



Universidad Nacional de Córdoba
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Tesis de Maestría

**ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN DE
ACEITE DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.)
OBTENIDO POR PRENSADO EN FRIO**

Presentada por Bodoira Romina Mariana para optar al grado de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Córdoba, 2014



Universidad Nacional de Córdoba

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET)

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNC)

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN DE ACEITE DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.) OBTENIDO POR PRENSADO EN FRIO

Directora: Dra. Martínez Marcela Lilian

Codirectora: Dra. Penci María Cecilia

Tribunal:

*Dr. Daniel Wunderlin (Universidad Nacional de Córdoba)

*Dr. Celso Camusso (Universidad Nacional de Córdoba)

*Dra. Amalia Antonia Carelli Albarracín (Universidad Nacional del Sur)

AGRADECIMIENTOS

A Marce, mi directora, que me ayudó incondicionalmente en el trabajo diario, en la escritura y en los problemas que en todo trabajo experimental surgen continuamente, siempre tratando de apoyarme, enseñarme y acompañarme humildemente y a la par.

A Damián, mi director de Doctorado, por permitirme volar un poco y dejarme hacer y ser en este camino que comienzo como investigadora. También le agradezco por los aportes de todo tipo realizados a este trabajo de tesis.

A Ceci, mi codirectora, por los aportes realizados durante el diseño experimental, durante el desarrollo del mismo y en la escritura final de esta tesis.

A los ayudantes de laboratorio y tesinistas que durante estos años pasaron por el laboratorio y fueron de gran ayuda para mí en la parte experimental. Gracias: Nico, Fede, Vir, Lucy, Jesi, Rena, Pablo, Georgi y Silvi.

Al tribunal de esta tesis por tomarse el tiempo de valorar este trabajo.

Al instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA-UNC) por brindarme el lugar físico y los equipos necesarios para llevar a cabo el trabajo realizado.

A Domingo Montagno de “Aceites del Desierto” por su desinteresada predisposición constante y apoyo a las investigaciones del grupo.

A Javier Larralde por las semillas de chía.

A Danisco por facilitarme los antioxidantes requeridos.

A CONICET y SECyT- UNC, un sentido reconocimiento de gratitud, ya que sin sus aportes financieros, nada hubiera podido lograr.

A mis compañeros de trabajo: Jime, Marce, Damián, Ali, Julio, José, Agus, Romis, Diana, Pauli y Seba, que logran un ambiente de trabajo hermoso, diariamente es un gusto compartir con ustedes.

A mis compañeros de la maestría, que hicieron que los dos años de cursado entre mates almuerzos, trabajos en equipo, risas y momentos se pasen volando.

A mi familia, papis, hermanas, abu y sobris... por siempre apoyarme en mis estudios, por nunca cuestionar mis deseos, por dejarme ser y decidir, y por estar orgullosos de mí y demostrármelo siempre. Pero principalmente por ser la familia y el sustento que cualquier persona quisiera, porque sin ese sustento y presencia ninguno de mis logros hubiesen sido posibles. Los amo con todo mi corazón y son la razón de querer ser lo que sueño.

A mis amigas de siempre, amigas de la vida misma, que sin saber o sabiéndolo me apoyan con sus buenas ondas, que aunque sin entender lo que hago siempre están expectantes de mis logros, que por solo estar ahí, siempre, hacen que mi vida nunca se olvide su cuota de risa y encanto. Porque sin ellas simplemente no sería quien soy y porque las amo es que esta tesis también va dedicada a ustedes.

Finalmente y principalmente agradezco, a mi Amor.... Ari sin vos nada de esto hubiera sido posible, a pesar de que al principio tenías miedo de mi salud mental por intentar hacer esta maestría junto con el doctorado, te bancaste; con todo el amor que estas acostumbrado a brindar desinteresadamente, mis ausencias, mis horas y horas de estudio, mis libros y papers en la mesa, mis semillas en la heladera, mi cabeza en cualquier parte casi todo el tiempo (eso más allá de esta tesis) mis humores en días de “catarsis académica”, vos siempre estabas ahí... siempre estás ahí apoyándome incondicionalmente con tu comprensión, tu paciencia y tu amor. Por eso esta tesis es un logro de los dos...uno entre tantos que nos depara esta vida juntos...Te amo.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
INTRODUCCION GENERAL	
El cultivo en la actualidad.....	1
Composición nutricional de la semilla de chía.....	2
Los Ácidos Grasos Poliinsaturados y su importancia en la salud.....	3
Chía vs. otras fuentes de Omega-3.....	6
Alteración de los aceites.....	7
Los antioxidantes.....	7
Hipótesis.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos.....	8
CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE CHÍA.	
Antecedentes.....	9
Objetivos Específicos.....	10
Materiales y Métodos.....	10
Resultados y Discusión.....	19
Conclusiones.....	26
CAPÍTULO II: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ADITIVOS NATURALES SOBRE EL ACEITE DE CHÍA.	
Antecedentes.....	27
Objetivos Específicos.....	33
Materiales y Métodos.....	33
Resultados y Discusión.....	36
Conclusiones.....	45
CAPÍTULO III: ENSAYO DE ALMACENAMIENTO PROLONGADO	
Antecedentes.....	47
Objetivos Específicos.....	49
Materiales y Métodos.....	49
Resultados y Discusión.....	51
Conclusiones.....	59
CONCLUSION GENERAL	60
BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

La semilla de *Salvia hispanica* L. (chía), hierba anual que pertenece a la familia Labiaceae, posee notables características nutricionales. En cuanto al aceite es considerado la mayor fuente vegetal de ácidos grasos de la serie ω -3 ($\geq 60\%$), cuyo consumo es esencial para el ser humano. Las reacciones de oxidación (autooxidación y lipólisis) de los lípidos, que dependen en gran medida del grado de insaturación, son causa de disminución de la calidad nutricional y sensorial de los alimentos. Los antioxidantes, son sustancias capaces de interrumpir la propagación en cadena de radicales libres. Aunque los sintéticos son muy utilizados, su seguridad ha sido cuestionada promoviendo la investigación de compuestos naturales. Entre estos, el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L) (ER), reconocido como un aditivo GRAS (*Generally recognized as safe*), posee el ácido carnósico como componente activo mayoritario. El derivado liposoluble del ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo (PA) es otro ejemplo y tocoferol (TOC) es el nombre de varios compuestos orgánicos conformados por fenoles metilados con actividad vitamínica y antioxidante.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de antioxidantes naturales y sus combinaciones sobre la estabilidad oxidativa primero en ensayo de oxidación acelerada (Rancimat) luego en almacenamiento prolongado.

El aceite fue obtenido con prensa de tornillo helicoidal de acero inoxidable y caracterizado según diferentes parámetros químicos. Luego se probaron distintas concentraciones y combinaciones de antioxidantes (ER, PA, Terbutilhidroquinona (TBHQ), Acido cítrico y TOC) en Rancimat (100°C, 20mL/min de flujo y 3 g de aceite).

Según los factores de protección (horas) obtenidos en Rancimat y los máximos estipulados por el Código Alimentario Argentino (CAA) se realizó un ensayo de almacenamiento prolongado (165 días-25°C-oscuridad) dinámico o sin reposición para los siguientes tratamientos por triplicado: dos controles sin aditivar uno en luz y otro en oscuridad, TBHQ (200 ppm), PA (200 ppm), ER (8000 ppm), TOC (200 ppm) y la única combinación que demostró sinergismo PA + TOC (200 ppm de c/u). Estos tratamientos se sometieron quincenalmente a los siguientes análisis: grado de acidez (GA), índice de peróxidos (IP), dienos conjugados (k_{232}) y trienos conjugados (k_{270}). Adicionalmente a los 165 días también se midió: DPPH, tocoferoles, composición acídica e índice de Yodo (IY).

Tanto el GA como k_{270} se mantienen prácticamente constantes durante todo el período de almacenamiento y en la totalidad de los tratamientos. En cambio la dinámica de IP y k_{232} presentó un comportamiento equivalente: TBHQ, PA y PA + TOC demostraron mayor efectividad en la protección del aceite, no mostrando diferencias significativas entre ellos hasta los 135 días, momento a partir del cual la combinación PA + TOC, se diferencia significativamente de los otros dos y muestra los valores más bajos de IP. Por su parte los tratamientos: CO, ER y TOC no demostraron buena capacidad antioxidante superando siempre el máximo permitido por el CAA de IP (15 meqO₂/Kg). La condición lumínica (CL) ejerce un efecto significativo sobre la generación de productos de oxidación primarios ya que la foto-oxidación representa una vía importante de generación de peróxidos cuando la misma sucede en presencia de un fotosensibilizador adecuado (clorofilas, feofitinas o flavinas). Estas reacciones no presentan un período de inducción apreciable.

Se observó que los pigmentos disminuyen significativamente a lo largo del período de almacenamiento, no existiendo diferencias para los carotenos, entre las condiciones de luz y oscuridad, pero sí para las clorofilas las cuales sufren una reducción de aproximadamente un 80% en luz y de un 63% en oscuridad. Por su parte el perfil de ácidos grasos y la actividad antioxidante medida según DPPH_r, no se modificaron con el almacenamiento en ambas condiciones.

El aceite de chía, por su perfil altamente insaturado posee una ventaja nutricional pero acarrea una desventaja tecnológica en cuanto a la estabilidad del producto. Si bien contiene naturalmente sustancias antioxidantes, cuando se encuentra expuesto a factores como el aire, la luz y la temperatura se oxida alterando su calidad. En respuesta a esta realidad, se comprobó que, el efecto protector de la combinación de los antioxidantes naturales PA y TOC (50:50), respetando los límites establecidos por el CAA, fue superior al alcanzado con TBHQ. Constituyendo una alternativa novedosa para la industria aceitera actualmente interesada en estos aceites no convencionales.

PALABRAS CLAVES: aceite de chía, antioxidantes naturales, estabilidad oxidativa, conservación, vida útil.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: microgramo
µl: microlitro
µm: micrómetro
AA: Ácido Araquidónico
AA': Ácido Ascórbico
AC: Ácido Cítrico
a.C: antes de Cristo
AG: ácidos grasos
AGL: ácidos grasos libres
AGMI: ácidos grasos monoinsaturados
AGPI: ácidos grasos poliinsaturados
AGPICL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
ANAVA: Análisis de la Varianza
AOCS: American Oil Chemists' Society
°C: grados centígrados
BHA: 3-Terbutil 4-hidroxianisol
BHT: 2,6-diterbutil-4-metilfenol
bh: base húmeda
bs: base seca
CAA: Código Alimentario Argentino
Cap.: Capítulo
CCD: Cromatografía en capa delgada
CG: Cromatografía gaseosa
CG-MS: Cromatografía gaseosa por espectrometría de masas
CL: Control Luz
cm: centímetros
CO: Control Oscuridad
DHA: Ácido Docosahexaenoico
DPA: Ácido Docosapentaenoico
DPPH·: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPHr: DPPH remanente
E: absorbancia a la longitud de onda específica
E1%: absorbancia específica en una solución al 1 % medida en una cubeta de 1 cm de paso óptico
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles
EO: Estabilidad oxidativa
EPA: Ácido Eicosapentaenoico
ER: Extracto de romero
FAO: Food and Agriculture Organization
FDA: Food and Drug Administration
Fig.: Figura
FP: Factor de protección
g: gramos

GA: Grado de acidez
GRAS: *Generally Recognized as Safe*
h: horas
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
ICTA: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IP: Índice de peróxidos
IY: Índice de yodo
k₂₃₂: Dienos conjugados
k₂₇₀: Trienos conjugados
Kcal: kilocalorías
Kg: kilogramo
l: litro
l/h: litros por hora
LA: Ácido Linoleico
LNA: Ácido Linolénico
LSD: test a posteriori de comparaciones múltiples
M: molaridad
m: metros
meq: miliequivalentes
mg: miligramo
min: minutos
ml: mililitro
ml/min: mililitros por minuto
mm: milímetro
N: normalidad
n: número de réplicas
ND: No detectado
nm: nanómetros
NOA: Noroeste Argentino
NWARP: Northwestern Argentina Regional Project
OMS: Organización Mundial de la Salud
p: nivel de significación
p/v: peso en volumen
p/p: peso en peso
PA: Palmitato de ascorbilo
PM: peso molecular
ppm: partes por millón
rpm: revoluciones por minuto
R²: coeficiente de regresión lineal
s: segundos
T°: temperatura
TBHQ: 2,5-diterbutil hidroquinona
TI: Tiempo de inducción
Tr: Valores traza
TOC: Tocoferoles

LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Ácido α -Linolénico como % del total de ácidos grasos en aceites vegetales.	3
Tabla 2:	Rendimiento de aceite, parámetros químicos y composición de ácidos grasos del aceite de chía obtenido por prensado en frío.	20
Tabla 3:	Ácidos grasos mayoritarios presentes en aceites vegetales y los índices de yodo (IY) correspondientes.	22
Tabla 4:	Contenido de tocoferoles (mg/Kg) en aceites vegetales.	24
Tabla 5:	Concentraciones (ppm) de los antioxidantes probados en el ensayo de de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	35
Tabla 6:	Factores de protección (h) de antioxidantes individuales y su combinación con ER (Extracto de Romero), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	39
Tabla 7:	Factores de protección (h) de antioxidantes naturales a 100 y 200 ppm (ppm) en comparación con Terbutilhidroquinona (TBHQ) a las mismas concentraciones, obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	45
Tabla 8:	Tratamientos utilizados para evaluar la estabilidad del aceite de chía en un ensayo de almacenamiento prolongado (luz fluorescente, intensidad 800 Lux, 25°C).	50
Tabla 9:	Coefficientes de regresión y R^2 para los índices de peróxidos (meq O_2 /Kg aceite) de los distintos tratamientos utilizados en el ensayo de almacenamiento prolongado. Ecuaciones de regresión: " $y = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2$ " donde "y" es la variable dependiente (IP), β_0 es la constante que indica el valor esperado de "y" cuando "x"=0, " β_1 " es el coeficiente de "x", " β_2 " es el coeficiente de " x^2 ", "x" es la variable independiente o regresora (días).	57
Tabla 10:	Parámetros químicos medidos a los 0 y 165 días en los aceites control (luz y oscuridad). Valores medios (n=3) \pm desvío estándar.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Se muestra la planta (a), flor (b), fruto (c) y semilla de <i>Salvia hispanica</i>	1
Figura 2:	Transformación metabólica de los ácidos grasos de las series ω -9, ω -6, ω -3.	5
Figura 3:	Esquema de la prensa de tornillo helicoidal utilizada para la extracción del aceite.	11
Figura 4:	Distribución esquemática del equipo Rancimat (a) y curva de oxidación típica (b).	16
Figura 5:	Esteroles de la fracción insaponificable del aceite de chía: (a) β -sitosterol, (b) 4,6-Colestadien-3 β -ol y (c) Campesterol.	25
Figura 6:	Reacciones de la autoxidación de lípidos insaturados	28
Figura 7:	Antioxidantes de Tipo I: compuestos fenólicos sintéticos.	29
Figura 8:	Antioxidantes de Tipo II: quelantes o secuestrantes de metales.	30
Figura 9:	Ácido carnósico.	31
Figura 10:	Ácido ascórbico y su derivado lipofílico palmitato de ascorbilo.	32
Figura 11:	Estructura química de los tocoferoles.	32
Figura 12:	Recta Temperatura (°C) vs. Tiempo (h) para lograr la estimación del tiempo de vida útil del aceite de chía sin aditivar a 25°C.	37
Figura 13:	Factores de protección (h) de Extracto de Romero (ER) a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	37
Figura 14:	Factores de protección (h) de Palmitato de Ascorbilo (PA) a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	40
Figura 15:	Factores de protección (h) de Tocoferoles (TOC) a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	41

Figura 16:	Factores de protección (h) de la combinación (50:50) de Palmitato de Ascorbilo (PA) y Tocoferoles (TOC) y a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	42
Figura 17:	Factores de protección (h) de Palmitato de Ascorbilo (PA), Tocoferoles (TOC) y de la combinación de ambos a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).	43
Figura 18:	Porcentaje (%) de sinergismo entre Palmitato de Ascorbilo (PA) y Tocoferoles (TOC) a distintas concentraciones (ppm) de cada uno	43
Figura 19:	Evolución del grado de acidez durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.	54
Figura 20:	Evolución del coeficiente de extinción específica (k ₂₇₀ , trienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.	54
Figura 21:	Evolución del coeficiente de extinción específica (k ₂₃₂ , dienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.	55
Figura 22:	Evolución del índice de peróxidos (meqO ₂ /Kg aceite) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.	55
Figura 23:	Evolución del índice de peróxidos (meqO ₂ /Kg aceite) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas de los tratamientos que presentaron mejores resultados.	56

INTRODUCCION GENERAL

La *Salvia hispanica* L., cuyo nombre común es chía, es una hierba anual de verano que se desarrolla en clima tropical a sub-tropical, pertenece a la familia Labiaceae y es nativa del sur de México y norte de Guatemala. La chía tiene una larga historia como alimento humano; su domesticación se remonta a los antiguos pueblos mexicanos en el año 2600 a.C.; junto con el amaranto, los frijoles y el maíz eran los principales componentes de las dietas de civilizaciones azteca y maya, también utilizada como medicina y para la elaboración de pinturas y cosméticos.

Esta hierba alcanza una altura entre 1-1,5 m (Fig. 1a), tiene flores hermafroditas en espigas terminales (Fig. 1b) que resultan en un tipo de frutos denominados aquenios (Fig. 1c). Sus semillas son ovales de aproximadamente 1,5- 2 mm de largo (Fig. 1d), según la variedad pueden ser blancas a negras grisáceas con manchas irregulares en su superficie y con un rinde de hasta 3000 kg por hectárea, actualmente la mayoría de las plantaciones tienen un bajo porcentaje de semillas blancas.

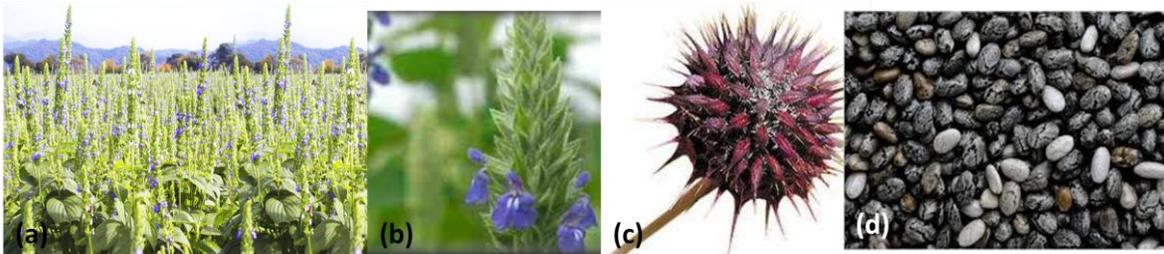


Figura 1: Planta (a), flor (b), fruto (c) y semilla de *Salvia hispanica* L.

El cultivo en la actualidad

Luego del descubrimiento de América, la superficie cultivada de chía disminuyó marcadamente. Actualmente, en su lugar nativo (México y Guatemala) la especie está limitada a unas pocas hectáreas con escasas posibilidades de incrementar el área sembrada debido a factores sociales y políticos entre otros. Sin embargo, teniendo en cuenta sus características nutricionales sobresalientes, se ha comenzado a cultivar en diferentes países en forma regular. En 1991 se comenzó a plantar chía en el norte de Argentina, en las provincias de Salta, Tucumán y Catamarca en el marco del proyecto llamado “*Northwestern Argentina Regional Project*” (NWARP). Dicho proyecto fue una iniciativa

conjunta de organizaciones públicas y privadas estadounidenses y argentinas cuyo objetivo fue identificar y llevar a la producción comercial nuevos cultivos industriales que pudieran diversificar la producción agrícola e incrementar los beneficios de los productores en el noroeste argentino (NOA) (Coates & Ayerza 1996). Asimismo, el proyecto se proponía encontrar una fuente natural sustentable de ácidos grasos ω -3 para reemplazar al aceite de pescado y algas marinas (Crettaz 2006).

La migración del cultivo al norte, desde Catamarca a la provincia de Salta donde hoy se concentra la mayor producción, tuvo lugar gracias a las condiciones climáticas, principalmente al factor heladas, ya que la planta tolera muy bien la sequía y suelos con baja o mediana fertilidad, no así las heladas tempranas. El NWARDP también introdujo la chía en el Valle de Cauca en Colombia y en los desiertos costeros de Perú, pero por problemas asociados a las fuertes lluvias y los costos de producción del agua de riego respectivamente, se abandonó el cultivo en estas áreas (Ayerza & Coates 2006). En este contexto, técnicos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Salta impulsaron y acompañaron a los productores del NOA para que opten por esta “alternativa productiva complementaria” demandada principalmente por Estados Unidos, Japón y Europa (Gimenez 2012). En la campaña que comenzó en enero de 2013, la superficie de cultivo en Salta ascendió a 50.000 hectáreas y un 80% de la producción estaría destinada principalmente a la exportación (Saravia Olmos 2012).

Composición nutricional de la semilla de chía

La semilla de chía contiene alrededor de un 32% de materia grasa; 27,7% de fibra, 21,1% de proteínas y 4,8% de cenizas (Ayerza 1995; Ixtaina *et al* 2008; 2011; Ayerza & Coates 2004, 2011). Es una fuente completa de proteínas no sólo por su contenido, alto respecto a otras semillas comestibles, sino también en cuanto a su composición de aminoácidos siendo nueve de ellos esenciales para el hombre. Por otro lado, las proteínas de las semillas de chía, a diferencia de las del trigo, avena, cebada y centeno, no contienen gluten. En cuanto a los micronutrientes, son una fuente de vitamina A y del complejo B, aporta hierro, calcio, zinc, potasio, magnesio, cobre y fósforo y no posee compuestos anti-nutricionales ni tóxicos (Ayerza & Coates 2006). Resulta interesante destacar que esta semilla es una importante fuente de antioxidantes, entre los cuales se pueden mencionar, el

ácido clorogénico, el ácido cafeico, la miricetina, la quercetina y el kampeferol (Reyes-Caudillo *et al* 2008).

Los lípidos, componentes mayoritarios de la semilla de chía (32-39%), serán tratados en el apartado siguiente dado la importancia de los mismos en el presente trabajo.

Los Ácidos Grasos Poliinsaturados y su importancia en la salud

La riqueza nutricional de la chía la convierte en un ingrediente ideal para incorporar en productos de panificación, barras energéticas, suplementos dietarios, preparaciones culinarias y como complemento en la dieta de aves de corral y rumiantes con el fin de aumentar en sus productos (leche, carne y huevos) el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Ayerza & Coates 2000; 2001; 2002; Woods & Fearon 2009). El aceite de chía es considerado la mayor fuente vegetal de ácidos grasos de la serie ω -3 conocida hasta el momento (más de un 60% de α -Linolénico) si se lo compara con los aceites vegetales tradicionales (Tabla 1). Teniendo en cuenta que, el requerimiento diario de ácido α -Linolénico para individuos normales es un 0,5% de las calorías totales (2000 Kcal), puede estimarse que el consumo de no más de 5 g de semillas de chía por día cumple con el requerimiento diario de este ácido graso esencial.

Aceite	% Ácido Linolénico
Chía	≥ 60 %
Linaza	57 %
Nuez	15,2 %
Canola	8,8 %
Soja	7,6 %
Maíz	1,2 %
Girasol	0,8 %
Oliva	0,7 %

Tabla 1: Ácido α -Linolénico como % del total de ácidos grasos en aceites vegetales.

La esencialidad de los AGPI, descrita por primera vez por los esposos Burr (1929) y reafirmada luego por un famoso estudio de los daneses Dyerberg & Bang (1978) sobre la dieta de esquimales y el riesgo reducido de esta población en contraer enfermedades de tipo cardiovascular, está determinada por la imposibilidad que tienen los mamíferos para sintetizar estos ácidos grasos.

Los vegetales terrestres y marinos pueden sintetizar AGPI a partir de precursores más simples, los peces y otros animales marinos pueden elongar y desaturar AGPI y transformarlos en Ácidos Grasos Poliinsaturados de Cadena Larga (AGPICL). Los mamíferos por su parte, tienen la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos para transformarlos en AGPICL, pero sólo a partir de ciertos precursores presentes en la dieta (Fig.2). Tal es el caso del ácido linoleico (18:2, LA) que pertenece a la serie ω -6 y que da origen, entre otros, al ácido araquidónico (20:4, AA), que es a su vez un importante precursor de eicosanoides del sistema parácrino. Por su parte el ácido linolénico (18:3, LNA) que pertenece y da origen a la serie ω -3, permite la formación de tres importantes AGPICL: el ácido eicosapentaenoico (20:5, EPA), el ácido docosapentaenoico (22:5, DPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6, DHA).

Es importante mencionar que la conversión de LNA a EPA y DHA es de un 6% y 3,8% respectivamente, cuando se recibe una dieta principalmente constituida por grasa saturada, si se incrementa el consumo de AGPI ω -6, esta conversión se reduce en un 40%-50% (Gerster 1998), esto puede deberse a la competencia que existe por la enzima delta-6-desaturasa que cataliza la primera reacción de ambas series (ω -6 y ω -3) (Valenzuela *et al* 1999) (Fig.2). A pesar de que se supone que la conversión de LNA a AGPICL es baja, un estudio reciente (Welch *et al* 2010) demostró que si bien la ingesta directa de EPA y DHA en vegetarianos estrictos y veganos es nula, la relación precursor-producto fue mayor en estos últimos que en aquellos consumidores habituales de pescado, esto podría demostrar una adaptación del organismo que determina un aumento de la conversión de LNA a EPA y DHA.

Los beneficios a la salud que brindan estos AGPICL, incorporados a la dieta directamente o mediante los precursores mencionados, son muchos y variados. Se reconocen los beneficios en cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares, reducción del riesgo de infarto, del grosor arterial, de la presión sanguínea y del contenido

de triglicéridos (Ayerza & Coates 2005), a la protección contra las arritmias y la taquicardia ventricular, también en cuanto a la salud mental, ya el DHA es un ácido graso esencial en la formación de las membranas y en la función del tejido nervioso y visual, a su vez cumple importantes funciones regulatorias en el sistema inmunológico (Galli & Marangoni 2006; Fereidoon 2009) . En adición, pueden tener un efecto positivo para pacientes con diabetes tipo II y con trastornos inflamatorios, tales como la artritis. También se ha demostrado que resultan importantes para el tratamiento de la depresión, la esquizofrenia y los problemas de memoria que caracterizan a enfermedades como el mal de Alzheimer y la demencia (Peet & Stokes 2005; Mazza *et al* 2007). En mujeres embarazadas y en período de lactancia se recomienda un consumo adecuado de ácidos grasos ω -3 para satisfacer la necesidad del feto o lactante en el desarrollo de la retina y el cerebro (Bowen & Clandini 2005).

Debido a cambios en los hábitos alimentarios y el modo de vida, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), son causas cada vez más importantes de discapacidad y muerte en los países tanto en desarrollo como desarrollados y suponen una carga adicional para los presupuestos sanitarios nacionales (Organización Mundial de la Salud 2003). De ahí el desafío y la obligación de la industria alimenticia de generar productos que beneficien la salud y promuevan una alimentación saludable.

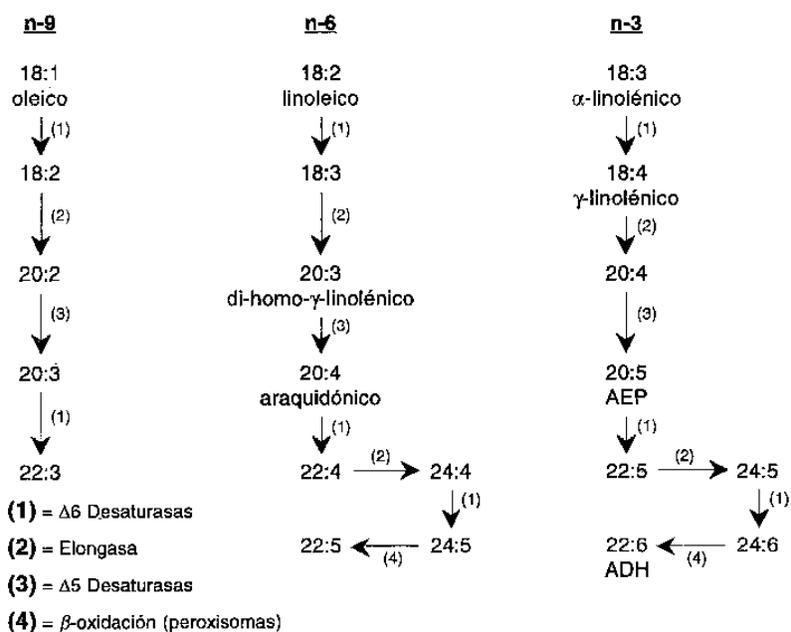


Figura 2: Transformación metabólica de los ácidos grasos de las series ω -9, ω -6 y ω -3.

(Fuente: Valenzuela *et al* 1999).

Chía vs. otras fuentes de ω -3

En la actualidad, existen en el mercado diversos productos alimenticios enriquecidos con ácidos grasos ω -3, los cuales se obtienen incluyendo en los alimentos para consumo humano y animal: semillas de lino, de chía, algas marinas, pescado y su aceite . Si bien, estas cuatro materias primas son las principales fuentes en la naturaleza de ácidos grasos ω -3, existen notables diferencias entre ellas en cuanto a factores de mercado como disponibilidad, uniformidad y precios, composición química y también en cuanto a su aceptación de acuerdo a los hábitos alimentarios de cada población.

Las fuentes vegetales de AGPI, contienen en promedio una mayor proporción de ω -3 que las de origen marino, además un cultivo agrícola tiene la ventaja de poder aumentar la cantidad disponible con relativa facilidad, de acuerdo a los requerimientos del mercado. Por otro lado, una de las desventajas principales del pescado como alimento es que su consumo se encuentra dentro de las causas más comunes de alergias alimenticias (Hansen *et al* 1997; Madsen 1997) por lo que su incorporación a la dieta se encuentra limitada en muchas personas. A su vez, la aceptación de las algas, el pescado y sus derivados implica cambios en hábitos alimentarios muy arraigados a las culturas que no son simples de modificar, y que se relacionan con la historia y la geografía de las poblaciones no sólo con sus preferencias subjetivas. Otra consideración acerca de los aceites de pescado es que contienen colesterol puesto que son productos animales y sólo el proveniente de la especie conocida como *menhaden* ha sido calificado como seguro (*GRAS, Generally recognized as safe*) por la *Food and Drug Administration* (FDA), status que acredita que un alimento o aditivo es seguro para la salud humana. Finalmente, resulta oportuno destacar que, las reservas mundiales de peces están disminuyendo debido a la pesca excesiva y a la polución de las vías acuáticas, incluso se ha comprobado que muchos peces para consumo poseen altas concentraciones de contaminantes como las dioxinas en sus tejidos que son acumulados luego en la grasa corporal de los consumidores habituales (Svensson *et al* 1991).

Respecto al lino (*Linum usitatissimum* L.), ha sido fuertemente cuestionado por la presencia de cianoglicósidos tóxicos (linamarin) y factores antagónicos de la vitamina B6 (Vetter 2000). El aceite de lino está prohibido para consumo humano en Francia y limitado en Alemania y Suiza, por su parte en los Estados Unidos no se encuentra aprobado por la

FDA. Ninguno de los factores tóxicos ni antinutricionales del lino, o cualquier otro factor adverso, se han encontrado en las semillas o el aceite de chía, por tal motivo, la FDA no pone restricción alguna para su empleo en alimentación (Ayerza & Coates 2005).

Alteración de los aceites

La oxidación de los lípidos alimenticios constituye un grave problema, tanto para los consumidores como para los fabricantes. Las reacciones de oxidación motivan una disminución de la calidad nutricional y sensorial de los alimentos, debido a pérdidas de ácidos grasos esenciales, actividad vitamínica y color. Además, algunos productos de oxidación son potencialmente tóxicos (Esterbauer 1993; Colles *et al* 2001; Dobarganes & Márquez-Ruiz 2003). Estas reacciones que dan como resultado el deterioro de los aceites, siendo más vulnerables los más insaturados, se conocen comúnmente como rancidez y pueden deberse a dos mecanismos: la auto oxidación o rancidez oxidativa y la lipólisis o rancidez hidrolítica que serán explicadas con detalle en el Capítulo II.

Los antioxidantes

Son moléculas o procesos de protección física capaces de retardar o prevenir el deterioro asociado a los lípidos. Los antioxidantes químicos pueden ser de origen natural o artificial, y sus mecanismos de acción son variados y serán tratados con detalle en el Capítulo II. Si bien la mayor parte de los antioxidantes de grado alimentario son sustancias fenólicas sintéticas, a la luz de las nuevas tendencias en alimentación, la presencia de estos aditivos está siendo cuestionada cada vez en mayor grado. Muchas sustancias naturales, entre las que se encuentran fenoles simples, ácidos fenólicos, carotenoides, antocianinas, flavonoides y vitaminas, presentan probadas propiedades antioxidantes (Maestri *et al* 2006).

La eficacia de un antioxidante depende no sólo de sus características químicas sino también del tipo de sustrato, es decir, sistema lipídico simple o complejo. A su vez, los antioxidantes muestran diferente grado de eficacia en la protección de un alimento si se encuentran solos o combinados con otros, siendo las combinaciones entre ellos las que suelen proporcionar una protección más completa que la que se puede alcanzar por los efectos aditivos de cada uno de ellos por separado. Así, la mezcla de antioxidantes tiene en

ocasiones una acción sinérgica, si bien en muchos casos su mecanismo de acción se encuentra sin esclarecer (Fenemma 1993).

Hipótesis

Antioxidantes naturales y/o sus combinaciones estabilizan al aceite de chía, una matriz sumamente vulnerable a la auto oxidación debido a su perfil altamente insaturado, de manera similar a como antioxidantes sintéticos comúnmente usados en la industria aceitera estabilizan a los aceites tradicionales.

Objetivo General

Analizar la eficacia de antioxidantes naturales solos y/o combinados sobre la estabilidad oxidativa del aceite de chía obtenido por prensado en frío.

Objetivos Específicos

- *Objetivo 1:* Obtener aceite de chía por prensado en frío, caracterizarlo y evaluar la calidad química del mismo.
- *Objetivo 2:* Analizar la eficacia de sustancias naturales y sintéticas, solas y en diferentes combinaciones, sobre la estabilidad oxidativa del aceite de chía mediante oxidación acelerada (Rancimat).
- *Objetivo 3:* Evaluar la conservación del aceite de chía en condiciones controladas de almacenamiento prolongado utilizando concentraciones seleccionadas de los antioxidantes estudiados teniendo en cuenta no sólo los factores de protección obtenidos por Rancimat sino también la legislación vigente en el Código Alimentario Argentino (CAA).

CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE CHÍA

Antecedentes

Los aceites vegetales están constituidos por triglicéridos (95-98%), ácidos grasos libres (0,1-3%) fosfoglicéridos (0,1-3%) y también por una gran variedad de otros componentes minoritarios, entre los cuales se pueden mencionar: los esteroides, alcoholes triterpénicos, hidrocarburos, tocoferoles, carotenoides, clorofilas y flavonoides que componen la fracción insaponificable.

El aceite de chía conocido como *Chiamatl* era usado por los antiguos mexicanos como cosmético y alimento. Actualmente, se comercializa principalmente en forma de cápsulas o en envases de 100-150 mL como un suplemento dietario fuente de ácidos grasos ω -3. Existen empresas Argentinas como “Sturla”, “Sol azteca” y “Chiacaps” entre otras, que se destacan por sus productos en este mercado.

El contenido de aceite en las semillas de chía varía entre 32 y 39% siendo algo superior en las semillas blancas (Ayerza 1995; Ixtaina *et al* 2008).

El Código Alimentario Argentino (CAA) en el capítulo XVII (alimentos de régimen o dietéticos) en el artículo 1381 bis (Resolución Conjunta SPReI N° 76/2009 y SAGPyA N° 391/2009), denomina al aceite de chía como el obtenido de semillas de *Salvia hispánica* L. y menciona las siguientes exigencias:

- Aspecto: color amarillo claro, brillante, libre de materiales extraños e inmiscibles con el agua.
- Sabor y aroma: Característico del aceite, sabor y olor suave, sin indicios de rancidez u otra anormalidad en los ensayos organolépticos.
- Acidez libre: menos del 1%
- Índice de iodo: 205-215.
- Composición de ácidos grasos determinada por cromatografía en fase gaseosa: ácido mirístico (C14:0): 0,04 %; ácido palmítico (C16:0): 6,7 %; ácido palmitoleico (C16:1): 0,1%; ácido esteárico (C18:0): 3 %; ácido oleico (C18:1): 7 %; ácido linoleico (C18:2): 21% ; ácido linolénico (C18:3): 60 %. Relación ω -6/ ω -3: 0,35.

Palma *et al* (1947) fueron de los primeros en analizar químicamente al aceite de chía, cuya característica sobresaliente es su alto contenido (\geq 60%) de ácido linolénico,

seguido del ácido linoleico (aprox. 20%), del esteárico (aprox. 6%) y del oleico (aprox. 5%), manteniéndose los demás a niveles trazas ($\leq 0,4\%$). Este perfil de ácidos grasos, no se ve afectado por el método de extracción del aceite (prensado vs solvente) (Ixtaina *et al* 2011), pero sí por las condiciones ambientales de la zona de cultivo (Ayerza 1995; Ayerza & Coates 2004; 2009). Ayerza & Coates (2011) mostraron que el contenido de ácido linolénico aumentó a medida que aumentaba la altura de la zona de cultivo, este ácido graso también varió según el estado fenológico de la planta, disminuyendo de 649 a 499 g/Kg durante la recolección de las semillas (Peiretti & Gai 2009).

Según Ixtaina *et al* (2011), el triglicérido más abundante es el α LNA α LNA α LNA (32,8%) seguido del α LNA α LNA LA (20,3%); mientras que el isómero γ de los tocoferoles es el mayoritario. A su vez, evidenciaron que el método extractivo afecta significativamente los rendimientos en vitamina E.

Los aceites vegetales poseen antioxidantes naturales que ejercen efecto protector contra la oxidación lipídica. En el aceite de chía se ha encontrado la presencia de antioxidantes naturales, tales como flavonoles y polifenoles (ácidos clorogénico y cafeico), pero en menor proporción que en sus semillas (Taga *et al* 1984).

Objetivo Específico

Obtener aceite de chía por prensado en frío, caracterizarlo y evaluar la calidad química del mismo.

Materiales y Métodos

Obtención del Aceite

Las semillas de chía, previamente humedecidas (ver metodología a continuación), fueron prensadas en una prensa de tornillo helicoidal escala piloto marca Komet (Modelo CA 59 G) (Fig.3) en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA-UNC). La longitud, total y efectiva, y el diámetro interno del barral de la prensa fueron de 7 cm, 3 cm y 3,5 cm, respectivamente y la longitud y diámetro del tornillo de acero inoxidable fueron de 15 cm y 3 cm. La temperatura de salida del aceite y de la torta o residuo de

extracción se controló mediante un termómetro digital colocado en el orificio de salida (reducción) de la prensa.

Las condiciones de prensado fueron las siguientes: humedad de la semilla 0,11 según base seca (bs), temperatura de extracción 30°C, reducción de la prensa 6 mm y velocidad de prensado 20 rpm (Martinez *et al* 2012).

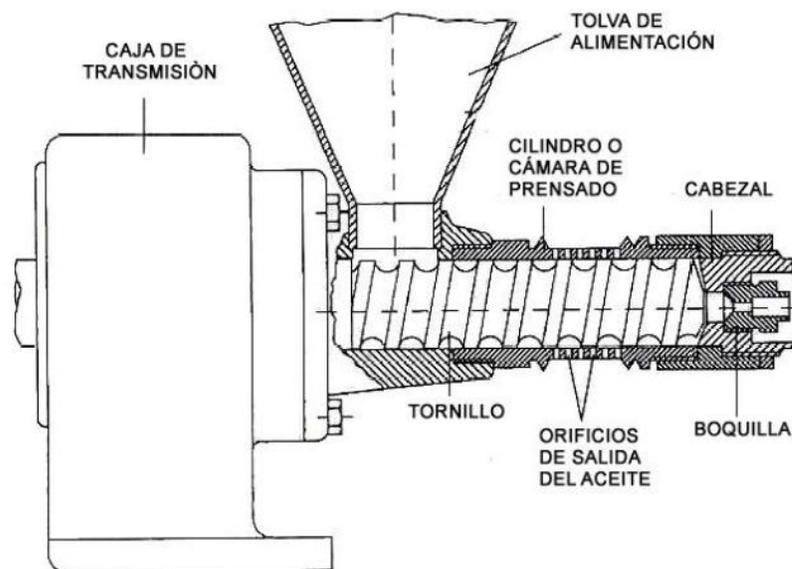


Figura 3: Esquema de la prensa de tornillo helicoidal utilizada para la extracción del aceite.

El porcentaje de humedad inicial de las semillas (previamente molidas) fue obtenido en estufa de vacío a 60°C hasta alcanzar peso constante. La humidificación de las semillas a prensar se llevó a cabo según la metodología propuesta por Martínez & Vance (2008). El agua se agregó a la muestra mediante aspersion, luego se colocó en una bolsa de polietileno con cierre hermético y se almacenó durante 48 h hasta alcanzar el equilibrio. La bolsa fue sometida a agitación, a intervalos regulares de tiempo, para asegurar una distribución uniforme de la humedad en el material. Antes de ingresar a la prensa, se determinó el contenido de humedad de cada muestra.

Una vez obtenido el aceite, éste fue almacenado en botellas color ámbar a -20°C en atmósfera de nitrógeno y, luego fue filtrado utilizando un filtro prensa perteneciente a la aceitera “Aceites del Desierto” (Río Cuarto, Córdoba). A una fracción de este aceite se le realizaron los análisis químicos que se detallan a continuación.

Métodos Analíticos

Rendimiento de Aceite

El material vegetal previamente molido y secado en estufa (60°C) fue sometido a un proceso de extracción continua sólido-líquido en equipo Soxhlet, durante 10 h, utilizando como disolvente n-hexano (AOCS 1998) y se expresó según base seca (bs) y base húmeda (bh).

Grado de acidez

Se pesaron 300 mg de aceite aproximadamente y se disolvieron en una mezcla de 3,5 mL de etanol desnaturalizado (1:10 metanol en etanol) y 3,5 mL de éter etílico. Se le agregaron 3 gotas de solución etanólica de fenolftaleína (1 % p/v) y posteriormente se tituló con una solución de KOH 0,02 N (valorada al momento de ser utilizada) con agitación magnética hasta viraje del indicador y persistencia de este color por, al menos, 30 s. El grado de acidez (GA) se expresó como porcentaje (p/p) de ácido oleico mediante la siguiente ecuación:

$$GA=(V \times PM \times N)/(10 \times Pa)$$

Donde:

V: volumen de solución de KOH utilizados para la titulación (mL).

PM: peso molecular del ácido oleico (PM: 282).

N: normalidad real de la solución de KOH.

Pa: peso de aceite (g).

Índice de peróxidos

Se pesaron 600 mg de aceite y se le agregaron 3mL de una solución de ácido acético:cloroformo (3:2 v/v), se agitó vigorosamente hasta disolución. Se adicionaron 0.5 mL de solución saturada de KI, se agitó y luego se dejó en reposo en oscuridad durante 1 min. Posteriormente, se agregaron 3 mL de agua destilada y se titularon, agitando continuamente, con solución 0,1 N de Na₂S₂O₃ hasta desaparición del color amarillo. Se adicionaron 0,5 mL de solución de almidón (1% p/v) y se continuó titulando hasta

desaparición del color azul. El índice de peróxidos (expresado como miliequivalentes de oxígeno/kg de aceite) se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$IP = (S \times N^* \times 1000) / (\text{g de aceite})$$

Donde:

S = mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumidos.

N^* = normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Cuando se utilizan menos de 0,5 mL de solución 0,1 N, se repite la determinación con solución 0,01 N o 0,001 N.

Composición acídica de los aceites

La identificación y cuantificación de ácidos grasos de los aceites se llevó a cabo por cromatografía gaseosa (CG).

Preparación de la muestra: Los aceites crudos (0,5 g aproximadamente) se saponificaron con 30 mL de solución de KOH 1 N en metanol mediante reflujo durante 45 min. El material insaponificable se extrajo con n-hexano (3 x 30 mL). Los ácidos grasos hidrolizados se esterificaron con 50 mL de solución de H_2SO_4 1 N en metanol mediante reflujo durante 45 min. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron con n-hexano (3 x 40 mL). La solución resultante se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y concentró en evaporador rotatorio a 40 °C.

Análisis de ácidos grasos: La mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos se analizó en un cromatógrafo de gases (GC *Clarus* 500, Perkin Elmer) equipado con detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna capilar de fase Supelcowax-10, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase. Se empleó nitrógeno como gas portador (1 mL/min) y el siguiente programa de temperatura: T° inicial 180 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta 240 °C (10 min). Los tiempos de retención relativos se consideraron en relación al del palmitato de metilo y el contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos (Maestri *et al* 1998).

Índice de Yodo y AGMI/AGPI

Se determinó el índice de yodo (IY) teórico, que mide el nivel de insaturación de un aceite, en base a los valores porcentuales de los ácidos grasos insaturados (Maestri *et al* 1998) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IY = (\% \text{ Oleico} \times 0,899) + (\% \text{ Linoleico} \times 1,814) + (\% \text{ Linolénico} \times 2,737)$$

También se determinó la relación de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) sobre los ácidos grasos polinsaturados (AGPI) según la siguiente fórmula:

$$AGMI/AGPI = (\% \text{ Palmitoleico} + \% \text{ Oleico}) / (\% \text{ Linoleico} + \% \text{ Linolénico})$$

Contenido de pigmentos

Se diluyeron en ciclohexano grado espectrofotométrico 7,5 g de aceite hasta un volumen final de 25 mL. Una alícuota de esta solución se utilizó para cuantificar la concentración de pigmentos carotenoides, mediante la medida de la absorbancia a 470 nm (correspondiente al máximo de absorción de la luteína), y de clorofilas (670 nm, máximo de absorción de la feofitina), de acuerdo a la metodología propuesta por Minguez-Mosquera *et al* (1991). La concentración de cada fracción de pigmentos se obtuvo aplicando la siguiente ecuación (Papaseit 1986):

$$C = [(E \times V_f) / (E_{1\%} \times P)] \times 10000$$

Donde:

C = concentración de pigmentos (mg de clorofilas o carotenoides/Kg de aceite).

E = absorbancia a la longitud de onda específica.

V_f = volumen final de la solución aceite: ciclohexano (mL).

P = peso de la muestra de aceite (g).

E_{1%} = absorbancia específica en una solución al 1 % medida en una cubeta de 1 cm de paso óptico (E_{1%} feofitina = 613; E_{1%} luteína = 2000).

Coefficientes de extinción específica: dienos (k_{232}) y trienos (k_{270}) conjugados

Se pesaron 0,15 g (k_{232}) y 0,30 g (k_{270}) de aceite y se colocaron en matraces aforados de 25 mL completando el volumen final con ciclohexano de calidad espectrofotométrica. Las soluciones resultantes se homogeneizaron y una alícuota de cada una se utilizó para medir la absorbancia a 232 nm (k_{232}) y 270 nm (k_{270}), utilizando el disolvente puro como referencia. Cuando los valores de extinción específica obtenidos no estuvieron comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8 se realizaron nuevas determinaciones utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según corresponda.

$$k_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{b \cdot c}$$

Donde:

k_{λ} = coeficiente de extinción específica a la longitud de onda λ .

A_{λ} = absorbancia leída en el espectrofotómetro a la longitud de onda λ .

c = concentración de aceite de la disolución en g/100 mL.

b = espesor en cm de la cubeta.

Estabilidad Oxidativa

Fue determinada mediante el método de oxidación acelerada por Rancimat (Fig. 4a) (AOCS Cd 12b-92 e ISO 6886). La muestra se expone a temperaturas entre 50°C y 220 °C en una corriente de aire de caudal fijo. Los productos de oxidación ligeramente volátiles (en su mayor parte derivados del ácido fórmico) se transfieren con la corriente de aire al equipo donde se absorben en la solución de medición (agua destilada). Mediante el registro continuo de la conductividad de esta solución se consiguen curvas de oxidación (Fig. 4b) cuyo punto de inflexión se designa como tiempo de inducción (TI), el cual se expresa en horas. En el presente trabajo las condiciones utilizadas fueron: 100°C, flujo de aire de 20mL/min y cantidad de aceite 3 g.

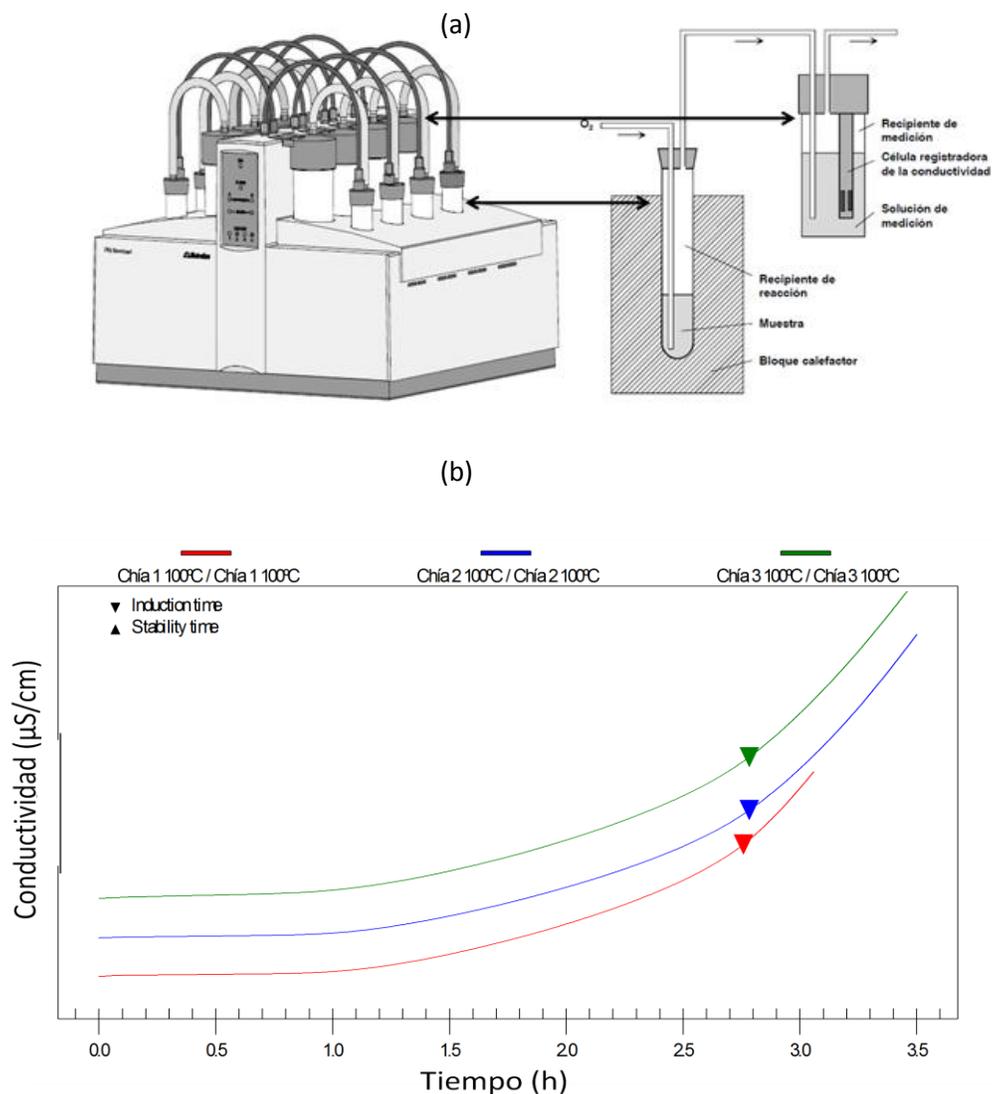


Figura 4: Distribución esquemática del equipo Rancimat (a) y curva de oxidación típica (b).

Actividad antioxidante (radical DPPH)

El radical DPPH presenta un pico máximo de absorción a 515 nm y tras entrar en contacto con los compuestos antioxidantes presentes en el aceite produce una disminución de la absorbancia proporcional a la concentración y actividad de dichos antioxidantes (Brad-Williams *et al* 1995). A 100 mg de aceite se le agregó 1 mL de tolueno, se agitó vigorosamente y se adicionó 3,9 mL de solución 10^{-4} M de DPPH· (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en tolueno, seguido de agitación. Finalmente, se midió la absorbancia a 515

nm luego de 30 min de incubación, utilizando tolueno puro como blanco. La actividad antioxidante al DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{DPPH}_r = \{1 - [(\text{Absorbancia del Control} - \text{Absorbancia de la Muestra}) / \text{Absorbancia del Control}] \} \times 100$$

Donde, DPPH_r expresa la cantidad de DPPH que permanece en el medio una vez que los antioxidantes presentes en el aceite son consumidos. El Control es la mezcla de reacción sin aceite.

Contenido de tocoferoles

Los tocoferoles se analizaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de acuerdo con el procedimiento propuesto por Pocklington & Dieffenbacher (1988). Se pesó 1g de aceite con una aproximación de 0,01 g y se colocó en un matraz aforado de 25 ml. El volumen final se completó con n-hexano calidad HPLC. Una alícuota de 20 μl de la solución previamente filtrada (filtro de nylon, poro 0,45 μm) se inyectó en una columna de sílica de fase normal (Lichrosorb Si 60). Como fase móvil se utilizó n-hexano:acetato de etilo (70:30 v/v) con un flujo de 1 mL/min. Se empleó un detector UV a una longitud de onda de 295 nm. Los componentes de la mezcla (α -, γ - y δ -tocoferol) se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con respecto a patrones corridos bajo idénticas condiciones. Para la cuantificación de los componentes individuales se valoró la respuesta del detector (como porcentaje de área) a diferentes diluciones de cada uno de los patrones puros. La concentración se expresó como mg de tocoferol/Kg de aceite.

Escualeno

Se utilizó la técnica propuesta por Lanzón *et al* (1995), se mezcló vigorosamente 0,2 g de aceite con una aproximación de 0,01 g, 1 mL de KOH 2N en metanol, 0,5 mL de hexano y 1 mL de una solución de escualano en hexano (1mg/1mL) que actúa como estándar interno, luego se realizaron dos lavados de esta mezcla con 4 mL de una solución etanol:agua (50:50) en una ampolla de separación. La fase superior se recuperó y se analizó mediante cromatografía en fase gaseosa en un cromatógrafo (*Clarus 500*, Perkin Elmer) equipado con detector de ionización de llama utilizando la columna capilar polar HP-5 (12

m x 0,2 mm x 0,33 μ m). La temperatura de horno se programó de manera isotérmica a 270°C durante 15 min; las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 290°C y el gas portador fue nitrógeno (1mL/min).

Fenoles totales y orto-difenoles

La cuantificación de estos compuestos se realizó tanto en la semilla como en el aceite. En el primer caso 1 g de semillas previamente molidas fueron sometidas a tres lavados en agitación con 10 mL de metanol durante 15 min cada uno. Luego se realizaron tres lavados sucesivos (40 mL x 3) con n-hexano, utilizando una ampolla de decantación. Se recuperó la fase metanólica, se filtró y se concentró hasta sequedad en evaporador rotatorio bajo atmósfera de nitrógeno a 35 °C. El residuo se disolvió en 5 mL de metanol grado cromatográfico. En el caso del aceite, 20 g del mismo se disolvieron en 10 mL de hexano, esta mezcla se lavó con metanol:agua (60:40 v/v) (15 mL x 3) luego se procedió de la misma manera que en la técnica para semilla descrita previamente. Finalmente la cuantificación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo mediante la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteau y posterior lectura espectrofotométrica a 725 nm (Vázquez-Roncero *et al* 1973). En el caso de los σ -difenoles la concentración se calculó a partir de la reacción con $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y lectura a 350 nm (Gutfinger 1981). La curva de calibración fue construida con concentraciones conocidas del estándar ácido cafeico y ácido gálico respectivamente.

Fracción insaponificable

Se saponificó 1 g de aceite con 20 mL de una solución de KOH 1 N en metanol mediante reflujo durante 45 min. El material insaponificable se extrajo con n-hexano (30 mL x 3), se concentró en evaporador rotatorio y se analizó mediante cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel (0,5 mm de espesor) utilizando tolueno:acetona (95:5 v/v) como fase móvil. Posteriormente, la placa se asperjó con solución etanólica de 2,7-diclorofluoresceína (3 % p/v) y se observó bajo luz UV. Se observaron tres fracciones, las cuales fueron identificadas mediante el empleo de patrones, como esteroides, metil-esteroides e hidrocarburos. Cada una de estas fracciones fue removida de la placa en forma separada, re-suspendida en cloroformo y purificada nuevamente por CCD bajo las condiciones

señaladas anteriormente. Las fracciones identificadas tentativamente como esteroides, metil-esteroides y alcoholes triterpénicos se analizaron, separadamente, mediante GC y GC – espectrometría de masa (GC-MS), bajo las siguientes condiciones: GC: se utilizó una columna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espesor de fase) VF - 5ms (5 % fenil, 95 % polidimetilsiloxano); gas portador nitrógeno (1mL/min); temperatura de horno programada desde 240 °C (1 min) hasta 290 °C (2 °C/min); temperaturas de inyector y detector, 300 °C. GC-MS: se utilizó una columna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espesor de fase) HP 5 (5 % fenilmetilsiloxano); gas portador, helio (1 mL/min). Las temperaturas de horno, inyector y detector fueron iguales a las utilizadas en el análisis por GC.

Los esteroides, metil-esteroides y alcoholes triterpénicos se identificaron mediante comparación con espectros de masa de compuestos de referencia. La fracción de hidrocarburos se analizó mediante GC utilizando la columna capilar VF - 5ms. La temperatura de horno se programó desde 70 hasta 300 °C (4 °C/min); las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 320 °C; el gas portador fue nitrógeno (1 mL/min). Para el análisis por GC-MS se utilizó la columna capilar HP 5 y helio (1 mL/min) como gas portador. Las temperaturas de horno, inyector y detector fueron las mismas que las utilizadas en el análisis por GC. Los hidrocarburos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con respecto a patrones corridos bajo idénticas condiciones y por comparación con datos de espectros de masa obtenidos de compuestos puros (estándares) de referencia.

Análisis estadísticos

La base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2011. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión

En la tabla 2 se presentan los resultados de la caracterización química del aceite de chía obtenido por prensado en frío.

Parámetro	Media ± DE
GA (% Oleico)	0,13 ± 0,003
IP (meq O ₂ /Kg aceite)	ND
Acidos Grasos (%)	
<i>Palmítico</i>	7,46 ± 0,15
<i>Palmitoleico</i>	Tr
<i>Estéarico</i>	2,98 ± 0,09
<i>Oleico</i>	7,18 ± 0,15
<i>Linoleico</i>	20,08 ± 0,16
<i>Linolénico</i>	61,82 ± 0,46
<i>Araquídico</i>	Tr
IY	212,08 ± 1,699
AGMI/AGPI	0,09 ± 0,002
Carotenos (mg/Kg)	5,41 ± 0,09
Clorofilas (mg/Kg)	4,66 ± 0,06
K ₂₃₂	1,35 ± 0,07
K ₂₇₀	0,15 ± 0,02
EO (horas)	3,04 ± 0,25
DPPH	40,33 ± 0,29
Tocoferoles (mg/Kg)	
α	Tr
β	ND
γ	651,76 ± 41,89
δ	64,77 ± 2,68
Escualeno (mg/Kg)	ND
Fenoles Totales en aceite(mg/Kg)	42,09 ± 3,96
σ-difenoles en aceite(mg/Kg)	3,99 ± 0,85
Fracción Insaponificable	
Esteroles (% sobre el total de esteroles)	
<i>Stigmast-5-en-3-ol, (3β)(β)-Sitosterol</i>	59,99 ± 0,04
<i>4,6-Colestadien-3β-ol</i>	30,31 ± 0,02
<i>Ergost-5-en-3-ol(Campesterol)</i>	9,7 ± 0,01
Hidrocarburos (% sobre el total de hidrocarburos)	
<i>Tetradecano (C:14)</i>	7,96 ± 0,03
<i>Hexadecano (C:16)</i>	29,25 ± 0,05
<i>Octadecano (C:18)</i>	36,42 ± 0,08

<i>5-Eicoseno (C:20)</i>	3,77 ± 0,02
<i>Henicosano (C:21)</i>	1,96 ± 0,02
<i>Docosano (C:22)</i>	16,33 ± 0,04
<i>Pentacosano (C:25)</i>	0,86 ± 0,01
<u><i>Hexatriacontano (C:36)</i></u>	<u>0,76 ± 0,01</u>

Tabla 2: Parámetros químicos y composición de ácidos grasos del aceite de chía obtenido por prensado en frío. Abreviaturas: GA, grado de acidez; IP, índice de peróxidos; IY, índice de yodo; AGMI/AGPI: relación ácidos grasos monoinsaturados y polinsaturados, EO: Estabilidad oxidativa y DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Valores medios (n=3) ± desvío estándar. Tr: valores trazas. ND (No Detectado).

El valor medio de rendimiento (bs) obtenido (39%) y el de % de humedad (6,37 %) resultaron cercanos a valores obtenidos en bibliografía (Palma *et al* 1947; Ayerza 1995; Ixtaina *et al* 2011; Martinez *et al* 2012).

El GA indica la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite, resultantes de la hidrólisis (química o enzimática) del enlace éster que mantiene unido al ácido graso y al glicerol formando el triglicérido, fue muy bajo (0,13 % ác.oleico) y se correspondió con los niveles permitidos ($\leq 1\%$) para este aceite según el CAA. La importancia de que el GA de un aceite resulte bajo radica en que los ácidos grasos libres se encuentran más expuestos a sufrir un deterioro oxidativo que cuando están unidos al glicerol formando los triglicéridos. Los aceites vegetales crudos pueden tener niveles altos de ácidos grasos libres si la semilla ha sido dañada, se almacenan inadecuadamente y/o las condiciones de extracción y almacenaje del aceite no son las apropiadas, ya que las enzimas lipasas son activadas por la humedad. Por lo tanto, este bajo % de ácidos grasos libres que obtuvimos resulta del escaso contenido de humedad de las semillas de chía, de las adecuadas condiciones de almacenamiento de estas y de extracción del aceite que se llevaron a cabo.

En cuanto a los compuestos de oxidación primaria, no se detectó presencia de peróxidos, los valores de dienos (k_{232}) y trienos (k_{270}) conjugados resultaron bajos en el aceite de chía obtenido. Si bien el CAA no determina un valor límite de IP para el aceite de chía en particular, sí lo especifica para otros aceites vegetales. Para un aceite de girasol virgen no refinado determina un límite máximo de 15 miliequivalentes de oxígeno por

kilogramo de aceite (meqO₂/Kg). El Codex, por su parte, es más general y determina para aceites vírgenes prensados en frío un máximo también de 15 meqO₂/Kg; mientras que para otras grasas y aceites de 10 meqO₂/Kg.

Respecto a k₂₃₂ y k₂₇₀, aunque el CAA no estableció límites para estos parámetros respecto al aceite de chía en el artículo 1381 bis detallado anteriormente, se puede tomar de referencia los límites establecidos para el aceite de oliva extra virgen; k₂₇₀ ≤ 0,22 y k₂₃₂ ≤ 2,5. Los valores obtenidos para el aceite de chía analizado fueron de 0,15 y 1,35 respectivamente, similares a los obtenidos por Martínez *et al* (2012).

En cuanto a la composición acídica, el ácido graso mayoritario fue el linolénico (61,8%) seguido del linoleico (20,1%), palmítico (7,46%) y oleico (7,18%), valores que están dentro de los establecidos por el CAA para el aceite de chía y que coinciden con estudios previos (Ayerza 1995; Peiretti & Gai 2009; Ayerza & Coates 2009; Ixtaina *et al* 2011; 2012; Martínez *et al* 2012). El elevado porcentaje de linolénico resulta en una relación monoinsaturados-polinsaturados (AGMI/AGPI) de 0,09 y en un IY de 212 que, comparándolo con el de otros aceites (Tabla 3), resulta significativamente alto.

Porcentajes de ácidos grasos (AG) mayoritarios en aceites vegetales comestibles														Y			
	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	16:1	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	IY
Coco	<1.2	3-15	3-15	41-56	13-23	4-12	1-5					3-12	1-3.7				6-11
Palmiste	<0.5	2-6	2.5-7	41-55	14-20	6.5-11	1-3.5					10-23	0.7-5				13-23
Palma	<1.2				0.5-6	32-59	1.5-8	<1			<0.6	27-52	5-14	<1.5			50-55
Olivo						7-20	0.5-3.5				0.3-3.5	56-83	3-20	<1			75-94
Maní						6-16	1.6-5	1-3	1-5	0.5-3	<1	35-80	13-45	<1	0.5-2	<2	80-106
Maíz						8-19	0.5-4	<1	<0.5		<0.5	19-50	34-62	<2	<0.5		103-128
Canola						2.5-6	1-2.1	0.1-1	<0.5		<0.6	50-66	18-30	6-14	1.4-3	<5	110-126
Girasol					<0.5	3-10	1-10	<1.5	<1	<0.5	<1	14-65	20-75	<0.7	<0.5	<0.5	110-143
Soja					<0.5	7-14	1-5.5	<1	<0.5		<0.5	19-30	44-62	4-11	<1		120-143
Uva				<0.5		5.5-11	3-6	<1			<1.2	12-28	58-78	<1			130-138

Tabla 3: Ácidos grasos mayoritarios presentes en aceites vegetales y los índices de yodo (IY) correspondientes (Padley 1986; Maestri 2010).

La estabilidad oxidativa es decir el Tiempo de Inducción (TI) del aceite de chía fue de 3 h aproximadamente, evidenciando su baja estabilidad termo-oxidativa. Valores similares se obtuvieron en aceites extraídos por prensado en frío (2,8 h), no así en los obtenidos con solventes, en los cuales la estabilidad fue menor (2,4 h) (Ixtaina *et al* 2011).

El contenido de pigmentos: clorofilas y carotenoides, responsables en parte del color de los aceites, fue de 4,66 y 5,41 mg/Kg de aceite, respectivamente. De acuerdo a Wong (1995) y Frankel (2005) es importante conocer la cantidad de pigmentos presentes en un aceite vegetal dado que la foto-oxidación representa una vía importante de generación de peróxidos a partir de ácidos grasos insaturados, cuando la misma sucede en presencia de un fotosensibilizador adecuado como las clorofilas. Si bien el aceite de chía contiene una baja concentración de clorofilas, de acuerdo a Suzuki *et al* (1984) esta cantidad de pigmento fotosensibilizador es suficiente para la producción fotoquímica de oxígeno singulete. Esta es una especie altamente reactiva del oxígeno y puede reaccionar más rápidamente (unas 1500 veces más rápido que el oxígeno en su forma más estable, el estado triplete) con zonas de alta densidad electrónica, como son los dobles enlaces C=C de los ácidos grasos insaturados. Respecto a los pigmentos carotenoides, tienen una función antioxidante actuando como protectores del deterioro fotooxidativo atrapando al oxígeno singulete. Warner & Frankel (1987) han demostrado que la presencia de β -caroteno en el aceite de soja, en concentraciones entre los 5 y 20 mg/ Kg de aceite, tuvo efectos protectores contra los daños oxidativos causados por la luz. Por lo tanto el efecto resultante de los pigmentos sobre el aceite de chía será evaluado en el Capítulo III de la presente tesis.

Con respecto a la actividad antirradicalaria, la valoración del DPPH_r que proporciona una medida de la capacidad de las sustancias antioxidantes naturalmente presentes en el aceite para estabilizar radicales libres, fue de aproximadamente 40,33 %, la cual puede ser atribuida principalmente a su contenido de tocoferoles.

El valor obtenido de tocoferoles totales en el aceite de chía analizado fue cercano a los 700 mg/Kg de aceite, siendo valores superiores a los reportados en trabajos anteriores (Ixtaina *et al* 2011; 2012). En cuanto a la abundancia de los distintos isómeros de tocoferoles (α , β , γ y δ), este aceite se caracteriza por su alto contenido en γ -Tocoferol (651 mg/Kg), siendo comparable por ejemplo con los aceites de soja y maíz (tabla 4).

Contenido de tocoferoles (mg/kg) en algunos aceites vegetales

Aceite	α-Toc	β-Toc	γ-Toc	δ-Toc
Canola	103 - 170	134	174 - 403	10 - 41
Girasol	622 - 723	19 - 41	5 - 65	---
Soja	81 - 151	27 - 33	545 - 624	207 - 300
Nuez	15 - 29	1 - 8	207 - 355	30 - 62
Maní	49 - 304	1 - 41	99 - 389	---
Oliva	104 - 425	1 - 3	5 - 30	---
Germen de trigo	984 - 1845	386 - 739	231 - 681	105
Palma	3 - 185	---	4 - 36	---
Sésamo	12 - 113	3 - 6	244 - 400	5 - 32
Maíz	134 - 344	14 - 31	412 - 729	36 - 39
Algodón	402 - 573	1.5 - 40	317 - 572	7 - 10

Tabla 4: Contenido de tocoferoles (mg/Kg) en aceites vegetales (Padley 1986).

El contenido de fenoles totales en el aceite resultó mucho más bajo (42,1 mg/Kg) que en la semilla (680 mg/Kg), ya que estos compuestos son generalmente hidrofílicos. En comparación por ejemplo el aceite de oliva, matriz que se caracteriza generalmente por su alto contenido de antioxidantes naturales, contiene polifenoles totales que varían entre 50 y 800 mg/Kg (Cioffi *et al* 2010; Ziogas *et al* 2010; Ceci & Carelli 2010) en función del clima, la variedad, el método de extracción y la madurez del fruto (Vinha *et al* 2005; Torres & Maestri 2006; Gomez-Rico *et al* 2008). Respecto a los σ -difenoles; en la semilla de chía analizada se detectó un contenido de 543 mg/Kg pero en el aceite sólo 4 mg/Kg. Estos compuestos por su estructura química poseen una alta capacidad reductora.

La fracción insaponificable de los aceites está conformada por hidrocarburos, esteroides, alcoholes grasos, triterpenos, compuestos fenólicos, vitaminas liposolubles como los tocoferoles, clorofilas y compuestos aromáticos. No existen, además de la cuantificación de tocoferoles y pigmentos (Ixtaina *et al* 2011; 2012; Martinez *et al* 2012), antecedentes de análisis de esta fracción en aceite de chía. En la tabla 2 se presenta la composición de la misma; los esteroides estuvieron representados por el β -sitosterol (Fig.5a) (60 % del total de esteroides), el 4-6-Colestadien-3 β -ol (Fig.5b) (30%) y el campesterol (Fig.5c) (9,7 %), alcoholes triterpénicos y metilesteroides no fueron detectados. Mientras que, la fracción de

hidrocarburos estuvo representada, en su mayor parte, por alcanos, entre los principales se encuentran el octadecano (36,42 % del total de hidrocarburos), el hexadecano (29,25 %), el docosano (16,33 %), el tetradecano (7,96 %), y el nonadecano (2,68 %). Respecto al escualeno, triterpeno que se encuentra de forma característica en el aceite de oliva (entre un 0,2 y un 0,7%) posee actividad antioxidante y antitumoral (Warleta *et al* 2006). Debido a la ausencia de estudios previos respecto a la presencia de este hidrocarburo en el aceite de chía es que se analizó la posible presencia del mismo, sin embargo no se detectaron niveles significativos de este compuesto.

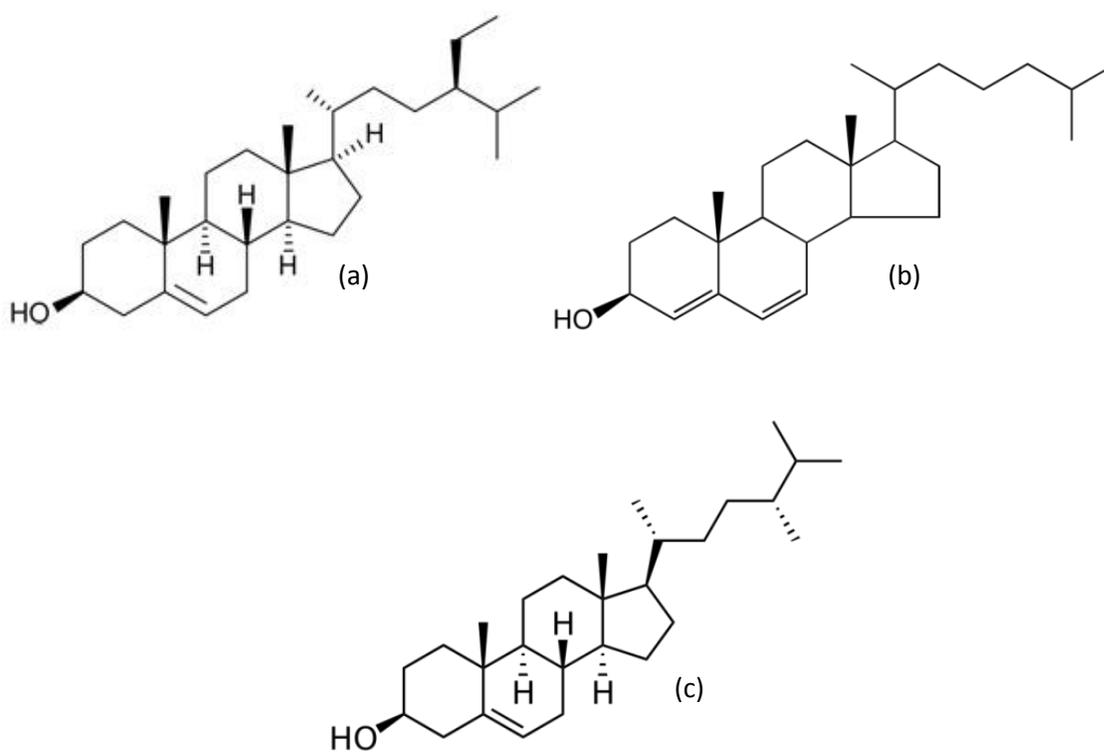


Figura 5: Estructura química de los esteroides de la fracción insaponificable del aceite de chía:
(a) β - sitosterol (b) 4,6-Colestadien-3 β -ol y (c) Campesterol.

Conclusiones

La cantidad de trabajos científicos que describen las bondades nutricionales de la chía respecto de otras fuentes de ácidos grasos ω -3 y la comercialización de productos que la incluyen, está creciendo alrededor del mundo. La ciencia moderna explica porqué las antiguas civilizaciones mesoamericanas consideraban a la chía como componente básico de sus dietas y después de 500 años de ser forzado a la oscuridad, el cultivo oculto de los aztecas ofrece al mundo una oportunidad de volver a los orígenes y mejorar la nutrición humana, suministrando una fuente natural de ácidos grasos ω -3 y antioxidantes.

Si bien la composición química de un aceite vegetal es un factor importante, la susceptibilidad a la oxidación depende también del procesamiento, el empaque y las condiciones de almacenamiento, pudiendo los antioxidantes incrementar la vida media de los productos alimenticios retardando la oxidación lipídica. El aceite de chía posee un elevado contenido de AGPI (>60 %) y relativamente bajo de antioxidantes, por lo que constituye un sustrato particularmente susceptible al ataque por el oxígeno atmosférico, por lo que es de interés comprobar la eficacia de antioxidantes naturales que actualmente están ganando mercado a los sintéticos tradicionalmente utilizados en la industria alimenticia.

CAPITULO II: DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ADITIVOS NATURALES Y ARTIFICIALES SOBRE EL ACEITE DE CHIA

Antecedentes

Las reacciones de oxidación de los lípidos constituyen una de las causas de mayor importancia comercial en la industria alimentaria por las pérdidas que producen en grasas, aceites y alimentos que contienen lípidos. Los sustratos de estas reacciones son fundamentalmente los ácidos grasos no saturados que, cuando están libres, se oxidan por lo general más rápidamente que cuando son parte de moléculas de triglicéridos o fosfolípidos. Es el grado de insaturación el factor que mayormente influye en la velocidad de oxidación; por ej. a 100°C las velocidades relativas de oxidación de los ácidos esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) son 1 : 100 : 1000/1500 : 2000/3500, respectivamente (Frankel 2005). Los ácidos grasos saturados sólo se oxidan a temperaturas superiores a 60 °C, mientras que los poliinsaturados se oxidan incluso durante el almacenamiento de los alimentos, en estado congelado. También pueden sufrir reacciones de oxidación otros sustratos no saturados: algunos hidrocarburos presentes en los aceites, las vitaminas A y E y los pigmentos carotenoides.

Los AGPI tienen en común la presencia de dobles enlaces separados entre sí por un grupo metileno (CH₂) interruptor. Los átomos de hidrógeno de este grupo están activados por la vecindad de los dobles enlaces y son más reactivos que otros hidrógenos de la molécula del ácido graso. La luz y la temperatura favorecen la oxidación. La remoción de un átomo de hidrógeno a partir del grupo CH₂ interruptor produce un radical alquilo inestable, el cual sufre inmediatamente una estabilización electrónica para formar híbridos de resonancia conjugados. En condiciones de presión normal de oxígeno, el radical alquilo reacciona rápidamente con el oxígeno para formar el radical peróxido. Éste sustrae un átomo de hidrógeno a otra molécula de ácido graso para formar un hidroperóxido y un nuevo radical libre. Esta secuencia de reacciones (Fig.6) constituyen la rancidez oxidativa o auto-oxidación de lípidos propiamente dicha y se caracteriza por la acumulación de peróxidos lipídicos (hidroperóxidos) y por ser una reacción autopropagada, ya que dichos hidroperóxidos favorecen la iniciación de la reacción actuando como catalizadores. Finalmente, los hidroperóxidos se rompen en varias etapas dando lugar a una amplia

variedad de productos de descomposición entre los que se encuentran hidrocarburos, aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, furanoides, etc. Desde el punto de vista práctico, los aldehídos volátiles que se forman tienen gran importancia debido a que imparten sabores y olores rancios a las grasas, aceites o alimentos que los contienen, disminuyendo así su calidad.

La lipólisis o rancidez hidrolítica consiste en la rotura de los triglicéridos constituyentes del aceite, en ácidos grasos libres y glicerol. Esto conlleva a un aumento de la acidez y a una mayor vulnerabilidad a la autoxidación. Los principales factores que afectan a la lipólisis son la humedad, la temperatura, ciertas enzimas lipasas y lipoxigenasas endógenas (lipólisis enzimática) y varios microorganismos (lipólisis microbiana).

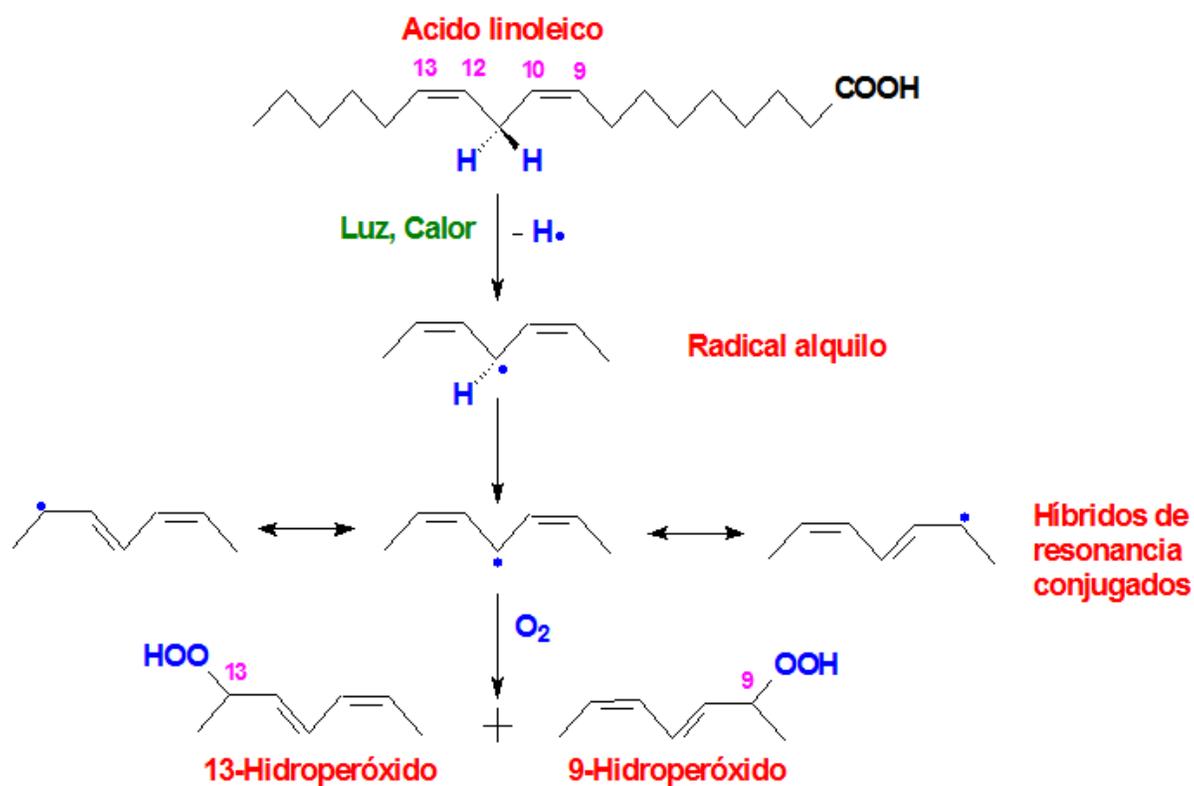


Figura 6: Reacciones de la autoxidación de lípidos insaturados (Martinez 2010).

Antioxidantes

Se pueden clasificar a las sustancias y métodos utilizados como antioxidantes en tres categorías:

- Tipo I: Se trata de sustancias capaces de interrumpir la propagación en cadena de radicales libres actuando como donores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres. Los principales antioxidantes de Tipo I utilizados en los alimentos son los fenoles mono o polihidroxilados con varias sustituciones en el anillo (Fig.7). Siendo el Terbutilhidroxianisol (BHA), Diterbutilmetilfenol (BHT) y Diterbutilhidroquinona (TBHQ) los antioxidantes más utilizados en aceites, por su alta efectividad a bajas concentraciones y su relativo bajo costo. Aunque estos antioxidantes sintéticos son muy utilizados en la industria como aditivos alimentarios, su seguridad ha sido cuestionada (Shahidi & Zhong 2005) estimulando la investigación de compuestos naturales con similares propiedades antioxidantes.

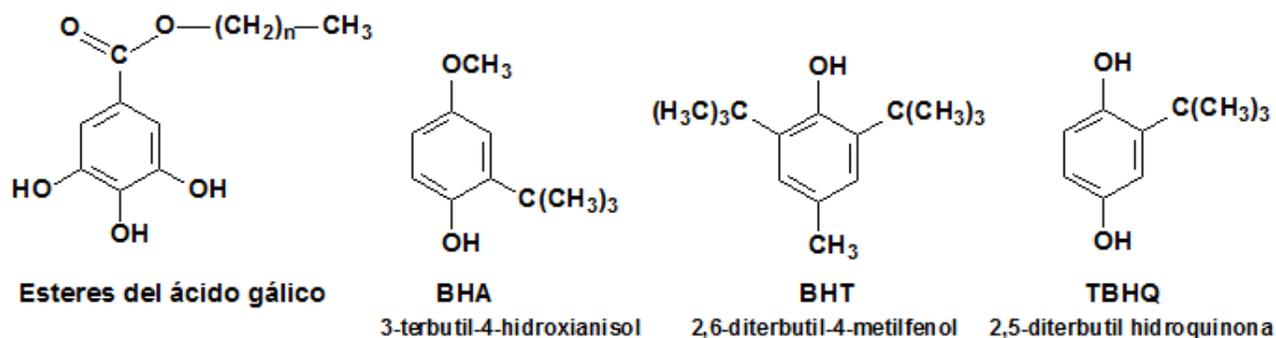


Figura 7: Antioxidantes de Tipo I: compuestos fenólicos sintéticos.

- Tipo II: Los antioxidantes de esta categoría son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres. Los más utilizados son los agentes que acomplejan los metales. Muchos de los agentes quelantes utilizados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), los ácidos policarboxílicos (cítrico, málico, succínico, entre otros) (Fig.8) y macromoléculas (porfirinas y proteínas).

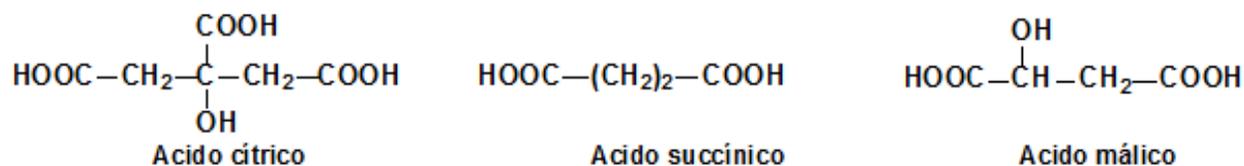


Figura 8: Antioxidantes de Tipo II: quelantes o secuestrantes de metales.

- Tipo III: Se clasifican en esta categoría los procedimientos de protección contra la oxidación, que consisten en establecer condiciones físicas o físico-químicas (contenido de oxígeno en el embalaje, humedad, temperatura, iluminación, pH, etc.) convenientemente escogidas.

Como se mencionó, los antioxidantes artificiales están siendo cada vez más cuestionados respecto a su seguridad y reevaluados en cuanto a sus rutas metabólicas (Shahidi & Zhong 2005; Iqbal & Bhangar 2007). Es por ello que actualmente existe un gran interés en obtener y utilizar compuestos con propiedades antioxidantes provenientes de fuentes naturales, entre los que se encuentran fenoles simples, ácidos fenólicos, carotenoides, antocianinas y flavonoides extraídos de hierbas y especias (Irwandi *et al* 2000; Yanishlieva & Marinova 2001; Frankel 2005; Maestri *et al* 2006). Entre estos, el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L) (ER), se encuentra reconocido como un aditivo GRAS, no existen regulaciones que limiten su uso y está disponible en el mercado en distintas formulaciones. Variadas investigaciones indican que el ácido carnósico (Fig.9), al igual que en la salvia común (*Salvia officinalis*), es el componente activo mayoritario que actúa como antioxidante en el ER, aunque también se mencionan al carnosol y al ácido rosmarínico aunque en menor medida (Richheimer *et al* 1996; Terpin *et al* 2009; Visentin *et al* 2011). El ER en distintas concentraciones, sólo y en combinación con otros antioxidantes, ha sido evaluado en variados trabajos (Wada & Fang 1994; Frankel *et al* 1996; Chu & Hsu 1999; Gamel & Kiritsakis 1999; Nguyen *et al* 1999; Hras *et al* 2000; Erkan *et al* 2008; Ixtaina *et al* 2012; Martinez *et al* 2013^a; Martinez *et al* 2013^b; Chen *et al* 2014) con el objetivo de estabilizar distintas matrices (aceite de pescado, maíz, maní, oliva, colza, girasol, chía, nuez y almendra) tanto en ensayos de oxidación acelerada como de almacenamiento prolongado.

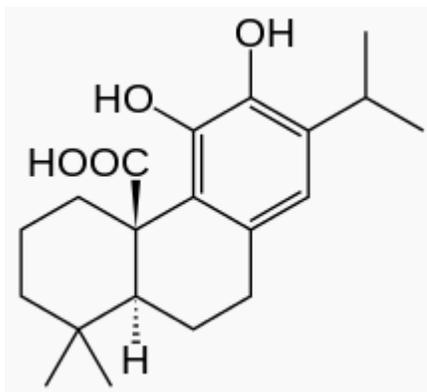


Figura 9: Ácido carnósico.

Otro ejemplo es el ácido ascórbico (Vitamina C) (Fig. 10), sustancia que posee propiedades fuertemente reductoras, debido a la presencia del grupo enodiol. En consecuencia, además de su actividad vitamínica, presenta propiedades antioxidantes y se lo utiliza como aditivo para esa finalidad, a menudo en combinación con un antioxidante fenólico. Si bien el mecanismo de acción no está completamente esclarecido, la mezcla de ambos antioxidantes tiene frecuentemente una acción sinérgica. Se cree que el ácido ascórbico puede regenerar el antioxidante fenólico proporcionando átomos de hidrógeno a los radicales fenoxi. Sin embargo este antioxidante como tal no se solubiliza en aceites, lo que se consigue mediante la esterificación con ácidos grasos habitualmente láurico o palmítico. El mecanismo de acción del palmitato de ascorbilo (PA) (Fig. 10) no está esclarecido en su totalidad, sin embargo Lee *et al* (1997) han reportado que el PA puede actuar como un “atrapante” de oxígeno en reacciones de fotooxidación de aceites vegetales.

Este antioxidante demostró su potencialidad en aceite de canola: sólo (McMullen *et al* 1991) y en combinación con galato de propilo (Hawrysh *et al* 2006), además de mostrar sinergismo con tocoferoles (Marinova & Yanishlieva 1990) y con ER (Hras *et al* 2000) en aceite de girasol y con este último en aceite de nuez (Martinez *et al* 2013^a) y de almendra (Martinez *et al* 2013^b). En aceite de chía también fue estudiado por Ixtaina *et al* (2012) en un ensayo estático de almacenamiento prolongado (225 días) a una concentración de 250 ppm, manteniendo el IP cercano a 1 meqO₂/Kg durante todo el ensayo, mientras que el ER a la misma concentración no protegió eficazmente a dicho aceite.

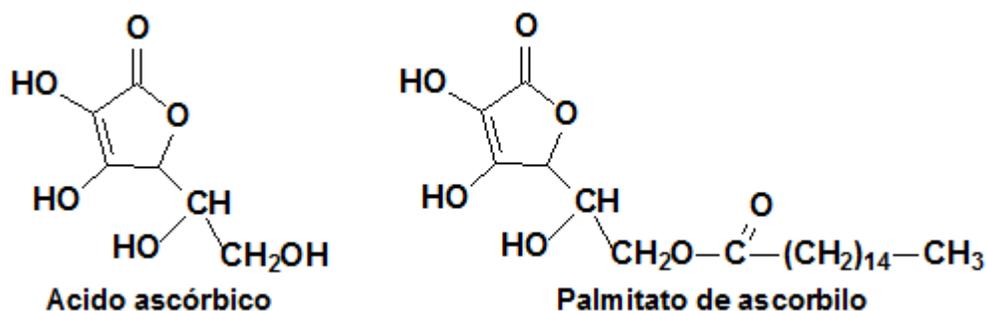


Figura 10: Ácido ascórbico y su derivado lipofílico Palmitato de ascorbilo.

Los tocoferoles (Fig. 11) abundan de forma natural en las grasas vegetales sin refinar, y especialmente en los aceites de germen de trigo, arroz, maíz o soja. En forma general, se los conoce a todos los isómeros (α , β , γ y δ) en conjunto con los tocotrienoles (cadena poliprenoide insaturados) como vitamina E.

Tocoferoles	R^1	R^2	R^3	Nom
	CH_3	CH_3	CH_3	α -tocoferol
	CH_3	H	CH_3	β -tocoferol
	H	CH_3	CH_3	γ -tocoferol
	H	H	CH_3	δ -tocoferol

Figura 11: Estructura química de los tocoferoles.

El más abundante y potente en su actividad vitamínica es el α tocoferol. El β , γ y δ -tocoferol también tienen actividad vitamínica y se encuentran juntos en los aceites vegetales. Estos compuestos, se obtienen industrialmente como un subproducto del refinado de estos aceites o por síntesis química (E306: extracto rico en tocoferol, E307: α -tocoferol sintético, E308: γ -tocoferol sintético y E309: δ -tocoferol sintético). Su actividad como antioxidante parece seguir un orden inverso a su actividad biológica como vitamina, siendo el más eficaz el δ , retardando el enranciamiento de las grasas y la degradación oxidativa de la vitamina A y los carotenoides presentes en los alimentos. El CAA no pone límites para este tipo de aditivo, el Codex en cambio delimita 300 ppm sólo o mezclados.

Khan & Shahidi (2001) obtuvieron una efectividad equiparable a la obtenida con BHA con una mezcla comercial de α - β y γ tocoferol, con mayor porcentaje de este último, sobre

triglicéridos purificados de aceite de prímula en un ensayo de termoxidación acelerada (60°C, 168 h). Además la mezcla resultó ser más eficaz que los tocoferoles individuales. En un estudio llevado a cabo por Wagner & Elmadfa (2000), en aceite de oliva, el γ -tocoferol presentó la mayor actividad antioxidante, siendo el α -tocoferol el menos eficaz. Ixtaina *et al* (2012) en cambio, no lograron estabilizar el aceite de chía mediante el agregado de 5000 ppm de una mezcla de tocoferoles donde el γ era el mayoritario. Por otro lado, Hras *et al* (2000), informaron que en aceite de girasol el α -tocoferol exhibió un efecto prooxidante y no presentó sinergismo con ER. En contraposición, Wada & Fang (1994) obtuvieron sinergismo entre estos dos antioxidantes en aceite de sardina a 30°C. Estas premisas evidencian que la eficacia de los antioxidantes naturales no sólo depende de la matriz en estudio, sino también del tipo, concentración e interacción de los mismos.

Objetivo Específico

Evaluar la eficacia antioxidante de sustancias naturales y sintéticas, individualmente y en diferentes combinaciones, sobre la estabilidad oxidativa del aceite de chía mediante ensayo de oxidación acelerada (Rancimat).

Materiales y Métodos

Estimación de la vida útil del aceite de chía sin aditivar

A través de la metodología de análisis de estabilidad oxidativa por oxidación acelerada mediante Rancimat ya explicada en el Capítulo I, se calculó el período de vida útil del aceite de chía sin aditivar mediante una extrapolación de los resultados. Esta herramienta que ofrece el software del equipo, permite convertir a una temperatura deseada los resultados medidos a diferentes temperaturas. Para lo cual se obtuvieron los tiempos de inducción (TI) del aceite de chía a distintas temperaturas (130°C, 120°C, 110°C, 100°C, 90°C y 80°C) y luego mediante una regresión se calcularon los valores de la siguiente expresión:

$$T = \ln(t)/A - \ln(A)/ B$$

Donde:

T: temperatura (°C)

t: tiempo (h)

A y B parámetros estimados por el programa.

Reemplazando en ésta fórmula el valor de “T” por 25°C y despejando “t” se puede estimar el período de vida útil del aceite sin aditivar a esta temperatura.

Determinación del factor de protección de los antioxidantes naturales seleccionados

Se evaluaron a 100°C distintas concentraciones (tabla 5) de los siguientes antioxidantes:

- Mezcla de Tocoferoles al 70 % (Danisco) (TOC): que fue analizado mediante HPLC y se comprobaron los siguientes porcentajes de cada uno de los isómeros: $\alpha= 8,8\%$, $\beta= 1,55\%$, $\gamma= 61,82\%$ y $\delta= 27,82\%$.
- Palmitato de Ascorbilo (PA): sólo y en combinación con Tocoferoles (TOC) para probar la posible existencia de sinergismo.
- Terbutilhidroquinona (TBHQ): este antioxidante sintético se tendrá como un control positivo, debido a su conocida capacidad en la estabilización de aceites comestibles y por su amplio uso en la industria alimenticia con estos fines.
- Extracto de Romero (ER): el utilizado fue al 1% (Danisco) de compuestos triterpénicos y fue evaluado sólo en diferentes concentraciones y en combinación con PA, AC y TOC sólo a una concentración (8000 mg/Kg).
- Ácido Cítrico (Danisco) (AC): Sólo y en combinación con ER, ya que el AC es un agente quelante y generalmente se utiliza combinado con otros.

En la tabla 5 se presentan las distintas concentraciones y combinaciones ensayadas de los antioxidantes descriptos. Resulta importante explicar que, en algunas determinaciones se utilizaron concentraciones superiores a las establecidas por el CAA con el objetivo de intentar identificar, la concentración por encima de la cual el antioxidante comienza a actuar como pro-oxidante, en el caso que esto suceda.

Antioxidante/s	Concentraciones probadas (ppm)
TOC	50, 100, 150, 200, 250, 500, 600, 700 y 800
ER	1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 14000 y 16000
PA	50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 y 700
PA + TOC	50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500 y 700
AC	100
TBHQ	100 y 200
ER + AC	8000 + 100
ER + PA	8000 + 200
ER + TOC	8000 + 200

Tabla 5: Concentraciones (ppm) de los antioxidantes probados en el ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C).

La capacidad antioxidante se midió determinando el tiempo de inducción del aceite y calculando el factor de protección (FP) empleando la siguiente ecuación:

$$FP = \frac{\text{tiempo de inducción del aceite con antioxidante (horas)}}{\text{tiempo de inducción del aceite sin antioxidante (horas)}}$$

En el caso de las combinaciones de dos antioxidantes, los TI resultantes para cada concentración se utilizaron para calcular el sinergismo entre antioxidantes mediante la ecuación propuesta por Bishov *et al* (1977). Si el resultado obtenido es positivo significa que existe sinergismo entre los antioxidantes evaluados.

$$\%Syn: \frac{(TI_{mezcla} - TI_{control}) - [(TI_1 - TI_{control}) + (TI_2 - TI_{control})]}{[(TI_1 - TI_{control}) + (TI_2 - TI_{control})]} \times 100$$

Donde:

TI₁ y TI₂: los tiempos de inducción de los antioxidantes individuales.

TI_{mezcla}: el tiempo de inducción de la mezcla de antioxidantes 1 y 2 ambos en la misma proporción y en la misma concentración que estos están en TI₁ y TI₂.

TI_{control}: el tiempo de inducción del aceite sin aditivar.

Análisis estadísticos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2011. Las diferencias entre los tratamientos se estimaron mediante análisis de la varianza (ANAVA). En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples (Fisher LSD).

Resultados y Discusión

En la Figura 12 se representa la recta calculada $T = \ln(t)/(-0,111) - \ln(139776,47)/(-0,111)$ según la cual el período de vida útil del aceite de chía sin aditivar a 25 °C sería aproximadamente de 1 año (8797 h). Dado que este tiempo estimado es un valor puramente teórico y su exactitud depende en gran medida del tipo de matriz lipídica, en el Capítulo III de la presente tesis, se determinará experimentalmente el tiempo de vida útil del aceite de chía bajo condiciones de anaquel (25 °C) y así se podrán comparar ambos resultados y evaluar la veracidad de dicha predicción.

En las figuras 13, 14, 15 y 16 se muestran los FP de los antioxidantes utilizados a diferentes concentraciones. En el caso del ER (Fig. 13), al no estar legislado por el CAA, se evaluaron concentraciones altas alcanzando un FP de 3,28 con 16000 ppm. Si bien existen diferencias estadísticamente significativas entre los FP ($p \leq 0,05$) de todas las concentraciones ensayadas, a partir de las 10000 ppm se evidenció una marcada disminución de la solubilidad del extracto en el aceite la cual impartía turbidez al sistema. Sumado a este inconveniente tecnológico, el aumento de la estabilidad oxidativa, aunque sostenida, no fue proporcional al incremento en la concentración de ER, por lo que, se decidió continuar trabajando con 8000 ppm de ER (Tabla 6).

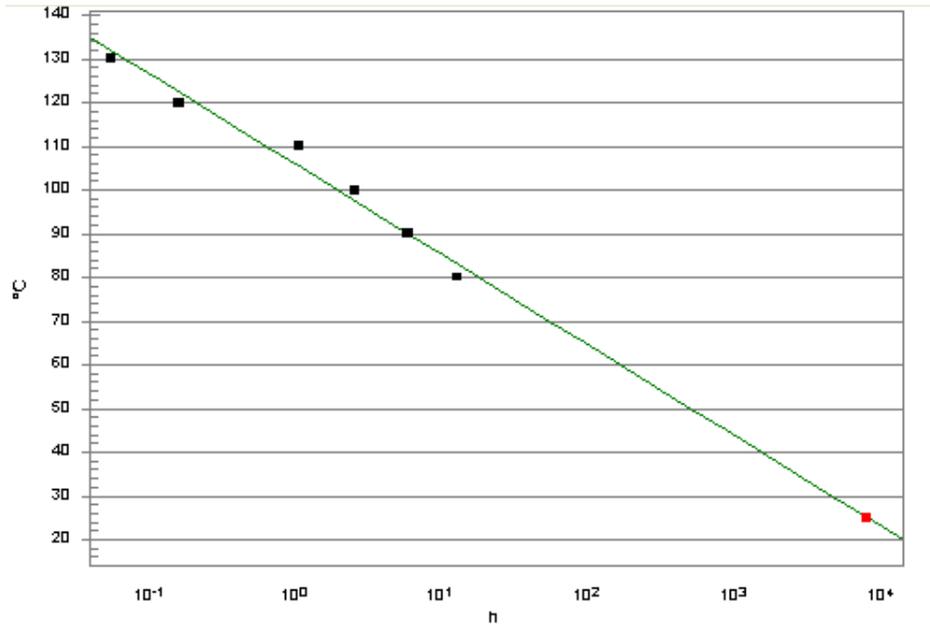


Figura 12: Recta Temperatura (°C) vs. Tiempo (horas) para lograr la estimación del tiempo de vida útil del aceite de chía sin aditivar a 25°C.

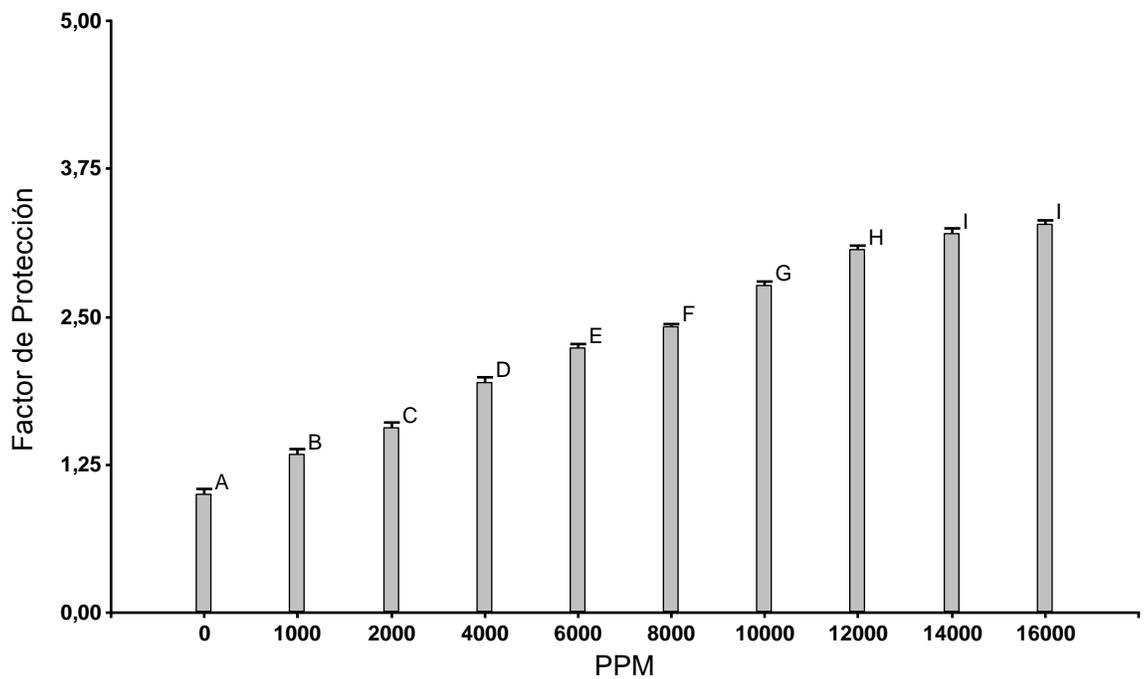


Figura 13: Factores de protección (h) de Extracto de Romero (ER) a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Cuando el ER se combinó con AC, PA y TOC (Tabla 6); sólo la mezcla binaria, 100 ppm de AC más 8000 ppm de ER, mostró un efecto protector adicional significativo ($p \leq 0,05$) respecto al ER sólo. Sin embargo, el sinergismo alcanzado, aunque positivo, fue relativamente bajo (17,25%). Teniendo en cuenta estos resultados, en el ensayo de almacenamiento prolongado (Cap.III) no se utilizarán ninguna de estas combinaciones. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Hras *et al* (2000) en aceite de girasol sometido a 60°C durante 12 días, quienes observaron sinergismo entre ER, AC y PA y con Martínez *et al* (2013^b) en aceite de almendra también sometido a 60 °C durante 12 días, quienes lograron buenos resultados en la estabilización del mismo con 400 ppm de ER (3% ac.carnósico) combinado con 100 ppm de AP demostrando un efecto adicional cuando se encontraban juntos, sin embargo el TBHQ presentó los mejores resultados sólo y en combinación con AP y ER en este aceite. En un trabajo realizado en aceite de girasol por Zhang *et al* (2010), en el cual se evaluó la actividad antioxidante del ácido carnósico puro a tres concentraciones diferentes en comparación con antioxidantes sintéticos (BHA, BHT y TBHQ), en un ensayo de oxidación acelerada (21 días-60°C), el mayor efecto protector se obtuvo con el TBHQ, seguido por la concentración más alta de ácido carnósico. Resultados similares fueron reportados por Chen *et al* (2014) también en aceite de girasol, quien utilizó extractos alcohólicos de romero en un ensayo bajo las mismas condiciones. En aceite de nuez (Martinez *et al* 2013^a) en un ensayo de oxidación acelerada a 110 °C, observó que la mayor estabilidad oxidativa se lograba con 800 ppm de ER (3 % de ac. carnósico) alcanzando un FP de 2,18, este extracto combinado con PA y con TBHQ en un ensayo prolongado (180 días) mostró sinergismo en la matriz lipídica estudiada. Finalmente, en aceite de chía Ixtaina *et al* (2012), a través de un ensayo de oxidación acelerada llevado a cabo en Rancimat a 98 °C evaluaron la eficacia antioxidante de ER (4%) sólo y en combinación con tocoferoles y té verde. Los resultados obtenidos con este extracto en dicho estudio son comparables con los obtenidos en el presente trabajo, por otro lado, las combinaciones con tocoferoles y con té verde no mostraron diferencias significativas respecto al ER solo.

Antioxidante/s	Concentración (ppm)	Factor de Protección (h)
Control	0	1,00 ^a ± 0,01
Ácido Cítrico (AC)	100	1,08 ^{ab} ± 0,01
Palmitato de Ascorbilo (PA)	200	3,55 ^e ± 0,07
Tocoferoles (TOC)	200	1,22 ^b ± 0,03
Extracto de Romero (ER)	8000	2,41 ^c ± 0,09
ER + AC	8000 + 100	2,66 ^d ± 0,06
ER + TOC	8000 + 200	2,49 ^c ± 0,08
ER + PA	8000 + 200	3,64 ^e ± 0,08

Tabla 6: Factores de protección (h) de antioxidantes individuales y su combinación con Extracto de Romero (ER), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios seguidos por letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

En la Figura 14 y 15 se muestran los FP alcanzados con distintas concentraciones de PA y TOC, respectivamente. El máximo FP (7,24) se alcanzó con 800 ppm de PA (Fig.14), mientras que entre 200 y 500 ppm no existieron diferencias significativas en los FP. Por lo tanto, teniendo en cuenta la cantidad máxima permitida del presente aditivo en el CAA tanto aislado como mezclado con otro/s antioxidante/s, se seleccionó la concentración de 200 ppm para el ensayo de almacenamiento prolongado (Cap. III). En el caso de los TOC la capacidad antioxidante resultó considerablemente más baja (Fig. 15) siendo el FP logrado con la máxima concentración examinada (800 ppm) de 1,39. Según el CAA se puede utilizar tocoferoles en concentración que no exceda la necesaria para el efecto deseado, sin embargo el Codex especifica un límite máximo de 300 ppm solos o mezclados con otros antioxidantes. En cuanto al FP alcanzado con 200 ppm (1,22) no fue significativamente diferente al arrojado con 400 ppm. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Ixtaina *et al* (2012) en aceite de chía, quienes también ensayaron TOC y PA individualmente en Rancimat (98°C), y al igual que en este trabajo los tocoferoles no presentaron un efecto protector considerable.

Cort (1974) quien estudió el efecto antioxidante de los siguientes compuestos: TBHQ, BHT, ácido ascórbico (AA'), PA y la combinación de estos dos últimos, sobre aceite de soja almacenado a 45 °C, reportó el siguiente orden de efectividad: 200 ppm de TBHQ > 200 ppm de PA > 100 ppm de PA más 100 ppm de BHT > 100 ppm de PA > 200

ppm de AA' > 200 ppm de BHT. Más aún, McMullen *et al* (1991) observaron que el PA (200 ppm) retardó el enranciamiento del aceite de canola almacenado a 65 °C. Por su parte Calvo *et al* (2004), en aceite de girasol, probaron la efectividad de antioxidantes sintéticos (BHA, BHT, TBHQ y Propilgalatos) y naturales (mezcla de tocoferoles, ER y Salvia) obteniendo distintos resultados según el origen y composición del aceite de base. Sin embargo el TBHQ fue el antioxidante más efectivo frente a la totalidad de los aceites analizados; los tocoferoles por su parte, tuvieron una efectividad prácticamente nula a todas las concentraciones analizadas.

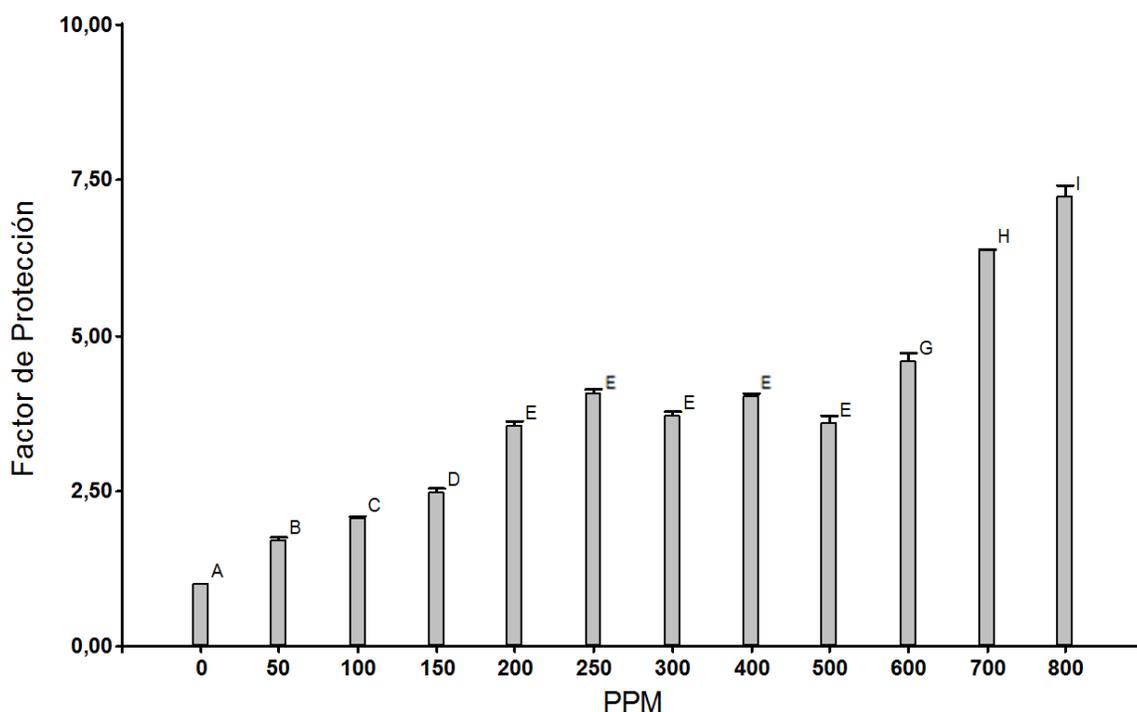


Figura 14: Factores de protección (h) de Palmitato de Ascorbilo (PA) a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

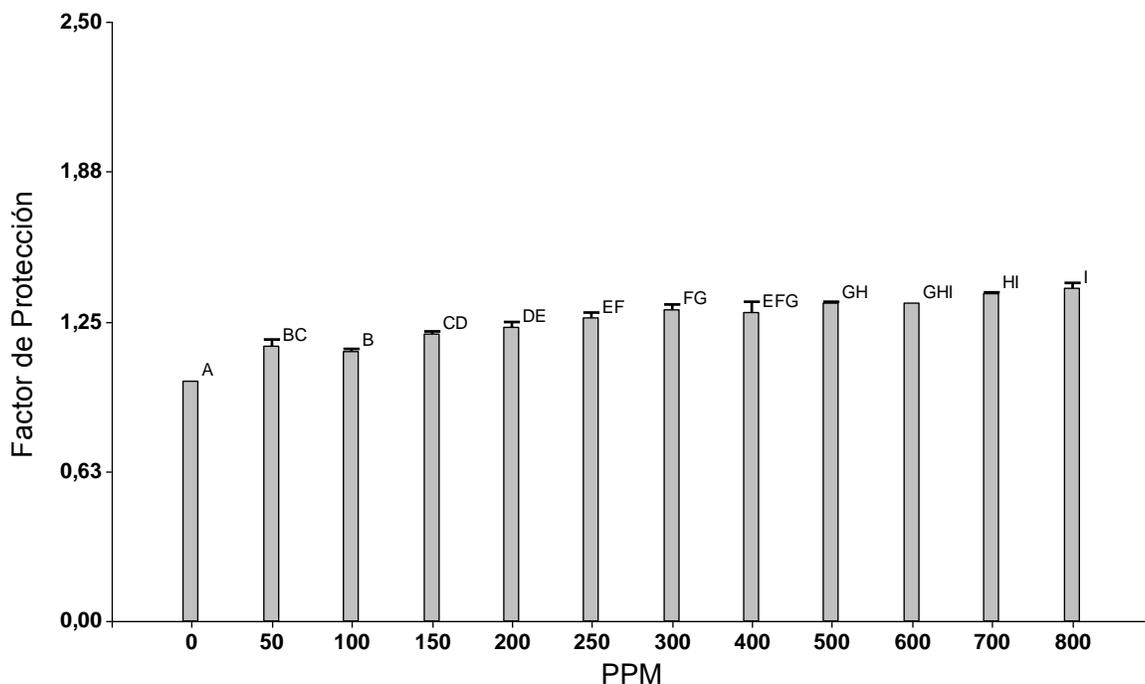


Figura 15: Factores de protección (h) de Tocoferoles (TOC) a distintas concentraciones (ppm) , obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Con la finalidad de corroborar el sinergismo entre PA y TOC informado por otros autores (Marinova & Yanishlieva 1990), en el presente trabajo se evaluó la eficacia de la combinación de PA y TOC en una proporción de 50% de cada uno (Fig.16). El máximo FP alcanzado fue de 9,49 con una concentración de 500 ppm de la mezcla (250 ppm de cada uno); a partir de este punto un aumento de la concentración de antioxidantes pasa a tener un efecto negativo, es decir, disminuye el FP. En la Figura 17 se muestran conjuntamente los FP de la combinación PA + TOC con los de dichos antioxidantes individuales. En la misma se observa que, a partir de las 300 ppm la mezcla presenta mayor efectividad que el PA sólo y esto se mantiene hasta las 700 ppm. El gráfico concentración (ppm) vs. Sinergismo (%) (Fig.18) demuestra el efecto prooxidante del aumento de la concentración de ambos antioxidantes, cayendo el % de sinergismo de 141% (300 ppm de c/u) a 41,89 % (400 ppm de c/u), no presentando este último valor diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con el % a las 50 ppm (32,8 %). El ANAVA permitió determinar que no existen diferencias significativas

entre las concentraciones 150, 200, 250 y 300 ppm de cada uno de los antioxidantes (Fig.17).

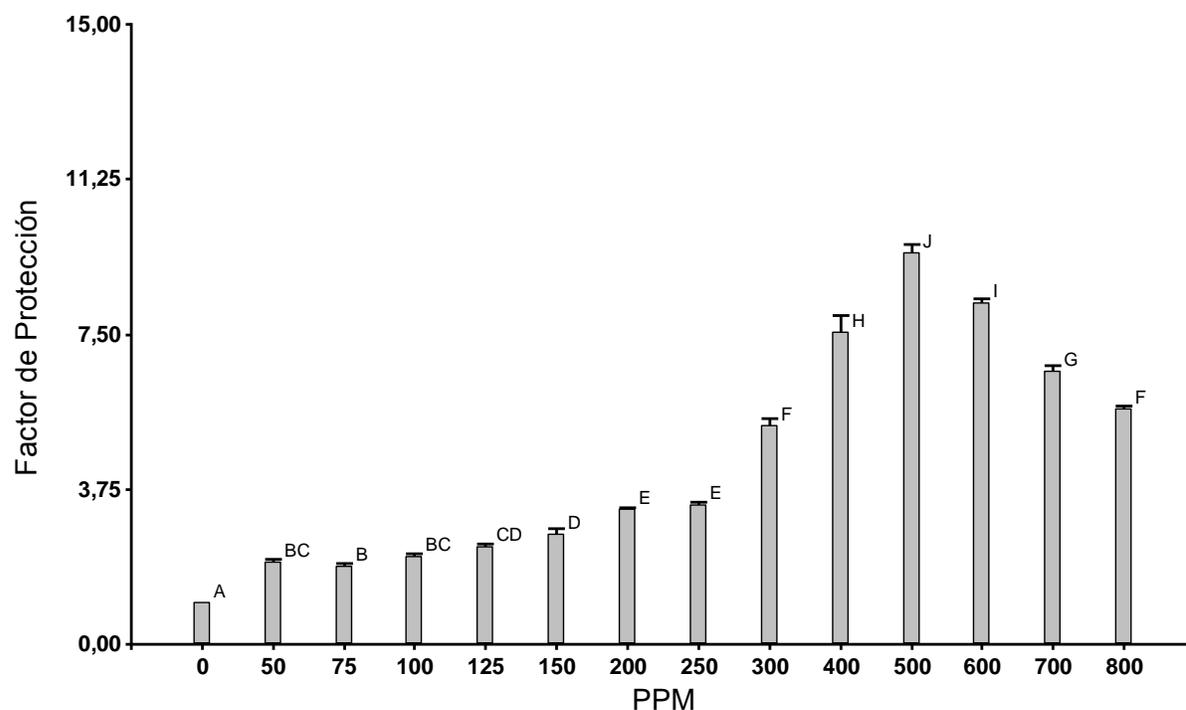


Figura 16: Factores de protección (h) de la combinación de Palmitato de Ascorbilo (PA) y Tocoferoles (TOC) en una proporción 1:1 y a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

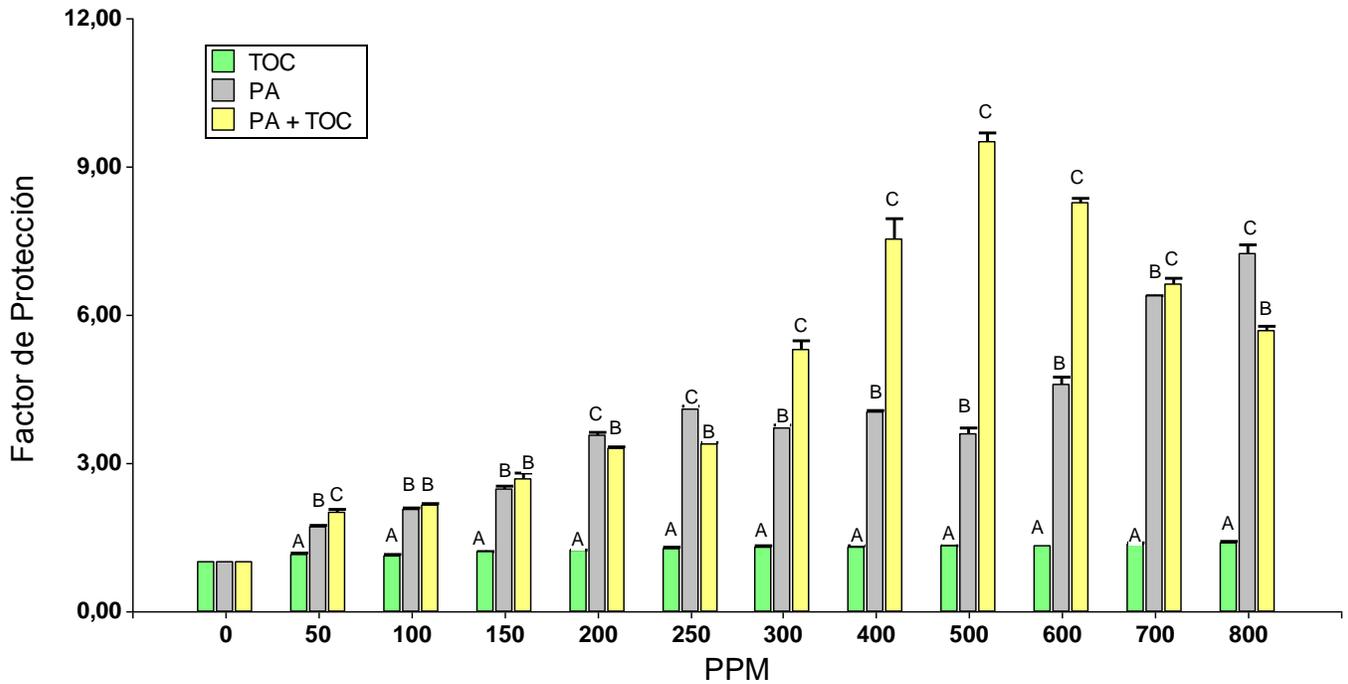


Figura 17: Factores de protección (h) de Palmitato de Ascorbilo (PA), Tocoferoles (TOC) y de la combinación (50:50) de ambos a distintas concentraciones (ppm), obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

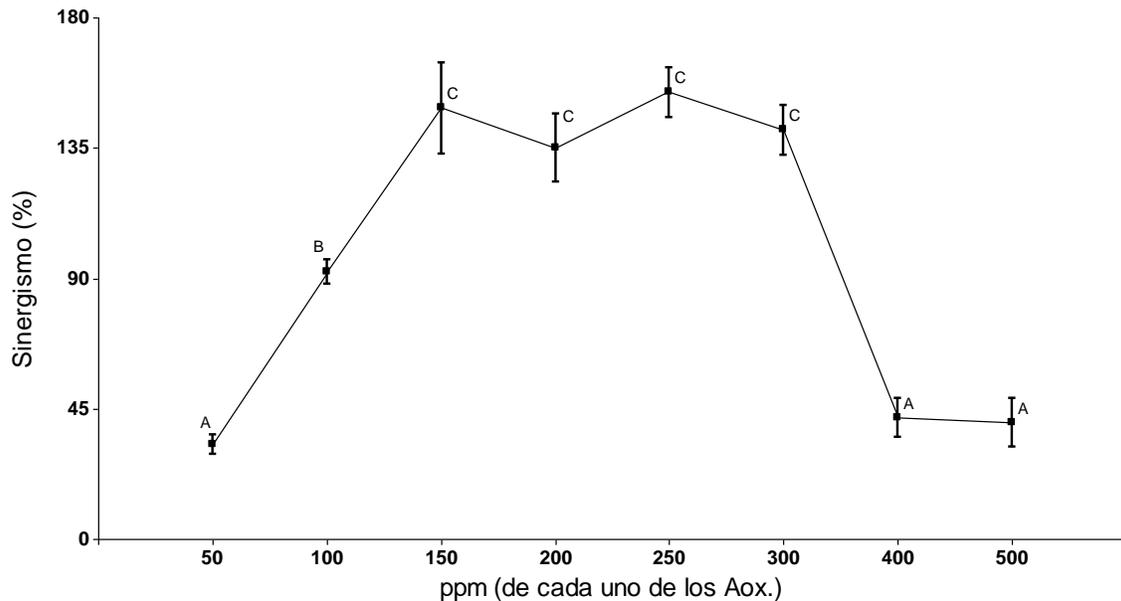


Figura 18: Porcentaje (%) de sinergismo entre los antioxidantes Palmitato de Ascorbilo (PA) y Tocoferoles (TOC) a distintas concentraciones (ppm) de cada uno. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Finalmente, en la tabla 7 se muestran, a los fines de comparar la eficacia de los antioxidantes naturales utilizados en esta tesis con un antioxidante artificial comúnmente utilizado en aceites y con efectividad conocida en la industria alimentaria como es el TBHQ, los FP del TBHQ y de los antioxidantes naturales a 100 y 200 ppm (a excepción del ER porque las concentraciones utilizadas con este, al ser altas no resultaron útiles a los fines comparativos con el TBHQ). Los análisis demuestran que la capacidad antioxidante del TBHQ es significativamente superior a la de todos los antioxidantes naturales. El FP máximo cercano a 7 logrado con TBHQ a 200 ppm, se alcanza con PA a 700 ppm (Fig.14) y con este combinado con TOC en una proporción de 200 ppm de cada uno (Fig. 16).

Además de los trabajos ya citados en los que se utilizó TBHQ como antioxidante, se puede mencionar que en aceite de pescado, Méndez *et al* (1990) quienes utilizaron TBHQ, ER, extracto de té verde, mezcla de tocoferoles y PA combinados entre sí; concluyeron que la adición de 200 ppm de TBHQ resultó ser más efectiva que la adición de 500 ppm de cualquiera de los cuatro antioxidantes naturales solos o combinados. Por su parte, en aceite de lino Omar *et al* (2010) obtuvieron buenos resultados combinando el TBHQ con polifenoles de té en un ensayo de 20 días a 60°C. Es común que en ensayos de oxidación acelerada el TBHQ se comporte mejor que cualquier antioxidante natural (Cort 1974; Méndez *et al* 1990; Calvo *et al* 2004; Zhang *et al* 2010; Ixtaina *et al* 2012; Martínez *et al* 2013^a; Chen *et al* 2014), sin embargo, debido al cuestionamiento que existe sobre la utilización de este y otros antioxidantes artificiales, sería una buena alternativa reducir la cantidad de los mismos en una matriz lipídica. En este sentido, Martínez *et al* (2013^b) demostraron que, en el caso de la estabilidad oxidativa del aceite de almendra, se obtienen similares resultados con 100 y 200 ppm de TBHQ. Por el contrario, en el aceite de chía esto no sucede ya que entre estas dos concentraciones el FP prácticamente se duplica (tabla 7).

Antioxidante/s	Concentración (ppm)	Factor de Protección (h)
Control	0	1,00 ^a ± 0,01
Tocoferoles (TOC)	100	1,12 ^b ± 0,02
Tocoferoles (TOC)	200	1,22 ^b ± 0,03
Palmitato de Ascorbilo(PA)	100	2,07 ^c ± 0,04
Palmitato de Ascorbilo (PA)	200	3,55 ^e ± 0,07
PA + TOC	50 + 50	2,14 ^c ± 0,05
PA + TOC	100 + 100	3,29 ^d ± 0,05
TBHQ	100	3,79 ^f ± 0,07
TBHQ	200	6,64 ^g ± 0,01

Tabla 7: Factores de protección (h) de antioxidantes naturales a 100 y 200 ppm en comparación con Terbutilhidroquinona (TBHQ) a las mismas concentraciones, obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 100°C). Valores medios (n = 2) ± desvío estándar. Valores medios seguidos por letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Conclusiones

El período de vida útil del aceite de chía sin aditivar a 25 °C estimado mediante una extrapolación de los TI obtenidos a distintas temperaturas fue de aproximadamente un año (8797 h).

En cuanto a los antioxidantes evaluados en este aceite a través de Rancimat a 100°C:

*Con 16000 ppm de ER se llega a un FP de 3,28. Se demostró que no existe sinergismo entre ER con AC, PA ni TOC.

* En el caso del PA se alcanza un FP de 7,24 a 800 ppm, sin embargo el máximo permitido por el CAA para este antioxidante tanto aislado como mezclado con otro/s es de 200 ppm, a esta concentración el FP fue de 3,55.

*De los antioxidantes evaluados, los TOC presentan la eficacia antioxidante más baja siendo el FP máximo alcanzado de 1,39 con 800 ppm. Sin embargo en el presente trabajo, se utilizará una concentración de 200 ppm en el ensayo de almacenamiento prolongado (Cap. III) con la finalidad de poder comparar su comportamiento combinado con PA.

*La combinación de PA y TOC, demostró ser efectiva hasta las 500 ppm (250 ppm de c/u) punto en el cual se observa una actividad antioxidante con un FP de 9,49. Con el aumento de la concentración de ambos antioxidantes se observa un efecto prooxidante, evidenciándose también una disminución del % de sinergismo. Teniendo en cuenta lo legislado en el CAA se evaluará en el ensayo de almacenamiento prolongado (Cap. III) la eficacia antioxidante de la mezcla de 200 ppm de PA más 200 ppm de TOC.

*De todos los antioxidantes evaluados, el TBHQ, presentó la máxima capacidad protectora. El FP cercano a 7 logrado con TBHQ a 200 ppm se alcanza con PA a 700 ppm y con este combinado con TOC en una cantidad de 400 ppm en total, demostrando una vez más la efectividad de la combinación de PA + TOC. Este antioxidante artificial se utilizará a 200 ppm en el ensayo de almacenamiento prolongado como un control positivo.

CAPITULO III: ENSAYO DE ALMACENAMIENTO PROLONGADO

Antecedentes

Numerosos estudios científicos han evaluado la eficacia de antioxidantes y sus combinaciones en distintas matrices lipídicas. La mayoría de ellos mediante ensayos de oxidación acelerada ya sea utilizando Rancimat a temperaturas altas (98°-120°C) u hornos y estufas a temperaturas medias (60°C), muchos de estos han sido citados en el Capítulo II. Por el contrario, los trabajos que se llevan a cabo bajo condiciones reales de anaquel (aprox. 25°C) son escasos.

Okogeri & Tasioula-Margari (2002) y Gómez Alonso *et al* (2007), estudiaron el efecto de compuestos minoritarios del tipo fenólico propios del aceite de oliva sobre la estabilidad oxidativa del mismo evaluando parámetros químicos y sensoriales. En este contexto Sinesio *et al* (2005) analizaron los cambios en atributos sensoriales como la amargura y la pungencia que son indicadores de calidad en el aceite de oliva extra virgen, en un ensayo de 18 meses variando la temperatura de 10 °C a 28 °C simulando así las condiciones de almacenamiento de un hogar y sus variaciones estacionales.

Por su parte, Arcoleo *et al* (2009) quienes estudiaron el efecto de agregar aceite esencial de limón al aceite de oliva en un ensayo de 10 meses (10°C a 22°C) evidenciaron un marcado efecto antioxidante de dicho aceite esencial. También en este aceite Gambacorta *et al* (2006) informaron una alta actividad antioxidante del orégano y el romero, y baja de la pimienta y el ajo, después de 7 meses de almacenamiento.

Olmedo *et al* (2008; 2009), en aceite de maní adicionado con aceite esencial de orégano, romero, laurel y aceite de oliva lograron minimizar el IP hacia el final del ensayo (112 días) con todos los antioxidantes probados, demostrando también la reducción en el desarrollo de aromas y sabores indicadores de rancidez.

Let *et al* (2007) evaluaron la estabilidad del aceite de pescado adicionado con: γ -tocoferol, EDTA, PA y la combinación de los tres durante 6 semanas almacenado a temperatura ambiente. Siendo EDTA el que presentó la mayor efectividad seguido del γ -tocoferol, por el contrario PA mostró un efecto prooxidante a una concentración de 300 ppm y una ligera capacidad antioxidante a una concentración de 50 ppm. Resultados similares fueron obtenidos por Horn *et al* (2009), quienes evaluaron durante 10 meses la

estabilidad oxidativa de barras de cereal aditivadas con aceite de pescado utilizando ácido cafeico, PA y γ - tocoferol como antioxidantes. Para cada una de estas sustancias, observaron efectos pro y antioxidantes dependientes de la concentración.

Particularmente en aceite de chía, Ixtaina *et al* (2012) realizaron un ensayo de almacenamiento prolongado con reposición o estático a dos temperaturas (4°C y 20 °C). En dicho trabajo se ensayó: ER, extracto de té verde y PA a 500 y 2500 ppm cada uno además de un control sin aditivar, todos en condiciones de oscuridad. Los aceites que se mantuvieron más estables fueron los almacenados a 4°C y el PA fue el antioxidante que mejores resultados mostró en cuanto a la conservación del aceite en el tiempo.

Más recientemente, en aceite de nuez, una matriz similar al aceite de chía por ser altamente insaturado ($\geq 50\%$ ácido linoleico), Martinez *et al* (2013^a), evaluaron la capacidad protectora de PA, ER y TBHQ, solos y combinados, a 25 °C bajo condición de luz y oscuridad durante 6 meses. Estos autores observaron que, ninguno de los antioxidantes logró ser eficaz para contrarrestar los efectos causados por la fotooxidación, por el contrario en ausencia de luz todos los tratamientos con agregado de antioxidantes fueron eficaces para inhibir la formación de productos de oxidación primaria durante el período de almacenamiento, siendo el más efectivo el TBHQ y las combinaciones más efectivas las de este con PA y ER.

Finalmente, es importante tener en cuenta lo que la legislación determina para el uso de aditivos alimentarios antioxidantes en aceites: según el CAA, legislación que se tendrá en cuenta en esta tesis, en el Artículo 523bis - (Res 2012, 19.10.84) del Capítulo VII de alimentos grasos y aceites alimenticios: "Los aceites y grasas vegetales comestibles podrán ser adicionados, con la exclusión de los aceites de oliva de presión no refinados, de los siguientes antioxidantes y sinergistas:

1. Galato de propilo, galato de octilo y galato de dodecilo (o sus mezclas), Máx: 100 mg/Kg, aislados o mezclados.
2. Hidroxianisolbutilado (BHA), Máx: 200 mg/Kg.
3. Hidroxitoluenobutilado (BHT), Máx: 200 mg/Kg.
4. Terbutilhidroquinona (TBHQ), Máx: 200 mg/Kg.
5. Mezcla de los galatos citados, BHA y/o BHT, Máx: 200 mg/Kg siempre que no incorporen más de 100 mg/Kg de galatos.

6. Mezclas de TBHQ con BHA y BHT, Máx: 200 mg/Kg .
7. Tocoferoles naturales o sintéticos (en concentración que no exceda la necesaria para el efecto deseado).
8. Palmitato y estearato de ascorbilo, Máx: 200 mg/Kg , aislados o mezclados.
9. Ácido cítrico, ácido fosfórico, citrato de monoisopropilo, ésteres de monoglicéridos con ácido cítrico, Máx: 100 mg/Kg, aislados o mezclados.”

Objetivo Específico

Evaluar la conservación del aceite de chía en condiciones controladas de almacenamiento prolongado utilizando concentraciones adecuadas de los antioxidantes teniendo en cuenta los factores de protección obtenidos en Rancimat y la legislación vigente en el CAA.

Materiales y Métodos

Con el propósito de evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de chía se llevó a cabo un ensayo de almacenamiento prolongado de tipo dinámico o también denominado “sin reposición” durante 165 días. En este tipo de ensayos a diferencia de los estáticos (Ixtaina *et al* 2012) a medida que se van tomando muestras el espacio de cabeza, que contiene oxígeno, aumenta. Esta situación coincide con lo que sucede con el aceite almacenado por el consumidor. En los estáticos o “con reposición” cada muestreo está representado por frascos individuales de igual capacidad, los cuales no se abren hasta el momento de su análisis.

Los aditivos, en las concentraciones y combinaciones que se detallan en la tabla 8, se disolvieron en una alícuota de 50 mL de aceite de chía (obtenido por prensado en frío como fue detallado en el Cap. I) usando un agitador magnético durante aproximadamente 5 minutos o hasta lograr una apariencia homogénea. Esta mezcla fue transferida a envases de vidrio transparente de 250 mL de capacidad que contenían 200 mL de aceite crudo. La condición de almacenamiento en oscuridad se logró recubriendo los envases con una lámina de aluminio. Se preparó también un control sin aditivar (CO) y uno sin aditivar y sin recubrir con aluminio (CL) para analizar los efectos producidos por la luz (fotooxidación).

Los tratamientos se realizaron por triplicado y se almacenaron durante un período de 6 meses aproximadamente en una cámara con iluminación permanente (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) y temperatura controlada (25°C). Para la selección de los aditivos antioxidantes utilizados y su concentración, se tuvieron en cuenta: i) los FP obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación acelerada (Cap. II), ii) la solubilidad de las sustancias y iii) la legislación vigente. De esta manera, se descartaron las combinaciones de ER con AC, PA y TOC por no presentar FP significativos respecto al ER sólo (ver Tabla 6). Para TBHQ y PA se utilizó la máxima cantidad permitida (200 ppm) por el CAA. En el caso de TOC se utilizó 200 ppm a los fines comparativos con la combinación de PA y TOC de la cual se seleccionó la de 400 ppm (200 ppm de cada uno) debido al sinergismo manifestado en el Capítulo II y a que no existieron diferencias estadísticas con 250 ni 300 ppm, además de que respetamos así la máxima cantidad permitida por el CAA de 200 ppm para el PA. Todos los aceites aditivados presentaron un aspecto translúcido. En la siguiente tabla se resumen los tratamientos utilizados y se detallan los códigos que se manejarán a lo largo del capítulo.

Código Tratamiento	Antioxidante/s	Concentración (ppm)	Condición
CL	_____	Control	Luz
CO	_____	Control	Oscuridad
PA	Palmitato de Ascorbilo	200 ppm	Oscuridad
ER	Extracto de Romero	8000 ppm	Oscuridad
TBHQ	Terbutilhidroquinona	200 ppm	Oscuridad
TOC	Tocoferoles al 70%	200 ppm	Oscuridad
PA + TOC	Palmitato de Ascorbilo y Tocoferoles	200 ppm de c/u	Oscuridad

Tabla 8: Tratamientos utilizados para evaluar la estabilidad del aceite de chía en un ensayo de almacenamiento prolongado (luz fluorescente, intensidad 800 Lux, 25°C).

Con una periodicidad quincenal se extrajeron muestras (10 g) de cada uno de los tratamientos a fin de evaluar posibles cambios en la calidad química de los aceites y en los

parámetros indicativos de oxidación. Las muestras se almacenaron en recipientes de vidrio de 10 cm³ color ámbar en atmósfera de nitrógeno a -20°C hasta el momento de su análisis. Los parámetros medidos fueron: grado de acidez (GA), índice de peróxido (IP), dienos y trienos conjugados (k_{232} y k_{270}), cuyas metodologías fueron detalladas en la sección materiales y métodos del Capítulo I. Con el objetivo de analizar posibles cambios en el perfil característico del aceite, se realizaron sobre los controles (CL: luz y CO: oscuridad) los siguientes ensayos según metodología descrita en el Capítulo I: perfil de ácidos grasos e IY, pigmentos, cuantificación de tocoferoles y actividad antioxidante al DPPH tanto en el tiempo inicial como en el final (165 días).

Análisis estadísticos

La base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2011. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las diferencias entre los tratamientos se estimaron mediante análisis de la varianza (ANAVA). En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples (Fisher LSD). También se realizó una regresión lineal con IP como variable dependiente y los días como variable regresora o independiente.

Resultados y Discusión

En las figuras 19, 20, 21 y 22 se muestra la evolución de los parámetros oxidativos a lo largo del período de almacenamiento. Particularmente el GA (Fig.19) no se diferenció significativamente ($p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos, incluso en el tiempo no hubo un aumento significativo en ninguno de ellos. Teniendo en cuenta que el máximo permitido para este parámetro en aceite de chía según el CAA es de 1%, en el presente ensayo a los 165 días de almacenamiento el CL, presentó un GA de 0,22. Este hecho evidencia que el aceite de chía es estable frente a la degradación hidrolítica de los glicéridos, aún en condiciones de exposición a la luz.

Un comportamiento similar muestra el parámetro k_{270} (trienos conjugados) (Fig. 20), no mostrando diferencias significativas entre tratamientos hasta los 105 días de

almacenamiento, momento a partir del cual los tratamientos: CL, CO, TOC y ER comienzan a diferenciarse del resto. Resulta importante destacar que el ER muestra valores significativamente ($p \leq 0,05$) más altos de k_{270} que los controles, infiriendo cierta acción prooxidante de este extracto.

Los parámetros k_{232} (dienos conjugados) (Fig.21) e IP (Fig.22), en cambio sí muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$), demostrando una capacidad diferencial de los compuestos antioxidante utilizados para proteger al aceite de chía de la oxidación y prolongar su período de inducción, tiempo necesario para que la acumulación de peróxidos alcance el valor de 15 meqO₂/kg (Economou *et al* 1991).

En la k_{232} (Fig.21) los tratamientos CL y ER se diferencian del resto de los tratamientos desde los 15 días de almacenamiento en adelante. A partir de los 75 días tanto CO como TOC se diferencian de los tratamientos aditivados con PA, PA + TOC y TBHQ, acercándose a los valores de k_{232} que presentan CL y ER, incluso este último y TOC superan los valores de CL a partir de los 120 días, alcanzando a los 165 días valores de 3,58 con ER y de 3,35 con TOC respecto al CL que fue de 3,23. Por su parte, los tratamientos PA, PA +TOC y TBHQ presentan valores de k_{232} por debajo de 1,7 no mostrando diferencias significativas entre ellos a lo largo de todo el período de almacenamiento.

En cuanto al IP (Fig.22), sin tener en cuenta el CL que se diferencia del resto a partir de los 15 días y será discutido más adelante; se puede observar un comportamiento similar al observado para k_{232} . A partir de los 60 días de almacenamiento los tratamientos se dividen en dos grupos, uno compuesto por: CO, ER y TOC y otro por TBHQ, PA y PA + TOC. El primer grupo de antioxidantes detallado no muestra buena capacidad protectora superando la cantidad máxima de IP admitido por el CAA; en el caso de TOC a partir de los 135 días (FP: 15,87) y en el caso de CO y ER a partir de los 150 días de almacenamiento (15,78 y 17,82 respectivamente). El segundo grupo es el que muestra mayor efectividad en la protección del aceite de chía, no exhibiendo diferencias significativas entre ellos hasta los 135 días; momento a partir del cual la combinación PA + TOC, se diferencia significativamente de los otros dos y presenta los valores más bajos de IP finalizando el ensayo con 0,42 meqO₂/Kg (Fig. 23). Estos tres tratamientos mantienen el

IP por debajo de 1 meq O₂/Kg hasta los 135 días en el caso del TBHQ, hasta los 150 días en el caso del PA y no superándolo nunca en el caso de PA + TOC (Fig. 23).

Del análisis conjunto de los parámetros evaluados surge que la condición lumínica ejerce un efecto significativo sobre la generación de productos de oxidación primarios: dienos conjugados (Fig.21) y peróxidos (Fig. 22) en el aceite de chía. Con CL se demuestra que la fotooxidación acelera el proceso de deterioro del aceite siendo el IP a los 165 días de 24,3 respecto al CO que fue de 18,4. De acuerdo a Wong (1995) y Frankel (2005) la fotooxidación representa una vía importante de generación de peróxidos a partir de ácidos grasos insaturados, cuando la misma sucede en presencia de un fotosensibilizador adecuado como las clorofilas, feofitinas o flavinas. Estas reacciones de oxidación fotosensibilizadas, al igual que las que ocurren durante la auto-oxidación, conducen a la formación de peróxidos pero, a diferencia de estas últimas, no presentan un período de inducción apreciable, puesto que no son inhibidas ni retardadas por sustancias inhibidoras de la propagación en cadena de radicales libres, como los antioxidantes utilizados o los que están presentes naturalmente en un aceite. Si bien el aceite de chía utilizado como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de las diversas sustancias ensayadas en este trabajo contiene una baja concentración (4,66 ppm) de clorofilas (tabla 2), de acuerdo a Suzuki *et al* (1984) esta cantidad del pigmento fotosensibilizador es suficiente para la producción fotoquímica de oxígeno singulete. Esto se evidencia en la Figura 22, donde el tratamiento CL carece de período de inducción, observándose un aumento lineal y sostenido del IP. Por tal motivo en el presente trabajo de tesis, y basándonos en antecedentes previos (Martínez *et al* 2013^a) es que la eficacia de los antioxidantes seleccionados sólo fue evaluada en ausencia de luz.

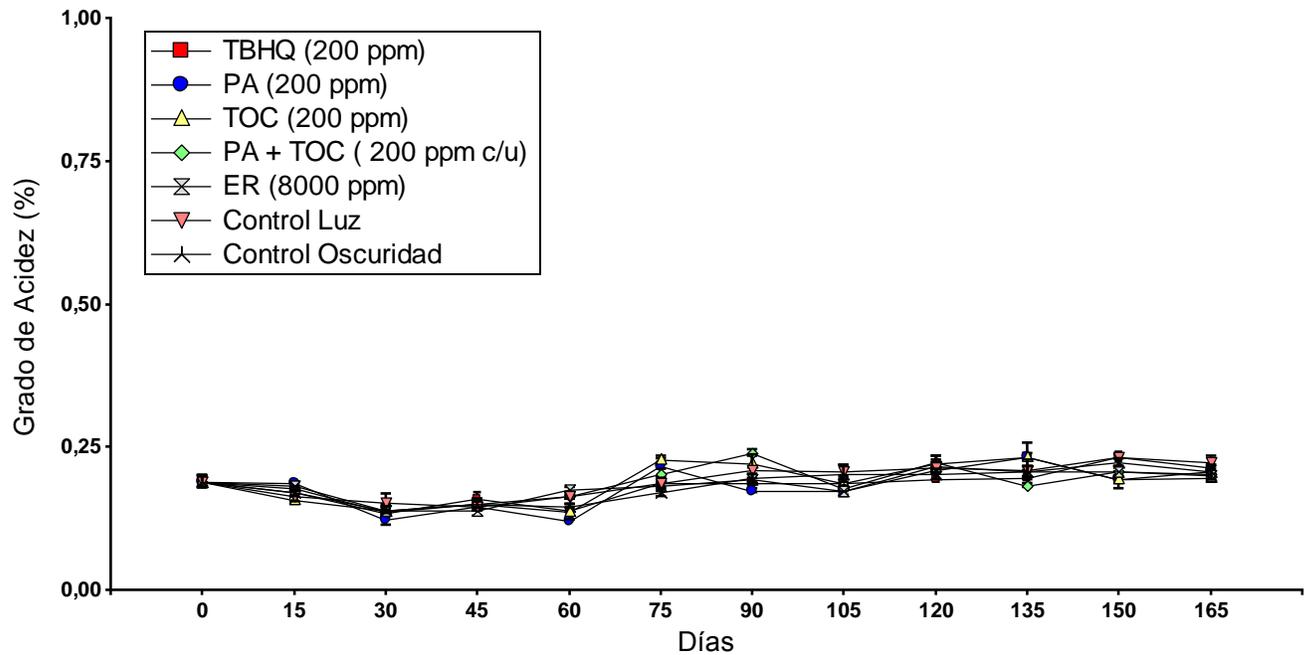


Figura 19: Evolución del grado de acidez durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

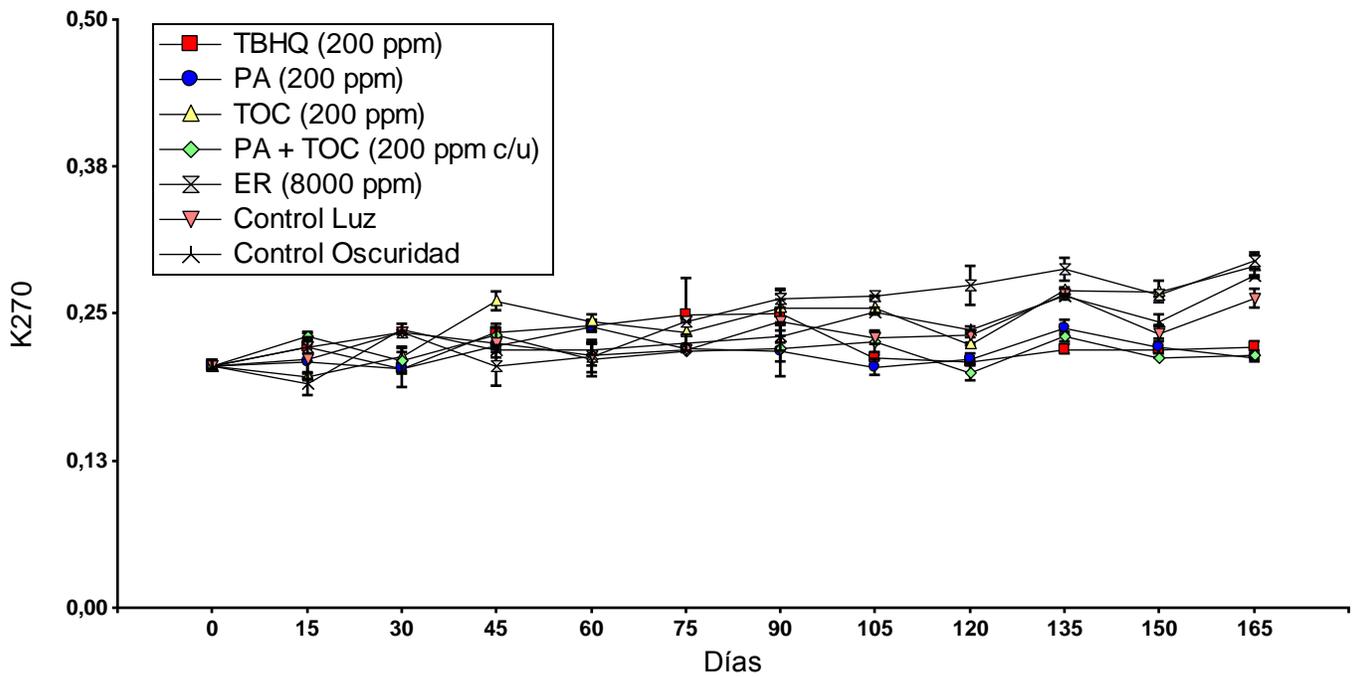


Figura 20: Evolución del coeficiente de extinción específica (k_{270} , trienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

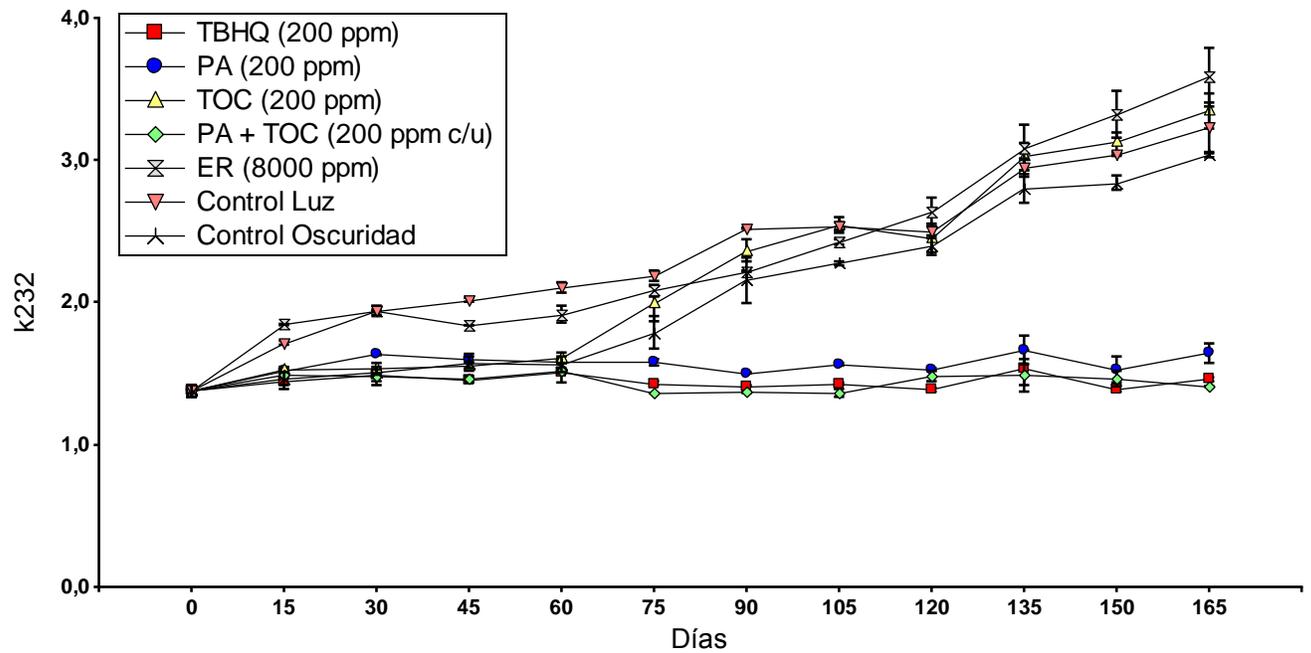


Figura 21: Evolución del coeficiente de extinción específica (k_{232} , dienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

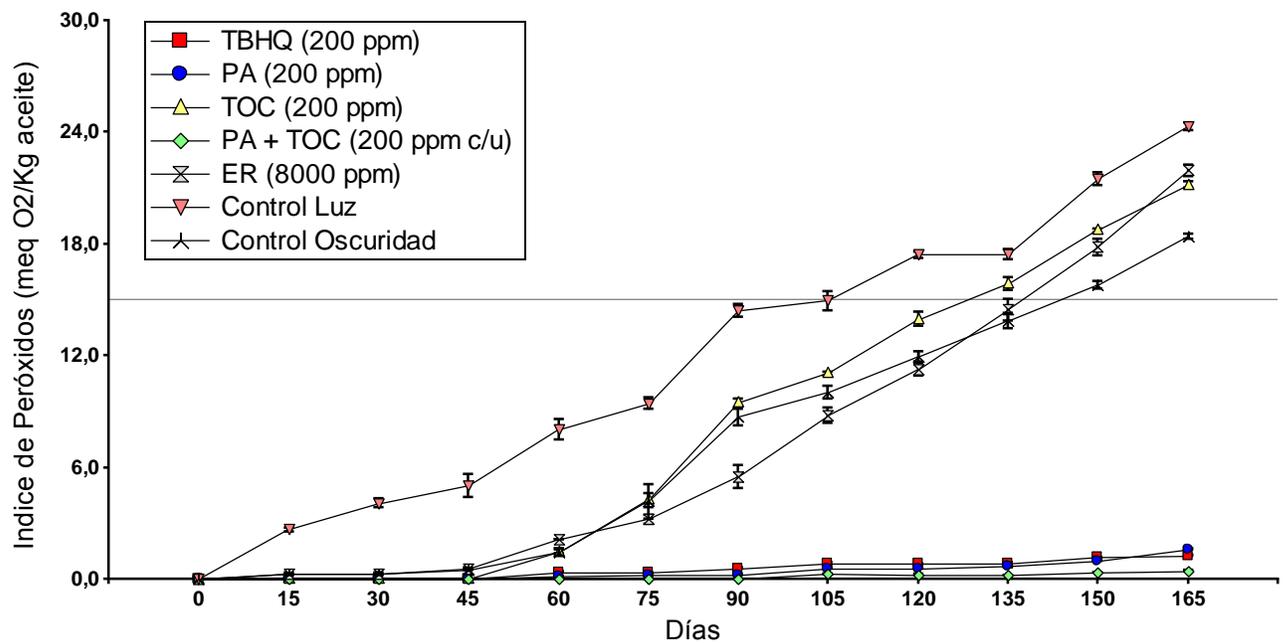


Figura 22: Evolución del índice de peróxidos (meq O_2 /kg aceite) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

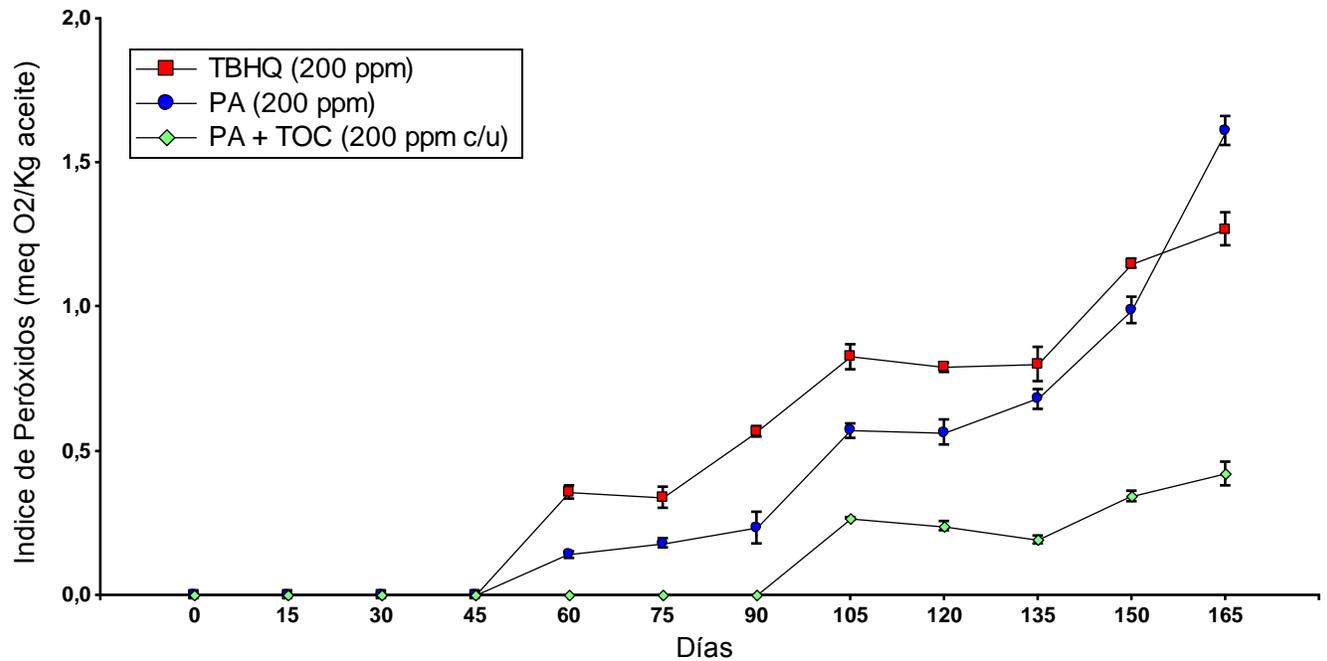


Figura 23: Detalle de la Fig. 22. Evolución del índice de peróxidos (meqO₂/kg aceite) durante el almacenamiento del aceite de chía en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas de los tratamientos que presentaron mejores resultados: Terbutilhidroquinona (TBHQ), Palmitato de ascorbilo (PA) y la combinación (50:50) de Palmitato de Ascorbilo y Tocoferoles (PA+ TOC).

Para aquellos aceites extraídos por prensado en frío y sin una legislación particular, el CAA, como se mencionó anteriormente, admite un valor de IP máximo de 15 meqO₂/Kg de aceite. En virtud de este hecho, en la Tabla 9 se expresan los días de almacenamiento estimados (a partir de la regresión con los datos experimentales) para alcanzar un determinado valor de IP (IP=15: para CL, CO, ER y TOC; IP=2 para PA y TBHQ e IP=1 para PA + TOC). Estimando según esta metodología que es PA + TOC el tratamiento que mayor vida útil brinda al aceite de chía (207 días para llegar a 1 meqO₂/Kg) y es el tratamiento con TOC el que menos protección brinda (126 días para llegar a 15 meq O₂/Kg), menos aún que CO (142 días). En cuanto al CL, es decir un aceite sin ninguna protección ni siquiera a la luz, se estima que a los 108 días llegaría a un IP de 15 meq O₂/Kg, resultando menor al tiempo de vida útil que resultó de la estimación realizada mediante Rancimat a distintas temperaturas (Fig. 11- Cap. II).

Tratamiento	β_0	β_1	β_2	R^2	Día	Día	Día
					estimado	estimado	estimado
					(IP15)	(IP2)	(IP1)
Control Luz	0,12	0,13	0,000093	0,98	108		
Control Oscuridad	-1,42	0,05	0,00043	0,96	142		
TBHQ (200 ppm)	-0,13	0,01	0,000016	0,95		216	
PA (200 ppm)	0,26	-0,01	0,0001	0,96		190	
TOC (200 ppm)	-10,8	0,24	0,00046	0,99	126		
PA + TOC	-1,67	0,03	-0,00008	0,87			207
ER (8000 ppm)	0,01	-0,02	0,00092	0,99	144		

Tabla 9: Coeficientes de regresión y R^2 para los índices de peróxidos (meq O_2 /Kg aceite) de los distintos tratamientos utilizados en el ensayo de almacenamiento prolongado. Ecuaciones de regresión: “ $y = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2$ ” donde “ y ” es la variable dependiente (IP), β_0 es la constante que indica el valor esperado de “ y ” cuando “ x ”=0, “ β_1 ” es el coeficiente de “ x ”, “ β_2 ” es el coeficiente de “ x^2 ”, “ x ” es la variable independiente o regresora (días). Abreviaturas: Terbutilhidroquinona (TBHQ), Tocoferoles (TOC), Extracto de Romero (ER) y Palmitato de Ascorbilo (PA).

Finalmente, en la tabla 10 se muestran los resultados de los análisis químicos (% AG, IY, Tocoferoles y DPPH) de los tratamientos CO y CL al tiempo cero y a los 165 días de almacenamiento. Se observó que los pigmentos disminuyen significativamente a lo largo del período de almacenamiento, no existiendo diferencias significativas para los carotenos entre las condiciones de luz y oscuridad, pero sí para las clorofilas las cuales sufren una reducción de aproximadamente un 80% en luz y de un 63% en oscuridad. En concordancia con lo observado por Ixtaina *et al* (2012) y Martínez *et al* (2013^b), el perfil de ácidos grasos tanto saturados, monoinsaturados como polinsaturados no se ve afectado por las condiciones de almacenamiento. Si bien a los 165 días, CL y CO, no evidencian una disminución significativa en el contenido de tocoferoles; Ixtaina *et al* (2012) informó que en períodos más prolongados de tiempo (225 días), el contenido de tocoferoles, disminuye en un rango de 10% al 24% dependiendo del tratamiento. Más aún, en aceite de oliva Okogeri & Tasioula-Margari (2002) observaron una reducción en el α - tocoferol del 50% en 12 meses en oscuridad y del 79% en 4 meses bajo luz; por su parte Gómez Alonso *et al* (2007) también en este aceite percibieron una reducción de este compuesto aunque más leve (12% al 23%). En cuanto a la actividad antirradicalaria medida mediante DPPH se mantuvo aproximadamente en una media de 43 % transcurridos los 165 días de almacenamiento; lo cual puede ser atribuida a su contenido constante en tocoferoles.

Parámetro	Control Luz		Control Oscuridad	
	Día 0	Día 165	Día 0	Día 165
% Ácidos Grasos				
<i>Palmítico</i>	7,46 ^a ± 0,15	6,54 ^a ± 0,39	7,46 ^a ± 0,15	6,88 ^a ± 0,34
<i>Palmitoleico</i>	Tr	Tr	Tr	Tr
<i>Esteárico</i>	2,98 ^a ± 0,09	2,46 ^a ± 0,2	2,98 ^a ± 0,09	2,62 ^a ± 0,21
<i>Oleico</i>	7,18 ^a ± 0,15	6,54 ^a ± 1,28	7,18 ^a ± 0,15	6,29 ^a ± 0,49
<i>Linoleico</i>	20,08 ^a ± 0,16	19,14 ^a ± 0,96	20,08 ^a ± 0,16	19,94 ^a ± 0,39
<i>Linolénico</i>	61,82 ^a ± 0,46	66,39 ^a ± 2,91	61,82 ^a ± 0,46	64,28 ^a ± 1,36
IY	212,08 ^a ± 0,94	222,31 ^a ± 6,49	212,08 ^a ± 0,94	217,75 ^a ± 2,6
Carotenoides (mg/Kg)	5,41 ^a ± 0,09	3,22 ^b ± 0,35	5,41 ^a ± 0,09	3,44 ^b ± 0,09
Clorofilas (mg/Kg)	4,66 ^a ± 0,06	0,9 ^b ± 0,09	4,66 ^a ± 0,06	1,69 ^c ± 0,08
DPPH	40,33 ^a ± 0,29	42,24 ^a ± 0,41	40,33 ^a ± 0,29	45,45 ^a ± 1,24
Tocoferoles (mg/Kg)				
α	Tr	Tr	Tr	Tr
β	Tr	Tr	Tr	Tr
γ	651,76 ^a ± 41,9	598,39 ^a ± 8,4	651,76 ^a ± 41,9	600,15 ^a ± 13,2
δ	64,77 ^a ± 2,68	68,39 ^a ± 1,39	64,77 ^a ± 2,68	67,68 ^a ± 1,76

Tabla 10: Parámetros químicos medidos a los 0 y 165 días de almacenamiento en los aceites control (luz y oscuridad). Valores medios (n=3) ± desvío estándar. Tr: valores trazas. Valores medios seguidos por letras diferentes difieren significativamente (p ≤ 0.05). Abreviaturas: Índice de Yodo (IY), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Conclusiones

La estabilidad oxidativa de un aceite o grasa depende de varios factores entre ellos; el grado de insaturación de los ácidos grasos, la cantidad y tipo de antioxidantes, la presencia de trazas metálicas y de luz, la disponibilidad de oxígeno y la exposición a temperaturas elevadas. El aceite de chía constituye un sustrato altamente susceptible a reacciones oxidativas que deterioran su calidad química y organoléptica. Este hecho hace necesario que para su conservación deba ser protegido mediante el empleo de sustancias y condiciones de almacenamiento que puedan inhibir o retardar los procesos de oxidación.

Entre los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran el BHA, BHT y TBHQ. El uso de estos está siendo cada vez más cuestionado dado que se le atribuyen efectos negativos sobre la salud. Por tal motivo, en los últimos años, ha surgido un interés creciente en el estudio y aplicación de antioxidantes naturales.

El análisis de la estabilidad del aceite de chía frente a la auto-oxidación, permitió determinar la eficacia antioxidante de algunas sustancias bajo condiciones de almacenamiento que simulan las utilizadas por el consumidor. El efecto protector de la combinación de PA con TOC en una proporción 50:50 y respetando los límites establecidos por el CAA de 200 ppm para PA fue mayor que con TBHQ, uno de los antioxidantes artificiales más usados y citados por su conocida eficacia.

Tanto la composición de ácidos grasos como la actividad antirradicalaria y la proporción y cantidad de tocoferoles, en los aceites control, permanecieron prácticamente sin modificaciones al cabo del período de almacenamiento. Por el contrario, la cantidad de pigmentos carotenoides disminuyó proporcionalmente, tanto en luz como en oscuridad, mientras que las clorofilas se redujeron significativamente bajo condiciones de iluminación permanente.

CONCLUSION GENERAL

El creciente interés de los consumidores en cuanto a la relación alimentación-salud ha intensificado la búsqueda para adoptar un estilo de vida sano. Una alimentación rica en ácidos grasos insaturados: ω -3, ω -6 y ω -9 disminuye el riesgo de padecer enfermedades, especialmente las cardiovasculares, cáncer y síndrome metabólico. Su consumo habitual constituye un remedio eficaz para reducir el nivel de colesterol y de triglicéridos en sangre, y contribuye a regular la presión arterial. Los Comités Internacionales de Nutrición y Alimentación convocados por FAO/OMS (1994) recomiendan que la distribución de consumo de los distintos ácidos grasos corresponda, dentro de un 30% total, a un aporte del 10% por parte de los saturados (AGS), de un 10% de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y de un 10% de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Además, la relación de AGPI ω -6 y de AGPI ω -3 debería estar en el rango de 5:1 a 10:1 como máximo.

En este contexto el aceite de chía, por su perfil altamente insaturado puede jugar un papel importante, ya que son pocos los aceites vegetales con características semejantes. Sin embargo, esta ventaja nutricional acarrea una desventaja tecnológica en cuanto a la estabilidad del producto debido a la vulnerabilidad de los dobles enlaces mencionada en el capítulo II de esta tesis. Si bien el aceite de chía contiene naturalmente sustancias antioxidantes con efecto protector, cuando se encuentra expuesto a factores medioambientales como el aire, la luz y la temperatura se oxida alterando su calidad química y organoléptica. Por lo tanto, una alternativa tecnológica para preservar la calidad química de este tipo de aceite radica en el agregado de antioxidantes sintéticos o naturales, teniendo estos últimos un interés creciente tanto por parte de la industria como de los consumidores.

En respuesta a esta realidad, en esta tesis se comprobó que, el efecto protector de la combinación de los antioxidantes naturales palmitato de ascorbilo (PA) y tocoferoles en una proporción 50:50, respetando los límites establecidos por el CAA de 200 ppm para PA, fue superior al alcanzado con el antioxidante sintético TBHQ. Por lo tanto, constituye una alternativa interesante para la industria aceitera, la cual actualmente se encuentra interesada en este tipo de aceites no convencionales, provenientes de cultivos que están siendo revalorizados en el país y el continente.

BIBLIOGRAFIA

AOCS (1998). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Ed. AOCS Press, Champaign, USA.

Arcoleo, G., Indovina, M.C., Varvaro, G., Lanza, C.M. & Mazzaglia, A. (2009). Improving olive oil shelf life with lemon essential oil. *Chemical Engineering Transactions* 17: 849-854.

Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of oil of chia (*Salvia hispanica* L.), from five locations in Northwestern Argentina. *Journal of American Oil Chemists' Society* 72: 1079-1081.

Ayerza, R. & Coates, W. (2000). Dietary levels of chia: influence of yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry Science* 79: 724-739.

Ayerza, R. & Coates, W. (2001). Omega-3 enriched eggs: the influence of dietary alpha-linolenic fatty acid source on egg production and composition. *Canadian Journal of Animal Science* 81: 355-362.

Ayerza, R., Coates, W. & Lauria, M. (2002). Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an ω -3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance and sensory characteristics. *Poultry Science* 81: 826-837.

Ayerza, R. & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica* L.), grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science* 44 (3): 131-135.

Ayerza, R. & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research* 25: 995-1003.

Ayerza, R. & Coates, W. (2006). Chía: Redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas. 1^o Edición. Editorial: Del nuevo Extremo. Buenos Aires, Argentina.

Ayerza, R. & Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chía (*Salvia hispanica* L.) selections. *Industrial Crops and Products* 30: 321-324.

Ayerza, R. & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products* 34: 1366-1371.

Bishov, S. J., Masuoka, Y. & Kapsalis, J. G. (1977). Antioxidant effect of spices, herbs and protein hydrolyzates in freeze-dried model systems: synergistic action with synthetic phenolic antioxidants. *Journal of Food Processing and Preservation* 1: 153-166.

Bowen, R. A. R. & Clandini, M. T. (2005). Maternal dietary 22:6 n₃ is more effective than 18:3 n₃ in increasing content in phospholipids of cells from neonatal rat brain. *British Journal of Nutrition* 93: 601-611.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28: 25-30.

Burr, G.O. & Burr, M.M. (1929). A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry* 82: 345-367.

Calvo, A.C., Hamborg, M. & Patton, V. (2004). Protección del aceite de girasol mediante antioxidantes naturales y sintéticos. *Aceites & Grasas* 56: 486-489.

Ceci, L.N. & Carelli A.A. (2010). Relation between oxidative stability and composition in Argentinian olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87: 1189-1197.

Chen, X., Zhang, Y., Zu, Y., Yang, L., Lu, Q. & Wang, W. (2014). Antioxidant effects of rosemary extracts on sunflower oil compared with synthetic antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology* 49: 385-391.

Chu, Y.H. & Hsu, H.F. (1999). Effects of antioxidants on peanut oil stability. *Food Chemistry* 66: 29-34.

Cioffi, G., Pesca, M.S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L. & De Tommasi, N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry* 121: 105-111.

Coates, W. & Ayerza, R. (1996). Production potential of chia in north-western Argentina. *Industrial Crop Production* 5: 229-233.

Codex Alimentarius Commission (1999) Codex Stan 19. Edible fats and oils not covered by individual standards. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en

Código Alimentario Argentino. Capítulo VII: Alimentos grasos y aceites comestibles. Artículo 523bis - (Res 2012, 19.10.84) y Capítulo XVII: Alimentos de régimen o dietéticos. Artículo 1381 bis (Resolución Conjunta SPReI N° 76/2009 y SAGPyA N° 391/2009).

Colles, S.M., Maxson, J.M., Carlson, S.G. & Chisolm, G.M. (2001). Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles of oxysterols. *Trends in Cardiovascular Medicine* 11: 131-138.

Cort, W.M. (1974). Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 51: 321-325.

Crettaz, J. (2006). La chía, una semilla con historia y futuro. La Nación, 20 de Junio de 2006. Disponible en: http://www.lanacion.com.ar/nota.asp?nota_id=815349.

Dorbarganes, C. & Máquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 6: 157-163.

Dyerberg, J. & Bang, H.O. (1978). Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *The Lancet* 314 : 433-435.

Economou, K.D., Oreopoulou, V. & Thomopoulos, C.D. (1991). Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 109-113.

Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* 110: 76-82.

Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation products. *American Journal of Clinical Nutrition* 56: 7796-7865.

FAO (1994). Fats and Oils in Human Nutrition. Report of a Joint Expert Consultation FAO/OMS. Food and Nutrition Paper N° 57.

Fenemma, O.R. (1993). Química de los Alimentos. 2° Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

Ferereidoon, S. (2009). Omega-3 en alimentos. Un análisis sobre la incorporación de ácidos grasos Omega-3 en los alimentos y su significado para la salud. *Aceites & Grasas* 76: 476-479.

Frankel, E.N., Huang, S.W., Aeschbach, R. & Prior, E. (1996). Antioxidant activity of Rosemary Extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 131-135

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

Galli, C. & Marangoni, F. (2006). N-3 fatty acids in the Mediterranean diet. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75: 129-133.

Gambacorta, G., Faccia, M., Pati, S., Lamacchia, C., Baiano, A. & La Notte, E. (2006). Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage. *Journal of Food Lipids* 14: 202-215.

Gamel, T.H. & Kiritsakis, A. (1999). Effect of methanol extracts of rosemary and olive oil vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil. *Grasas y Aceites* 50: 345-350.

Gerster, M.A. (1998). Conversion of ALA to EPA and DHA. *Journal of Vitamin Nutrition Research* 68: 159-173.

Gimenez, M. (2012). Chía, una alternativa productiva en auge. En: www.intainforma.inta.gov.ar.

Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D. & Fregapane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 month storage at room temperature. *Food Chemistry* 100: 36-42.

Gómez-Rico, A., Fregapane, G. & Salvador, M.D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International* 41: 433-440.

Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58: 966-968.

Hansen, T.K., Bindsley, C.J. & Skov Poulsen, P.S. (1997). Codfish allergy in adults: IgE crossreactivity among fish species. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 78: 187-194.

Hawrysh, Z.J., Erin, M.K. Lin, Y.C. & Hardin, R.T. (2006). Propyl gallate and Ascorbyl Palmitate affect stability of canola oil in accelerated storage. *Journal of Food Science* 57: 1234-1238.

Horn, A.F., Nielsen, N.S. & Jacobsen, Ch. (2009). Additions of caffeic acid, ascorbyl palmitate or γ -tocopherol to fish oil-enriched energy bars affect lipid oxidation differently. *Food Chemistry* 112: 412-420.

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

Iqbal, S. & Bhangar, M.I. (2007). Stabilization of sunflower oil by galic extract during accelerated storage. *Food Chemistry* 100: 246-254.

Irwandi, J., Che Man, Y.B., Kitts, D.D., Bakar, J. & Jinap, S. (2000). Synergies between plant antioxidant blends in preventing peroxidation reactions in model and food oil systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 945-950.

Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M. & Tomás, M.C. (2008). Physical properties on chia (*Salvia hispánica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products* 28(3): 286-293.

Ixtaina, V.Y., Martinez, M. Spotorno, V., Mateo, C.M., Maestri, D.M., Diehl, B.W.K., Nolasco, S.M. & Tomás, M.C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 166-174.

Ixtaina, V. Y., Nolasco, S.M. & Tomás, S.M. (2012). Oxidative Stability of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil: Effect of Antioxidants and Storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89: 1077-1090.

Khan, M.A. & Shahidi, F. (2001). Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry* 75: 431-437.

Lanzón, A., Guinda, A., Albi, T., & De la Osa, C. (1995). Método rápido para la determinación de escualeno en aceites vegetales. *Grasas y Aceites* 46: 276-278.

Lee, K. H., Jung, M. Y. & Kim, S. Y. (1997). Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74: 1053-1057.

Let, M.B., Jacobsen, C. & Meyer, A.S. (2007). Ascorbyl palmitate, γ -Tocopherol and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2369-2375.

Madsen, C. (1997). Prevalence of food allergy intolerance in Europe. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4:163-167.

Maestri, D.M., Labuckas, D.O., Meriles, J.M., Lamarque, A.L., Zygadlo, J.A. & Guzman, C.A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 494-498.

Maestri, D.M., Nepote, V., Lamarque, A.L., Zygadlo, J.A. (2006). Natural products as antioxidants. En: *Phytochemistry: Advances in research* (Imperato, F., Ed.), Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India. pp: 105-135.

Maestri, D.M. (2010). Non-traditional oily crops from arid and semiarid regions. En: *Advances in Fats and Oils Research* (Tomás, M.). Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India. pp: 99-133.

Marinova, E.M. & Yanishlieva, N.V. (1990). Inhibited oxidation of lipids III: On the activity of Ascorbyl Palmitate during the autoxidation of two types of lipid systems in the presence of α -Tocopherol. *European Journal of Lipid Science and Technology* 94: 448-452.

Martinez, J.L. & Vance, S.W. (2008). Supercritical extraction plants: Equipment, process and costs. En: *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds* (Martinez, J.L., Ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, USA, 25-49.

Martinez M.L. (2010) Tesis Doctoral: Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia* L.): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa.

Martínez, M. L., Marín M.A., Salgado Faller, C.M., Revol, J., Penci, M.C. & Ribotta P.D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. *Food Science and Technology* 47: 78-82.

Martínez, M. L., Penci, M.C., Ixtaina, V., Ribotta P.D. & Maestri, D. (2013)^a. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *Food Science and Technology* 51: 44-50.

Martínez, M. L., Penci, M.C., Marin, M.A., Ribotta P.D. & Maestri, D. (2013)^b. Screw press extraction of almond (*Prunus dulcis*(miller) D.A. Webb): Oil recovery and oxidative stability. *Journal of Food Engineering* 119:40-45.

Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P. & Mazza, S. (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31: 12–26.

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

Méndez, C.R., Masson, L.S. & Jiménez, P.P. (1990). Estabilización de aceite de pescado por medio de antioxidantes naturales. *Aceites y Grasas* 80: 492-500.

Minguez-Mosquera, M.I., Rejano, L., Gandul, B., Sánchez, A. & Garrido, J. (1991). Color pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 332-336.

Nguyen, N.T.T., Pokorny, J. & Korczak, J. (1999). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in rapeseed and sunflower oils. *Journal of Food Science* 17: 121-126.

Okogeri, O. & Tasioula-Margari, M. (2002). Changes occurring in phenolic compounds and α -tocopherol of virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1077-1080.

Olmedo, R., Nepote, V., Mestrallet, M.G. & Grosso, N.R. (2008). Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried-salted peanuts. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 1935-1944.

Olmedo, R., Asensio, C., Nepote, V., Mestrallet, M.G. & Grosso, N.R. (2009). Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal Science of Food Agriculture* 89: 2128-2136.

Omar, K.A., Shan,L.,Wang, Y.L. & Wang, X. (2010). Stabilizing flaxseed oil with individual antioxidants and their mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112: 1003- 1011.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2003). Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. Antecedentes 2-16. Características y Tendencias Regionales y Mundiales del Consumo de Alimentos 3-24.

Padley, F.B. (1986). Mayor vegetable fats. En: *The Lipid Handbook* (Gunstone, F.D., Harwood J.L. & Padley, F.B). Chapman and Hall. Londres. pp: 55-113.

Palma, F., Donde, M. & Lloyd, W.R. (1947). Fixed oils of Mexico. Oil of chía – *Salvia hispanica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 24: 27-28.

Papaseit, T.J. (1986). The color of extra virgin olive oil. A characteristic of quality. *Grasas y Aceites* 37: 204-206.

Peet, M. & Stokes, C. (2005). Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Psychiatric Disorders. *Drugs* 65: 1051-1059.

Peiretti P.G. & Gai F.(2009). Fatty acid and nutritive quality of chía (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology* 148 : 267-275.

Pocklington,W.D. & Dieffenbacher,A. (1988). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography: results of a collaborative study and the standardised method. *Pure and Applied Chemistry* 6: 877-892.

Reyes-Caudillo, E., Tecante, A. & Valdivia-López, M.A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chía (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry* 107: 656-663.

Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent. M.C. & Bailey, D.T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from Rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73: 507-514.

Saravia Olmos, B. (2012). Especies, legumbres y semillas con acento salteño. El Tribuno CAMPO. *Cultivos alternativos*. Diciembre de 2012.

Shahidi, F. & Zhong, Y. (2005). Antioxidants: regulatory status. En: *Bailey's industrial oil and fat product* (Shahidi, F.). New York: John Wiley & Sons, Inc. pp: 491-512.

Sinesio, F., Moneta, E. & Esti, M. (2005). The dynamic sensory evaluation of bitterness and pungency in virgin olive oil. *Food Quality and Preference* 16: 557-564.

- Suzuki, T., Suzuki, Y., Endo, Y. & Kaneda, T. (1984). Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61: 785-788.
- Svensson, B.G, Nilsson, A.R.N., Hansson, M., Rappe, C., Akesson, B. & Staffan Skerfving, M.D. (1991). Exposure to dioxins and dibenzofurans through the consumption of fish. *The New England Journal of Medicine* 324 : 8-12.
- Taga, M.S., Miller, E.E. & Pratt, D.E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61: 928-931.
- Terpinc, P., Bezjak, M. & Abramovi, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry* 115: 740-744.
- Torres, M.M. & Maestri, D.M. (2006). The effects of genotype and extraction methods on chemical composition of virgin olive oils from Translasierra Valley (Córdoba, Argentina). *Food Chemistry* 96: 507-511.
- Valenzuela, A, Sanhueza, J. & Garrido, A. (1999). Ácidos Grasos Poliinsaturados de Cadena Larga n-3: cuándo y por qué es necesaria la suplementación con estos ácidos grasos. *Grasas y Aceites* 35: 294-299.
- Vázquez-Roncero, A., Janer Del Valle, C. & Janer Del Valle, M.L. (1973). Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 24: 350-357.
- Vetter, J. (2000). Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38: 11-36.
- Vinha, A.F., Ferreres, F., Branca, M.S., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M. & Andrade, P.B. (2005). Phenolic profiles of portuguese olive fruits (*Olea europea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry* 89: 561-568.
- Visentin, A., Cismondi, M., & Maestri, D. (2011). Supercritical CO₂ fractionation of rosemary ethanolic oleoresins as a method to improve carnosic acid recovery. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 142-145.
- Wada, S. & Fang, X. (1994). The synergism antioxidant effect of Rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *Journal of Food Process Preservation* 16: 263-274.
- Wagner, K.H. & Elmadfa, L. (2000). Effect of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102: 624-629.

Warleta, F., Ruiz-Mora, J., Campos-Segura, M., Serrano, M.J. & Gaforio, J.J. (2006). El escualeno, componente minoritario del aceite de oliva y su relación con el cáncer. I Congreso de Cultura del Olivo. España. 765-782.

Warner, K., & Frankel, E. N. (1987). Effect of β -carotene on light stability of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64: 213-218.

Welch, A.A., Shakya-Shrestha, S., Lentjes, M.A.H., Wareham, N.J. & Khaw, K.T. (2010). Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians and vegans and the precursor-product ratio of alpha-linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *American Journal of Clinical Nutrition* 92: 1040-1051.

Wong, D.W.S. (1995). Lípidos. En: Química de los alimentos: Mecanismos y teoría. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1-52.

Woods V.B. & Fearon, A.M. (2009). Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science* 126: 1-20.

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

Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wu, T. & Wang, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry* 118: 656-662.

Ziogas, V., Tanou, G., Molassiotis, A., Diamantidis, G. & Vasilakakis, M. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry* 120: 1097-1103.