efectuaron por cuadruplicado. El ensayo a 90, 100 y 110°C para la margarina Naturlí no se calculó directamente porque el aparato no pudo determinar la medida automáticamente dentro de un período de tiempo razonable. Por esta razón, se decidió completar los resultados mediante la extrapolación del factor conocido como Q10. El enfoque empírico del Q10, se basa en la observación de que el tiempo de inducción se duplica aproximadamente con cada reducción de 10°C en la temperatura del ensayo. Se extrapoló el factor Q10 mediante el software StabNet 1.1. Se calcularon los valores de los IP aplicando la ecuación 2 (Ito, E. *et al.*, 2015):

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{10/(T_2 - T_1)} \quad (2)$$

Donde: ($R_1=IP_1$ y $R_2=IP_2$)

4.4.3. Estudio de la influencia de antioxidantes procedentes de especias en la estabilidad oxidativa

Se procedió con replicas por cuadruplicados para la evaluación del tiempo de inducción de la margarina control sin especias y para la evaluación del tiempo de inducción de la margarina junto con la especia elegida (cúrcuma y romero). Se emplearon los mismos rangos de temperatura del anterior ensayo (120, 110, 100 y $90 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$) para cada especia y un caudal de aire de 20 L/h.

Se utilizaron 3,0 g margarina Tulipán y los ensayos se efectuaron por cuadruplicado.

- Preparación de las especias

Homogeneización: se trituró la muestra de romero con una trituradora modelo (Infinity Import S.L.). La cúrcuma fue proporcionada en polvo.

Es importante que la distribución del tamaño de grano de la muestra triturada sea aproximadamente la misma, ya que influye en el tiempo de inducción.

Medida directa: se pesaron 0,015 g de la especia elegida por el ensayo y se introdujeron en los recipientes de reacción. Se procedió a homogeneizar manualmente la margarina y la especia introducida con movimiento circulares. La especia tiene que estar completamente homogeneizada en la margarina, ya que la formación de coágulos influiría en el tiempo de inducción. Se utilizó un porcentaje 0.5% (w/v) según establecido de la European Commission, 2011.

4.4.4. Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por duplicado o cuadruplicado. Los resultados de este estudio se expresaron como una media \pm desviación estándar (SD).

El cálculo de la varianza (ANOVA) se realizó con SPSS (software v.21.0, IBM Corporation, EE. UU.) y el nivel de significación estadística se estableció en $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización adecuada de esta investigación se consideró de gran relevancia llevar a cabo el estudio de la cantidad adecuada de muestra y la influencia del agua en la misma, con el objetivo de concretar el método a llevar a cabo para el uso de Rancimat con emulsiones. Una vez determinados estos parámetros se pudo estudiar la estabilidad oxidativa de dos margarinas, en relación a las distintas composiciones de las muestras. Se completó la investigación, con el estudio del efecto de adición de productos vegetales (romero y cúrcuma) en la estabilidad oxidativa de la margarina.

5.1. Estudio de la cantidad óptima de margarina

Estudios precedentes efectuados en grasas y aceites, recomendaron 2,5 g de margarina como cantidad óptima para el ensayo mediante el test de Rancimat (Anwar, F. *et al.*, 2003). La cantidad de utilizar varía según el tipo de muestra (grasa o aceite) y según la composición de la misma, por ejemplo, hay que tener en cuenta el contenido en agua a la hora de evaluar posibles eventos de evaporación durante el ensayo. Por otra parte, Jebe y colaboradores, informaron que el estudio de la estabilidad oxidativa con una cantidad igual a 2,5 g mostró dificultades a la hora de utilizar el método Rancimat y sugirieron que 5,0 g de aceite/grasa eran una cantidad más apropiada. Afirmaron que, el equilibrio entre la velocidad del caudal de aire y el tamaño de la muestra, desempeña un papel fundamental a la hora de mantener condiciones saturadas de aire (Jebe, T. A. *et al.*, 1993). Por ello, cabe pensar que, el estado turbulento de la muestra bajo un continuo flujo de aire afecte a la detección del IP para tamaños bajos de la misma.

Sobre la base de estos estudios, el objetivo del presente experimento fue ajustar la cantidad óptima de margarina para una correcta detección del IP, y por ello, se planteó un análisis por duplicado estudiando el IP para 2,5, 3,0, 3,5 y 4,0 g. En la gráfica (fig.7), se muestran los valores de los IP \pm SD obtenidos a $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. Se eligió una temperatura de $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$. El flujo de aire utilizado fue de 20 L/h, según las instrucciones del manual (892 Professional Rancimat Manual, 2017). La margarina empleada para el ensayo fue Tulipán.

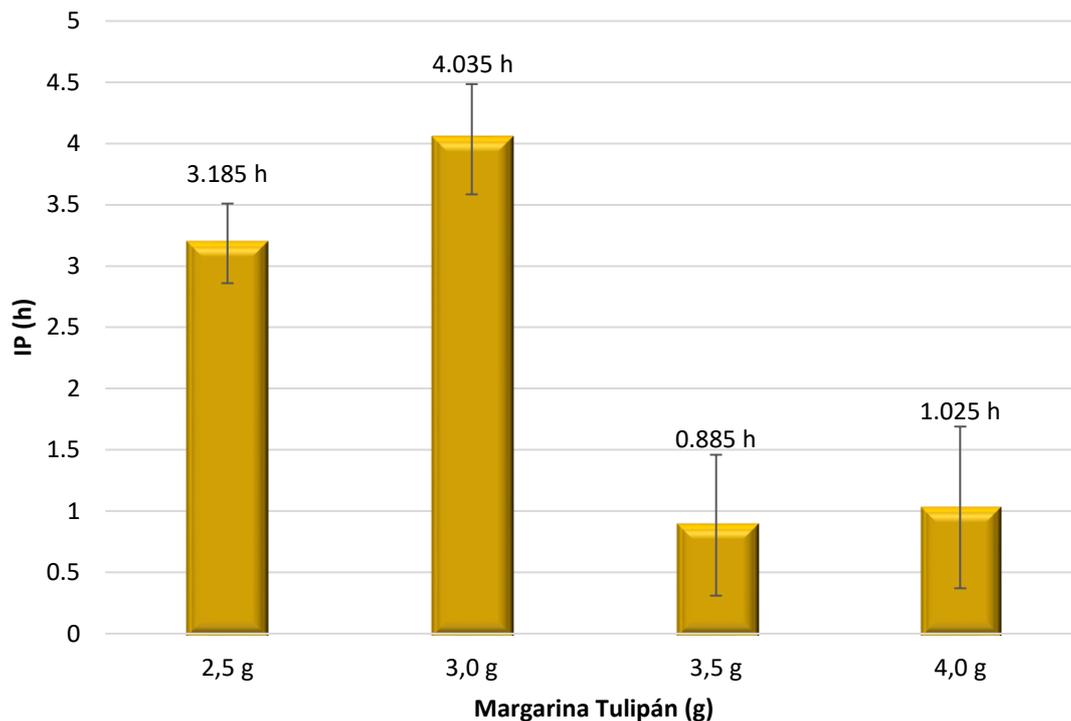


Figura 7. Gráfica de barras correspondiente a la variación del tiempo de inducción (IP) frente a los gramos (g) de margarina Tulipán utilizados para el ensayo. Los resultados se presentan como media \pm SD.

Las muestras de $3,5 \pm 0,001$ g ($0,885 \pm 1,15$ h) y $4,0 \pm 0,002$ g ($1,025 \pm 1,33$ h) presentaron valores de IP despreciables ($P < 0,05$). Los IP de las grasas como la margarina o la mantequilla, a 120°C se consideran validos si se encuentran en un valor comprendido entre las 2-6 h (892 Professional Rancimat Manual, 2017), por lo que se descartaron estas cantidades. Las muestras de $2,5 \pm 0,001$ g y $3,0 \pm 0,001$ g, se mantuvieron dentro del rango de tiempo esperado con un IP de $3,185 \pm 0,65$ h y $4,035 \pm 0,92$ h, respectivamente. Al no haber diferencias estadísticamente significativas entre las dos cantidades ($P < 0,05$), se decidió determinar $3,0 \pm 0,001$ g como cantidad óptima y así compensar eventuales pérdidas de agua por evaporación.

Sin embargo, cabe destacar que los IP obtenidos para los datos pertenecientes a 3,5 y 4,0 g, distaron mucho de los esperados. En la gráfica 7, se puede observar una disminución notable en el IP, que no sigue el patrón esperado. Se ha descrito en la "Introducción" que las margarinas son mezclas de aceites en agua. Se supuso que, el contenido en agua presente en las muestras pudo afectar a la detección de los IP a altas temperaturas de ensayo. Este hecho, nos llevó a plantear un trabajo de adaptación del equipo para el ensayo con margarinas.

5.2. Influencia del contenido de agua en la evaluación del IP mediante el test de Rancimat

La literatura nos ofrece abundantes estudios sobre la observación de la estabilidad oxidativa en aceites mediante el test de Rancimat. El caudal de aire, el peso de la muestra de aceite y la temperatura, son los parámetros operativos que pueden ajustarse fácilmente y que pueden afectar la determinación del IP (García Moreno, P. J. *et al.*, 2013). Diferentes estudios (Farhoosh, R., 2007; Pawar, N., 2014) han investigado el efecto de los parámetros de la prueba de Rancimat en la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales, sin embargo, aún no se han realizado investigaciones exhaustivas en emulsiones como son las margarinas.

El estudio con margarinas se complicó a la hora de proceder con la evaluación del IP. Los resultados obtenidos en las primeras pruebas nos llevaron a plantear el estudio mediante la modificación de algunos parámetros. Por esto, el objetivo de este experimento fue desarrollar un protocolo de adaptación para margarinas. Se decidió activar el criterio "Evaluation suppression" del software y complementar el ensayo con un separador de aceites, para estudiar si la composición de la muestra afectaría la detección del IP con el test de Rancimat. Se compararon los resultados con los obtenidos en la muestra control sin separador y supresión.

Los IP \pm SD de las muestras de margarina control, de las muestras con supresión 1,5 h y de las muestras con separador de aceite y supresión 1,5 h, se presentan en la figura 8. Los IP obtenidos corresponden a una temperatura de ensayo de $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y un flujo de aire de 20 L/h. Se utilizaron $3,0 \pm 0,03$ g de margarina Tulipán.

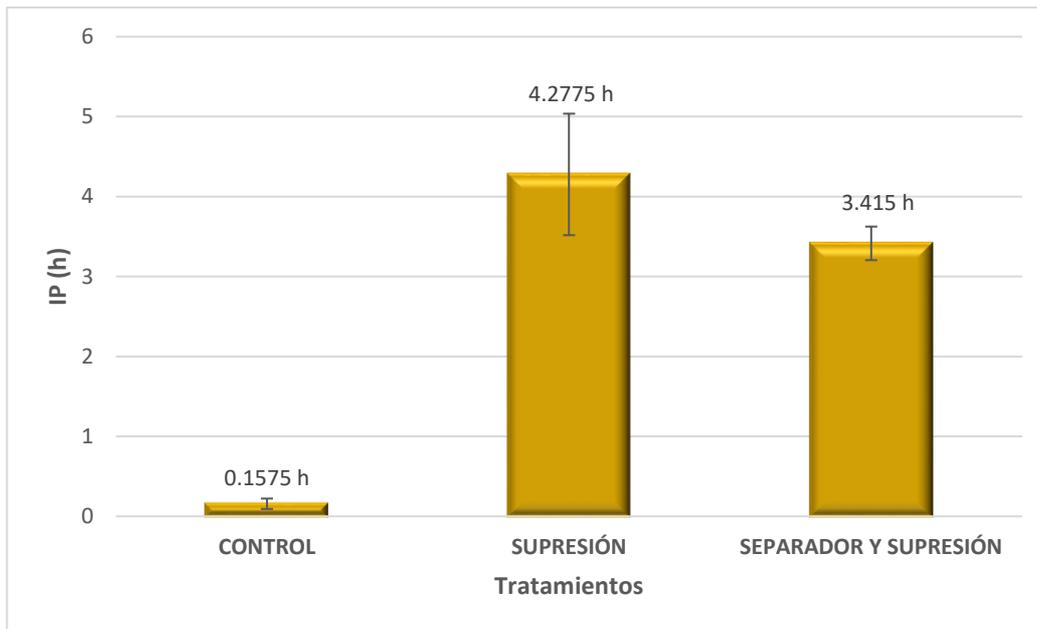


Figura 8. IP a $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ de las muestras de margarina Tulipán sometidas a distintos tratamientos: control (sin supresión y sin separador de aceites), supresión de 1,5 h, y supresión de 1,5 h más el separador de aceites. Los resultados se presentan como media \pm SD.

El IP de la muestra control ($0,1575 \pm 0,13$ h) presentó un valor significativamente no aceptable ($P < 0,05$) y fuera del rango recomendable, que, como ha sido antes comentado, resulta estar comprendido entre las 2- 6 h, para una temperatura de $120 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y un caudal de aire de 20 L/h (892 Professional Rancimat Manual, 2017). La cantidad de agua presente en la muestra en la fase de evaporación o la presencia de compuestos volátiles podría haber provocado pequeños aumentos en la conductividad e indicar un tiempo erróneo. Esto nos llevó a plantear el experimento activando el parámetro "Evaluation suppression" del software StabNet. La supresión permite la evaluación de la curva en un periodo de tiempo correspondiente. Sobre la base del valor de IP mínimo de referencia en margarinas (2 h), se decidió utilizar una supresión de 1,5 h. El IP obtenido mediante el ensayo con supresión ($4,2775 \pm 1,52$ h) presentó una mejora evidente, pues el valor se mantuvo dentro del rango de tiempo esperado (2-6 h). Sin embargo, la reproducibilidad del experimento siguió viéndose afectada y presentó valores no significativamente aceptables ($P < 0,05$). Durante la medición, se observaron trazas de la muestra en el recipiente de medición, además de que se formaron aglomerados de burbujas de gas alrededor de la celda de medición de conductividad. Se pensó que al evaporarse el agua, se produjo una transferencia del material graso desde el recipiente de reacción al recipiente de medición, esto dio como resultado la contaminación de la celda, que a su vez promovió la adherencia de las burbujas de gas,

provocando así un cambio en la conductividad. Por esta razón se decidió complementar el procedimiento con el uso de un separador de aceites. El separador reduce la cantidad de aceite contenido en la fase de vapor. El IP correspondiente a la muestra con separador ($3,415 \pm 0,42$ h) presentó valores estadísticamente relevantes ($P < 0.05$), los ensayos mostraron mejor reproducibilidad y coherencia. Si se usan muestras con un alto contenido de compuestos altamente volátiles, como la margarina, existe el riesgo de que esta se transfiera al recipiente de medición en la fase de vapor.

Cabe destacar también, qué a la hora de trabajar con el Rancimat, pequeñas inconstancias sobre los tiempos de inducción podrían ser asociadas a la presencia de partículas de grasa aparentemente no visibles procedentes de anteriores ensayos. Se vio en el apartado “Introducción” como las reacciones de autooxidación se catalizan por si solas, lo que podría afectar a la interpretación de resultados pequeños por distorsiones debidas a contaminaciones previas.

Deducimos de los resultados que la activación de la supresión y el uso del separador de aceite son factores esenciales a tener en cuenta para una correcta evaluación de la estabilidad oxidativa de margarinas mediante el test de Rancimat.

5.3. Estudio de la estabilidad oxidativa de margarinas con diferente composición a distintas temperaturas de ensayo

La matriz de margarina es mucho más compleja que la de los aceites. Factores tales como la naturaleza de los lípidos (saturados o insaturados), la concentración de oxígeno en contacto con estos, la relación entre la superficie interfacial de las gotas de emulsión o el contenido de agua, pueden influir en la resistencia de la margarina a la degradación a altas temperaturas. Shen, N. *et al.*, mostraron que el aceite de soja, que presenta un alto porcentaje en AGI, es menos estable a altas temperaturas que los aceites con mayores cantidades de AGS (p. ej. aceite de coco) (Shen, N. *et al.*, 1997).

En la tesis Doctoral de L. Redondo-Cuevas, dirigida por G. Castellano en colaboración con Rowett Institute of Nutrition and Health (Aberdeen University), se analizaron 22 aceites y grasas de origen vegetal (incluyendo refinados, no refinados y prensados en frío) y se estudió la estabilidad oxidativa a diferentes temperaturas ($120, 140, 160, 180 \pm 1,6^\circ\text{C}$). Tomando en cuenta nueve componentes (AGS, AGM, AGP, clorofila, betacaroteno, TPC, delta, gamma y alfa-tocoferol), demostraron como el tipo de ácidos grasos es de importancia crítica para la estabilidad oxidativa de los aceites y las grasas AGS, AGM y AGP representaron el 67% de la variabilidad (Redondo-Cuevas, L. *et al.*, 2017).

Sobre la base de los resultados obtenidos por Redondo-Cuevas, L. *et al.*, se propuso un estudio análogo para margarinas, para averiguar si tienen un comportamiento comparativamente similar a los aceites correspondientes ya estudiados o lo contrario. Por esta razón, se decidió estudiar dos margarinas con diferente composición en AGS/AGI.

En la gráfica (fig.9) se muestran los distintos IP de las muestras de margarinas a 120, 110, 100 y 90 ± 1,6°C y un caudal de aire de 20 L/h. Se emplearon 3,0 ± 0,02 g de margarina Tulipán y 3,0 ± 0,01 g de margarina Naturlí. Se aplicó una supresión de 1,5 h y se completó la preparación del equipo mediante el separador de aceites. Según la información nutricional proporcionada por los fabricantes (ver el apartado “Materiales y métodos”), la margarina Tulipán contiene un 15% de AGS, 15 % de AGM y 26 % de AGP, mientras que la margarina Naturlí presenta un contenido del 26 % en AGS, 33 % en AGM y 12% en AGP.

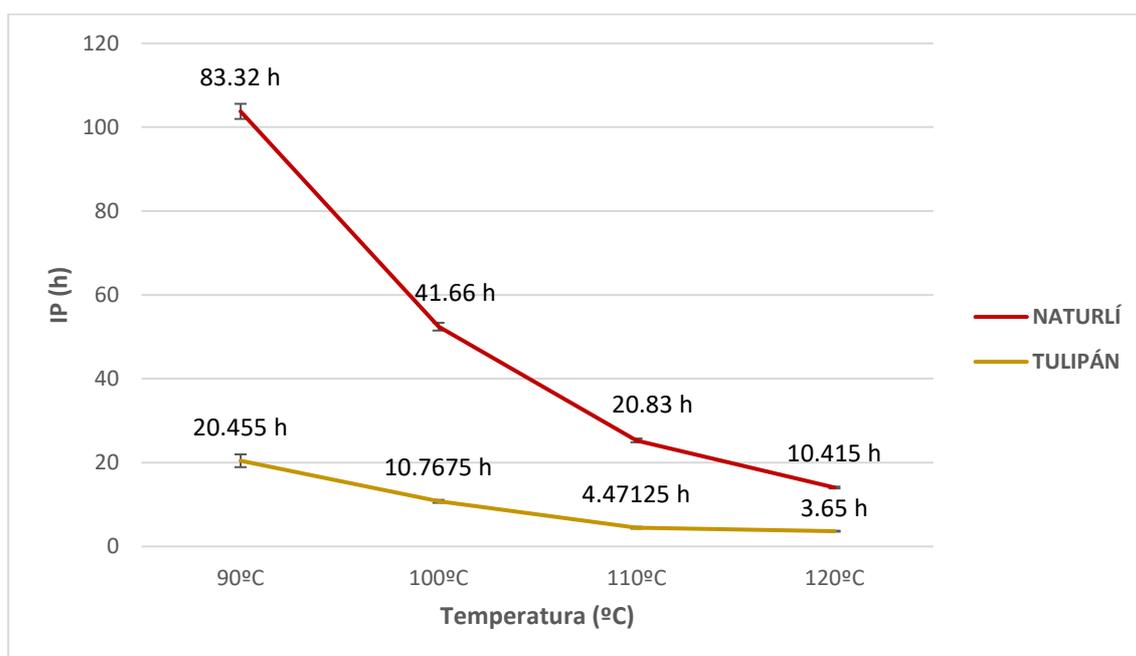


Figura 9. Variación del IP de la muestra Tulipán (curva amarilla) e IP de la muestra Naturlí (curva roja) a 120, 110, 100 y 90 ± 1,6°C, con un flujo de aire de 20 L/h. Los resultados se presentan como media ± SD.

El estudio de la margarina Tulipán a 120°C (3,65 ± 0,20 h) resultó ser el más eficiente (P<0.05), aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa con 110°C (4,47125 ± 0,44 h). Los resultados a 100°C (10,7675 ± 0,71 h), aunque presentaron una SD ligeramente más alta que a 110 y 120°C, siguen el patrón de IP esperado. Sin embargo, el estudio a 90°C (20,455 ± 3,05 h), mostró más variabilidad con una SD de 3,05 h. Es probable, que al no producirse ningún fenómeno de evaporación a estas temperaturas,

el contenido de agua presente en la muestra podría haber afectado a la detección del IP. Estos resultados indicaron que 90°C no es una temperatura aceptable a la hora de trabajar con margarinas mediante el método Rancimat, por lo que se aconseja un estudio a temperaturas $\geq 100^\circ\text{C}$.

El estudio con la margarina Naturlí, la cual tiene un mayor porcentaje de AGS, presenta los resultados esperados. El tiempo que tardó en oxidarse la muestra a 120°C ($10,415 \pm 0,45$) fue significativamente más alto que el respectivo a la misma temperatura de la muestra Tulipán. El IP a 90, 100 y 110°C para la margarina Naturlí no se calculó directamente porque el aparato no pudo determinar la medida automáticamente dentro de un período de tiempo razonable. Se calculó el IP a 90, 100 y 110°C a partir del factor de aceleración de la temperatura, conocido como Q10. La determinación de Q10 que se basa en el aumento de la tasa de oxidación producida por un aumento de 10°C en la temperatura. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la extrapolación matemática no refleja las verdaderas condiciones de ensayo. Por esta razón, es difícil calcular la vida útil exactamente con este modelo empírico.

En las gráficas inferiores (fig. 10), se evidencia más claramente cómo, a porcentajes parecidos en AGI (41% Tulipán y 45% Naturlí) y a las mismas condiciones de ensayo ($120 \pm 1,6^\circ\text{C}$ y 20 L/h), la margarina Naturlí (26% AGS) presentó un incremento significativo de IP de $6,765 \pm 0,34$ h con respecto a la margarina Tulipán (15% AGS). Además, con el objetivo de averiguar diferencias en la estabilidad oxidativa con respecto a los aceites, se quisieron comparar los resultados con los obtenidos por un precedente estudio efectuado por nuestro grupo de investigación utilizando como ejemplo el aceite de maíz (Redondo-Cuevas, L. *et al.*, 2017). En este estudio se demostró como el contenido en AGS, AGM y AGP en combinación, parecen ser los factores más importantes (que explican el 67% de la variabilidad). Estos resultados están de acuerdo con estudios publicados anteriormente que buscan correlacionar la estabilidad oxidativa de diferentes aceites y grasas de origen vegetal refinados con la composición de sus AG (Kerrihard *et al.*, 2015).

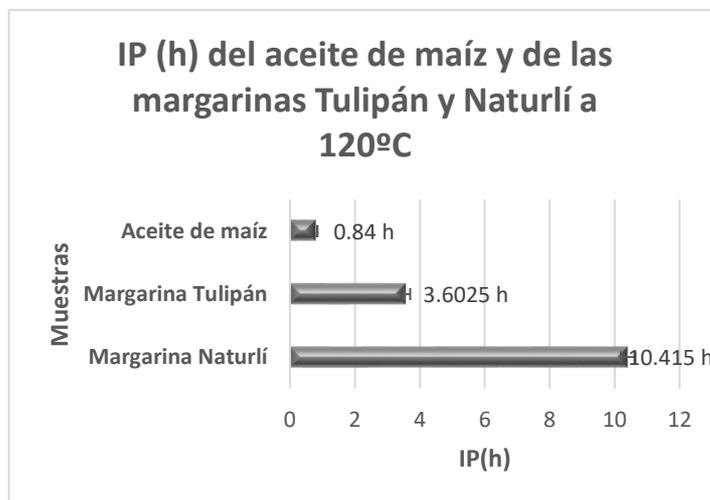
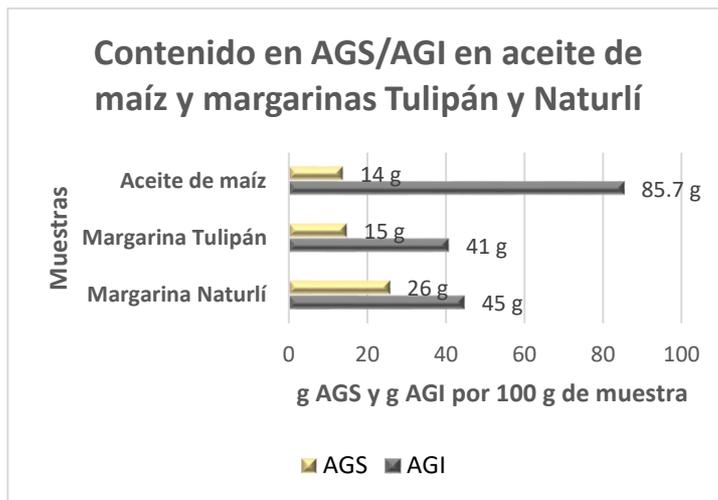


Figura 10. Superior: contenido en AGS/AGI (g) del aceite de maíz y de las margarinas Tulipán y Naturlí utilizadas en el presente estudio. Los valores corresponden a los gramos contenidos en 100 g de muestra. Inferior: variación del IP(h) en relación con los porcentajes entre AGS/AGI del aceite de maíz y de las margarinas Tulipán y Naturlí. Los resultados se expresan como media \pm SD.

Así como en el estudio efectuado con aceites, los resultados del mismo trabajo con las margarinas Tulipán y Naturlí demostraron un evidente cambio en la tasa de oxidación según el contenido en %AGS y %AGI. Menos componentes insaturados generan menos productos de oxidación radicalaria y por ello presentan mayor estabilidad oxidativa y mayor tiempo de inducción. Sobre la base de los resultados obtenidos, se afirma claramente que la estabilidad oxidativa en margarinas con mayor contenido en AGS, es significativamente mayor con respecto a margarinas que presentan menor porcentaje

de estos y un mayor contenido en AGI. Una comparación entre el IP del aceite de maíz y los IP obtenidos para las dos margarinas, reveló que estas últimas presentan mayor estabilidad oxidativa con respecto a los aceites. Sin embargo, es conveniente señalar que las margarinas resultan ser emulsiones, compuestas por agua y mezclas de aceites, por lo que resulta difícil sacar resultados significativos comparando aceites y margarinas. Comparando la margarina Tulipán con el aceite de maíz, observamos que, a pesar de que tienen una cantidad similar de AGS (15% y 14% respectivamente), muestra mayor estabilidad oxidativa la margarina Tulipán (menor IP), esto se debe que la margarina tiene menor % AGI que el aceite de maíz. Este resultado es coincidente con la ecuación 1 (apartado 1.5) obtenida del análisis estadístico multivariante (Redondo L., 2018).

5.4. Estudio del efecto antioxidante de *C.longa* y *R.officinalis* sobre el tiempo de inducción

Numerosos estudios demuestran la validez del uso de antioxidantes de origen natural en la industria alimentaria (Banerjee, A. *et al.*, 2013; Eshghi, N. *et al.*, 2014; Kozłowska, M. *et al.*, 2018; Mezza, G.N., 2018; Redondo-Cuevas, L., 2017; Riveros, CG. *et al.*, 2016; Yi, B., 2015). Cada uno de ellos se centra en el estudio de la estabilidad oxidativa en aceites, y actualmente, resultan muy pocas las investigaciones conducidas en sistemas alimenticios complejos, tales como las emulsiones.

En la gráfica (fig.11) se muestran los IP de la muestra de margarina control (sin especias) y los IP de la muestra de margarina con *C. longa* (cúrcuma) y *R. officinalis* (romero) a 90, 100, 110 y 120 ± 1,6 °C, con un flujo de 20 L/h. Para el ensayo se utilizaron 3,0 ± 0,05 g de margarina Tulipán. Se añadieron 0,015 ± 0,0002 g de cúrcuma y 0,015 ± 0,0003 g de romero.

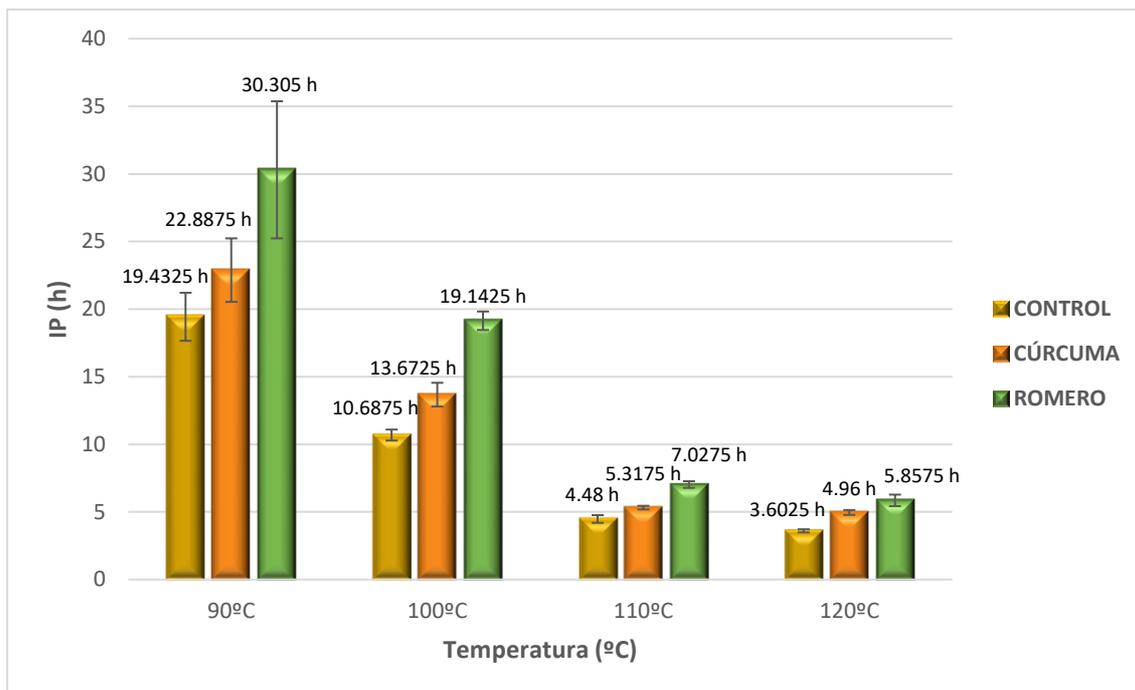


Figura 11. Comparativa entre la eficacia antioxidante de la cúrcuma y romero en margarinas a diferentes temperaturas (90, 100, 110, 120°C). Los resultados se presentan como media \pm SD.

El tratamiento con cúrcuma presentó la mayor eficiencia a 120°C ($4,96 \pm 0,36$ h), mostrando un incremento significativo de $1,35 \pm 0,29$ h ($P < 0,05$) con respecto a la muestra control ($3,6025 \pm 0,23$ h). Resultados satisfactorios se obtuvieron también a 110°C ($5,3175 \pm 0,27$ h), indicando un aumento del tiempo de inducción de $0,83 \pm 0,25$ h respecto a la muestra control. A 100°C ($13,6725 \pm 1,76$ h) se evidenció un alto incremento de IP de $2,985 \pm 0,98$ h. No obstante, la SD a esta temperatura mostró valores más altos. Probablemente, la presencia de zonas con agua en fase de transición, podría haber afectado a la detección del IP.

A $90 \pm 1,6^\circ\text{C}$ se señaló el mayor incremento en el IP correspondiente a $3,45 \pm 1,27$ h, sin embargo, los resultados fueron poco significativos ($P < 0,05$). Como se ha discutido anteriormente, 90°C no es una temperatura idónea a la hora de proceder con el ensayo de margarinas mediante el test de Rancimat, pues el contenido de agua afecta a la detección del IP. Por esta razón, vale la pena señalar que los resultados obtenidos a 90°C, aunque presenten alta variabilidad, son descartables a la hora de evaluar los parámetros óptimos de ensayos para el estudio con margarinas; sin embargo, estos resultados son de gran relevancia a la hora de evaluar la efectividad antioxidante de la cúrcuma. En un reciente estudio de 2019, Chang Yang Park y sus colaboradores demostraron como la actividad fenólica y antioxidante de los extractos acuosos de cúrcuma, resultan ser afectadas por la temperatura de calentamiento. Los resultados obtenidos en este trabajo señalaron que la temperatura tuvo un efecto significativo en

la extracción de curcuminoides. La máxima concentración de desmethoxycurcumina, bis-desmethoxycurcumina y cúrcumina se obtuvo a 90°C, estudiando un rango de temperaturas entre 60 y 90°C (Park, C. Y., 2019).

El tratamiento con romero mostró la máxima eficacia antioxidante en comparación con la cúrcuma. Los resultados obtenidos mostraron la mayor eficiencia antioxidante a $90 \pm 1,6^\circ\text{C}$ con un incremento del IP de $10,8725 \text{ h} \pm 7,42 \text{ h}$ con respecto a la muestra control; sin embargo, por las motivaciones antes explicadas, los datos resultan dispersos. El mismo planteamiento se puede hacer por $100 \pm 1,6^\circ\text{C}$, donde el incremento de IP es notable ($8,46 \pm 1,09 \text{ h}$), por contrario la SD sigue mostrando valores relativamente altos. A 120 y $110 \pm 1,6^\circ\text{C}$ los resultados son estadísticamente significativos, muestran reproducibilidad y significatividad, aunque el incremento de IP con respecto a las otras temperaturas resulta ser menos evidente.

En la tesis Doctoral de L. Redondo-Cuevas antes mencionada, se estudió el poder antioxidante y la actividad fenólica de diferentes especias (entre ellas romero y cúrcuma), utilizando como modelo el aceite de maíz, para identificar la especia con la actividad antioxidante más potente.

En las gráficas inferiores (fig.12, 13 y 14), se quiso relacionar el contenido en fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto de romero y cúrcuma, con el IP del aceite de maíz y el IP de la margarina Tulipán utilizada en el presente estudio.

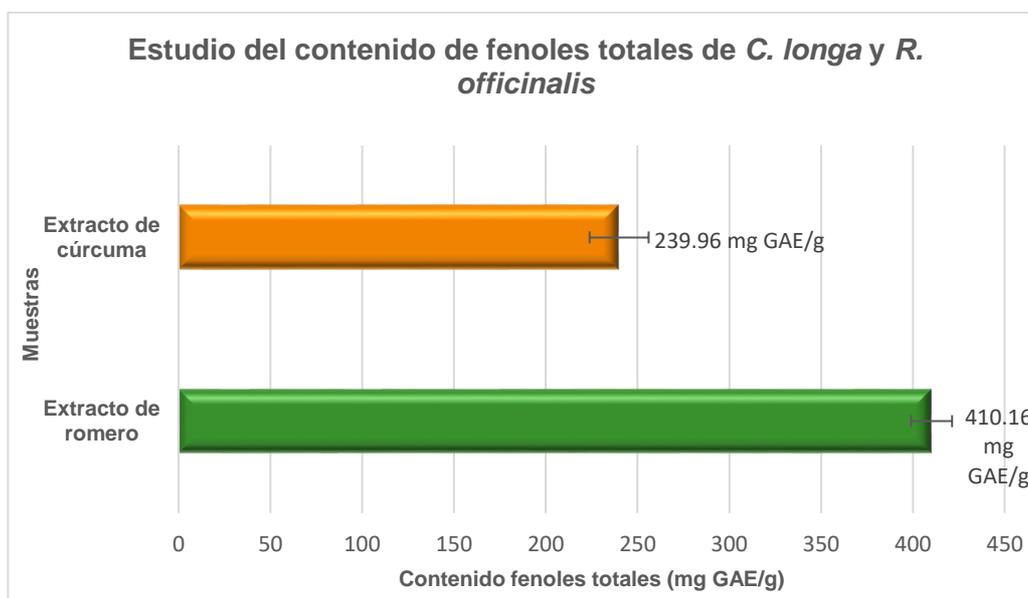


Figura 12. Estudio del contenido de fenoles totales (mg GAE/g) de *C. longa* y *R. officinalis*. Los resultados de los IP (h) se presentan como media \pm SD.

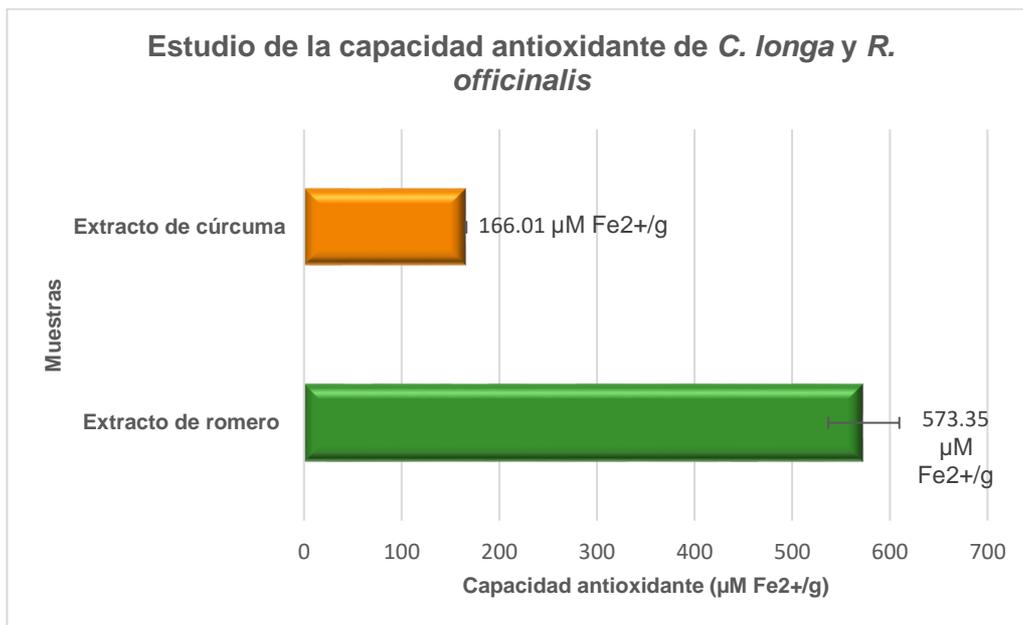


Figura 13. Estudio de la capacidad antioxidante ($\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$) de *C. longa* y *R. officinalis*. Los resultados de los IP (h) se presentan como media \pm SD.

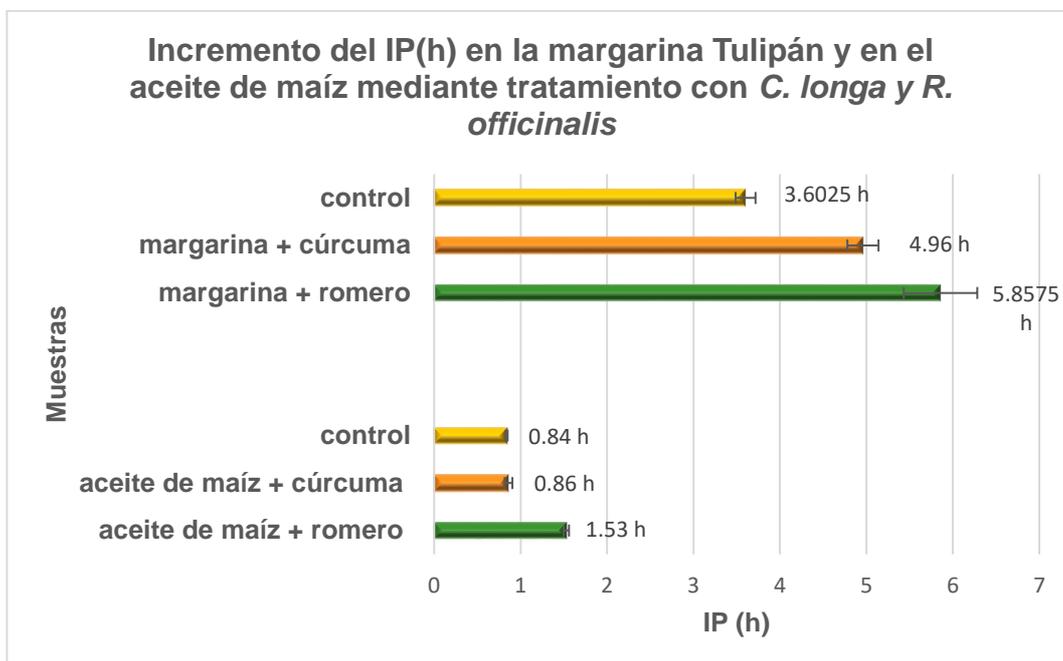


Figura 14. Incremento del IP(h) en la margarina Tulipán y en el aceite de maíz mediante tratamiento con *C. longa* y *R. officinalis* a $120 \pm 1,6$ °C y 20 L/h. Los resultados de los IP se presentan como media \pm SD.

El polvo de romero presentó la mayor capacidad antioxidante y mayor contenido en fenoles totales con respecto a la cúrcuma, y reveló el mejor potencial para aumentar la estabilidad oxidativa en el aceite de maíz y en la muestra margarina. El extracto de romero es popular como antioxidante natural en los aceites vegetales debido a su fuerte capacidad antioxidante, que se atribuye a la presencia de terpenos fenólicos como el ácido carnósico y el carnisol (Terpinc, P. *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el aceite de maíz después de un tratamiento con cúrcuma a 120°C y con un flujo de aire de 20 L/h, mostraron un incremento del IP de $0,2 \pm 0,03$ h con respecto al control. El tratamiento con romero presentó un aumento de $0,69 \pm 0,06$ h, evidenciando una mayor eficacia antioxidante.

El comportamiento antioxidante de las especias en margarinas sigue el mismo patrón que en el aceite de maíz. Tanto el romero como la cúrcuma presentaron actividad antioxidante, aunque el romero ($2,25 \pm 0,20$ h) mostró una eficacia mayor a la hora de evaluar su influencia en el IP con respecto a la cúrcuma ($1,35 \pm 0,12$ h).

De los siguientes resultados, se puede deducir que el comportamiento antioxidante de las especias fue efectivo tanto en aceites como en margarinas. Sin embargo, como explicado anteriormente en el estudio del contenido de AGS/AGI, las margarinas resultan ser emulsiones, por lo que resulta difícil sacar resultados concluyentes comparando aceites y margarinas. No obstante, tal como muestra la figura 14, la estabilidad oxidativa de la margarina es mayor que la del aceite de maíz con ambas especias, esto demuestra el diferente comportamiento de aceites y margarinas como se predijo en la hipótesis.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados en esta investigación indican que:

- La cantidad de margarina óptima a la hora de trabajar con el Rancimat resultó ser de $3,0 \pm 0,001$ g, para una temperatura de $120 \pm 1,6^\circ\text{C}$ y un flujo de aire de 20 L/h. El IP obtenido ($4,035 \pm 0,92$ h) no mostró diferencias estadísticamente significativas con el IP obtenido para 2,5 g ($3,185 \pm 0,65$ h), sin embargo, se decidió elegir $3,0 \pm 0,001$ g para compensar eventuales pérdidas de agua por evaporación.

El estudio llevado a cabo para las muestras de margarina de $3,5 \pm 0,001$ g y $4,0 \pm 0,002$ g presentó resultados no relevantes.

- La supresión de 1,5 h junto con el uso del separador de aceite, resultan ser esenciales para el estudio de la estabilidad oxidativa de margarinas mediante el test de Rancimat. Si se usan muestras con un alto contenido de agua, como la margarina, existe el riesgo de que esta se transfiera al recipiente de medición en fase de vapor y determine un falso IP.

- Los resultados evidenciaron que $90 \pm 1,6^\circ\text{C}$ no es una temperatura ideal a la hora de trabajar con margarinas mediante el método Rancimat, por lo que se aconseja un estudio a temperaturas $\geq 100^\circ\text{C}$.

Se afirma, que al no producirse ningún fenómeno de evaporación a esta temperatura, el contenido de agua presente en la muestra afecta a la detección del IP.

- El estudio llevado a cabo con la margarina Naturlí (26 % AGS y 45% AGI) y con la margarina Tulipán (15% AGS y 41% AGI), presentó los resultados esperados. El tiempo que tardó en oxidarse la muestra Naturlí a 120°C ($10,415 \pm 0,45$) fue significativamente más alto que el respectivo a la misma temperatura de la muestra Tulipán ($3,65 \pm 0,20$ h). Se demostró, como a las mismas condiciones de ensayo ($120 \pm 1,6^\circ\text{C}$ y 20 L/h), la margarina Naturlí presentó un incremento significativo del IP de $6,765 \pm 0,34$ h con respecto a la muestra Tulipán.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se ratifica que el tipo de AG (además que otros factores) determina la estabilidad oxidativa en margarinas y que el IP en margarinas con mayor contenido en AGS, es significativamente mayor con respecto a margarinas que presentan menor porcentaje de estos.

- La cúrcuma se puede utilizar como fuente de antioxidantes naturales efectivos. En este estudio, se afirma claramente que 0,5 w/v de polvo de cúrcuma bajo altas temperaturas de ensayo pueden actuar eficazmente como antioxidantes en alimentos emulsionados como las margarinas.

- La adición de romero aumentó considerablemente la estabilidad oxidativa de la margarina en comparación a la estudiada con cúrcuma. Esto se debe a que el romero presenta una actividad antioxidante más elevada que la cúrcuma bajo las mismas condiciones de ensayo. Este comportamiento es análogo a los aceites de origen vegetal.
Se puede deducir que la actividad antioxidante de las especias es similar en aceites y en margarinas.

- Es de destacar que al comparar el aceite de maíz con la margarina Tulipán que tienen similar % AGS, es más estable la margarina por tener menor % AGI que son responsables de la generación de radicales libres los cuales conducen al deterioro de los aceites y grasas. Este resultado es coherente con la ecuación 1 resultado de análisis multivariante.

- Es conveniente señalar que las margarinas resultan ser emulsiones compuestas por agua y gran variedad de mezclas de aceites, por lo que es difícil sacar resultados concluyentes comparando un aceite vegetal con una margarina. No obstante, podemos deducir que, en general, la estabilidad oxidativa de la margarina estudiada es mayor que la de un aceite vegetal puro (como el aceite de maíz) con y sin especias. El motivo es que las margarinas presentan un % en peso de AGM y AGP menor que los aceites, por lo que al ser estos compuestos los que sufren reacciones radicalarias de oxidación, las margarinas resultan más estables frente a la oxidación que los aceites.
Esto demuestra el diferente comportamiento de aceites y margarinas frente a la estabilidad oxidativa como se predijo en nuestra hipótesis inicial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

892 Professional Rancimat. (2017). Manual, Herisau/Switzerland: Metrohm AG

Akadiri, Y. Magloire, P N. Gbankoto, A. Mashalla, Y. yMoutairou, K. (2015). Beneficial Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Gestational Diabetes: Consequences in Macrosomia and Adulthood Obesity. *J Diabetes Res*. doi: 10.1155/2015/731434

Ayala, A. Muñoz, M. F. y Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–31. doi:10.1155/2014/360438

Anwar, F., Bhanger, M. I., & Kazi, T. G. (2003). Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(2), 151- 155. doi:10.1007/s11746-003-0668-2

Banerjee, A., Ghosh, S., y Ghosh, M. (2013). Anti-oxidative effect of turmeric on frying characteristics of soybean oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1760–1765. doi:10.1007/s13197-013-1156-y

Bazinet, R.P. y Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci*, 15(12), 771–785. doi:10.1038/nrn3820.

Benlloch, M., Muriach, M., Castellano, G., Romero, F.J. (2015). Role of LyciumBarbarum Extract in Retinal Disease. *LyciumBarbarum and Human Health*, 153-197.

BrglezMojzer, E., KnezHrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., y Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(7), 901. doi:10.3390/molecules21070901

Budilarto, E. S. y Kamal-Eldin, A. (2015) 'The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(8), 1095–1137. doi: 10.1002/ejlt.201400200.

- Calder, P.C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 39(1), 18-32. doi: 10.1177/0148607115595980.
- Castellano, G., Tena Medialtea, J. y Torrens, F. (2012). Classification of Phenolic Compounds by Chemical Structural Indicators and Its Relation to Antioxidant Properties of *Posidonia Oceanica* (L.) Delile. *MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry*, 67(1), 231-250
- Castellano, G. y Torrens, F. (2015). Quantitative Structure-Antioxidant Activity Models of Isoflavonoids: A Theoretical Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (12), 12891-12906. doi: 10.3390/ijms160612891.
- Chiranjib, B., Westberg, M., Breitenbach, T., Mikkil B., y Peter, R. (2017). Monitoring Interfacial Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions using Spatially-Resolved Optical Techniques. *Analytical Chemistry*, 89(11), 6239-6247. doi.org/10.1021/acs.a
- Claire, C. Berton, C. Ropers, M.H. y Genot, C. (2014). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Safety*, 13(5), 945-977. doi.org/10.1111/1541-4337.12097.
- Del Gobbo, L.C. Imamura, F. Aslibekyan, S. Marklund, M. Virtanen, J.K. Wennberg, M, Yakoob, M.Y. Chiuve, S.E. Dela Cruz, L. Frazier-Wood, A.C.Fretts, A.M. Guallar, E. Matsumoto, C. Prem, K. Tanaka, T. Wu, J.H.Y. Zhou, X. Helmer, C. Ingelsson, E. Yuan, J.M. Barberger-Gateau, P. Campos, H. Chaves, P.H.M. Djoussé, L. Giles, G.G. Gómez-Aracena, Hodge, A.M. Hu, F.B. Jansson, J.H. Johansson, I. Khaw, K.T., Koh, W.P., R.N. Lemaitre, L. Lind, R.N. Luben, E.B. Rimm, U. Risérus, C. Samieri, P.W. Franks, D.S. Siscovick, M. Stampfer, L.M. Steffen, B.T. Steffen, M.Y. Tsai, R.M. van Dam, S. Voutilainen, W.C. Willett, M. Woodward, D. Mozaffarian. (2016). ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies. *JAMA Intern. Med*, 176(8), 1155–1166. doi: 10.1001/jamainternmed.2016.2925.
- Dennis, E.A. Norris, P.C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol*, 15(8), 511–523. doi: 10.1038/nri3859.

- Di Nicolantonio, J. & O’Keefe, J. (2017). Good Fats versus Bad Fats: A Comparison of Fatty Acids in the Promotion of Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity. *Mo Med*, 114(4), 303–307.
- Dobarganes, C., & Márquez-Ruiz, G. (2015). Possible adverse effects of frying with vegetable oils. *British Journal of Nutrition*, 113(2), 49–57. doi:10.1017/s0007114514002347
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol (vol. 3, p. 1461–1568). doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1461
- Eshghi, N., Asnaashari, M., Haddad Khodaparast, M. H., y Hosseini, F. (2014). Evaluating the potential of natural curcumin for oxidative stability of soybean oil. *Natural Product Research*, 28(17), 1375–1378. doi:10.1080/14786419.2014.901319
- Estrela, J. M., Mena, S., Obrador, E., Benlloch, M., Castellano, G., Salvador, R., y Dellinger, R. W. (2017). Polyphenolic Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Bioavailability versus Bioefficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(23), 9413–9436. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01026
- European Commission. (2010). ‘Commission Directive 2010/67/EU of 20 October 2010 amending Directive 2008/84/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners’, *Official Journal of the European Union*, L 277.
- European Commission. (2010). ‘Commission Directive 2010/69/EU of 22 October 2010 amending the Annexes to European Parliament and Council Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners’, *Official Journal of the European Union*, L 279.
- European Commission. (2011). COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011. *Official Journal of the European Union*, L 295.

- Farhoosh, R. (2007). The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelflife prediction of soybean oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 84, 205-209.
- Fredman, G. y Tabas, I. (2017). Boosting Inflammation Resolution in Atherosclerosis: The Next Frontier for Therapy. *Am. J. Pathol*, 187(6), 1211–1221. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.01.018
- Fritsche, Kevin L. (2015). The Science of Fatty Acids and Inflammation. *Adv Nutr*, 6(3), 293–301. doi: 10.3945/an.114.006940
- Ganesan, B. Brothersen, C. y McMahon, DJ. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54(1), 98-114. doi: 10.1080/10408398.2011.578221
- García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., y Guadix, E. M. (2013). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 303–308. doi: 10.1016/j.lwt.2012.11.002
- Gebauer, S.K. Psota, T.L. Harris, W.S. y KrisEtherton, P.M. (2006). n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr*, 83(6), 26–35. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1526S.
- Gertz, C. (2014). Fundamentals of the frying process. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(6), 669–674. doi:10.1002/ejlt.201400015
- Ghnimi, S., Budilarto, E., y Afaf, K.E. (2017). The New Paradigm for Lipid Oxidation and Insights to Microencapsulation of Omega-3 Fatty Acids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1206-1218. doi.org10.1111/1541-4337.12300
- Gil, Á. (2013). Libro blanco de los Omega 3 (2a ed.). Madrid:Ed. Médica Panamericana.
- Hadorn, H. YZtircher, K. (1986). Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the

- rancimat method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(6), 792–795. doi: 10.1007/BF02541966
- Hosseini, H., Ghorbani, M., Meshginfar, N., & Mahoonak, A. S. (2016). A Review on Frying: Procedure, Fat, Deterioration Progress and Health Hazards. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(4), 445–466. doi: 10.1007/s11746-016-2791-z
- Ito, E., Ikemoto, Y., y Yoshioka, T. (2015). Thermodynamic implications of high Q10 of thermoTRP channels in living cells. *BIOPHYSICS*, 11(0), 33–38. doi: 10.2142/biophysics.11.33
- Jacobsen, C. (2015). Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: a review. *Eur J Lipid Sci Technol*, 117(11), 1853-1866. doi.org/10.1002/ejlt.201500137
- Jain, S., y Sharma, M. P. (2011). Thermal stability of biodiesel and its blends: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 438–448. doi: 10.1016/j.rser.2010.08.022
- Jebe, T. A., Matlock, M. G., y Sleeter, R. T. (1993). Collaborative study of the oil stability index analysis. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(11), 1055–1061. doi:10.1007/bf02632142
- Katsuki, K. Miyagawa, Y. Nakagawa, K. y Adachi, S. (2017). Dispersion Stability of O/W Emulsions with Different Oil Contents Under Various Freezing and Thawing Conditions. *J Food Sci*, 82(7),1569-1573. doi: 10.1111/1750-3841.13764
- Kerrihard, A. L., Nagy, K., Craft, B.D. y Beggio, M. (2015). Oxidative Stability of Commodity Fats and Oils: Modeling Based on Fatty Acid Composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(8), 1153–1163. doi: 10.1007/s11746-015-2686-4.

- Kozłowska, M. y Gruczyńska, E. (2018). Comparison of the oxidative stability of soybean and sunflower oils enriched with herbal plant extracts. *Chem Zvesti*, 72(10), 2607–2615. doi: 10.1007/s11696-018-0516-5
- Lück, E. y von Rymon Lipinski, G.W. (2002). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (3a ed.). Germany: Wiley-VCH Weinheim. doi: 10.1002/14356007.a11_561
- Mezza, G. N., Borgarello, A. V., Grosso, N. R., Fernandez, H., Pramparo, M. C., y Gayol, M. F. (2018). Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil. *Food Chemistry*, 242, 9–15. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.042
- Manuela Silva, M. y Cebola, Lidon F. (2016). An overview on applications and side effects of antioxidant food additives. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(12), 823-832. doi: 10.9755/ejfa.2016-07-806.
- McClements, D. J. Bai, L. y Chung, C. (2017). Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. *Annu Rev Food Sci Technol*, 205-236. doi: 10.1146/annurev-food-030216-030154.
- McClements, D. J. y Weiss J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques* (2nd Edition, p. 1-609). Florida: CRC Press. Boca Raton.
- Mena, P., y Llorach, R. (2017). New Frontiers on the Metabolism, Bioavailability and Health Effects of Phenolic Compounds. *Molecules*, 22(1), 151. doi: 10.3390/molecules22010151
- Miyagawa, Y. y Adachi, S. (2017). Dispersion and oxidative stability of O/W emulsions and oxidation of microencapsulated oil. *Biosci Biotechnol Biochem*, 81(4), 625-633. doi: 10.1080/09168451.2016.1270742.
- Moss, G. P., Smith, P. A. S., y Tavernier, D. (1995). Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry* (vol. 67, p.1307-1375). Germany: Chemistry. doi:10.1351/pac199567081307.

- Mukhtiar, A. Pickova, J. Taufiq, A. Liaquat, M. Farid, A. y Jahangir, M. (2016). Oxidation of Lipids in Foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3), 230-238. doi: 10.17582/journal.sja/2016.32.3.230.238
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., y Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31426–31433. doi:10.1074/jbc.m212549200
- Osborn, H. T., y Akoh, C. C. (2004). Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 84(3), 451–456. doi:10.1016/s0308-8146(03)00270-x
- Pawar, N., Purohit, A., Gandhi, K., Arora, S., y Singh, R. R. B. (2014). Effect of Operational Parameters on Determination of Oxidative Stability Measured by Rancimat Method. *International Journal of Food Properties*, 17(9), 2082–2088. doi:10.1080/10942912.2012.680220
- Park, C. Y., Lee, K.Y., Gul, K., Rehman, M.S., Kim, A.N., Chun, J. y Choi, S.G. (2019). Phenolics and antioxidant activity of aqueous turmeric extracts as affected by heating temperature and time. *LWT*, 105, 149-155. doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.014
- Pokorná, I., Filip, V. y Šmidrkal, J. (2004). Lipid oxidation in margarine emulsions. *Czech Journal of Food Science*, 22, 140–143.
- Redondo-Cuevas, L., Castellano, G., y Raikos, V. (2017). Natural antioxidants from herbs and spices improve the oxidative stability and frying performance of vegetable oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(11), 2422–2428. doi:10.1111/ijfs.13526
- Redondo-Cuevas, L., Castellano, G., Torrens, F., y Raikos, V. (2018). Revealing the relationship between vegetable oil composition and oxidative stability: a multifactorial approach. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.027>

- Shoeb, M., Ansari, N.H., Srivastava, S.K. y Ramana, K.V. (2014). 4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis and Progression of Human Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 21(2), 230-237. doi 10.2174/09298673113209990181
- Siefarth, C.Serfert, Y. Drusch, S. y Buettner, A. (2014). Comparative Evaluation of Diagnostic Tools for Oxidative Deterioration of Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Infant Formulas during Storage. *Foods*, 3(1), 30–65. doi: 10.3390/foods3010030.
- Stoker, H.S. (2011). *General, Organic and Biological Chemistry*, 6(97). Boston: Cengage Learning.
- Sun, A. y Gunasekaran, S. (2009). Measuring rheological characteristics and spreadability of soft food using a modified squeeze-flow apparatus. *Journal of Texture Studies*, 40(3), 275–287. doi:10.1111/j.1745-4603.2009.00181.x
- Tanvir, E.M., Sakib Hossen, M., Fuad Hossain, M., Afroz, R., Hua, G.S., Ibrahim, K. y Nurul, K. (2017). *Journal of Food Quality*, 1-8. doi.org/10.1155/2017/8471785
- Tao, L. (2015). Oxidation of polyunsaturated fatty acids and its impact on food quality and human health. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.*, 1(6), 135-142. doi: 10.17140/AFTN- SOJ-1-123
- Terpinc, P., Bezjak, M., y Abramovič, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115(2), 740–744. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.033
- Tirosh, O. Shpaizer, A. y Kanner, J. (2015). Lipid Peroxidation in a Stomach Medium Is Affected by Dietary Oils (Olive/Fish) and Antioxidants: The Mediterranean versus Western Diet. *J. Agric. Food Chem.*, 63(31), 7016-7023. doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02149
- Torrens, F. y Castellano, G. (2017). QSRP Prediction of Retention Times of Chlorogenic Acids in Coffee by Bioplastic Evolution. doi 10.5772/intechopen.68661

- Vallerio Rios, R. Durigan, M. Pessanha F. Fernandes de Almeida, P. Leonel Viana, C. y Caetano da Silva Lannes, S. (2014). Application of fats in some food products. *Food Sci. Technol*, 34(1). doi.org/10.1590/S0101-20612014000100001
- Vander Veen, L. A., Hashim, M. F., Shyr, Y., y Marnett, L. J. (2003). Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14247–14252. doi:10.1073/pnas.2332176100
- Yi, B., Ka, H. J., Kim, M.J. y Lee, J. (2015). Effects of Curcumin on the Oxidative Stability of Oils Depending on Type of Matrix, Photosensitizers, and Temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(5), 685–691. doi:10.1007/s11746-015-2639-y
- Yukihiro, Y. y Misawa, R. (2018). Effect of Emulsifier Concentration on the Oxidation of an O/W Emulsion Prepared from Canola Oil. *Food and Nutrition Sciences*, 9(6), 683-692. doi: 10.4236/fns.2018.96052