



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y
MONOTERPENOS COMO AGENTES
CONSERVANTES DE LAS PROPIEDADES
QUÍMICAS Y SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS**

Lic. Patricia Raquel Quiroga

Tesis

**Para optar al Grado Académico de
Doctora en Ciencias Agropecuarias**

Córdoba, 2013

EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y MONOTERPENOS COMO AGENTES CONSERVANTES DE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS

Patricia Raquel Quiroga

Comisión Asesora de Tesis

Directora: Dra. Valeria Nepote _____

Co-Director: Dr. Julio A. Zygadlo _____

Asesor: Dr. Nelson Rubén Grosso _____

Tribunal Examinador de Tesis

Dr. Nelson Rubén Grosso _____

Dr. Enrique Iván Lucini _____

Dra. María del Carmen Prámparo _____

Presentación formal académica

11 de Octubre de 2013

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que contribuyeron para la realización de este trabajo. Muchísimas gracias a todos por el apoyo, la paciencia, la confianza y la fuerza que me dieron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mis dos directores Rubén y Vale por haber confiado en mí y haberme dado la posibilidad de formar parte de su grupo de trabajo. A Rubén por su gran paciencia y su aliento y estímulo en todo momento. A Vale por ayudarme a encontrarle la vuelta a las cosas, por su paciencia y comprensión a lo largo de estos años.

A mi co-director Julio por brindarme su conocimiento, guiándome.

A todos mis compañeros del laboratorio, por ayudarme con mis dudas, por sus sabios consejos

A las chicas del laboratorio que más que compañeras son mis amigas. Por escucharme en todo momento, aunque no siempre fueron cosas del trabajo. A Clau por las incontables charlas en el regreso a casa, por ver las cosas de otra manera. Mari, por tus ideas y optimismo, porque siempre le ves el lado bueno a las cosas. Ceci porque le buscas la razón más simple a las cosas y me ayudas a verlas con más tranquilidad y Paula, “la nueva”, que recién llegada ya sos una de las chicas del lab.

Al Enri por los consejos y toda la ayuda en el laboratorio. Por tus ocurrencias y miles de anécdotas, por ser un adulto adolescente con el que se puede hablar pavadas y también cosas serias.

A la Guille por las charlas, consejos y la buena onda de siempre.

A Rubencito, por su contribución en la parte experimental de este trabajo y por acompañarme y aconsejarme siempre.

A Liliana y Marta, por su apoyo en la realización de mi tesis.

A todo los que formaron parte del panel de jueces en las sesiones de evaluación sensorial, por su dedicación desinteresada.

A las chicas del Beto, porque siempre que lo necesité me ayudaron desinteresadamente.

A mis amigos de la facu, Guille, Andre, Mari, Lalo, Ine y Noe, que siempre están cerca cuando se los necesita, y cuando no también, para ayudarme en los buenos y malos momentos. Porque me aceptaron así como soy. Y por agrandar el grupo, gracias a Rami y Agus, Emma y Guille.

A las chicas del cole, Nati, Ali y Vale (aunque estés colada), por estar siempre presentes aunque no nos veamos muy seguido. Por su gran amistad. Las quiero

A mi familia, a mi mama y papa porque si no fuera por ellos no estaría acá, por acompañarme siempre y dejarme ser como soy. A mis hermanos, Laura, Silvina, Francisco, Belén y Claudia. Y a los integrantes que se fueron agregando con el tiempo, a Marcos, Mili y Santi, a Gonzalo, Franchuli y Anita, a Christian y Benja y a Lanita.

A Lucas, compañero y sobretodo amigo, que me acompaña desde el primer día de esta etapa, que siempre ha creído en mí y me ha apoyado dándome cariño, confianza, en todos los momentos para seguir adelante, sin pedir nada a cambio. Por elegirme. Por ser mi compañero. Por comprender lo que hago. Por hacerme ver que los problemas no son tan grandes. Porque ser el mejor.

A los Belbruno (Claudia, Oscar, Hernán, Nati y Agustín), que me aceptaron como una nueva integrante de su familia.

A todos los que en este tiempo me enseñaron a crecer no solo profesional sin también personalmente.

Muchas gracias

Dedicatoria

A todos los que me acompañaron en este camino

Resumen

Por su composición química rica en lípidos, las oleaginosas y sus productos derivados son susceptibles de deterioro oxidativo. El agregado de antioxidantes constituye una alternativa para prolongar la vida útil de estos productos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto protector de aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios puros aplicados sobre alimentos con alto contenido graso, para prevenir el deterioro oxidativo de los lípidos. Se trabajó con aceites esenciales (AE) de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Lippia turbinata* Griseb. (poleo), cuatro diferentes oréganos: Cordobés (Cor), Compacto (Com), Mendocino (M) y Criollo (Cri) y monoterpenos puros: carvacrol (Car), sabineno hidrato (S) y timol (T). Se determinó: la composición química de los AE, la actividad antioxidante (AA) (actividad secuestrante de radical DPPH, actividad anti-lipasa, prueba en Rancimat y prueba de oxidación a 60 °C de aceite de canola, midiendo: índice de peróxidos (IP), dienos conjugados (DC) e índice de *p*-anisidina (*Ip*-A). Además se realizaron estudios de almacenaje de semillas de girasol tostadas con los AE, monoterpenos puros y BHT, efectuando estudios químicos (IP, DC, *Ip*-A y volátiles por CG-EM) y sensoriales (análisis descriptivo y de aceptabilidad). Los AE de orégano y poleo presentaron actividad sobre DPPH, actividad anti-lipasa y por el método de Rancimat. Al evaluar los cambios químicos y sensoriales durante el almacenaje de semillas de girasol tostadas con estos AE, ambos mostraron un efecto protector frente al deterioro oxidativo de los lípidos y la calidad sensorial de las semillas. El AE de orégano mostró mayor AA. Los consumidores tuvieron una aceptabilidad positiva sobre estos productos. Debido a la mayor AA del AE de orégano, se evaluó la AA de los AE de los cuatro diferentes oréganos. Estos AE mostraron tener actividad sobre DPPH y en aceite de canola. Los AE con mayor AA fueron Com y Cor. Los compuestos mayoritarios en estos AE fueron los monoterpenos S y T. Por esta razón, se evaluó la AA de los mismos, y de Car por ser un compuesto característico en los oréganos. Car y T presentaron actividad sobre DPPH. Al evaluar su actividad sobre aceite de canola Car, T y S presentaron AA siendo mayor la actividad de S y T, y similares al BHT. Estos monoterpenos también mostraron un efecto sinérgico con BHT sobre aceite de canola. Al evaluar los cambios químicos y sensoriales durante el almacenaje de semillas de girasol tostadas adicionadas con estos monoterpenos, Car, T y S presentaron un efecto protector frente al deterioro oxidativo de los lípidos y la calidad sensorial de las semillas, siendo este efecto superior para el Car. Estos AEs y sus componentes mayoritarios pueden ser potenciales conservantes de alimentos de alto contenido lipídico.

Palabras Clave: Aceites esenciales, monoterpenos, lípidos, oxidación, antioxidantes.

Abstract

Because of their chemical composition rich in lipids, oilseeds and derived products are susceptible to oxidative deterioration. The addition of antioxidants is an alternative to prolong the shelf-life of oilseed products. The aim of this work was study the protective effect of essential oils and their major compounds applied to high-fat foods to prevent oxidative deterioration of lipids. Essential oils of *Origanum vulgare* L. (oregano), *Lippia turbinata* (Griseb.) (poleo), different species of oregano: Cordobés (Cor), Compacto (Com), Mendocino (M) y Criollo (Cri) and pure monoterpenes: carvacrol (Car), thymol (T) and *trans*-sabinene hydrate (S) were studied. The following determinations were performed on the essential oils and monoterpenes: chemical composition of essential oils (EO), the antioxidant activity (radical scavenging activity on DPPH, anti-lipase activity, Rancimat test and accelerated oxidation test on canola oil, determining peroxide (IP), conjugated dienes (DC) and *p*-anisidine index (*Ip*-A) during storage of samples). In addition, storage studies were performed on roasted sunflower seeds with EO, monoterpenes and synthetic antioxidant BHT. Chemical analysis (IP, DC, *Ip*-A and volatiles by GC-MS) and sensory analysis (acceptability and descriptive) were conducted on the roasted sunflower samples from storage. The oregano and poleo essential oils showed activity on DPPH, anti-lipase activity and by the Rancimat method. Both essential oils showed a protective effect against oxidative and sensory deterioration of sunflower products, and oregano EO showed higher activity than poleo EO. Consumers had positive acceptability of these products. Due to the higher activity of oregano, AA was evaluated on essential oils of the four different species of oregano (Cor, Com, M and Cri). These EO had activity against DPPH and in canola oil. The most active EO were Com and Cor. The major compounds in these EO were the monoterpenes S and T. In consequence, those monoterpenes and the Car were used to evaluate their antioxidant activity. Car and T showed activity on DPPH. Car, T and S showed antioxidant activity on canola oil, being higher the activity of S and T, both similar to BHT. These monoterpenes also showed synergistic effect with BHT on canola oil. The chemical and sensory changes during storage of roasted sunflower seeds with these monoterpenes indicated Car, T and S had protective effect against oxidative and sensory deterioration of the products. Carvacrol had the highest protective effect. These EO and its major components are potential food preservatives, and can be used to replace synthetic antioxidants such as BHT.

Key words: *Essentials oils, monoterpenes, lipids, oxidation, antioxidants.*

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
Lista de tablas	XIII
Lista de figuras	XVII
Lista de abreviaturas	XXIII
CAPITULO I INTRODUCCIÓN GENERAL	1
ALIMENTOS	1
LÍPIDOS	2
Oxidación de lípidos	3
Mecanismo de auto-oxidación del aceite vegetal	3
Compuestos de oxidación primarios	5
Compuestos de oxidación secundarios	5
Volátiles	5
No volátiles	6
Compuestos de alto peso molecular	6
Ácidos grasos	6
ANTIOXIDANTES	6
Antioxidantes primarios	7
Antioxidantes secundarios	8
Antioxidantes sintéticos	9
Antioxidantes naturales	10
Aceites esenciales	10
Hidrocarburos no terpenoides	11
Terpenos o terpenoides	12
SINERGISMO	12
ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS	13
Los sentidos: instrumentos sensoriales	14
La vista	15
El oído	15
El olfato	15

El gusto	15
El tacto	16
Atributos sensoriales	16
El color	16
El olor	16
El aroma	16
El gusto o “sabor básico”	17
El sabor	17
La textura	17
Los jueces evaluadores	18
Juez experto	18
Juez entrenado	19
Juez semientrenado o “de laboratorio”	19
Juez consumidor	19
Las pruebas sensoriales	20
Pruebas afectivas	20
Pruebas discriminativas	20
Pruebas descriptivas	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
BIBLIOGRAFÍA CITADA	23
CAPITULO II COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTI-LIPASA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE OREGANO Y POLEO	27
INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Material vegetal.....	30
Diseño experimental	30
Extracción de aceites esenciales	30
Composición de los aceites esenciales	30

Contenido de fenoles totales	31
Actividad antioxidante	31
Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH	31
Índice de actividad antioxidante por RANCIMAT	32
Actividad anti-lipasa	32
Análisis estadísticos	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
Composición de los aceites esenciales	34
Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante	38
Actividad anti-lipasa	41
Análisis de correlación	42
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA CITADA	44
CAPITULO III EFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE POLEO Y OREGANO SOBRE SEMILLAS DE GIRASOL TOSTADAS	48
INTRODUCCIÓN	48
MATERIALES Y MÉTODOS	50
Materiales	50
Preparación de las muestras y tratamientos	50
Almacenaje y muestreo	50
Análisis químicos	51
Índice de peróxidos (IP)	51
Índice de dienos conjugados (DC)	51
Índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip</i> -A)	52
Métodos sensoriales	53
Aceptabilidad de consumidores	53
Análisis descriptivo	53
Análisis estadísticos	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
Aceptabilidad de los productos de girasol tostado	60

Análisis químicos y sensoriales de los productos de girasol tostado durante el almacenaje	62
Análisis químicos	62
Análisis descriptivo	64
Análisis de regresión lineal	70
Análisis de componentes principales y correlación	75
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA CITADA	79
CAPITULO IV ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE CUATRO ESPECIES DE ORÉGANO ARGENTINAS EN RELACIÓN CON SU COMPOSICIÓN QUÍMICA	82
INTRODUCCIÓN	82
MATERIALES Y MÉTODOS	84
Material vegetal	84
Extracción de aceites esenciales	84
Composición de los aceites esenciales	84
Actividad antioxidante	84
Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH	84
Actividad antioxidante de los AEs de orégano en Aceite de canola	85
Análisis estadístico	85
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
Composición de los aceites esenciales	87
Actividad antioxidante	91
Actividad secuestrante de radicales libres de DPPH	91
Actividad antioxidante de los AEs de orégano en Aceite de canola	92
Análisis de regresión lineal	94
Análisis de componentes principales	96
Análisis de conglomerados	98
CONCLUSIONES	100

BIBLIOGRAFÍA CITADA	101
CAPITULO V ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS MONOTERPENOS CARVACROL, SABINENO HIDRATO Y TIMOL Y SU EFECTO SINÉRGICO CON BHT	104
INTRODUCCIÓN	104
MATERIALES Y MÉTODOS	107
Actividad antioxidante de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol	107
Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH	107
Actividad antioxidante de los monoterpenos en Aceite de canola	107
Efecto sinérgico de los monoterpenos junto al antioxidante sintético BHT en Aceite de canola	108
Análisis estadísticos	108
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
Actividad antioxidante de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol	109
Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH	109
Actividad antioxidante de los monoterpenos en Aceite de canola	110
Análisis de regresión lineal	113
Análisis de componentes principales	116
Efecto sinérgico de los monoterpenos junto al antioxidante sintético BHT en Aceite de canola	118
CONCLUSIONES	122
BIBLIOGRAFÍA CITADA	123
CAPITULO VI EFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS MONOTERPENOS CARVACROL, SABINENO HIDRATO Y TIMOL SOBRE SEMILLAS DE GIRASOL TOSTADAS	125
INTRODUCCIÓN	125

MATERIALES Y MÉTODOS	127
Materiales	127
Preparación de las muestras	127
Almacenaje y muestreo	127
Análisis químicos	128
Análisis de volátiles de oxidación (AV)	128
Métodos sensoriales	129
Análisis descriptivo	129
Análisis estadísticos	133
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	134
Análisis químicos y sensoriales de las semillas de girasol tostadas durante el almacenaje	134
Análisis químicos	134
Análisis sensoriales	139
Análisis de regresión lineal	144
Análisis de correlación y componentes principales	148
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA CITADA	152
CAPITULO VII CONCLUSIONES GENERALES	154

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en los aceites esenciales de orégano y poleo según su orden de elución en el análisis de CG-EM.	34
Tabla 2.2 Fenoles totales, concentración inhibitoria del 50% de DPPH (DPPH-IC50), índice de actividad antioxidante por Rancimat (IAA), y concentraciones inhibitorias del 50% de las lipasas (<i>Candida antarctica</i> : L-C-IC50 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> : L-P-IC50) medidos en los aceites esenciales de Orégano y poleo.....	39
Tabla 2.3. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables químicas: con-tenido de fenoles totales, concentración inhibitoria 50% de DPPH (DPPH-IC50), y concentración inhibitoria 50% de la actividad lipasa (L-C-IC50: actividad sobre la lipasa de <i>C. antarctica</i> , y L-P-IC50: actividad sobre la lipasa de <i>P. fluorescence</i>) de los aceites esenciales de Orégano y poleo.	42
Tabla 3.1 Definición de atributos utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas	55
Tabla 3.2. Intensidades de referencias estándares y muestra “ <i>warm up</i> ” utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas.	56
Tabla 3.3 Promedios y desviaciones estándar (n = 100) de la aceptabilidad de consumidores (color, olor, sabor, textura y aceptabilidad general) en una escala hedónica de 9 puntos en los productos de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)	61

Tabla 3.4 Promedios y desviación estándar (n=3) de los atributos sensoriales en las mues-tras de girasol tostado en el día cero de almacenaje: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).	65
Tabla 3.5 Análisis de regresión lineal simple para las variables químicas: índice de peróxidos (IP), dienos conjugados (DC) é índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip</i> -A) durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)	71
Tabla 3.6 Análisis de regresión lineal simple para los atributos sensoriales (sabor a aceite esencial, sabor a girasol tostado, sabor a cartón y sabor a oxidado) durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)	74
Tabla 3.7 Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables químicas y atributos sensoriales del estudio del almacenaje de los productos de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).....	77
Tabla 4.1. Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en el aceite esencial de las cuatro especies de orégano según su orden de elución en el análisis de CG-EM.	88
Tabla 4.2. Promedios y desvíos estándar del porcentaje de inhibición de los cuatro aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) a diferentes concentraciones (5,77; 2,77; 1,39 y 0,69 µg/mL) y la concentración inhibitoria de 50% (IC50).....	91

Tabla 4.3. Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables dependientes: índice de peróxidos (IP) é índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip</i> -A) en función del tiempo de almacenaje (días) en las muestras de aceite de canola: control, con el agregado de los aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) y con BHT.	95
Tabla 5.1 Concentración inhibitoria 50% de DPPH (DPPH-IC50) medidos en BHT y en los monoterpenos: carvacrol, timol y sabineno hidrato.....	109
Tabla 5.2 Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables dependientes: índice de peróxidos (IP), índice de dienos conjugados (DC) é índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip</i> -A) en aceite de canola control y con el agregado de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol, y con el antioxidante sintético BHT durante su almacenaje.....	115
Tabla 6.1 Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de girasol tostado.	130
Tabla 6.2. Intensidades de referencias estándares y de muestra “ <i>warm up</i> ” utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de girasol tostado.....	131
Tabla 6.3 Promedios y desviaciones estándares (n=3) de los atributos sensoriales en el día cero de almacenaje de las muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).....	140
Tabla 6.4 Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables químicas: índice de peróxidos (IP), índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip</i> -A) y contenidos de hexanal y de los antioxidantes (por análisis de los volátiles (AV) por CG-EM) durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).	145

Tabla 6.5 Ecuaciones de regresión y R ² de las variables sensoriales: sabores a oxidado, cartón, girasol tostado y monoterpeno durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).....	147
Tabla 6.6. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables químicas y atributos sensoriales del estudio del almacenaje de semillas de girasol tostadas	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismo de autooxidación de aceites vegetales	4
Figura. 3.1 Box para evaluación sensorial. Sala sensorial ICTA – UNC.....	58
Figura 3.2 Índice de peróxidos (IP) de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)	62
Figura 3.3 Índice de dienos conjugados (DC) de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)	63
Figura 3.4 Índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip</i> -A) de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).	63
Figura 3.5 Intensidad de sabor a oxidado de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje.....	67
Figura 3.6 Intensidad de sabor a cartón de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje.....	68
Figura 3.7 Intensidad de sabor a girasol tostado de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje	69

Figura 3.8 Intensidad de sabor a aceite esencial de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje	69
Figura 3.9 Biplot de las primera y segunda componentes principales del análisis de componentes principales. Variables: indicadores químicos (índice de peróxidos: IP, dienos conjugados: DC, índice de <i>p</i> -anisidina, <i>I_p-A</i>) y los atributos sensoriales (sabores a oxidado, cartón, girasol tostado y a aceite esencial), del estudio de almacenaje de muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).	76
Figura 4.1. Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg) de las diferentes muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola con los aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) y con BHT, almacenados a 60 °C.	93
Figura 4.2. Índice de <i>p</i> -anisidina de las diferentes muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola con los aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) y con BHT, almacenados a 60 °C.	93
Figura 4.3. Biplot de la primera y segunda componentes del análisis de componentes principales. Variables: concentración inhibitoria 50% en DPPH (IC ₅₀) e indicadores químicos (IP e <i>I_p-A</i>) del estudio de estabilidad de las muestras de aceite de canola, para las especies de orégano estudiadas (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino).	97

Figura 4.4. Dendograma proveniente del análisis de conglomerados de las diferentes especies de orégano (Com-pacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) considerando las variables: contenido de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales, concentración inhibitoria del 50% sobre el radical DPPH (IC50), y los indicadores químicos de oxidación (IP e <i>Ip-A</i>) del estudio de estabilidad de aceite de canola.	99
Figura 5.1 Índice de peróxidos (IP) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C) y aceite de canola con el agregado de los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidrato (S) y timol (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) almacenados a 60 °C.....	111
Figura 5.2 Índice de dienos conjugados (DC) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C) y aceite de canola con el agregado de los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidrato (S) y timol (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) almacenados a 60 °C.....	112
Figura 5.3 Índice de <i>p</i> -anisidina (<i>Ip-A</i>) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C) y aceite de canola con el agregado de los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidrato (S) y timol (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) almacenados a 60 °C.....	113
Figura 5.4 Biplot de las primera y segunda componentes principales del análisis de componentes principales. Variables: indicadores químicos (índice de peróxidos: IP, dienos conjugados: DC, índice de <i>p</i> -anisidina, <i>Ip-A</i>) del estudio de oxidación de aceite de canola: control, con el agregado de BHT y los monoterpenos: Carvacrol, Sabineno hidrato y Timol, y el IC50 de DPPH (DPPH-IC50) de los compuestos antioxidantes.....	117

- Figura 5.5** Índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola adicionado con el monoterpeno Carvacrol y el antioxidante sintético BHT en las siguientes proporciones monoterpeno:BHT: control, 0:100 (BHT), 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 observado en los días 0 y 14 del estudio de oxidación acelerada a 60 °C. Letras diferentes sobre las barras en un mismo día indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$). 119
- Figura 5.6** Índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola adicionado con el monoterpeno Sabineno hidrato y el antioxidante sintético BHT en las siguientes proporciones monoterpeno:BHT: control, 0:100 (BHT), 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 observado en los días 0 y 14 del estudio de oxidación acelerada a 60 °C. Letras diferentes sobre las barras en un mismo día indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$). 120
- Figura 5.7** Índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola adicionado con el monoterpeno Timol y el antioxidante sintético BHT en las siguientes proporciones monoterpeno:BHT: control, 0:100 (BHT), 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 observado en los días 0 y 14 del estudio de oxidación acelerada a 60°C. Letras diferentes sobre las barras en un mismo día indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$). 120
- Figura 6.1** Índice de peróxidos (IP) de las muestras de semillas de girasol tostadas: control (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT), y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje a temperatura ambiente 135

Figura 6.2 Índice de <i>p</i> -anisidina (<i>I_p-A</i>) de las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT), y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje a temperatura ambiente.	136
Figura 6.3 Áreas de pico (cuentas electrónicas x 1000000, obtenidas por CG-EM de los volátiles de las muestras) para el hexanal en las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT), y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje a temperatura ambiente.	137
Figura 6.4 Áreas de pico (cuentas electrónicas x 1000000, obtenidas por CG-EM de los volátiles de las muestras) para los compuestos antioxidantes agregados (BHT, carvacrol, sabineno hidrato y timol) en las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje.....	138
Figura 6.5 Atributo sensorial sabor oxidado de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).....	141
Figura 6.6 Atributo sensorial sabor cartón de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).....	142
Figura 6.7. Atributo sensorial sabor a girasol tostado de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).....	143

Figura 6.8 Atributo sensorial sabor a monoterpeno de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T). 143

Figura 6.9 Biplot de la primera y segunda componentes del análisis de componentes principales. Variables: indicadores químicos: índice de peróxidos (IP), índice de *p*-anisidina (*Ip*-A), hexanal y monoterpenos (por análisis de volátiles, AV), y los atributos sensoriales: sabor a oxidado, a cartón, a girasol tostado y a monoterpenos, del estudio de almacenaje de girasol tostado control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T). 149

LISTA DE ABREVIATURAS

% (p/p)	Porcentaje peso en peso
μg	Microgramo
A _(anti-lipasa)	Absorbancia de la muestra con el aceite esencial (método anti-lipasa)
A _(DPPH)	Absorbancia de la solución de DPPH con el aceite esencial (método DPPH)
A _(dienos)	Absorbancia de la solución de aceite y n-hexano (método de dienos conjugados)
A ₀ (anti-lipasa)	Absorbancia del control sin aceite esencial (método anti-lipasa)
A ₀ (DPPH)	Absorbancia de la solución de DPPH (método DPPH)
AA	Actividad antioxidante
A _b (anti-lipasa)	Absorbancia de la muestra sin lipasa (blanco) (método anti-lipasa)
A _b (DPPH)	Absorbancia de metanol con el aceite esencial (método DPPH)
A _b (<i>p</i> -anisidina)	Absorbancia de la solución de aceite y n-hexano (método de <i>p</i> -anisidina)
AC	Análisis de Clusters
ACP	Análisis de componentes principales
AE	Aceite esencial
AE-Com	Aceite esencial de orégano “Compacto”
AE-Cor	Aceite esencial de orégano “Cordobés”
AE-Cri	Aceite esencial de orégano “Criollo”
AE-M	Aceite esencial de orégano “Mendocino”

AEs	Aceites esenciales
A _s	Absorbancia de la solución de aceite y n-hexano después de la reacción con la solución de <i>p</i> -anisidina
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
C	Muestra control del test de oxidación acelerada de monoterpenos en aceite de canola
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
CAA	Código Alimentario Argentino
Car	Carvacrol
CG-EM	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa
Co	co-inyección con estándar
CP	Componentes principales
DC	Índice de dienos conjugados
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPH-IC50	Concentración inhibitoria 50% de DPPH
DVB/CAR/PDMS	divinilbenceno/Carboxen/polidimetilsiloxano
EO	Essential oil
ES-MEFS	Micro-extracción en fase solida de espacio de cabeza
GT-BHT	Semillas de girasol tostadas con el agregado de antioxidante sintético BHT

- GT-C Semillas de girasol tostadas sin el agregado de aditivos
- GT-Car Semillas de girasol tostadas con el agregado de monoterpeno carvacrol
- GT-O Semillas de girasol tostadas con el agregado del aceite esencial de orégano
- GT-P Semillas de girasol tostadas con el agregado del aceite esencial de poleo
- GT-Sab Semillas de girasol tostadas con el agregado de monoterpeno sabineno hidrato
- GT-T Semillas de girasol tostadas con el agregado de monoterpeno timol
- ha Hectáreas
- IAA índice de actividad antioxidante por el método Rancimat
- IC50 Concentración inhibitoria 50%
- INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- IP Índice de peróxidos
- Ip*-A Índice de *p*-anisidina
- IR Índice de retención
- L-C Lipasa de *Candida antarctica*
- L-C-IC50 Concentración inhibitoria 50% de lipasa *Candida antarctica*
- L-P Lipasa de *Pseudomonas fluorescens*
- LP Lipasa pancreática
- L-P-IC50 Concentración inhibitoria 50% de lipasa *Pseudomonas fluorescens*
- m Masa en gramos del aceite

m/z	masa/carga
MEFS	Micro Extracción en Fase Sólida
mL	mililitro
MOI	Métodos de identificación en cromatografía gaseosa
MS	Detector de masa
N	Normalidad de la solución de Na ₂ S ₂ O ₃
ND	No se detecta
nm	nanómetro
R•	Radical libre
ROO•	Radical peróxido
ROOH	Hidroperóxido
RR	Radicales libres combinados
S	Volumen de Na ₂ S ₂ O ₃ utilizado en la titulación
Sab	Sabineno hidrato
SRL	Secuestrantes de radicales libres
T	Timol
TBHQ	Terbutilhidroquinona
X	Variable independiente (días)
Y	Variable dependiente: indicadores químicos (IP, DC e <i>I_p-A</i>) y atributos sensoriales (sabores a aceite esencial, a monoterpenos, a girasol tostado, a cartón y a oxidado)
β_0	Coeficiente de la ecuación $Y = \beta_0 + \beta_1 X$
β_1	Coeficiente de la ecuación $Y = \beta_0 + \beta_1 X$

Introducción general

Alimentos

Los alimentos son materiales que en sus formas naturales, procesados o cocidos, son consumidos por los humanos como alimento y para el disfrute.

Los términos "alimento" y "disfrute" introducen dos importantes propiedades de los alimentos: el valor nutricional y el valor hedónico. El primero es relativamente fácil de cuantificar, ya que todos los nutrientes importantes son conocidos y sus efectos se definen. Además, sólo hay un número limitado de nutrientes. Definir el valor hedónico de un alimento es más difícil, porque tal definición debe tener en cuenta todas las propiedades de un alimento, que interactúan con los sentidos, como atractivo visual, olor, sabor y textura. Un requisito adicional obvio de un alimento es que debe estar libre de materiales tóxicos.

La naturaleza altamente compleja de los alimentos da lugar a una multitud de reacciones deseadas y no deseadas que son controladas por una variedad de parámetros. Partiendo del análisis de la composición (detección, aislamiento y caracterización estructural de componentes de los alimentos), pueden ser seguidas las reacciones de un solo componente o de una mezcla simple. Posteriormente, se puede realizar una investigación de un alimento en el que domina una reacción individual. Inherentemente, tal estudio comienza con un compuesto dado y no está por tanto restringida a un alimento o grupo de alimentos. (Belitz *et al.*, 2009).

Gran parte del trabajo en el área de calidad de los alimentos consiste en la relación entre la evaluación sensorial, mediciones instrumentales y de preferencias de los consumidores, el papel de los factores ambientales externos tiene menos importancia (Pierson *et al.*, 1995).

La calidad de los alimentos es un concepto importante ya que las personas eligen los alimentos en gran medida por su calidad. La calidad es difícil de definir con precisión, pero

se refiere al grado de excelencia de un alimento, e incluye todas las características de un alimento que sean significativas y que hacen aceptable al alimento.

La calidad nutricional, de un alimento, se puede medir a través de análisis químicos, en cambio, la aceptación de los alimentos no es fácil de medir ya que es muy subjetiva. Los consumidores hacen una valoración subjetiva utilizando uno o más de los cinco sentidos cada vez que eligen o ingieren un alimento (Vaclavik, 2008).

La calidad de un producto alimenticio implica el mantenimiento o mejora de los principales atributos del producto, incluyendo color, sabor, textura, seguridad, salubridad, vida útil y conveniencia. Para mantener su calidad, es importante controlar el deterioro microbio-lógico, la degradación enzimática y química. Estos componentes de la calidad dependerán de la composición de los alimentos, los métodos de elaboración, embalaje y almacenamiento (Parker, 2003).

La calidad de un alimento debe ser controlada regularmente durante su producción para asegurarse que cumple con los controles de calidad. También se debe controlar su almacenamiento. (Vaclavik, 2008)

Lípidos

No existe una definición exacta de lípidos. Varios autores concuerdan en que son compuestos no solubles en agua pero si en solventes apolares (Akoh y Min, 2002).

La mayoría de las grasas y aceites consisten de triacilglicéridos, que difieren en su composición de ácidos grasos en cierta medida. Otros componentes que constituyen menos del 3% de las grasas y los aceites son la fracción insaponificable y un número de los acil-lípidos, restos de ácidos grasos libres, mono y diacilglicéridos. El término "grasa" se designa en general a un sólido a temperatura ambiente y "aceite" a un líquido. Las denominaciones son bastante imprecisas, ya que el grado de firmeza es dependiente del clima y, por otra parte, muchas grasas no son ni sólido ni líquido, pero son semi-sólidos (Akoh y Min, 2002).

Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos en alimentos es iniciada por mecanismos de radicales libres que generan una serie de reacciones autocatalíticas de radicales libres. Estas reacciones de autooxidación conducen a la descomposición de los lípidos y a la formación de una amplia gama de productos de oxidación (Kubow, 1992). La oxidación de los lípidos puede alterar el sabor y la calidad nutricional de los alimentos y producir compuestos tóxicos, los cuales pueden hacer al alimento menos aceptable o inaceptable para los consumidores (Min y Kim, 1999). Los productos de oxidación incluyen compuestos de bajo peso molecular volátiles como también compuestos indeseables que provocan mal sabor y olor característico (Labuza y Dugan, 1971; Lee y Min, 1988; Jung *et al.*, 1998). La naturaleza y proporción de estos productos pueden variar ampliamente entre los alimentos y dependen de la composición del alimento, así como también de numerosos factores ambientales (Kubow, 1992). La importancia toxicológica de la oxidación de lípidos en los alimentos es complicada por las interacciones de los productos secundarios de oxidación de lípidos con otros componentes de los alimentos. Estas interacciones bien podrían formar complejos que limitan la biodisponibilidad de los productos de degradación de lípidos o puede conducir a la formación de productos tóxicos derivados de fuentes no lipídicas (Sherwin, 1978; Kubow, 1992).

Mecanismo de auto-oxidación del aceite vegetal

La estabilidad a la oxidación de aceites vegetales basados en triglicéridos está limitada principalmente por el grado de dobles enlaces insaturados presentes en los ácidos grasos. Enlaces carbono-carbono insaturados funcionan como sitios activos para muchas reacciones, incluyendo la oxidación (Adhvaryu *et al.*, 2000). El mecanismo para la auto-oxidación de aceites vegetales está bien estudiado y una representación clásica del mecanismo de autooxidación de aceite se muestra en la Figura 1.1 (Frankel, 1984; Belitz *et al.*, 2009). La oxidación del aceite vegetal se inicia por la formación de radicales libres ($R\bullet$). Los radicales libres pueden formarse fácilmente a partir de la eliminación de un átomo de hidrógeno del grupo metileno próximo a un doble enlace. Los radicales libres reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido ($ROO\bullet$). El radical peróxido puede atacar otra molécula de lípido para eliminar un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido ($ROOH$) y otro radical libre, propagando el proceso de oxidación (Fox y Stachowiak, 2007).

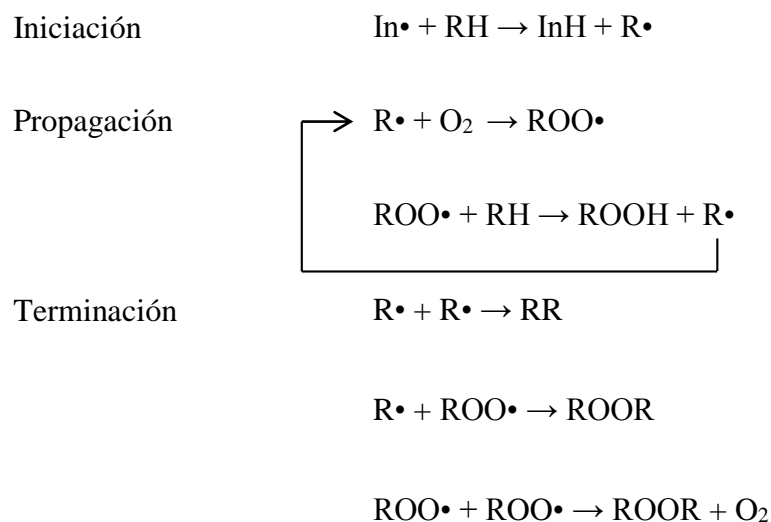


Figura 1.1. Mecanismo de autooxidación de aceites vegetales

La eliminación de un átomo de hidrógeno por el radical peróxido para generar un hidroperóxido es la etapa limitante de velocidad de autooxidación de aceite vegetal (Porter *et al.*, 1995). Cuanto mayor es el número de dobles enlaces mayor será la cantidad de sitios susceptibles a la eliminación de un átomo de hidrógeno y el proceso de auto-oxidación puede ocurrir a una velocidad más rápida. Los aceites vegetales que contienen un alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados se auto-oxidarán a altas temperaturas, mientras que los aceites que contienen ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácido linoleico y linolénico, se autooxidan fácilmente a temperatura ambiente (Fox y Stachowiak, 2007).

En la mayoría de los alimentos la iniciación se atribuye con frecuencia a la reacción de los ácidos grasos con especies de oxígeno activo. La fase de propagación de la oxidación se ve favorecida por la interacción lípidos-lípidos, por lo que el radical peróxido abstrae un hidrógeno de una molécula adyacente, resultando en un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico libre. Las interacciones de este tipo continúan 10 (Borg y Schaich, 1988) a 100 veces (Gutteridge y Halliwell, 1990) antes de que dos radicales libres (RR) se combinen para terminar el proceso. Los radicales producidos continuaran con la eliminación de hidrógenos de los ácidos grasos insaturados (Erickson, 2002).

Los hidroperóxidos continúan acumulándose en el aceite a través de la propagación y pasos de ramificación. En algún momento los hidroperóxidos ya no se mantienen estables y se descomponen en compuestos de oxidación secundarios volátiles y no volátiles (Fox y Stachowiak, 2007).

Compuestos de oxidación primarios

Los hidroperóxidos de triacilglicéridos son los compuestos de oxidación primarios de los aceites vegetales a base de triacilglicerol (Fox y Stachowiak, 2007).

Compuestos de oxidación secundarios

Volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles se producen durante las etapas secundarias de oxidación del lípido. Se forman después de la descomposición de los hidroperóxidos de triglicéridos (Fox y Stachowiak, 2007).

Los compuestos volátiles son los principales responsables de los sabores y olores desagradables de los aceites y grasas oxidados. La industria alimentaria está particularmente interesada en el sabor y la calidad de los aceites vegetales y, como tal, las técnicas para el análisis de compuestos orgánicos volátiles están bien establecidas junto con el conocimiento de los principales componentes volátiles de los aceites vegetales oxidados (Frankel *et al.*, 1981; Snyder *et al.*, 1985; Neff *et al.*, 1994).

Durante la oxidación de los aceites vegetales, la mayor cantidad de volátiles se produce en la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados. El ácido linolénico (C18:3) se descompone principalmente en 2,4-heptadienal y propanal. El ácido linoleico (C18:2) produce principalmente pentano, pentanal, hexanal y 2-heptenal. Los ácidos grasos monoinsaturados se descomponen a una velocidad mucho más lenta y los niveles de liberación de compuestos volátiles es mínima en comparación con sus homólogos poliinsaturados. Los aceites ricos en ácido oleico (C18:1) producen principalmente nonanal, octanal y algo de heptanal (Snyder *et al.*, 1985; Neff *et al.*, 1994).

No volátiles

La descomposición de hidroperóxidos conduce a compuestos volátiles de cadena corta junto con los correspondientes polímeros, compuestos no volátiles.

Se ha identificado en aceite oxidado una amplia gama de compuestos no volátiles orgánicos, pero podrían ser separados en tres categorías principales.

- Triacilglicéridos con cadenas de ácidos grasos intactas, uno de ellos contiene un átomo de oxígeno, hidroxilo, epoxi o grupos peróxido.
- Triacilglicéridos con cadenas de ácidos grasos intactas, dos de ellos que contiene un átomo de oxígeno, hidroxilo, epoxi o grupos peróxido.
- Triacilglicéridos con dos cadenas de ácidos grasos intactas y una cadena que termina en un reducido grupo de oxígeno o hidroxilo (Fox y Stachowiak, 2007).

Compuestos de alto peso molecular

Los compuestos de alto peso molecular son el producto de las reacciones de ciclación y polimerización que se producen a temperaturas y presiones elevadas y representan las etapas finales del proceso de oxidación (Fox y Stachowiak, 2007).

Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres aparecen durante la degradación de los aceites y grasas. Los ácidos grasos se liberan principalmente de los triglicéridos mediante la eliminación del hidrógeno β y una hidrólisis posterior. Tanto la eliminación del hidrógeno β como la hidrólisis no son reacciones de oxidación, pero es probable que la oxidación se produzca conjuntamente como otro proceso de degradación (Fox y Stachowiak, 2007).

Antioxidantes

En los alimentos que contienen lípidos, los antioxidantes retrasan el inicio de la oxidación o disminuyen la velocidad a la cual ocurre. Estas sustancias aparecen como componentes naturales de los alimentos, pero también pueden ser añadidos intencionalmente a los productos o formados durante el procesamiento. Su papel no consiste en mejorar la calidad

de los alimentos, pero sí mantener la calidad y prolongar la vida útil. Los antioxidantes utilizados en el procesamiento de alimentos deben ser baratos, no tóxicos, eficaces a bajas concentraciones, estables y capaces de mantenerse durante el procesamiento (carry-through effect); el color, el sabor y el olor deben ser mínimos (Reische *et al.*, 2002).

(Halliwell y Gutteridge, 1995) definen a los antioxidantes como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato”, pero más tarde se los definió como “cualquier sustancia que retrasa, evita o elimina el daño oxidativo a una molécula blanco” (Halliwell, 2007). En el mismo año, (Khlebnikov *et al.*, 2007) definieron los antioxidantes como “cualquier sustancia que absorbe los ROO• directamente o actúa indirectamente para regular al máximo las defensas antioxidantes o inhibir la producción de ROO•” (Carocho y Ferreira, 2013).

Los antioxidantes se pueden clasificar en forma general por su mecanismo de acción como antioxidantes primarios y antioxidantes secundarios. Algunos antioxidantes muestran más de un mecanismo de acción por lo cual se denominan antioxidantes de múltiple función. Estas sustancias son capaces de actuar en todas las etapas de las reacciones de radicales libres (Reische *et al.*, 2002).

Antioxidantes primarios

Los antioxidantes primarios reaccionan con los radicales peróxido y lipídicos y los transforman en productos más estables no radicalarios. Los antioxidantes primarios donan un átomo de hidrogeno al radical lipídico y produce un derivado lipídico y un radical antioxidante que es más estable y menos disponible para promover la autooxidación. Como dadores de hidrogeno, los antioxidantes primarios tienen mayor afinidad por los radicales peróxido que por los lipídicos (Porter, 1980). El radical antioxidante producido por la donación de un hidrogeno tiene una reactividad muy baja con los lípidos. Esta baja reactividad reduce la velocidad de propagación ya que la reacción entre el antioxidante radical con oxígeno o lípidos es muy lenta. El radical antioxidante se estabiliza por deslocalización del electrón desapareado en el anillo fenólico por híbridos de resonancia estables (Reische *et al.*, 2002).

Los antioxidantes primarios son mono o polihidroxi-fenoles con varias sustituciones en el anillo. La sustitución con un grupo dador de electrones en las posiciones *orto* o *para* al grupo hidroxilo fenólico incrementa la actividad antioxidante del compuesto por un efecto inductivo. Estos antioxidantes fenólicos estéricamente impedidos disminuyen la reactividad del grupo hidroxilo mediante el aumento de su densidad electrónica. Una sustitución con grupos butílico o etílico en posición *para* al grupo hidroxilo mejora la actividad antioxidante. Sin embargo, debido al impedimento estérico, la presencia de una cadena larga o de un grupo alquílico ramificado en la posición *para* puede disminuir la efectividad antioxidante (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996). Las sustituciones de grupos alquilo ramificados en las posiciones *orto* mejoran la capacidad del antioxidante fenólico para formar estructuras estables de resonancia y reducir aún más la capacidad del radical antioxidante de participar en reacciones de propagación (Reische *et al.*, 2002).

Los antioxidantes primarios más comunes utilizados son compuestos sintéticos. Ejemplos importantes de antioxidantes fenólicos primarios incluyen a butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP), y terbutilhidroquinona (TBHQ) (Reische *et al.*, 2002).

Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios, preventivos o de tipo 2, actúan a través de numerosos mecanismos posibles. Este tipo de antioxidantes disminuye la velocidad de oxidación de diferentes maneras, pero ellos no transforman los radicales libres en productos más estables. Los antioxidantes secundarios pueden quelar metales pro-oxidantes y desactivarlos, reponer el hidrogeno donado al antioxidante primario, descomponer los hidroperóxidos en especies no radicalarias, desactivar el oxígeno singlete, absorber la radiación ultravioleta o actuar como eliminadores de oxígeno. Estos antioxidantes son llamados también como antioxidantes sinérgicos porque promueven la actividad antioxidante de los antioxidantes primarios. Ejemplos de los antioxidantes secundarios son: ácido cítrico, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, lecitina y ácido tartárico (Reische *et al.*, 2002).

Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos se han desarrollado para ser incorporados en alimentos y además se utilizan como sistema de medición de la actividad antioxidante estándar para comparar con antioxidantes naturales. Estos compuestos puros se añaden a los alimentos para que puedan resistir los diversos tratamientos y condiciones, así como también para prolongar la vida útil. Hoy en día, casi todos los alimentos procesados poseen antioxidantes sintéticos incorporados. A pesar de que se asegura que estos compuestos sintéticos no representan riesgo para la salud, algunos estudios indican lo contrario (Carocho y Ferreira, 2013). BHT (butil-hidroxitolueno) y BHA (butil-hidroxianisol) son los antioxidantes químicos más ampliamente utilizados (Branen, 1975).

Varios estudios han observado que BHA y BHT pueden actuar como anticancerígenos en varios modelos de animales (Wattenberg, 1972; Wattenberg *et al.*, 1980; Wattenberg, 1986; Williams, 1986; Hocman, 1988; Williams y Iatropoulos, 1996). Por otra parte, también se ha reportado efectos carcinógenos de BHA y BHT en animales de experimentación (Ito *et al.*, 1983; Williams, 1986; Hocman, 1988). Iverson (1995) indica que la producción de tumores por BHA es el resultado de un mecanismo secundario dependiente de la saturación de una vía metabólica por niveles excesivos de BHA. La actividad biológica de compuestos fenólicos sintéticos y de origen natural antioxidantes puede llegar a ser mucho mayor y significativamente más complejo de lo que se creía. También sugiere que estos compuestos pueden tener importantes propiedades deseables, además de su papel como inhibidores de la oxidación de lípidos.

Un estudio realizado por Botterweck *et al.* (2000) indica que no hay asociación entre la ingestión de BHA y BHT y el riesgo de incidencia de cáncer estomacal, corroborando la hipótesis de que la ingesta de niveles bajos de BHA y BHT no son carcinogénicos en los seres humanos. La mayoría de los resultados son de experimentos realizados en animales, difíciles de comparar con los resultados en humanos y deben ser interpretados con cautela. Las cantidades de BHA o BHT utilizados en la dieta de los animales son mucho más altas que los niveles permitidos en la dieta humana.

A pesar de la superior eficacia, bajo costo y alta estabilidad de los antioxidantes sintéticos en los alimentos existe la preocupación sobre si son o no perjudiciales para la salud

humana, por lo que hay una mayor tendencia en el uso de productos naturales como ingredientes funcionales en alimentos y bebidas, como resultado del interés del consumidor por aditivos cuyo origen sean fuentes naturales y evitar los compuestos sintéticos considerados como potenciales agentes dañinos (Reische *et al.*, 2002).

Antioxidantes naturales

Las investigaciones y desarrollos recientes de compuestos fenólicos antioxidantes de origen natural parecen estar impulsados no solo por su capacidad para disminuir la oxidación lipídica, sino por el potencial de modular las enfermedades humanas que pueden estar relacionadas con los efectos deletéreos de especies endógenas de oxígeno activas. Una vía potencial para controlar las enfermedades cardiovasculares, cataratas, supresión inmune, cáncer y otras enfermedades degenerativas asociadas normalmente con el envejecimiento se relaciona con la reducción selectiva o la eliminación de especies de oxígeno activas (Ames *et al.*, 1993; Halliwell, 1994).

Aunque existen numerosos compuestos fenólicos naturales con propiedades de antioxidantes primarios, relativamente pocos han sido utilizados como antioxidantes lipídicos. La mayoría de estos antioxidantes naturales son compuestos como el tocoferol (vitamina E) y polifenólicos tales como ácido caféico, ácido clorogénico, varios taninos, flavonoides tales como quercetina y extractos de especias, té, y de otras fuentes vegetales (Iverson, 1995).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son bien aceptados y reconocidos en el ámbito académico, en la industria química y más recientemente, en la vida cotidiana (Teranishi y Kint, 1993). En general, los aceites esenciales son conocidos como sustancias aromáticas producidas por especies de plantas específicas. Se llaman esenciales porque se pensaba que cada aceite representa la esencia de la planta original. Los aceites esenciales también se han utilizado como medicamentos desde la antigüedad. Desde este punto de vista, los aceites esenciales se consideran los productos más ampliamente utilizados en muchas áreas naturales debido a que muchos medicamentos populares tradicionales se basan principalmente en materiales vegetales. Los aceites esenciales se componen de muchos tipos o clases de moléculas, incluyendo terpenoides, compuestos fenólicos, aromáticos, cíclicos y acíclicos, cetónicos, y compuestos

que contienen azufre y nitrógeno, dependiendo de la planta y el método de extracción (Foderaro, 1991).

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes en concentraciones muy diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes principales a concentraciones altas (20-70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza. Generalmente, estos componentes principales determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Los componentes incluyen dos grupos de distinto origen biosintético (Croteau *et al.*, 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky *et al.*, 2006). El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro de los componentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008). Estos dos grupos se pueden clasificar en terpenoides e hidrocarburos no terpenoides (Hüsni *et al.*, 2007).

Aunque, a veces en la literatura un aceite esencial se define como un extracto de planta aromática y volátil (Foderaro, 1991). Nakatsu, *et al.* (2000) definen los aceites esenciales como mezclas de compuestos extraíbles por destilación con vapor, disolventes no polares (tales como, pentano, hexano), dióxido de carbono supercrítico, y fluorocarbonos. Los aceites esenciales se pueden extraer de muchas partes de la planta: flores, hojas, frutos, cáscaras de frutas, semillas, ramas, tallos y raíces.

En el estudio de los aceites esenciales, la separación y el aislamiento de los componentes químicos individuales es esencial para comprender el origen de la actividad biológica de estos aceites. En estudios de seguimiento es fundamental para una comprensión completa de los compuestos activos y sus relaciones estructura-actividad la determinación estructural completa, en particular las asignaciones estereoquímicas relativas y absolutas (Nakatsu *et al.*, 2000).

Hidrocarburos no terpenoides

Los hidrocarburos no terpenoides que se encuentran en los aceites esenciales tales como alcoholes de cadena corta y los aldehídos se forman por conversión metabólica o degradación de fosfolípidos y ácidos grasos (Croteau y Karp, 1991).

Terpenos o terpenoides

Los terpenos, también llamados isoprenoides, son una de las mayores clases de productos químicos naturales formados por reordenamiento de cabeza a cola de dos o más moléculas de isopreno. Ellos son una parte importante de los aceites esenciales. Las moléculas formadas a partir de dos moléculas de isopreno se llaman monoterpenos ($C_{10}H_{16}$). Los compuestos C_5H_8 son hemiterpenos. Los sesquiterpenos contienen tres unidades de isopreno, por lo que tienen la fórmula $C_{15}H_{24}$. Los compuestos $C_{20}H_{32}$ formados a partir de cuatro unidades de isopreno son diterpenos. Los terpenos más pesados como los diterpenos generalmente no se encuentran en los aceites esenciales. El isopreno por sí mismo se considera hemiterpeno, pero los derivados que contienen oxígeno, tales como el ácido isovalérico y prenol son también hemiterpenoides (Croteau, 1986; Hüsni *et al.*, 2007; Evans, 2009).

Sinergismo

Muchos informes sobre las actividades de los aceites esenciales, a menudo mencionan conceptos tales como sinergismo, antagonismo, aditividad, pero rara vez se apoya experimentalmente, siendo en su mayor parte puramente especulativa (Janssen *et al.*, 1988). Sin embargo, cuando un estudio sobre la actividad antimicrobiana de un aceite esencial comprende el análisis de la actividad de sus componentes individuales, los efectos antagonista y/o sinérgico asumen un mayor significado, más completo y útil para explicar la actividad biológica observada (Knobloch *et al.*, 1989; Cuong *et al.*, 1994; Griffin *et al.*, 1998; Helander *et al.*, 1998)

Los sistemas biológicos de alimentos por lo general contienen sistemas antioxidantes de múltiples componentes. Los numerosos antioxidantes existentes tienen diferentes funciones potenciales, incluyendo la inhibición de pro-oxidantes de diferentes tipos (por ejemplo, metales, especies reactivas de oxígeno, enzimas); inactivación de radicales libres y pro-oxidantes en fases acuosas, interfaciales y en fases lipídicas; y la inactivación de compuestos en diferentes etapas de oxidación, por ejemplo, especies iniciadoras ($\bullet OH$), especies de propagación (peróxidos), productos de descomposición de la oxidación de lípidos (aldehídos). Además, los sistemas antioxidantes de múltiples componentes son beneficiosos porque se producen interacciones directas entre los antioxidantes (Decker, 2002).

Las combinaciones de quelantes y secuestrantes de radicales libres (SRL) a menudo da como resultado una inhibición sinérgica de la oxidación lipídica (Nawar, 2008). La interacción sinérgica probablemente se produce por un efecto “ahorrativo” proporcionado por el quelante. Dado que el quelante reducirá las tasas de oxidación mediante la inhibición de la oxidación catalizada por un metal, generando menos radicales libres en el sistema. Esto significa que la inactivación eventual de los secuestrantes de radicales libres será más lenta a través de reacciones de terminación o autooxidación, por lo tanto su concentración será mayor en cualquier momento dado. En consecuencia la combinación de quelantes y secuestrantes de radicales libres disminuye la generación de radicales libres y aumenta el potencial de captación de radicales libres (Decker, 2002).

El efecto sinérgico en la actividad antioxidante también se puede observar por la combinación de dos o más secuestrantes de radicales libres diferentes. Esto ocurre cuando un secuestrante de radicales libres reacciona más rápidamente con los radicales libres que el otro, como resultado de las diferencias en las energías de disociación de enlace y/o por el impedimento estérico de las interacciones de SRL/ROO• (Nawar, 2008). Por lo tanto un antioxidante se consume más rápido que el otro. Sin embargo, es posible que este secuestrante de radicales libres sea regenerado por transferencia de su radical a un secuestrante diferente (Decker, 2002).

Dado que los sistemas antioxidantes de múltiples componentes pueden inhibir la oxidación en muchas diferentes fases de oxidación, la actividad antioxidante resultante puede ser sinérgica. Esto sugiere que los sistemas antioxidantes más eficaces para los alimentos podrían contener antioxidantes con diferentes mecanismos de acción y/o propiedades físicas. Determinar cuál antioxidante sería más eficaz depende de factores tales como el tipo de catalizador de oxidación, el estado físico de los lípidos (a granel vs emulsionado), y los factores que influyen en la actividad de los antioxidantes mismos (por ejemplo, pH, temperatura, capacidad de interactuar con otros compuestos en los alimentos) (Decker, 2002).

Análisis sensorial de alimentos

El campo de la evaluación sensorial ha crecido rápidamente en la segunda mitad del siglo 20, junto con las industrias de los alimentos procesados y de los productos de consumo. La evaluación sensorial comprende una serie de técnicas para medir de forma precisa la

respuesta del hombre a los alimentos minimizando el efecto sugestivo de la marca u otra influencia sobre la percepción del consumidor. Como tal, intenta aislar las propiedades sensoriales de los alimentos mismos y provee información útil sobre las características sensoriales de un producto a desarrolladores de productos, científicos de alimentos y gerentes (Lawless y Heymann, 2010).

La evaluación sensorial comprende un conjunto de métodos de análisis con pautas y técnicas establecidas para la presentación de productos, métodos estadísticos, y las directrices para la interpretación de los resultados. Existen tres tipos principales de pruebas sensoriales que se centran en la existencia de diferencias globales entre los productos (pruebas de discriminación), especificación de atributos (análisis descriptivo), y los gustos y disgustos de los consumidores (pruebas afectivas o hedónicas). La aplicación correcta de la técnica sensorial implica correcta concordancia entre el método y objetivo de las pruebas. Las pruebas analíticas tales como las pruebas discriminativas y las descriptivas requieren un buen control experimental y la maximización de la precisión de la prueba. Los análisis afectivos por otro lado requieren de la elección de los consumidores representativos de los productos y de las condiciones del análisis que permitan generalizar cómo los consumidores experimentan el producto en el mundo real (Lawless y Heymann, 2010).

Los análisis sensoriales proporcionan información útil acerca de cómo el hombre percibe los cambios en el producto debido a cambio en los ingredientes, elaboración, envasado o de caducidad (Lawless y Heymann, 2010).

La evaluación sensorial se define como un método científico utilizado para sugerir, medir, analizar e interpretar las respuestas percibidas a través de los sentidos de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído de un producto dado (Stone y Sidel, 2004).

Los sentidos: instrumentos sensoriales

Este tipo de análisis tiene la ventaja de que la persona que realiza las observaciones lleva consigo sus instrumentos de medición, sus cinco sentidos. Los sentidos son los medios con los que el ser humano percibe y detecta el mundo que lo rodea. El ser humano tiene cinco sentidos: la vista, el oído, el olfato, el gusto y el tacto. (Anzaldúa-Morales, 1994).

La vista

El atributo sensorial más importante asociado con el sentido de la vista es el color. También existen otros atributos sensoriales relacionados con la vista como por ejemplo la apariencia, la forma, la superficie, el tamaño y el brillo (Anzaldúa-Morales, 1994).

El oído

Es el sentido que permite captar los sonidos. Permite percibir la textura de los alimentos por medio de vibraciones que pueden ser transmitidas por los huesos, en el caso de los sonidos producidos por la masticación de los alimentos, los que se pueden tomar en cuenta para la evaluación de la textura (Anzaldúa-Morales, 1994).

El olfato

Este sentido es muy importante ya que nos permite percibir el olor de las cosas. Hay que saber diferenciar entre olor y aroma. El olor es la percepción de las sustancias volátiles por medio de la nariz. El aroma es la detección de las sustancias volátiles, después de haberse puesto el alimento en la boca, que difunden a través de la membrana mucosa del paladar (Anzaldúa-Morales, 1994).

El gusto

Este sentido reside en la lengua la cual contiene a las papilas gustativas. Las papilas de la punta de la lengua perciben el gusto dulce de los alimentos. Los gustos salado y ácido son detectados en las papilas ubicadas a los costados. Las papilas que se encuentran en la parte posterior de la lengua, perciben el gusto amargo de las sustancias. La percepción de los gustos se debe a un reconocimiento químico de la estructura de las sustancias (Anzaldúa-Morales, 1994).

El tacto

Este sentido se localiza en las terminales nerviosas que se encuentran por debajo de la piel de todo el cuerpo. Son importantes para las evaluaciones sensoriales de los alimentos, las percepciones táctiles por medio de los dedos, la palma de la mano, la lengua, las encías, la parte interior de las mejillas, el paladar y la garganta (Anzaldúa-Morales, 1994).

Atributos sensoriales

Los atributos sensoriales de los alimentos son los que se detectan por medio de los sentidos. Hay algunos que se perciben por medio de un solo sentido, mientras que otros son detectados por dos o más sentidos (Anzaldúa-Morales, 1994; Lawless y Heymann, 2010):

El color

Esta propiedad es la percepción de la luz de una cierta longitud de onda reflejada por un objeto. El color es la única propiedad sensorial que puede ser medida en forma instrumental más efectivamente que en forma visual.

El olor

Es la percepción, por medio de la nariz, de sustancias volátiles liberadas por los objetos. En el caso de los alimentos (y en la mayoría de las sustancias olorosas) esta propiedad es diferente para cada uno y no ha sido posible establecer clasificaciones ni taxonomías completamente adecuadas para los olores. Además, dentro del olor característico, o *sui generis*, de un alimento existen diferentes componentes: su intensidad o potencia; su persistencia (cuando aún después de haberse retirado la sustancia olorosa, la persona continua percibiendo el olor debido a que las fosas nasales y la mucosa que recubre el interior de éstas quedan saturadas de la sustancia volátil) y el acostumbramiento que las personas experimentan con los olores después de un cierto tiempo.

El aroma

Esta propiedad consiste en la percepción de las sustancias olorosas o aromáticas de un alimento después de haberse puesto éste en la boca. Dichas sustancias se disuelven en la

mucosa del paladar y la faringe, y llegan a los centros sensores del olfato. El aroma es el principal componente del sabor de los alimentos.

El gusto o “sabor básico”

Puede ser ácido (agrio), dulce, salado o amargo; o bien, puede haber una combinación de dos o más de estos cuatro. Esta propiedad es detectada por medio de la lengua.

El sabor

Este atributo de los alimentos es muy complejo, ya que combina tres propiedades: el olor, el aroma y el gusto. Es por esto, que su medición y apreciación son más complejas que las de cada propiedad por separado. El sabor es lo que diferencia a un alimento de otro y no el gusto, ya que si se prueba un alimento con los ojos cerrados y la nariz tapada, solamente se podrá juzgar si es dulce, salado, amargo o ácido. En cambio, en cuanto se perciba el aroma, se podrá decir, de qué alimento se trata. Los jueces para las pruebas de sabor no deben haberse puesto perfume antes de participar de las degustaciones, ya que el olor a perfume puede interferir con el sabor de las muestras. El sabor se ve influido por el color y la textura. Es dependiente del tiempo, ya que hay sabores que se perciben más rápidamente que otros. Otra característica del sabor relacionada con el tiempo es la persistencia, la cual es conocida también como deajo o regusto.

La textura

Es la propiedad sensorial de los alimentos que es detectada por los sentidos del tacto, la vista y el oído y que se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación. No es posible definir una textura deseable, ya que una característica de textura puede ser deseable en un alimento mientras que en otro haría que éste fuese completamente repugnante. Por lo tanto, es necesario definir para cada tipo de alimento cuales son los atributos que merecen mayor atención. Las propiedades o características de textura han sido clasificadas en tres categorías: atributos mecánicos, geométricos y de composición. Los primeros dan una indicación del comportamiento mecánico del alimento ante la deformación. Los atributos geométricos son aquellos relacionados con la forma o la orientación de las partículas del alimento, como por

ejemplo, la fibrosidad, que nos indica la presencia de fibras y su resistencia; o la granulosis, la cristalinidad, la porosidad, la esponjosidad, etc. Los atributos de composición son los que aparentemente indican la presencia de algún componente en el alimento, como serían la humedad, la grasosidad, la harinosidad, etc.

Los jueces evaluadores

Las pruebas sensoriales son utilizadas en diversos tipos de industrias, tales como la industria alimentaria, la perfumera, la farmacéutica, la industria de pinturas, etc. (Anzaldúa-Morales, 1994).

La evaluación sensorial de los alimentos, constituye hoy en día un pilar fundamental para el diseño y desarrollo de nuevos productos alimenticios. Sin duda, el poder medir en el laboratorio el grado de satisfacción que brindará un determinado producto, nos permite anticipar la aceptabilidad que éste tendrá.

La evaluación sensorial trabaja en base a paneles de degustadores denominados jueces, que hacen uso de sus sentidos como herramienta de trabajo. Los jueces se seleccionan y entrenan con el fin de lograr la máxima veracidad, sensibilidad y reproducibilidad en los juicios que emitan, ya que de ello depende en gran medida el éxito y confiabilidad de los resultados (Anzaldúa-Morales, 1994).

La selección y el entrenamiento de las personas que tomarán parte en pruebas de evaluación sensorial son factores de los que dependen en gran parte el éxito y la validez de las pruebas. Es necesario determinar, en primer lugar, el número de jueces que deben participar, y después hay que seleccionarlos, explicarles en forma adecuada como han de realizar sus evaluaciones, y darles el entrenamiento adecuado. Existen cuatro tipos de jueces que pueden ser empleados en diferentes tipos de análisis sensoriales (Anzaldúa-Morales, 1994; Meilgaard *et al.*, 2010):

Juez Experto

Es una persona que posee gran experiencia en probar un determinado tipo de alimento. Posee una gran habilidad para percibir las diferencias entre muestras y distinguir y

evaluar las características del alimento (Meilgaard *et al.*, 2010). Estos jueces deben mantenerse en forma para realizar su trabajo por lo que deben abstenerse de fumar, consumir alimentos muy condimentados o bebidas demasiado calientes y nunca deben consumir (fuera de las pruebas) el producto con el que suelen trabajar (Anzaldúa-Morales, 1994). Su habilidad, experiencia y criterio son tales que en las pruebas que efectúa es suficiente contar con su respuesta.

Juez Entrenado

Estos jueces poseen habilidad para detectar alguna propiedad sensorial o algún sabor o textura particular en el objeto de estudio. Estos jueces han recibido cierta enseñanza teórica y práctica acerca de la evaluación sensorial y saben qué es exactamente lo que se desea medir en una prueba. Cuando se llevan a cabo pruebas sensoriales con este tipo de jueces, el número requerido es de al menos 7 y como máximo 15. Los jueces entrenados se emplean principalmente en pruebas sensoriales descriptivas, en las cuales se trata de definir las propiedades del objeto de estudio y medirlas de la manera más objetiva determinando su magnitud o intensidad (Meilgaard *et al.*, 2010).

Juez Semientrenado o “de laboratorio”

Se trata de personas que han recibido un entrenamiento teórico similar al de los jueces entrenados, pero que sólo van a diferenciar entre muestras y no van a medir propiedades o utilizar escalas (Anzaldúa-Morales, 1994).

Juez Consumidor

Se trata de personas que no tienen que ver con las pruebas, ni trabajan con alimentos como investigadores o empleados en una fábrica procesadora de alimentos, ni han efectuado evaluaciones periódicas. Por lo general son personas tomadas al azar, ya sea en la calle, en una tienda, escuela, supermercado, etc. Es importante en este caso escoger jueces que sean consumidores habituales del producto a probar, o en el caso de productos nuevos que sean potenciales consumidores (Anzaldúa-Morales, 1994).

Las pruebas sensoriales

El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo con diferentes pruebas sensoriales, según sea la finalidad para la que se efectúa. Existen tres tipos de pruebas sensoriales: las pruebas afectivas, las discriminativas y las descriptivas (Anzaldúa-Morales, 1994; Sancho *et al.*, 1999).

Pruebas Afectivas

En las pruebas afectivas el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza o si lo prefiere antes que a otro. En esta pruebas se presenta mayor variación en los resultados y son las más difíciles de interpretar. Para las pruebas es necesario contar con un mínimo de 30 jueces consumidores. Las pruebas afectivas pueden clasificarse en tres tipos: pruebas de preferencia (preferir una muestra sobre la otra), pruebas del grado de satisfacción (cuánto le gusta o disgusta un alimento) y pruebas de aceptación (incluye además de si gusta o no, otros factores como costos, culturales, etc.).

Pruebas Discriminativas

Se las utiliza cuando se desea establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras y en algunos casos la magnitud o importancia de esa diferencia. En este tipo de prueba se utilizan jueces semientrenados. Las pruebas más comúnmente utilizadas son las pruebas triangulares (tres muestras, dos iguales y se tiene que identificar la diferente), prueba dúo-trío (tres muestras, una referencia y se tiene que encontrar la igual a la referencia) y prueba de ordenamiento (se ordena en base a un atributo para pruebas de más de dos muestras).

Pruebas Descriptivas

En este tipo de prueba se trata de definir las propiedades del alimento y de medirlo de la manera más objetiva posible. En dichas pruebas no importa la preferencia de los jueces y no es importante saber si las diferencias entre las muestras son detectadas, sino cuáles son los atributos sensoriales de un alimento y cuál es la magnitud o intensidad de tales.

Estas pruebas presentan mucho más información que las otras, pero son más difíciles de realizar, el entrenamiento de los jueces es más intenso y la interpretación de los resultados es más laboriosa. Los jueces que participan en esta evaluación son jueces entrenados. Hay muchos tipos de pruebas, pero las más utilizadas son las que se trabaja con una calificación en escala no estructurada donde únicamente se encuentran puntos extremos (mínimo y máximo) y el juez debe expresar su apreciación de la intensidad del atributo de un alimento.

Hipótesis

Los aceites esenciales y sus monoterpenos constituyentes actúan como aditivos alimentarios que disminuyen el deterioro causado por procesos oxidativos, de alimentos con alto contenido de lípidos y mejoran sus características sensoriales, incrementando su aceptabilidad por parte de los consumidores

Objetivo general

Evaluar las propiedades antioxidantes de aceites esenciales y monoterpenos en aplicaciones sobre alimentos con alto contenido de lípidos para mejorar la conservación de sus propiedades nutricionales y sensoriales

Objetivos específicos

- ✓ Determinar la composición química de los aceites esenciales de especies regionales utilizadas en la elaboración de alimentos.
- ✓ Determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios.
- ✓ Determinar la aceptación por parte de consumidores de productos alimenticios frescos adicionados con aceites esenciales como antioxidantes.
- ✓ Determinar los cambios químicos y sensoriales que se producen durante el almacenaje de los productos alimenticios adicionados con aceites esenciales y sus componentes mayoritarios.
- ✓ Determinar el efecto sinérgico de los componentes mayoritarios seleccionados junto a un antioxidante sintético.

Bibliografía citada

- Adhvaryu, A., Erhan, S. Z., Liu, Z. S. y Perez, J. M. 2000. Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetables using pressurized differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Thermochemica Acta*. 364. 87-97
- Akoh, C. A. C. y Min, D. B. 2002. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. (2 Ed). Dekker, USA. 1005 pp. pp.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. y Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90. 7915-7922
- Anzaldúa-Morales, A. 1994. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Ed). Zaragoza, España. Acribia. 220 pp.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46. 446-475
- Belitz, H. D., Grosch, W. y Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. (4 Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 1070 pp. pp.
- Betts, T. J. 2001. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 936. 33-46
- Borg, D. C. y Schaich, K. M. 1988. Iron and hydroxyl radicals in lipid oxidation: Fenton reactions in lipid and nucleic acids co-oxidized with lipid. En: *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology: Proceedings*. (P. A. Cerutti, I. Fridovich, and J. M. McCord, eds Ed). Alan R. Liss, New York, USA, pp. 427-441. pp.
- Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J. y Van Den Brandt, P. A. 2000. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food and Chemical Toxicology*. 38. 599-605
- Bowles, E. J. 2003. *The Chemistry of Aromatherapeutic Oils*. (3 Ed). New South Wales, Australia. Allen & Unwin. 236 pp.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 52. 59-63
- Carocho, M. y Ferreira, I. C. F. R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51. 15-25
- Croteau, R. 1986. *Biochemistry of Monoterpenes and Sesquiterpenes of the Essential Oils*. En: *Herbs, Spices, and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*. (1 Ed). New York, USA. Food Products Press. pp.
- Croteau, R. y Karp, F. 1991. Origin of Natural Odorant. En: *Perfumes. Art, Science and Technology*. (1 Ed). London, UK. Elsevier. pp. 101-126
- Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Ed). American Society of Plant Physiologists. pp.
- Cuong, N. D., Xuyen, T. T., Motl, O., Stransky, K., Presslova, J., Jedlickova, Z. y Sery, V. 1994. Antibacterial properties of Vietnamese Cajuput oil. *Journal of Essential Oil Research*. 6. 63-67

- Decker, E. A. 2002. Antioxidant Mechanisms. En: Food Lipids (Chemistry, Nutrition and Biotechnology). (2 Ed). New York, USA. Dekker, USA. pp.
- Erickson, M. C. 2002. Lipid Oxidation of Muscle Foods. En: Food Lipids (Chemistry, Nutrition and Biotechnology). (2 Ed). New York, USA. Dekker. pp.
- Evans, W. C. 2009. Trease and Evans' Pharmacognosy. (16 Ed). London, UK. Elsevier Health Sciences UK. 616 pp.
- Foderaro, S. 1991. Nueva Enciclopedia Americana Ed). Grolier Internacional. 245 pp.
- Fox, N. J. y Stachowiak, G. W. 2007. Vegetable oil-based lubricants-A review of oxidation. *Tribology International*. 40. 1035-1046
- Frankel, E. N., Neff, W. E. y Selke, E. 1981. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids*. 16. 279-285
- Frankel, E. N. 1984. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in Lipid Research*. 23. 197-221
- Griffin, S. G., Leach, D. N., Markham, J. y Johnstone, R. 1998. Antimicrobial Activity of Essential Oils from Zieria. *Journal of Essential Oil Research*. 10. 165-174
- Gutteridge, J. M. C. y Halliwell, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 15. 129-135
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 344. 721-724
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 18. 125-126
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 35. 1147-1150
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. y Von Wright, A. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46. 3590-3595
- Hocman, G. 1988. Chemoprevention of cancer: Phenolic antioxidants (BHT, BHA). *International Journal of Biochemistry*. 20. 639-651
- Hüsni, K., Başer, C. y Demirci, F. 2007. Chemistry of Essential Oils. En: Flavors and Fragrances. (1 Ed). Springer Berlin Heidelberg. pp. 43-86
- Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M. y Ogiiso, T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*. 70. 343-352
- Iverson, F. 1995. Phenolic antioxidants: Health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Cancer Letters*. 93. 49-54
- Janssen, A. M., Tsai Sioe, W. H. R., Scheffer, J. J. C. y Svendsen, A. B. 1988. Citronellal and citronellol, a case of antimicrobial antagonism? *Flavour and Fragrance Journal*. 3. 137-140
- Jung, M. Y., Yoon, S. H., Lee, H. O. y Min, D. B. 1998. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. *Journal of Food Science*. 63. 408-412
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N. y Quinn, M. T. 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15. 1749-1770

- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. y Weis, N. 1989. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of Essential Oil Research*. 1. 119-128
- Kubow, S. 1992. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*. 12. 63-81
- Labuza, T. P. y Dugan, L. R. 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *C R C Critical Reviews in Food Technology*. 2. 355-405
- Lawless, H. T. y Heymann, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. (2 Ed). New York, USA. Springer. 596 pp.
- Lee, E. C. y Min, D. B. 1988. Quenching Mechanism of β -Carotene on the Chlorophyll Sensitized Photooxidation of Soybean Oil. *Journal of Food Science*. 53. 1894-1895
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T. y Civille, G. V. 2010. *Sensory Evaluation Techniques*. (4 Ed). Boca Raton, Florida, USA. Taylor & Francis. 416 pp.
- Min, D. B. y Kim, H. J. 1999. Chemistry of Lipid Oxidation. En: *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Ed). New York, USA. Kluwer Plenum Publishers. pp. 175-187
- Nakatsu, T., Lupo Jr, A. T., Chinn Jr, J. W., Kang, R. K. L. y Atta ur, R. 2000. Biological activity of essential oils and their constituents. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. Ed). Elsevier. pp. 571-631
- Nawar, W. W. 2008. Lipids. En: *Food science and technology*;169. Ed). Boca Raton, FL [etc.]. CRC. pp. 225-320
- Neff, W. E., Mounts, T. L., Rinsch, W. M., Konishi, H. y El-Agaimy, M. A. 1994. Oxidative stability of purified canola oil triacylglycerols with altered fatty acid compositions as affected by triacylglycerol composition and structure. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 71. 1101-1109
- Parker, R. O. 2003. *Introduction to Food Science*. (1 Ed). Delmar, Columbia, USA. 636 pp. pp.
- Pichersky, E., Noel, J. P. y Dudareva, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311. 808-811
- Pierson, B. J., Reeve, W. G. y Creed, P. G. 1995. 'The quality experience' in the food service industry. *Food Quality and Preference*. 6. 209-213
- Porter, N. A., Caldwell, S. E. y Mills, K. A. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*. 30. 277-290
- Porter, W. L. 1980. Recent trends in food applications of antioxidants. En: *Autoxidation in Food and Biological Systems* Ed). New York, USA. Plenum Press. pp. 143
- Rajalakshmi, D. y Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. En: *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives* Ed). New York. Dekker. pp. 65
- Reische, D. W., Lillard, D. A. y Eitenmiller, R. R. 2002. Antioxidants. En: *Food Lipids (Chemistry, Nutrition and Biotechnology)*. (2 Ed). Dekker, USA. pp.
- Sancho, J., Bota, E. y Castro, J. J. 1999. *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Ed). Barcelona, España. Edición Universita de Barcelona. 319 pp.
- Sherwin, E. R. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 55. 809-814
- Snyder, J. M., Frankel, E. N. y Selke, E. 1985. Capillary gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 62. 1675-1679
- Stone, H. y Sidel, J. L. 2004. *Sensory evaluation practices*. (3 Ed). San Diego. Elsevier Academic. 207 pp.

- Teranishi, R. y Kint, S. 1993. Bioactive Volatile Compounds from Plants. En: Bioactive Volatile Compounds from Plants. Ed). American Chemical Society. pp. 1-5
- Vaclavik, V. 2008. Essentials of Food Science. (3 Ed). Springer, Dallas, Texas, USA. 571 pp. pp.
- Wattenberg, L. W. 1972. Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin. *Journal of the National Cancer Institute*. 48. 1425-1430
- Wattenberg, L. W., Coccia, J. B. y Lam, L. K. T. 1980. Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo[a]pyrene-induced neoplasia. *Cancer Research*. 40.
- Wattenberg, L. W. 1986. Protective effects of 2(3)-tert-Butyl-4-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 24. 1099-1102
- Williams, G. M. 1986. Epigenetic promoting effects of butylated hydroxyanisole. *Food and Chemical Toxicology*. 24. 1163-1166
- Williams, G. M. y Iatropoulos, M. J. 1996. Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Cancer Letters*. 104. 49-53

Composición química, actividad antioxidante y actividad anti-lipasa de los aceites esenciales de orégano y poleo

Introducción

Desde la antigüedad, las hierbas y especias se han añadido a los alimentos para mejorar el sabor y propiedades organolépticas (Neffati *et al.*, 2009). Además, se sabe que los aceites esenciales de especies aromáticas poseen un gran potencial como agentes naturales para la conservación de los alimentos y se ha demostrado en varias ocasiones su eficacia contra una amplia gama de microorganismos (Baratta *et al.*, 1998; Helander *et al.*, 1998). Asimismo, muchos aceites esenciales han mostrado actividad antioxidante (Olmedo *et al.*, 2008; Quiroga *et al.*, 2011, 2013).

El creciente interés en la sustitución de los antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales ha dado lugar a múltiples investigaciones en el campo de los nuevos antioxidantes (Lante *et al.*, 2011). Los aceites esenciales han demostrado ser eficaces en el retraso del proceso de oxidación de lípidos. Por esa razón, los aceites esenciales están ganando más atención debido a su amplia aceptación por los consumidores y que se los considera relativamente seguros. Los aceites esenciales son una fuente rica en polifenoles los cuales son reconocidos como antioxidantes más fuertes que los tocoferoles. Estos últimos están presentes en la mayoría de los aceites vegetales pero son inestables durante el proceso de calentamiento (Nepote *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2010).

El orégano es una planta aromática importante ampliamente utilizada en muchos países para condimentar los alimentos. Los principales países que participan en la producción y exportación de orégano son México, Grecia, Israel, Albania, Marruecos y Turquía (Koksál *et al.*, 2010). Las especies del género *Origanum* son las más comúnmente utilizadas en la producción comercial de orégano. *Origanum* es un género con varias subespecies donde todas ellas se conocen como orégano en la mayoría de los países

(Dambolena *et al.*, 2010). *Origanum vulgare* L. es la hierba aromática más importante cultivada en Argentina, no sólo por la superficie (80%), sino también por la demanda de la población (Di Fabio, 2008; Dambolena *et al.*, 2010). Las principales áreas de cultivo se encuentran en la provincia de Mendoza (250 hectáreas), seguida de las provincias de Córdoba (113 ha) y San Juan (56 ha). Las hojas de orégano y aceite esencial se utilizaron durante siglos por sus propiedades medicinales, en particular, por su efecto positivo sobre la salud humana que se atribuye a la actividad antioxidante del aceite esencial y a las fracciones de fenoles solubles (Peake *et al.*, 1991; Eguchi *et al.*, 1996; Ruberto *et al.*, 2002).

Lippia turbinata GRISEB., cuyo nombre vulgar es poleo, es una planta aromática perteneciente a la familia *Verbenaceae*. Es un arbusto nativo de Sudamérica, que se encuentra comúnmente en el noreste de Argentina, donde es utilizado en la medicina popular y la industria alimentaria por su sabor. El aceite esencial de poleo del noreste argentino tiene marcadores filéticos como lipiona y dihidrolipiona (Ricciardi *et al.*, 2005).

La introducción de un antioxidante en el sistema de lípidos conduce a un cambio en el mecanismo del proceso de oxidación. El efecto del antioxidante depende de la participación de sus moléculas y los radicales formados a partir de este último en las reacciones en cadena. (Yanishlieva *et al.*, 1999) informaron de dos características cinéticas para explicar la acción inhibitoria de los antioxidantes:

1. La posibilidad de bloquear el proceso de la cadena radicalaria debido a la interacción con los radicales peróxido, afectando a la duración del periodo de inducción, y
2. La posibilidad de que los restos de inhibidor participen en otras reacciones, cambiando la velocidad de oxidación durante el periodo de inducción.

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas) son un grupo importante de enzimas que tienen importancia biotecnológica, y tienen numerosas aplicaciones en alimentos, productos lácteos, detergente, y las industrias farmacéutica (Gupta *et al.*, 2004). Las lipasas están ampliamente distribuidas en las especies animales, plantas, bacterias, levadura y hongos (Saxena *et al.*, 1999). Lipasas microbianas se han encontrado en diversos ambientes tales como los residuos industriales, fábricas de procesamiento de aceites vegetales,

lácteos, tierra contaminada con aceite, semillas oleaginosas y alimentos en descomposición (Sztajer *et al.*, 1988). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de los triacilgliceroles aumentando el contenido de ácidos grasos libres, por lo tanto, los inhibidores de lipasa pueden ser considerados para controlar la acidez del aceite y la estabilidad lipídica. La búsqueda de nuevos inhibidores de lipasa derivados de fuentes naturales dan acceso a nuevos aditivos alimentarios potenciales. Los compuestos naturales tales como terpenoides (Jang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009), triterpenos glicosídicos (Morikawa *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2009), flavonoides (Won *et al.*, 2007), catequinas (Yoshikawa *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2005), estilbenos (Matsuda *et al.*, 2009)), quitosano (Ostanina *et al.*, 2007) y compuestos fenólicos (Raghavendra y Prakash, 2002; Han *et al.*, 2007) han mostrado poseer actividad inhibitoria de lipasas.

La actividad bioquímica de enzimas, tales como las lipasas, está asociada a cambios estructurales en la enzima que resulta en reacciones selectivas y estereoespecíficas entre el sitio de unión a la lipasa y el sustrato (Peters *et al.*, 1997). El mecanismo de acción de estas enzimas consiste en la escisión nucleofílica de un enlace éster por una serina activa que pertenece a la tríada catalítica Ser-His-Asp/Glu. Los inhibidores reaccionan con la serina nucleofílica del sitio activo de la lipasa, lo que conduce a la formación de complejos lípido-proteína covalentes y equimolares que son estables en soluciones acuosas y orgánicas. Esta unión entre los inhibidores de la lipasa y el sitio activo es reversible (Oskolkova *et al.*, 2003). Metabolitos secundarios de plantas presentes en alimentos han demostrado ser inhibidores de lipasas. Entre estos metabolitos, saponinas, flavonoides y alcaloides, presentes en altas concentraciones en extractos de plantas, son una fuente prometedora de inhibidores de lipasa (Ruiz *et al.*, 2006). Probablemente, algunos compuestos de los aceites esenciales podrían inhibir la actividad de la lipasa interactuando con el sitio activo de la enzima.

El objetivo de este capítulo es determinar la actividad antioxidante y anti-lipasa de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. y *Lippia turbinata* Griseb. en relación con la composición química y el contenido de fenoles totales. Estas propiedades antioxidantes y anti-lipasa de los aceites esenciales permitirán inferir su potencial aplicación como conservantes de alimentos.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las especies estudiadas fueron *Origanum vulgare* L. de San Carlos (cosecha 2010), Mendoza, Argentina, y *Lippia turbinata* Griseb. de Altas Cumbres (cosecha 2010), Córdoba, Argentina. El material vegetal de cada especie fue cosechado en la etapa de floración en Noviembre de 2010. Las plantas de 2 años de edad (hojas, flores y tallos) se cortaron a 5 centímetros por encima del suelo.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de dos tratamientos × 3 repeticiones. Se estudiaron dos tratamientos: aceites esenciales (AE) de orégano y poleo. El experimento se realizó por triplicado. Se analizaron las siguientes variables: contenido de fenoles totales, actividad secuestrante de radicales libres por DPPH, índice de actividad antioxidante (IAA) por RANCIMAT y actividad anti-lipasa en lipasas de *Candida antarctica* y *Pseudomonas fluorescens*.

Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales se extrajeron por hidrodestilación durante 2 h en un aparato de tipo Clevenger. Los aceites esenciales resultantes se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en viales de vidrio color caramelo a -18 °C hasta su análisis.

Composición de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa CG-EM, en un equipo Perkin Elmer Q-700 acoplado con un detector de masas de trampa de iones (Perkin Elmer, Shelton, CT, EE.UU.). Se utilizó una columna DB-5 (30 m × 0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de espesor de revestimiento). El programa de temperatura fue: 60 °C por 3 minutos y luego una rampa de temperatura de 4 °C/min hasta 240 °C. El inyector se mantuvo a 250 °C. Se utilizó helio como gas portador con un caudal de 0,9 mL/min. La ionización se realizó por impacto de electrones a 70 eV. Los compuestos de los diferentes aceites esenciales fueron identificados por com-

paración de su índice de retención y espectros de masa con los datos publicados (Dambolena *et al.*, 2010), bibliotecas NIST y (Adams, 1995). Para la identificación de los componentes principales se co-inyectaron patrones auténticos (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Se utilizó un estándar interno de fenchona a una concentración de 0,1 mg/mL en diclorometano. La composición cuantitativa se obtuvo por la normalización del área de pico, y el factor de respuesta para cada componente se consideró igual a 1.

Contenido de fenoles totales

Se determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin–Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se utilizó el reactivo de Folin–Ciocalteu (Anedra, San Fernando Buenos Aires, Argentina), y el contenido de fenoles totales se determinó en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 1A, UV/VIS spectrophotometer) a 760 nm. El contenido de fenoles totales se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por mL de aceite esencial.

Actividad antioxidante

Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH

Esta técnica fue adaptada de Chen y Ho (1997). Los aceites esenciales fueron agregados a 3.9 mL de una solución metanólica 0.05 mM de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Las concentraciones finales de los aceites esenciales fueron 5,77; 2,77; 1,39 y 0,69 µg/mL. Luego de 30 minutos se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 1A, UV/VIS spectrophotometer) a 517 nm. El porcentaje de inhibición del radical DPPH por los AEs se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = \left(1 - \frac{A_{(DPPH)} - A_{b (DPPH)}}{A_{0 (DPPH)}} \right) \times 100$$

donde $A_{(DPPH)}$ es la absorbancia de la solución de DPPH con el aceite esencial

$A_{b (DPPH)}$ es la absorbancia de metanol con el aceite esencial

$A_{0 (DPPH)}$ es la absorbancia de la solución de DPPH.

Se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC50) a partir de la curva obtenida de la gráfica del % de inhibición vs la concentración final del aceite esencial (Loizzo *et al.*, 2009).

Índice de actividad antioxidante por RANCIMAT

Se utilizó un equipo RANCIMAT 743 (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland) para determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano y poleo en manteca (Auchan, Padova, Italia). Se prepararon tres tratamientos: manteca sin el agregado de aceite esencial como control y manteca con el agregado de aceite esencial de orégano y poleo, a una concentración final de 16,458 mg/g. Se utilizó un flujo de aire de 20 L/h, y la temperatura de calentamiento se mantuvo a 100 °C (Politeo *et al.*, 2006). El IAA se calculó con el tiempo de inducción (punto de quiebre de las curvas graficadas), de acuerdo a la siguiente formula (Viuda-Martos *et al.*, 2010):

$$IAA = \frac{\text{tiempo de inducción de manteca con AE}}{\text{tiempo de inducción de manteca control}}$$

Actividad anti-lipasa

La actividad anti-lipasa de los aceites esenciales se determinó según el método de Lomolino *et al.* (2003) con algunas modificaciones. Para determinar la actividad anti-lipasa se utilizó β -naftil acetato (Sigma) como sustrato. Se utilizaron lipasas comerciales de *Candida antarctica* (L-C) y *Pseudomonas fluorescens* (L-P) (Sigma). Se analizó una solución de β -naftil acetato en Triton \times 100 (Sigma) con los aceites esenciales a diferentes concentraciones (0,617; 1,234; 2,469; 4,938 y 9,875 $\mu\text{g/mL}$). Las muestras se incubaron a 40 °C por 90 min. Se agregó una solución de fast blue BB salt (Fluka, Buchs, Switzerland) para detener la reacción y se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 1A, UV/VIS spectrophotometer) a 500 nm. El porcentaje de inhibición de la lipasa se calculó según la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición de lipasa} = \left(1 - \frac{A_{(\text{anti-lipasa})} - A_{b(\text{anti-lipasa})}}{A_{0(\text{anti-lipasa})}} \right) \times 100$$

donde $A_{(\text{anti-lipasa})}$ es la absorbancia de la muestra con el aceite esencial

$A_{b(\text{anti-lipasa})}$ es la absorbancia de la muestra sin lipasa (blanco)

$A_{0(\text{anti-lipasa})}$ es la absorbancia del control sin aceite esencial.

Se calculó la concentración inhibitoria del 50% (IC50) a partir de la curva obtenida al graficar el porcentaje de inhibición vs la concentración final de aceite esencial (Quiroga *et al.*, 2011, 2013).

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron utilizando el software InfoStat, versión 2012p (Di Rienzo *et al.*, 2012). Se calcularon promedios y desvíos estándar. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0,05$) y test posterior de DGC para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. Se realizaron análisis de correlación entre las variables analizadas mediante la determinación de coeficientes de Pearson.

Resultados y discusión

Composición de los aceites esenciales

La composición de los aceites esenciales de orégano y poleo se muestra en la Tabla 2.1. Solo se muestran los componentes con porcentajes mayores al 0,1%. En el aceite esencial de orégano se identificaron 37 componentes, de los cuales los principales fueron los monoterpenos: γ -terpineno (32,10%), α -terpineno (15,10%), *p*-cimeno (8,00%), timol (8,00%) y β -felandreno (7,10%). Trabajos previos indican que los componentes mayoritarios de cuatros especies de orégano diferentes fueron los monoterpenos *trans*-sabineno hidrato, timol y γ -terpineno (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2011).

Tabla 2.1. Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en los aceites esenciales de orégano y poleo según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo %	
			Orégano	Poleo
924	MS	α -tujeno	0,70 \pm 0,06	ND
930	MS	α -pineno	1,40 \pm 0,1	0,9 \pm 0,08
944	MS	Camfeno	0,50 \pm 0,04 a	1,15 \pm 0,1 b
970	MS	Sabineno	3,10 \pm 0,26 b	1,4 \pm 0,08 a
974	Co-MS	β -pineno	ND	1,45 \pm 0,13
989	MS	β -mirceno	0,50 \pm 0,04	0,25 \pm 0,02
1002	Co-MS	α -felandreno	2,90 \pm 0,25	ND
1014	Co-MS	α -terpineno	15,10 \pm 1,2	ND
1020	MS	<i>p</i> -cimeno	8,00 \pm 0,6 b	0,15 \pm 0,01 a
1024	MS	Limoneno	0,60 \pm 0,05 a	76,8 \pm 6,9 b
1026	Co-MS	β -felandreno	7,10 \pm 0,62	ND

Tabla 2.1 (continuación). Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en los aceites esenciales de orégano y poleo según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo %	
			Orégano	Poleo
1027	MS	1,8-cineole	ND	4,95±0,35
1032	MS	Z β-ocimeno	0,60±0,05 b	0,15±0,01 a
1054	Co-MS	γ-terpineno	32,10±2,6	ND
1086	MS	Terpinoleno	4,10±0,33	ND
1089	MS	p-cimeno	0,20±0,02	ND
1095	MS	Linalool	2,10±0,02	ND
1124	MS	Crisantenona	ND	0,1±0,01
1140	Co-MS	Z β-terpineol	0,10±0,01	ND
1165	MS	Borneol	ND	0,15±0,01
1172	Co-MS	Terpinen 4 ol	0,30±0,02	0,15±0,01
1183	Co-MS	α-terpineol	0,20±0,01	0,35±0,03
1232	MS	Timol metil éter	0,30±0,02	ND
1239	MS	Carvona	ND	1,1±0,09
1241	MS	Carvacrol metil éter	0,50±0,04	ND
1249	MS	Piperitona	ND	0,15±0,01
1253	MS	Piperitona oxido	ND	0,25±0,02
1285	MS	Bornil acetato	ND	0,15±0,01
1289	Co-MS	Timol	8,00±0,71	ND
1298	MS	Carvacrol	4,00±0,33	ND

Tabla 2.1 (continuación). Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en los aceites esenciales de orégano y poleo según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo %	
			Orégano	Poleo
1340	MS	Carvil acetato	ND	0,3±0,02
1356	MS	Eugenol	ND	0,45±0,04
1366	MS	Piperitenona oxido	ND	0,9±0,08
1374	MS	α -copaeno	ND	0,15±0,01
1385	MS	β -bourboneno	0,10±0,01 a	0,85±0,07 b
1389	MS	β -elemeno	ND	0,25±0,02
1409	MS	α -gurjuneno	ND	0,15±0,01
1417	MS	β -cariofileno	2,00±0,13	1,25±0,11
1434	MS	γ -elemeno	ND	0,1±0,01
1439	Co-MS	Aromadendreno	0,40±0,03	0,15±0,01
1450	MS	α -humuleno	0,30±0,02	0,3±0,02
1458	Co-MS	Alo-aromadendreno	ND	0,2±0,01
1478	MS	γ -muuroleno	0,10±0,01	ND
1479	MS	α -curcumeno	ND	0,25±0,02
1484	MS	D germacreno	ND	0,4±0,03
1505	MS	β -bisaboleno	0,40±0,03	0,1±0,01
1513	MS	γ -cadineno	0,30±0,2	0,15±0,01
1522	MS	β -cadinene	1,00±0,09 b	0,25±0,02 a
1528	MS	<i>cis</i> -calameneno	ND	0,15±0,01

Tabla 2.1 (continuación). Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en los aceites esenciales de orégano y poleo según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo %	
			Orégano	Poleo
1537	MS	α -cadineno	0,10 \pm 0,01	ND
1544	MS	α -calacoreno	ND	0,2 \pm 0,01
1559	MS	B germacreno	0,10 \pm 0,01	ND
1575	MS	Espatulenol	0,90 \pm 0,08	0,4 \pm 0,04
1590	MS	Cariofileno oxido	0,80 \pm 0,07	1,55 \pm 0,13
1610	MS	Cedrol	ND	0,3 \pm 0,03
1631	MS	T-muurolol	ND	0,15 \pm 0,01
1640	MS	T-cadinol	ND	0,4 \pm 0,03
1655	MS	α -cadinol	ND	0,35 \pm 0,03
1988	MS	M+ 222	ND	0,25 \pm 0,02
1993	MS	M+ 234	ND	0,2 \pm 0,02
2003	MS	M+ 236	ND	0,25 \pm 0,02
2508	MS	M+ 290	0,50 \pm 0,04	ND
2526	MS	M+ 308	0,40 \pm 0,03	ND
2717	MS	M+ 310	0,20 \pm 0,02	ND

* Valores con letras distintas en las filas indican diferencias significativas entre los aceites esenciales de acuerdo con el test DGC, $\alpha = 0,05$ ($n = 3$).

ND: no detectado, IR = índice de retención, MOI = métodos de identificación: Co (co-inyección con estándar) y MS (datos de librería - Nist y Adams).

Otros trabajos indican como componentes mayoritarios del aceite esencial de orégano al timol, α -terpineol, linalil acetato y linalool (Pérez *et al.*, 2007; De Martino *et al.*, 2009) y linalool, timol y α -terpineol (Khosravi *et al.*, 2011). Las especies de orégano que

crecen en Argentina no tienen una concentración significativa de carvacrol (Dambolena *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2011). Esto puede estar relacionado con causas genéticas asociadas con el material original introducido a la Argentina que fue renovado por los clones y los factores ambientales que afectan a la composición de los aceites esenciales, como las condiciones del clima, la temperatura, la humedad y las precipitaciones entre otros (Figueiredo *et al.*, 2008; Dambolena *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2011).

Cuarenta y cinco compuestos fueron identificados en el aceite esencial de poleo, de los cuales los principales fueron: α -limoneno (76,80%), 1,8-cineol (4,95%), óxido de cariofileno (1,55%), β -pineno (1,45%) y sabineno (1,40%). Otros trabajos han encontrado limoneno, *cis*- α -bisaboleno, D-germacreno y β -cariofileno como componentes principales en el aceite esencial (Moriconi *et al.*, 2009; Passone *et al.*, 2012).

Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

El contenido de fenoles totales, concentración inhibitoria 50% de DPPH (DPPH-IC50), índice de actividad antioxidante por RANCIMAT (IAA) y la concentración inhibitoria 50% de lipasa (L-C-IC50 y L-P-IC50) de los aceites esenciales de orégano y poleo se muestran en la Tabla 2.2. El aceite esencial de orégano tuvo casi el doble de fenoles totales que el aceite esencial de poleo. Otros autores (Dambolena *et al.*, 2010) informaron el contenido de fenoles totales y la actividad secuestrante de radicales libres de extractos acuosos de cuatro especies de orégano (Compacto, Criollo, Cordobés y Mendocino) procedentes de distintos lugares de Argentina, encontrando diferencias en el contenido de fenoles y la actividad secuestrante de radicales libres entre las diferentes especies de orégano y lugares. En dicho trabajo se informaron fenoles totales entre 8,88 y 19,36 mg equivalente de ácido gálico/g en extractos acuosos de orégano. Por otra parte, Rodríguez Vaquero *et al.* (2010) encontraron aproximadamente 0,123 mg equivalente de ácido gálico/g en infusiones de *Lippia turbinata*. Otros autores encontraron 376,7 mg equivalentes ácido gálico/g en extractos metanólicos de *Lippia Schomburgkiana* (Da Silva *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos presentan actividad secuestrante de radicales libres y actividad antioxidante (Nepote *et al.*, 2004, 2005). La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las plantas aromáticas se atribuye principalmente a

la presencia de compuestos fenólicos (Olmedo *et al.*, 2008; Dambolena *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2011). Los porcentajes de inhibición del radical DPPH de los aceites esenciales de orégano y poleo a diferentes concentraciones se utilizaron para determinar DPPH-IC50 de los dos aceites esenciales (Tabla 2.2). En general, los aceites esenciales de orégano y poleo mostraron actividad secuestrante de radicales libres similares en todas las diferentes concentraciones de aceite esencial. Sin embargo, el aceite esencial de orégano mostró una mayor actividad secuestrante de radicales libres que el aceite esencial de poleo a las concentraciones 0,247 y 0,494 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo a los resultados que se muestran en la Tabla 2.2, el aceite esencial de orégano tuvo el menor valor de DPPH-IC50 (0,357 $\mu\text{g/mL}$), y por lo tanto, tuvo mayor actividad secuestrante del radical DPPH que el aceite esencial de poleo (0,400 $\mu\text{g/mL}$). Otros autores encontraron DPPH-IC50 entre 1,0 y 1,7 $\mu\text{g/mL}$ en aceites esenciales de orégano (Loizzo *et al.*, 2009) y una actividad secuestrante de radicales libres entre 17,5 y 75,3 % en extractos acuosos de orégano de diferentes localidades medidos a una concentración de 40 mg planta/mL (Dambolena *et al.*, 2010).

Tabla 2.2. Fenoles totales, concentración inhibitoria del 50% de DPPH (DPPH-IC50), índice de actividad antioxidante por RANCIMAT (IAA), y concentraciones inhibitorias del 50% de las lipasas (*Candida Antarctica*: L-C-IC50 y *Pseudomonas fluorescens*: L-P-IC50) medidos en los aceites esenciales de Orégano y poleo.

	Orégano*	Poleo*
Fenoles totales (mg ácido gálico/mL)	124,70 \pm 0,220 b	75,530 \pm 0,700 a
DPPH-IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	0,375 \pm 0,003 a	0,400 \pm 0,022 b
IAA	11,672 \pm 0,090 a	12,035 \pm 0,094 a
L-C-IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	50,919 \pm 0,059 a	74,921 \pm 0,132 b
L-P-IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	72,643 \pm 0,109 a	11,126 \pm 0,466 b

*Valores con letras distintas en cada fila son significativamente diferentes (test de DGC, $\alpha=0,05$, n = 3).

El método de RANCIMAT consiste en la exposición de la muestra lipídica a temperaturas entre 50 y 220 °C y a un flujo de aire. Los productos de oxidación volátiles (principalmente ácido fórmico) se transfieren con el flujo de aire a un equipo que mide la conductividad. El tiempo de inducción corresponde a los puntos de quiebre en la gráfica de las curvas trazadas de conductividad. Un tiempo de inducción bajo indica una rápida

oxidación lipídica. El IAA es la proporción entre los tiempos de inducción de la muestra con antioxidante y la muestra sin antioxidante. Los aceites esenciales de orégano y poleo no mostraron diferencias significativas en su IAA (Tabla 2.2), indicando que estos aceites esenciales tuvieron actividad antioxidante similar en las condiciones estudiadas (orégano 1.20 y poleo 1.24). Otros autores reportaron que los aceites esenciales de orégano, tomillo, clavo de olor, salvia y romero tuvieron IAA entre 1,05 y 1,67 siendo estos valores inferiores a BHT (IAA = 2.42) (Viuda-Martos *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta la alta temperatura y el flujo de aire en las condiciones de prueba del método RANCIMAT y que los aceites esenciales son compuestos volátiles, los aceites esenciales pudieron haberse perdido parcialmente durante la prueba. Estas causas podrían explicar la baja actividad antioxidante mostrada por los aceites esenciales en el método RANCIMAT. Los resultados obtenidos por el método RANCIMAT son a veces ambiguos y pueden guiar a conclusiones incorrectas (Politeo *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales con componentes tales como eugenol, timol o carvacrol han demostrado actividad antioxidante notable ya que estos compuestos tienen una base fenólica. Compuestos fenólicos con grupos sustituyentes donadores de electrones alquilo o metoxi en la posición *orto* aumentan la estabilidad del radical libre. La posición y el grado de hidroxilación de los compuestos fenólicos determina su actividad antioxidante (Dambolena *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2011). El aceite esencial de orégano utilizado, rico en terpenos como γ -terpineno, β -felandreno y terpinoleno y fenoles como el timol y carvacrol, mostró una mayor actividad antioxidante que el aceite esencial de poleo. Probablemente, esta mayor actividad fue influenciada por sus componentes fenólicos (timol y carvacrol). El aceite esencial de poleo exhibió alta concentración de terpenos como el limoneno y 1,8-cineol. A pesar del hecho de que el aceite esencial de poleo mostró baja concentración de compuestos fenólicos, este aceite esencial también exhibió actividad antioxidante. Muchos aceites esenciales sin compuestos fenólicos en su composición también han demostrado tener actividad antioxidante. Los aceites esenciales de *Citrus sinensis* ricos en limoneno, y de *Eucalyptus camaldulensis* rico en *p*-cimeno, 1,8-cineol, β -felandreno y espatulenol, y de *Myrtus communis* L. rico en 1,8-cineol y metil eugenol han demostrado tener actividad antioxidante moderada (Miguel, 2010). Además, algunos alquenos tales como terpinenos y cariofileno también mostraron retardar la peroxidación del ácido linoleico. Los terpinenos alfa y gamma, se pueden oxidar para formar *p*-cimeno previniendo la oxidación de ácido linoleico (Guo-Xiang y Zai-Qun, 2009).

Actividad anti-lipasa

Los porcentajes de inhibición de la lipasa de los aceites esenciales de orégano y poleo a diferentes concentraciones y en las lipasas de *C. antarctica* y *P. fluorescens* se utilizaron para obtener los resultados de IC50 presentados en la Tabla 2.2. Ambos aceites esenciales mostraron inhibición de las dos lipasas. Además, todas las concentraciones de aceite esencial de orégano presentaron mayores porcentajes de inhibición que las del aceite esencial de poleo. El aceite esencial de orégano presentó menor IC50 para ambas lipasas (5,09 y 7,26 µg/mL en las lipasas de *C. antarctica* y de *P. fluorescens*, respectivamente).

Otros autores encontraron actividad anti-lipasa de diferentes extractos de plantas aromáticas. Los resultados de IC50 de los extractos de *Monarda punctata* en lipasa de plasma de ratones fueron los siguientes: extracto de acetona, µg/mL; extracto de agua, 5600 µg/mL; extracto de éter, 180 µg/mL; carvacrol, 706,02 µg/mL, y orlistat, 44,6 µg/mL (Yamada *et al.*, 2010). La inhibición de la lipasa pancreática (LP) producida por un extracto metanólico de hojas de salvia resultó con un IC50 de 94 µg/mL. Algunos compuestos aislados a partir de dicho extracto fueron ácido carnósico y carnosol, los cuales inhibieron sustancialmente la actividad de la LP con la siguiente IC50: 12 y 4,4 µg/mL, respectivamente (Ninomiya *et al.*, 2004). Jang *et al.* (2008) identificaron, aislaron y evaluaron la actividad inhibitoria sobre LP de un nuevo triterpeno, ácido actinídico 3-O-*trans*- ρ -cumaroil, y de cinco triterpenos conocidos, ácido ursólico, ácido 23-hidroxiursólico, ácido corosólico, ácido asiático y ácido betulínico, a partir del extracto soluble en acetato de etilo de las raíces de *Actinidia arguta*. El ácido actinídico 3-O-*trans*- ρ -cumaroil tuvo la mayor actividad inhibitoria sobre la PL (IC50 = 9,45 µg/mL) seguido por ácido ursólico (IC50 = 7,22 µg/mL). Ácido 23-hidroxiursólico, ácido corosólico, ácido asiático y ácido betulínico también mostraron actividad inhibitoria significativa de la LP con valores de IC50 desde 9,58 hasta 37,31 µg/mL.

Análisis de correlación

Los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables analizadas sobre los aceites esenciales de orégano y poleo se muestran en la Tabla 2.3. Los fenoles totales mostraron una correlación negativa con las IC50 de DPPH y de las lipasas. Estas últimas variables se correlacionaron positivamente entre ellas. Un mayor contenido de fenoles totales en los aceites esenciales se relacionó con una mayor actividad secuestrante de radicales libres y anti-lipasa.

Tabla 2.3. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables químicas: contenido de fenoles totales, concentración inhibitoria 50% de DPPH (DPPH-IC50), y concentración inhibitoria 50% de la actividad lipasa (L-C-IC50: actividad sobre la lipasa de *C. antarctica*, y L-P-IC50: actividad sobre la lipasa de *P. fluorescence*) de los aceites esenciales de Orégano y poleo.

	DPPH-IC50	L-C-IC50	L-P-IC50
L-C-IC50	0,89*		
L-P-IC50	0,92*	1,00**	
Contenido de fenoles totales	-0,82*	-0,99**	-0,97**

* Coeficientes significativos a $p < 0.05$, ** Coeficientes significativos a $p < 0.01$.

Conclusiones

El aceite esencial de *Origanum vulgare* L. presenta en su composición química fenoles tales como timol y carvacrol, y el aceite esencial de *Lippia turbinata* Griseb. muestra una gran concentración de terpenos tales como limoneno y 1,8-cineol. Todos estos compuestos podrían ser responsables de la actividad antioxidante demostrada por estos aceites esenciales. El aceite esencial de orégano, tiene mayor contenido de fenoles totales, mayor actividad secuestrante del radical DPPH y actividad anti-lipasa que el aceite esencial de poleo. Sin embargo, estos aceites esenciales no tienen una diferencia significativa en su actividad antioxidante medida por el método de RANCIMAT. Los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. y *Lippia turbinata* Griseb. podrían ser utilizados como antioxidantes naturales y compuestos con actividad anti-lipasa como aditivos alimentarios en productos con alto contenido de lípidos como una alternativa para reemplazar los antioxidantes sintéticos que están cuestionados por sus efectos sobre la salud humana. Sin embargo, se deberían realizar experimentos sobre el perfil de seguridad de los aceites esenciales antes de ser utilizados como un aditivo en productos alimenticios.

Bibliografía citada

- Adams, R. P. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Ed). IL. pp.
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*. 76. 445-S450
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M. y Ruberto, G. 1998. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*. 10. 618-627
- Chen, J. H. y Ho, C. T. 1997. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45. 2374-2378
- Da Silva, N. A., Da Silva, J. K. R., Andrade, E. H. A., Carreira, L. M. M., Sousa, P. J. C. y Maia, J. G. S. 2009. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. *Natural Product Communications*. 4. 1281-1286
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. y Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58. 1115-1120
- De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., Rosselli, S. y Senatore, F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules*. 14. 4614-4624
- Di Fabio, A. 2008. El cultivo y su efecto sobre la calidad en orégano. *Boletín Cámara Argentina de especias y afines*. 1-11
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. InfoStat.
- Eguchi, Y., Curtis, O. F. y Shetty, K. 1996. Interaction of hyperhydricity-preventing *Pseudomonas* sp. with oregano (*Origanum vulgare*) and selection of high phenolics and rosmarinic acid-producing clonal lines. *Food Biotechnology*. 10. 191-202
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. y Scheffer, J. J. C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23. 213-226
- Guo-Xiang, L. y Zai-Qun, L. 2009. Unusual antioxidant behavior of α - and γ -terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. 3943-3948
- Gupta, R., Gupta, N. y Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64. 763-781
- Han, L., Li, W., Narimatsu, S., Liu, L., Fu, H., Okuda, H. y Koike, K. 2007. Inhibitory effects of compounds isolated from fruit of *Juglans mandshurica* on pancreatic lipase. *Journal of Natural Medicines*. 61. 184-186
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. y Von Wright, A. 1998. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46. 3590-3595

- Jang, D. S., Lee, G. Y., Kim, J., Lee, Y. M., Kim, J. M., Kim, Y. S. y Kim, J. S. 2008. A new pancreatic lipase inhibitor isolated from the roots of *Actinidia arguta*. Archives of Pharmacal Research. 31. 666-670
- Khosravi, A. R., Shokri, H., Kermani, S., Dakhili, M., Madani, M. y Parsa, S. 2011. Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. Journal de Mycologie Medicale. 21. 93-99
- Kim, J., Jang, D. S., Kim, H. y Kim, J. S. 2009. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta*. Archives of Pharmacal Research. 32. 983-987
- Koksal, O., Gunes, E., Orkan Ozer, O. y Ozden, M. 2010. Analysis of effective factors on information sources at Turkish oregano farms. African Journal of Agricultural Research. 5. 142-149
- Lante, A., Nardi, T., Zocca, F., Giacomini, A. y Corich, V. 2011. Evaluation of red chicory extract as a natural antioxidant by pure lipid oxidation and yeast oxidative stress response as model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59. 5318-5324
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., Cindio, B. d., Houghton, P. J., Menichini, F. y Frega, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. Food Chemistry. 117. 174-180
- Lomolino, G., Rizzi, C., Spettoli, P., Curioni, A. y Lante, A. 2003. Cell vitality and esterase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by increasing calcium concentration. Agro Food Industry Hi-Tech. 14. 32-35
- Matsuda, H., Asao, Y., Nakamura, S., Hamao, M., Sugimoto, S., Hongo, M., Pongpiriyadacha, Y. y Yoshikawa, M. 2009. Antidiabetogenic constituents from the Thai traditional medicine *Cotylelobium melanoxylon*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 57. 487-494
- Miguel, M. G. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. Molecules. 15. 9252-9287
- Moriconi, J. I., Fernández, E. A., Martínez, E. y Giulietti, A. 2009. Rendimiento de materia seca y composición del aceite esencial de *Lippia turbinata* Griseb. "poleo" (*Verbenaceae*), en plantas de San Luis (Argentina). Horticultura Argentina. 28 34-38
- Morikawa, T., Xie, Y., Asao, Y., Okamoto, M., Yamashita, C., Muraoka, O., Matsuda, H., Pongpiriyadacha, Y., Yuan, D. y Yoshikawa, M. 2009. Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*. Phytochemistry. 70. 1166-1172
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F. y Kiso, Y. 2005. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53. 4593-4598
- Neffati, A., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Limem, I., Kilani, S., Skandrani, I., Bhouiri, W., Le Dauphin, J., Barillier, D., Mosrati, R., Chekir-Ghedira, L. y Ghedira, K. 2009. Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils. Environmental Toxicology and Pharmacology. 27. 187-194
- Nepote, V., Grosso, N. R. y Guzman, C. A. 2004. Radical scavenging activity of extracts of Argentine peanut skins (*Arachis Hypogaea*) in relation to its trans-resveratrol content. Anales des la Asociacion Quimica Argentina. 92. 41-49

- Nepote, V., Grosso, N. R. y Guzmán, C. A. 2005. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85. 33-38
- Nepote, V., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2006. Oxidative stability in fried-salted peanuts elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *International Journal of Food Science and Technology*. 41. 900-909
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T. y Yoshikawa, M. 2004. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 14. 1943-1946
- Olmedo, R. H., Nepote, V., Mestrallet, M. G. y 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
- Oskolkova, O. V., Saf, R., Zenzmaier, E. y Hermetter, A. 2003. Fluorescent organophosphonates as inhibitors of microbial lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 125. 103-114
- Ostanina, E. S., Varlamov, V. P. y Yakovlev, G. I. 2007. Inhibition of lipase activity by low-molecular-weight chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43. 655-660
- Passone, M. A., Girardi, N. S., Ferrand, C. A. y Etcheverry, M. 2012. In vitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 70. 82-88
- Peake, P. W., Pussell, B. A., Martyn, P., Timmermans, V. y Charlesworth, J. A. 1991. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complement involves the C5 convertase. *International Journal of Immunopharmacology*. 13. 853-857
- Pérez, R. A., Navarro, T. y de Lorenzo, C. 2007. HS-SPME analysis of the volatile compounds from spices as a source of flavour in 'Campo Real' table olive preparations. *Flavour and Fragrance Journal*. 22. 265-273
- Peters, G. H., van Aalten, D. M., Svendsen, A. y Bywater, R. 1997. Essential dynamics of lipase binding sites: the effect of inhibitors of different chain length. *Protein Engineering*. 10. 149-158
- Politeo, O., Jukić, M. y Miloš, M. 2006. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica Chemica Acta*. 79. 545-552
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. y Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology*. 46. 2648-2655
- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A. y Nepote, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science and Technology*. 48. 642-649
- Raghavendra, M. P. y Prakash, V. 2002. Phenylboronic acid - A potent inhibitor of lipase from *Oryza sativa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 6037-6041
- Ricciardi, G. A. L., Torres, A. M., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Ricciardi, A. I. A., Dellacassa, E., Lorenzo, D. y Bandoni, A. L. 2005. Examen del Aceite esencial de *Aloysia virgata* var. *Platyphylla* (Briq.) Moldeke de Corrientes. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste.
- Rodríguez Vaquero, M. J., Tomassini Serravalle, L. R., Manca de Nadra, M. C. y Strasser de Saad, A. M. 2010. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*. 21. 779-785

- Ruberto, G., Tiziana Baratta, M., Sari, M. y Kaâbeche, M. 2002. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 17. 251-254
- Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Villo, L., Nicolosi, G., Pastor, F. I. J., Diaz, P. y Saso, L. 2006. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 40. 138-143
- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S. y Gulati, R. 1999. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*. 77. 101-115
- Silva, M. P., Martinez, M. J., Casini, C. y Grosso, N. R. 2010. Tocopherol content, peroxide value and sensory attributes in roasted peanuts during storage. *International Journal of Food Science and Technology*. 45. 1499-1504
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid "reagents". *American Journal of Enology and Viticulture*. 16. 144-158
- Sugimoto, S., Nakamura, S., Yamamoto, S., Yamashita, C., Oda, Y., Matsuda, H. y Yoshikawa, M. 2009. Brazilian natural medicines. III¹ structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 57. 257-261
- Sztajer, H., Maliszewska, I. y Wiczorek, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*. 10. 492-497
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. A. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*. 25. 13-19
- Won, S. R., Kim, S. K., Kim, Y. M., Lee, P. H., Ryu, J. H., Kim, J. W. y Rhee, H. I. 2007. Licochalcone A: A lipase inhibitor from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Food Research International*. 40. 1046-1050
- Yamada, K., Murata, T., Kobayashi, K., Miyase, T. y Yoshizaki, F. 2010. A lipase inhibitor monoterpene and monoterpene glycosides from *Monarda punctata*. *Phytochemistry*. 71. 1884-1891
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H. y Raneva, V. G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64. 59-66
- Yoshikawa, M., Shimoda, H., Nishida, N., Takada, M. y Matsuda, H. 2002. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. *Journal of Nutrition*. 132. 1819-1824

Efecto antioxidante de los aceites esenciales de poleo y orégano sobre semillas de girasol tostadas

Introducción

El contenido de lípidos y proteínas de las semillas de girasol es entre 45-50% y 33-35%, respectivamente. El aceite de girasol posee 18.7 % de ácido oleico y 67.5% de ácido linoleico como el componente mayoritario del aceite (Belitz *et al.*, 2009). Debido a su composición y valor nutricional, las semillas de girasol son consideradas una gran fuente de lípidos y proteínas (Brăţfălean *et al.*, 2008) y son principalmente utilizadas en la producción de aceites comestibles y alimentos proteicos para la alimentación animal. Desde el punto de vista de la salud humana, los ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido linolénico (18:2), son esenciales para los mamíferos y tienen un potente efecto hipocolesterolémico (Kris-Etherton *et al.*, 2001), disminuyendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los lípidos funcionales tales como los ácidos grasos omega-3 y omega-6, ácidos linoleicos conjugados, acil-triglicéridos de cadena media, y fitosteroles tienen muchos efectos beneficiosos sobre la salud humana como en la obesidad, la salud de los huesos, y en el tratamiento y manejo de la depresión, la presión arterial, salud cardiovascular y otros (Alabdulkarim *et al.*, 2012).

La composición química del aceite de girasol rica en ácidos grasos poliinsaturados lo hace susceptible a la oxidación lipídica. La oxidación de lípidos es una causa importante del deterioro de los aceites y grasas comestibles. Los principales productos primarios formados en las etapas iniciales de las reacciones de oxidación de lípidos son peróxidos e hidroperóxidos. Los productos secundarios de oxidación, alcanos, alquenos, aldehídos y cetonas, se forman durante la etapa final. Estos compuestos son volátiles, y son responsables de la pérdida de aroma o bien de la aparición del olor a rancio (Løvaas, 1992; Pereira de Abreu *et al.*, 2011). La susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación depende directamente de su grado de insaturación (Nepote *et al.*, 2006a, 2009; Riveros *et al.*, 2009).

El interés en antioxidantes naturales para la preservación de los alimentos se encuentra en aumento por su relevancia tecnológica y su impacto positivo en la salud de los consumidores. Múltiples investigaciones en el campo de nuevos antioxidantes se llevan a cabo con el fin de reemplazar los antioxidantes sintéticos por los naturales (Asensio *et al.*, 2011, 2012; Lante *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2011, 2013).

Muchos aceites esenciales han demostrado tener actividad antioxidante y ser eficaces en el retraso del proceso de oxidación de los lípidos en diferentes productos alimenticios (Asensio *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2011, 2013). Por esta razón, los aceites esenciales están ganando atención debido a sus propiedades para la salud y su amplia aceptación por los consumidores (Bakkali *et al.*, 2008; Irshaid *et al.*, 2012).

La aplicación de aceites esenciales de plantas aromáticas para el control de la oxidación lipídica requiere la evaluación de una serie de aspectos tales como los efectos sobre las propiedades organolépticas, la evaluación del rango de actividad contra el avance de la oxidación de los lípidos para un producto en particular, así como los efectos de composición de alimentos sobre la actividad. Los aceites esenciales podrían combinar sabores y aromas placenteros con acción conservante que evitarían la oxidación y el deterioro lipídico. Una caracterización química y sensorial simultánea puede resultar de suma utilidad a la hora de indagar sobre la actividad antioxidante, la aceptabilidad y las propiedades sensoriales de un alimento con el agregado de aceites esenciales.

Como ya se presentó, en el capítulo anterior, el orégano y la poleo son plantas aromáticas, con propiedades medicinales, utilizadas tradicionalmente para aromatizar diferentes alimentos (Eguchi *et al.*, 1996; Ruberto *et al.*, 2002). El aceite esencial de orégano presenta propiedades antioxidantes (Dambolena *et al.*, 2010). Sin embargo, el efecto antioxidante, la aceptabilidad y las características sensoriales de alimentos con el agregado de aceites esenciales como conservantes ha sido poco evaluada. En este capítulo, el objetivo fue evaluar el efecto sobre la aceptabilidad de los consumidores y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano y poleo aplicados sobre semillas de girasol tostadas.

Materiales y Métodos

Materiales

Semillas de girasol, *Helianthus annuus* L., sanas y limpias de la cosecha 2010, provistas por la compañía “Argensun S.A.” de Buenos Aires, Argentina.

Se extrajeron los aceites esenciales de las especies utilizadas en el capítulo II: *Origanum vulgare* L. de San Carlos (cosecha 2010), Mendoza, Argentina y *Lippia turbinata* Griseb. de Altas Cumbres (cosecha 2010), Córdoba, Argentina. El material vegetal de ambas especies fue cosechado en la etapa de floración en noviembre de 2010. Las plantas de dos años de edad (hojas, flores y tallos,) se cortaron a 5 centímetros por encima del suelo. Los aceites esenciales se extrajeron por hidrodestilación, como fue detallado en el capítulo II.

Preparación de muestras y tratamientos

Las semillas de girasol fueron tostadas a 150 °C en horno (Memert, model 600, Schwabach, Germany) por 30 minutos. Posteriormente, las semillas tostadas fueron glaseadas con 2 % (p/p) de aceite de girasol refinado (Natura, Aceitera General Dehesa, General Cabrera, Córdoba, Argentina). Se prepararon cuatro productos: Semillas de girasol tostadas sin el agregado de aditivos (GT-C), semillas de girasol tostadas con el agregado de antioxidante sintético BHT (GT-BHT), y semillas de girasol tostadas con el agregado de los aceites esenciales: orégano (GT-O) y poleo (GT-P). El BHT y los aceites esenciales de orégano y poleo, (0.02% p/p en el producto final) se agregaron a las semillas de girasol tostadas incluidos en el aceite de glaseado luego del proceso de tostado.

Almacenaje y muestreo

Se envasaron muestras de 100g de cada producto en bolsas plásticas de 27 x 28 cm (Ziploc; SC Johnson & Son, Buenos Aires, Argentina) y se almacenaron a temperatura ambiente (23 °C) en oscuridad, con 60-70% de humedad relativa, durante 35 días. Las muestras fueron extraídas del almacenaje cada 7 días para la evaluación de los cambios en los indicadores químicos y sensoriales. El ensayo fue realizado en tres repeticiones independientes.

Análisis químicos.

Las muestras de semillas de girasol tostadas almacenadas se prensaron (prensa hidráulica de 20 toneladas, Hermes I. Dupraz S.R.L. Córdoba, Argentina) para extraer el aceite, el cual fue sometido a los siguientes análisis químicos: índice de peróxidos (IP), índice de dienos conjugados (DC) e índice de *p*-anisidina (*Ip*-A).

Índice de Peróxidos (IP)

Este indicador fue evaluado de acuerdo al método 28.022 de la AOAC (1995) usando 5 g de aceite de cada muestra. Este método consiste en la reacción en oscuridad de una mezcla de aceite y cloroformo/ácido acético 2:3 (v/v) con solución saturada de yoduro de potasio. El yodo formado fue titulado con 0,1 N Na₂S₂O₃. El IP se expresó como miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite (meqO₂/kg). El índice de peróxidos se calculó con la siguiente formula:

$$IP = \frac{S * N * 1000}{gr\ muestra}$$

donde S es el volumen de Na₂S₂O₃ utilizado en la titulación

N es la normalidad de la solución de Na₂S₂O₃.

Índice de dienos conjugados (DC)

Se disolvieron 0,2 g de cada muestra de aceite en 6 mL de n-hexano. La absorbancia de los dienos conjugados fue medida a 232 nm en un espectrofotómetro (UV-V Espectrofotómetro con arreglos de diodos Hewlett Packard HP 8452 A, USA), usando como blanco n-hexano. El resultado fue informado como el coeficiente de extinción de la muestra E (1%, 1cm) (COI, 2001) según la siguiente fórmula:

$$E_{(1\%,1cm)} = \frac{\left(\frac{A_{(dienos)} \times 6}{dilución}\right)}{(m \times 100)}$$

donde $A_{(dienos)}$ es la absorbancia de la solución diluida

m es el peso aceite en gramos

6 son los ml n-hexano

dilución es (mL solución original aceite-hexano) / (mL solución original a-h + mL n-hexano agregado)

Índice de *p*-anisidina (**Ip-A**)

Este método es utilizado para la medición de los productos de las etapas secundarias de la oxidación lipídica (IUPAC, 1987). La técnica consiste en disolver entre 0.5-4.0 g de la muestra de aceite en 25 mL de n-hexano. La absorbancia de la solución se determinó a 350 nm en un espectrofotómetro (SP-2100UV, UV-V Spectrophotometer Spectrum, Shanghai, China) usando n-hexano como blanco. En un tubo de ensayo se colocaron 5 mL de la solución de aceite y 1 mL de solución de *p*-anisidina en ácido acético (0,25 g *p*-anisidina, BDH Laboratory Reagents, Poole, U.K., en 100 mL de ácido acético glacial). Luego de 10 minutos de reacción se midió la absorbancia de esta solución a 350 nm utilizando como blanco una mezcla de 5 mL de n-hexano y 1 mL de la solución de *p*-anisidina. El índice de *p*-anisidina se calculó por la siguiente fórmula:

$$Ip - A = 25 \times \left(\frac{1,2 A_s - A_b (p-anisidina)}{m}\right)$$

donde A_s es la absorbancia de la solución de aceite y n-hexano después de la reacción con la solución de *p*-anisidina

$A_b (p-anisidina)$ es la absorbancia de la solución de aceite y n-hexano, y m = masa en gramos del aceite.

Métodos sensoriales

Aceptabilidad de consumidores

Las muestras de cada producto (GT-C, GT-BHT, GT-O y GT-P) sin almacenaje (tiempo 0) se presentaron a 100 jueces consumidores para evaluar el efecto de la adición de los aceites esenciales de orégano y poleo en la aceptabilidad de los productos. Dichos consumidores (de Córdoba, Argentina) se reclutaron de acuerdo a los siguientes criterios: edad entre 18 y 65, no fumadores, personas sin alergias a alimentos, y personas que consumen girasol tostado y/o productos de girasol al menos una vez a la semana. Las muestras (3 g) se colocaron en envases plásticos codificados con números al azar de 3 dígitos, y fueron presentadas a los consumidores en orden al azar durante el día de análisis, junto con un vaso con agua y servilletas de papel, en una bandeja de plástico. Se indicó a los jueces consumir la muestra completa y luego enjuagarse la cavidad bucal con agua entre cada muestra para minimizar el efecto residual. Cada juez debió marcar con una cruz en la planilla de la prueba indicando su percepción de cada muestra. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos, desde “1 = me disgusta extremadamente” hasta “9 = me gusta extremadamente” para evaluar la aceptabilidad de color, olor, sabor y textura de las muestras (Peryam y Pilgrim, 1957; Nepote *et al.*, 2009).

Análisis descriptivo

Sobre las muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C, GT-BHT, GT-O y GT-P) tomadas en los diferentes tiempos del almacenamiento se evaluaron los atributos sensoriales descriptivos utilizando un panel de 10 jueces entrenados (8 mujeres y 2 hombres). Todos los jueces tenían 6 años de experiencia en la evaluación de productos similares (girasol y productos de maní) y fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios: personas entre 18 y 64 años de edad, con dentición natural, sin alergias a los alimentos, no fumadores, disponibles para todas las sesiones, interesadas en participar y capaces de comunicar verbalmente las observaciones relacionadas con el producto. Para la selección de los jueces se realizó una prueba de detección de atributos para el análisis descriptivo; todos mostraron una puntuación perfecta en dicha prueba y tuvieron capacidad de identificar 5 de 7 sabores encontrados comúnmente en los alimentos (Meilgaard *et al.*, 2010).

Los jueces fueron entrenados y calibrados en 8 sesiones de 2 horas cada una. Para el entrenamiento y la evaluación de las muestras se usó un método de análisis descriptivo híbrido entre el análisis descriptivo cuantitativo (QDA, Tragon Corp., Redwood City, California, EE.UU.) y el método Spectrum TM (Sensory Spectrum, Inc., Chatham, N.J., EE.UU.), utilizado en trabajos previos en productos de maní (Nepote *et al.* 2006a, b, 2009). Para la evaluación de los atributos de las muestras se utilizó una escala lineal no estructurada de 150 mm (0-150). Durante las sesiones de entrenamiento, se desarrolló una lista de definiciones y referencias para cada atributo (Tablas 3.1 y 3.2). Además, se definió y evaluó una muestra de referencia “*warm-up*”, la cual consistió en semillas de girasol tostado en las mismas condiciones definidas para los productos elaborados.

Tabla 3.1. Definición de atributos utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas.

Atributo	Definición
<i>Apariencia</i>	
<i>Color marrón</i>	Apariencia asociada al color marrón.
<i>Rugosidad</i>	Apariencia asociada con una superficie irregular, despareja.
<i>Brillo</i>	Cantidad de luz reflejada por la superficie.
<i>Sabor</i>	
<i>Girasol tostado</i>	Sabor y aroma asociado con un girasol tostado en un punto medio.
<i>Girasol oxidado</i>	Sabor y aroma asociado con aceite/grasa rancia o vieja.
<i>Cartón</i>	Sabor y aroma asociado a cartón húmedo.
<i>Esencia</i>	Sabor y aroma asociado a aceite esencial de orégano y poleo
<i>Gusto</i>	
<i>Dulce</i>	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución sacarosa.
<i>Salado</i>	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución salada como la de cloruro de sodio.
<i>Amargo</i>	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución amarga como la cafeína.
<i>Ácido</i>	El gusto percibido en la lengua asociado a un agente ácido como el ácido cítrico.
<i>Factor de sensación</i>	
<i>Astringencia</i>	Sensación de sequedad en boca y lengua.
<i>Textura</i>	
<i>Crujiente</i>	Magnitud de sonido generado al masticar con los molares.
<i>Dureza</i>	Fuerza necesaria para comprimir y romper un alimento con los molares.

Al finalizar el entrenamiento cada juez estuvo capacitado para describir la intensidad de los atributos previamente establecidos de los productos en la escala (0 a 150). En la Tabla 3.2 se muestran las intensidades asignadas a las referencias y a la muestra "warm up".

Tabla 3.2. Intensidades de referencias estándares y muestra “warm up” utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas.

Atributos	Referencias estándares	Intensidad de atributos (escala 0-150 mm)	Intensidad “warm up”
Color marrón	Poroto ¹	10	45
	Café ²	120	
Rugosidad	Copos de maíz ³	110	18
Brillo	Poroto ¹	35	17
Sabor girasol tostado	Girasol tostado medio ⁴	44	60
Sabor oxidado	Girasol oxidado ⁵	100	4
Sabor cartón	Cartón	30	9
Sabor esencia orégano	Aceite esencial de orégano 0,02% p/p en granos de girasol tostados	40	0
Sabor esencia poleo	Aceite esencial de poleo 0,02% p/p en granos de girasol tostados	30	0
Gusto dulce	Glucosa		17
	2%	20	
	5%	50	
	10%	100	

Tabla 3.2 (continuación). Intensidades de referencias estándares y muestra “*warm up*” utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas.

Atributos	Referencias estándares	Intensidad de atributos (escala 0-150 mm)	Intensidad “<i>warm up</i>”
Gusto salado	Cloruro de sodio		8
	0.2%	25	
	0.35%	50	
	0.5%	85	
Gusto amargo	Cafeína		15
	0.05%	20	
	0.08%	50	
	0.15%	100	
Gusto ácido	Ácido cítrico		3
	0.05%	20	
	0.08%	50	
	0.15%	100	
Astringencia	Té ⁶	34	30
Crujiente	Copo de maíz ³	110	30
Dureza	Almendra ⁷	70	40

¹ Porotos obtenidos comercialmente en “Grand.iet”, provincia de Córdoba, Argentina.

² Café Nescafé® clásico sabor intenso elaborado por Nestlé Brasil Ltda. Importado y fraccionado por Nestlé Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina.

³ Copos de maíz “Granix”, elaborado en la Provincia de Buenos Aires, República Argentina.

⁴ Girasol pelado tostado. El grado de tostado fue a punto medio.

⁵ Girasol pelado tostado que fue almacenado durante 126 días a 40°C.

⁶ Té Taragüí elaborado por Establecimiento Las Marías. Gdor Virasoro, Corrientes, Argentina.

⁷ Almendras obtenidas comercialmente en “Grandiet”, Córdoba, Argentina.

La evaluación de las muestras de estudio se realizó de manera individual en boxes aislados e iluminados por medio de lámparas fluorescentes como se observa en la Figura 3.1. Para cada sesión de evaluación y para cada juez se prepararon bandejas, con las muestras a ser evaluadas (5 g) en recipientes plásticos, un vaso de agua para enjuague, una muestra de “warm-up”, las referencias estándares y una planilla con el listado de los atributos con sus definiciones y las intensidades de las referencias y el “warm-up”. Las muestras fueron codificadas con número de tres dígitos y fueron presentadas al azar. Los resultados de las evaluaciones se registraron utilizando el software SiGeA V1.0 desarrollado por la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Universidad Nacional de Córdoba).



Figura. 3.1 Box para evaluación sensorial. Sala sensorial ICTA – UNC.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron utilizando el software InfoStat, versión 2012p (Di Rienzo *et al.*, 2012). Para cada variable química y sensorial evaluada en los productos se calcularon promedios y desviaciones estándar. Se realizó análisis de la varianza ($\alpha = 0,05$) y la prueba DGC para encontrar diferencias significativas entre los promedios. Se utilizaron ecuaciones de regresión lineal simple para determinar el efecto de la variable independiente (tiempo de almacenamiento) sobre los parámetros químicos y sensoriales. Para el análisis de regresión se utilizó un modelo lineal simple: $y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde 'y' fue la

variable dependiente (indicadores químicos y atributos sensoriales); β_0 fue una constante que es igual al valor de la 'y' cuando el valor de 'X' = 0; β_1 es el coeficiente de 'X', 'X' es la variable independiente (tiempo). Los análisis de correlación se realizaron empleando el coeficiente de Pearson con el fin de obtener las asociaciones entre las variables químicas y sensoriales del estudio de almacenamiento. El análisis de componentes principales (ACP) (Johnson y Wichern, 2007) se realizó con el propósito de explorar las asociaciones entre las variables sensoriales y químicas de los productos de semillas de girasol tostadas durante el almacenaje, utilizando la matriz de correlación de los datos estandarizados (normalizados) de los indicadores químicos (IP, DC e Ip-A) y los atributos sensoriales (oxidado, cartón, girasol tostado y el sabor del aceite esencial) de los productos elaborados.

Resultados y Discusión

En el capítulo II se determinó la composición de los aceites esenciales de orégano y poleo. Además, se observó que ambos aceites esenciales presentaron actividad antioxidante y actividad anti-lipasa. Y se concluyó que el mayor contenido de compuestos fenólicos en el aceite esencial de orégano se relacionó con una mayor actividad secuestrante del radical libre DPPH y actividad anti-lipasa. Con estos antecedentes se espera que estos aceites esenciales presenten actividad conservando las propiedades químicas y sensoriales en el producto de girasol tostado.

Aceptabilidad de los productos de girasol tostado

En la Tabla 3.3 se presentan los promedios de la aceptabilidad de consumidores en cuanto al color, olor, sabor, textura, y aceptabilidad general para los productos de girasol tostado: GT-C, GT-BHT, GT-O y GT-P. Todas las muestras tuvieron respuestas de los consumidores entre 5 (ni me gusta ni me disgusta) y 6.5 (me gusta ligeramente) en una escala hedónica de 9 puntos para aceptabilidad de color, olor, sabor, textura y general. Las muestras no se diferenciaron en aceptabilidad de color y textura. La aceptabilidad de olor, sabor y general fueron mayores en GT-C y GT-BHT que en las muestras con aceites esenciales GT-O y GT-P. Los productos con aceites esenciales (GT-O y GT-P) no se diferenciaron significativamente en su aceptabilidad. En consecuencia, el agregado de estos aceites esenciales afectó a la aceptabilidad de los productos de girasol tostado, mientras que el agregado de BHT no tuvo efecto significativo. Sin embargo, como los valores de aceptabilidad fueron todos superiores a 5 (ni me gusta ni me disgusta) se puede considerar que los productos con aceites esenciales no fueron rechazados por los consumidores (Grosso y Resurreccion, 2002).

Tabla 3.3. Promedios y desviaciones estándar (n = 100) de la aceptabilidad de consumidores (color, olor, sabor, textura y aceptabilidad general) en una escala hedónica de 9 puntos en los productos de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)

Variable	GT-C*	GT-BHT*	GT-P*	GT-O*
Color	5.8627±0.1207	5.9257±0.1228	5.7451±0.1129	5.7941±0.1118
Olor	6.1078±0.1238 a	6.3748±0.1168 a	5.4314±0.1281 b	5.6176±0.1501 b
Sabor	6.5294±0.1312 a	6.3944±0.1245 a	5.5098±0.1699 b	5.4314±0.1862 b
Textura	6.4314±0.1258	6.1249±0.1486	6.0196±0.1262	6.1078±0.1343
General	6.2328±0.0927 a	6.5248±0.1261 a	5.6765±0.0977 b	5.7377±0.1146 b

* Promedio ± error estándar seguidos por letras diferentes en cada fila muestran diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (ANOVA y DGC test, $\alpha = 0.05$).

Análisis químicos y sensoriales de los productos de girasol tostado durante el almacenaje

Análisis químicos

Los cambios de los indicadores químicos IP, DC y I_p -A, durante el almacenaje de los productos elaborados se muestran en las Figuras 3.2-3.4. Estas variables se incrementaron durante el almacenaje y se observaron diferencias significativas entre las muestras. Al final del almacenaje, GT-C tuvo el valor más alto y GT-BHT el menor valor de IP, DC y I_p -A. Las muestras con aceites esenciales (GT-O y L-GT) tuvieron valores de IP, DC y I_p -A intermedios, sin diferencias significativas entre ellos en su valores de IP y DC. La muestra GT-P presentó valores superiores de I_p -A que GT-O después del día 28 almacenamiento.

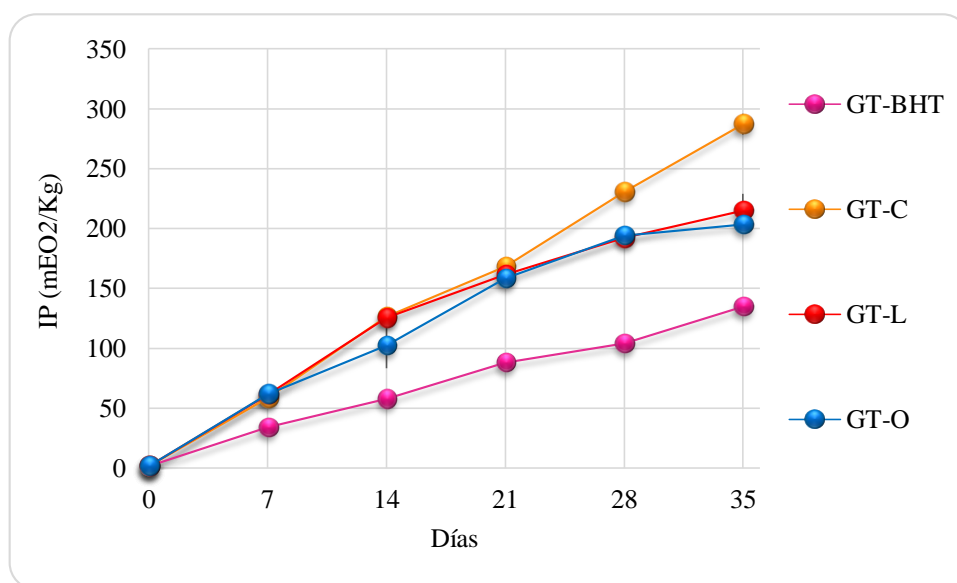


Figura 3.2 Índice de peróxidos (IP) de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)

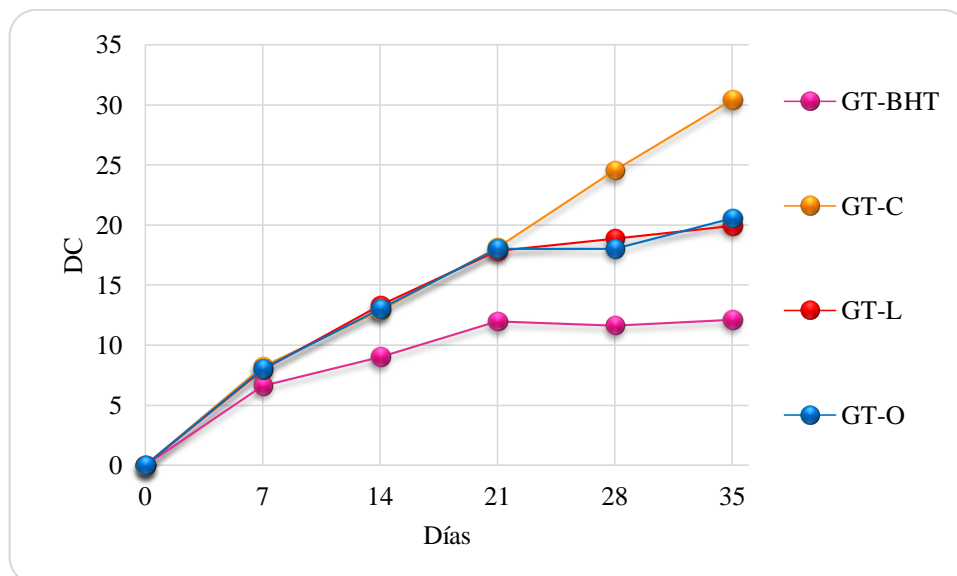


Figura 3.3 Índice de dienos conjugados (DC) de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)

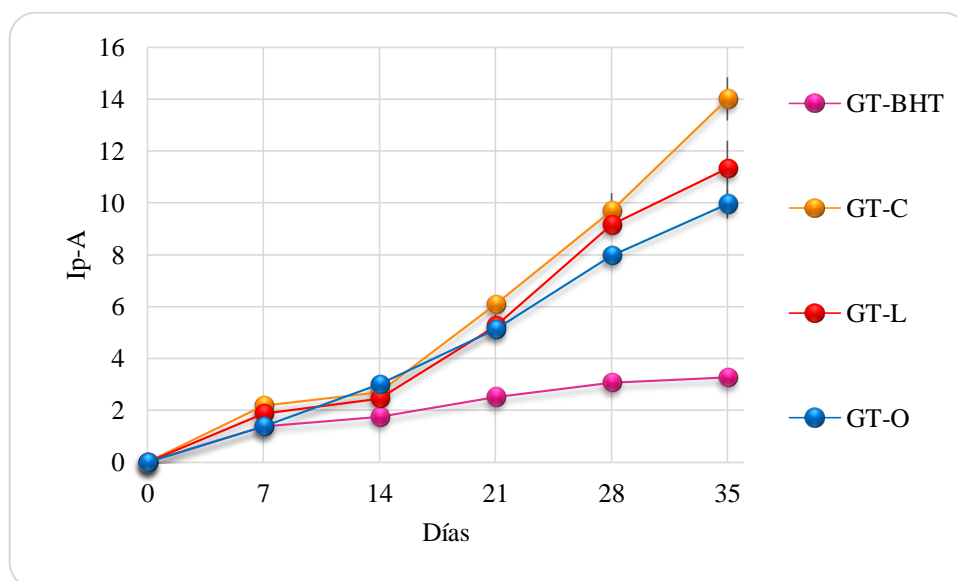


Figura 3.4 Índice de p-anisidina (I_p -A) de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).

Según estos resultados, se puede observar que la adición de BHT previene significativamente la oxidación lipídica del girasol tostado durante su almacenaje y que los aceites esenciales de orégano y poleo también aportan protección aunque en menor medida que el BHT. En otros trabajos se observó el efecto antioxidante del aceite esencial de orégano agregado a alimentos tales como aceite de oliva (Asensio *et al.*, 2011, 2012), productos de maní (Olmedo *et al.*, 2009, 2012) y queso crema (Olmedo *et al.*, 2013).

Análisis descriptivo

Los resultados de la intensidad de los atributos evaluados en el análisis descriptivo de los productos de girasol tostado antes de su almacenaje (día “cero” del almacenaje) se muestran en la Tabla 3.4. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras en los atributos sabor a aceite esencial, girasol tostado y amargo. El agregado de los aceites esenciales de orégano y poleo a las semillas de girasol tostadas afectó la intensidad en los atributos sabor a girasol tostado y sabor amargo en las muestras GT-O y GT-P mostrando menor intensidad en el atributo sabor a girasol tostado y mayor intensidad en el atributo sabor amargo con respecto a las muestras GT-C y GT-BHT. Las muestras no presentaron diferencias significativas en intensidad de los demás atributos. Olmedo *et al.* (2009) encontraron similar comportamiento en maní frito salado saborizados con aceite esencial de orégano y aceite de oliva. El producto con el aceite esencial de orégano tuvo menor valor de intensidad en el atributo maní tostado y mayor intensidad en el atributo sabor amargo que aquellas muestras que no contenían aceite esencial de orégano.

Tabla 3.4. Promedios y desviación estándar (n=3) de los atributos sensoriales en las muestras de girasol tostado en el día cero de almacenaje: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).

Atributos	GT-BHT	GT-C	GT-P	GT-O
Color	54.04±1.08	54.13 ± 0.54	54.17 ± 0.64	53.79 ± 0.79
Rugosidad	14.00±0.33	13.84 ± 0.51	13.92 ± 0.80	14.33 ± 0.52
Brillo	23.29±0.61	22.09 ± 1.14	22.67 ± 1.61	21.92 ± 1.00
Sabor a orégano	0.00±0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	24.07 ± 0.32 b
Sabor a Lippia	0.00±0.00 a	0.00 ± 0.00 a	19.13 ± 1.50 b	0.00 ± 0.00 a
Sabor a girasol tostado	53.84±3.13 a	55.46 ± 0.81 a	51.50 ± 1.11 b	48.54 ± 2.35 b
Sabor a oxidado	6.54±0.26	6.71 ± 0.71	6.13 ± 0.63	5.46 ± 0.38
Sabor a cartón	16.71±0.69	16.88 ± 0.63	17.42 ± 0.69	15.13 ± 1.60
Salado	7.84±0.19	7.42 ± 0.07	7.75 ± 0.33	7.63 ± 0.63
Dulce	8.51±0.38	8.13 ± 0.13	7.79 ± 0.64	8.25 ± 0.76

Tabla 3.4 (continuación). Promedios y desviación estándar (n=3) de los atributos sensoriales en las muestras de girasol tostado en el día cero de almacenaje: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).

Atributos	GT-BHT	GT-C	GT-P	GT-O
Ácido	6.96±0.52	7.08 ± 0.38	7.17 ± 0.31	7.75 ± 0.22
Amargo	17.50±0.33 b	17.59 ± 0.61 b	19.29 ± 0.36 a	18.96 ± 0.69 a
Astringencia	32.09±0.64	32.79 ± 0.92	33.67 ± 0.69	33.09 ± 1.30
Dureza	18.67±0.50	19.34 ± 0.71	19.00 ± 0.45	18.88 ± 1.19
Crujiente	21.71±0.88	22.5 ± 0.21	23.21 ± 0.88	22.58 ± 0.14

* Promedio ± desviación estándar seguidos por letras diferentes letras en cada fila muestran diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (ANOVA y DGC test, $\alpha = 0.05$).

En la Figuras 3.4-3.8 se presentan los cambios en los valores de intensidad de los atributos sabor a oxidado, cartón, girasol tostado, y sabores de aceites esenciales en las muestras durante el almacenamiento. El resto de los atributos no se modificaron significativamente en las muestras durante el almacenaje. Todas las muestras mostraron un incremento en la intensidad de los atributos sabor a oxidado (Figura 3.5) y a cartón (Figura 3.6) durante el almacenaje. Al final del almacenaje, la muestra GT-C mostró los mayores valores de estos atributos. Se detectaron diferencias significativas en estos atributos entre las muestras después de los días 14 para el sabor a oxidado y después de los 21 días para el sabor a cartón. Los resultados indican que el agregado de aceites esenciales protege al producto inhibiendo la formación de sabores no deseable que provienen del proceso secundario de la oxidación de lípidos. Esta inhibición de la formación de sabores indeseados se condice con los resultados obtenidos en los indicadores químicos de oxidación (IP, DC, *Ip-A*). Otros investigadores también informaron de un aumento en la intensidad de estos atributos (sabor oxidado y cartón) durante el almacenaje de maní y productos de maní (Riveros *et al.*, 2010; Olmedo *et al.*, 2012).

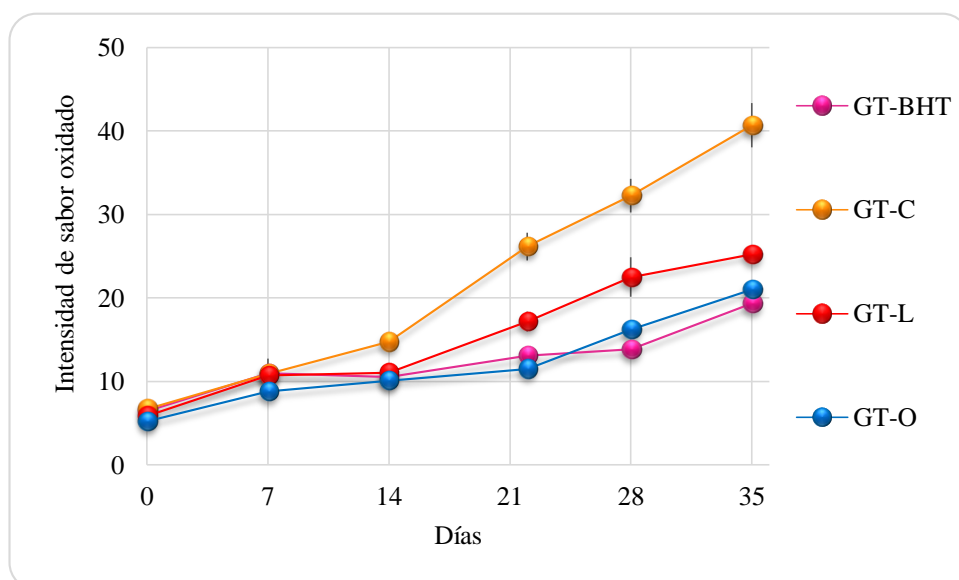


Figura 3.5 Intensidad de sabor a oxidado de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje.

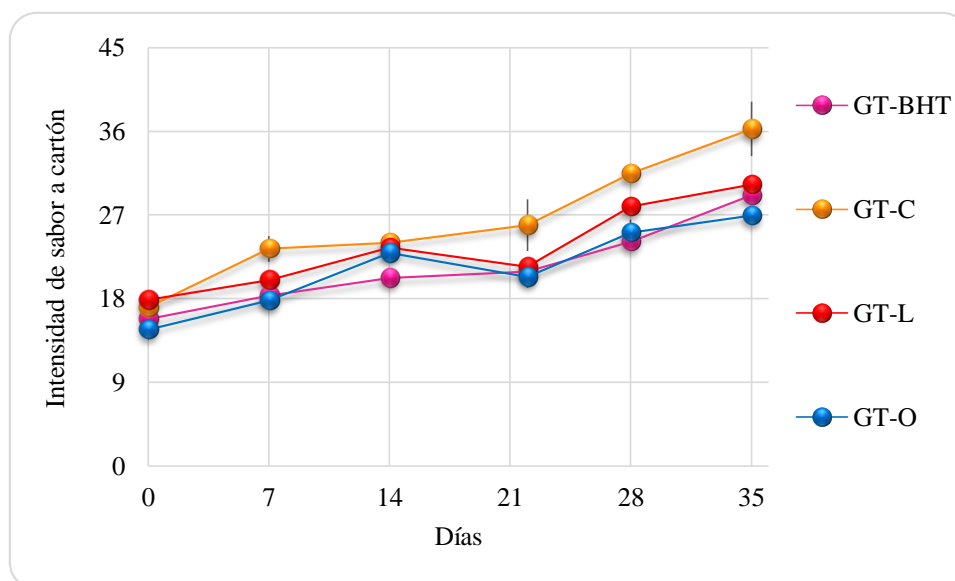


Figura 3.6 Intensidad de sabor a cartón de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje.

El sabor a girasol tostado es considerado un atributo sensorial positivo. En todos los productos, el valor de la intensidad de sabor a girasol tostado disminuyó durante el almacenaje, sin embargo la muestra GT-C fue la que presentó mayor disminución de este atributo (Figura 3.7). La disminución de este atributo durante el almacenamiento se considera un efecto negativo en la calidad sensorial del producto (Olmedo, et al., 2012, Riveros, et al., 2010). Al final del almacenaje (35 días) se observó que la muestra GT-C presentó la menor intensidad (38.58) y la muestra GT-BHT la mayor intensidad (48.50), mientras que las muestras con aceites esenciales (GT-O y GT-P) presentaron intensidades intermedias cercanas a GT-BHT (46.00 y 45.75, respectivamente) para el atributo girasol tostado. Entre los días 0 y 28 del almacenaje no se observaron diferencias significativas entre las muestras GT-BHT y GT-O. Es decir que la presencia de BHT y los aceites esenciales previene la pérdida del atributo sabor a girasol tostado durante el almacenaje de las muestras.

El atributo sabor a aceite esencial también disminuyó en las muestras de GT-O y GT-P durante el almacenaje (Figura 3.8). GT-O mostró durante el almacenaje mayores valores que la muestra GT-P. Olmedo *et al.* (2012) también encontraron que el atributo sabor a aceite esencial disminuye durante el almacenaje en los productos de maní con aceites esenciales.

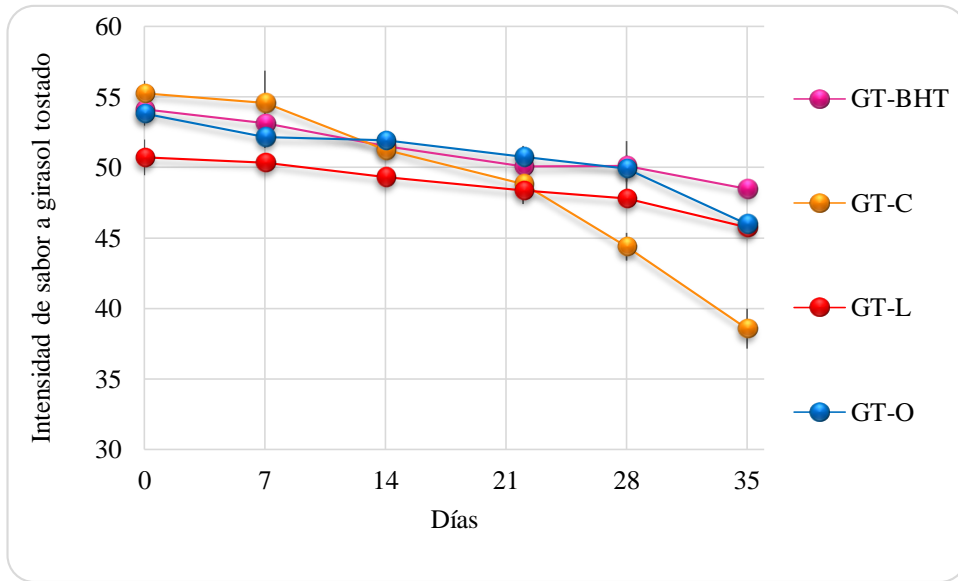


Figura 3.7 Intensidad de sabor a girasol tostado de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje.

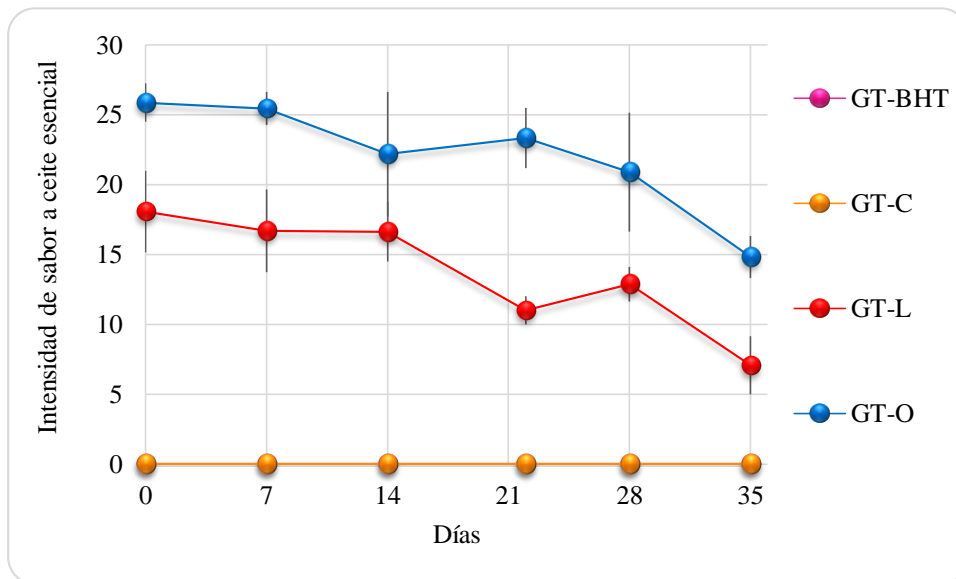


Figura 3.8 Intensidad de sabor a aceite esencial de las diferentes muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P), durante el almacenaje.

Análisis de regresión lineal

En la Tabla 3.5 se presentan las ecuaciones de predicción para las variables químicas (IP, DC, I_p -A) en función del tiempo de almacenaje de las muestras de girasol tostado, obtenidas mediante el análisis de regresión lineal simple. Todos los coeficientes de regresión lineal simple fueron significativos ($p < 0.05$) y se obtuvieron elevados coeficiente de determinación ($R^2 > 0.60$), lo cual indica buen ajuste de los datos con este modelo. Las pendientes (β_1) de las ecuaciones lineales de predicción pueden considerarse indicadores de la tendencia de deterioro de cada tratamiento. Se observaron diferencias significativas entre las pendientes (β_1) de los diferentes tratamientos para las variables químicas y sensoriales.

En cuanto a los indicadores químicos, se observó que la muestra GT-BHT mostró la mayor estabilidad química, presentando menores β_1 en IP, DC e I_p -A, mientras que la muestra GT-C exhibió los valores de β_1 más altos. Las muestras GT-O y GT-P tuvieron valores de β_1 para los indicadores químicos intermedios entre los valores de β_1 para las muestras GT-C y GT-BHT.

Tabla 3.5. Análisis de regresión lineal simple para las variables químicas: índice de peróxidos (IP), dienos conjugados (DC) é índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) durante el almacenamiento de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)

Coeficientes de regresión lineal simple*					
Variable dependiente	Muestras	β_0	β_1	**	R ²
IP	GT-BHT	5.0665 ± 1.8142	3.6810 ± 0.1347	c	0.9931
	GT-C	3.2286 ± 2.2271	8.0547 ± 0.3062	a	0.9929
	GT-P	18.7738 ± 0.7153	6.0881 ± 0.3050	b	0.9604
	GT-O	15.1162 ± 1.5272	5.9564 ± 1.0160	b	0.9168
DC	GT-BHT	2.8689 ± 0.0759	0.3220 ± 0.0060	c	0.8057
	GT-C	0.8965 ± 0.0896	0.8374 ± 0.0117	a	0.9918
	GT-P	3.0891 ± 0.1833	0.5600 ± 0.0173	b	0.8993
	GT-O	2.9891 ± 0.1721	0.5629 ± 0.0113	b	0.9083
<i>Ip</i> -A	GT-BHT	0.4064 ± 0.1112	0.0902 ± 0.0060	d	0.9289
	GT-C	-1.0802 ± 0.2045	0.3882 ± 0.0223	a	0.9326
	GT-P	-0.8075 ± 0.1193	0.3291 ± 0.0246	b	0.9400
	GT-O	-0.5594 ± 0.0780	0.2903 ± 0.0102	c	0.9758

* Ecuaciones de regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde Y = variable dependiente: indicadores químicos (IP, DC e *Ip*-A) y atributos sensoriales (sabores a aceite esencial, a girasol tostado, a cartón y a oxidado) y X variable independiente (días)

** ANOVA y test DGC: valores de pendiente (β_1) de cada variable seguidos por letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0,05$)

En la Tabla 3.6 se muestran las ecuaciones de predicción para los atributos sensoriales (sabor a oxidado, a cartón, a girasol tostado y a aceite esencial). Las pendientes de los atributos sabor oxidado y cartón obtenidas a partir del análisis de regresión lineal fueron superiores en la muestra GT-C (0.9973 y 0.4938, respectivamente) que en las otras muestras. La menor pendiente observada para el atributo de sabor oxidado correspondió a la muestra GT-BHT (0.3062), seguida por las muestras GT-O (0.4134) y GT-P (0.5615), mostrando diferencias significativas entre ellas. Las muestras GT-BHT (0.3430), GT-P, (0.3360) y GT-O (0.3255) no tuvieron diferencias significativas en las pendientes del atributo cartón. Los compuestos volátiles que causan olor y sabor oxidado/rancio se producen cuando el proceso de la oxidación de lípidos se encuentra en una etapa avanzada. Estos “malos sabores” están relacionados con el atributo oxidado (Grosso y Resurreccion, 2002; Frankel, 2005; Nepote *et al.*, 2009). Los resultados indican que la adición de los aceites esenciales mostró una protección en el producto inhibiendo formación de sabores y olores no deseables provenientes del proceso de oxidación secundaria de los lípidos. Otros trabajos también han informado un aumento en la intensidad de estos atributos (sabor oxidado y cartón) en productos alimenticios de alto contenido lipídico, tales como productos de maní (Olmedo *et al.*, 2008; Riveros *et al.*, 2009, 2010) y también se observó el incremento en la intensidad del sabor a oxidado en salame (Larrauri *et al.*, 2013) y aceite de oliva (Asensio *et al.*, 2011, 2012).

El proceso de tostado es un importante tratamiento previo utilizado antes del consumo que favorece el desarrollo de aromas o sabores agradables como el sabor a nuez o a tostado (Bozan y Temelli, 2008) y que además permite eliminar microorganismos mejorando la seguridad alimentaria. Por otra parte, para el caso de las semillas oleaginosas, se suele utilizar un proceso de calentamiento previo que permite facilitar la extracción de aceite. Los tratamientos térmicos producen algunos cambios en las propiedades físicas, químicas y nutricionales de las semillas y los aceites extraídos (Veldsink *et al.*, 1999). El sabor a girasol tostado es considerado un atributo sensorial positivo y la disminución de este atributo durante el almacenaje se considera un efecto negativo en la calidad sensorial del producto (Nepote *et al.*, 2006b; Olmedo *et al.*, 2008, 2009, 2012). En todos los productos, los valores de intensidad de sabor de girasol tostado disminuyeron durante el almacenamiento (Figura 3.7). Las pendientes obtenidas del análisis de regresión lineal de la Tabla 3.6 indicaron que las muestras con agregado de antioxidante y aceites esenciales

(GT-BHT, GT-O y GT-P) presentaron menores disminuciones del atributo sabor a girasol tostado en comparación con el control (GT-C).

La intensidad del atributo sabor a aceite esencial también disminuyó en las muestras GT-O y GT-P durante el almacenaje (Figura 3.8), por este motivo, se observaron pendientes negativas en ambos tratamientos. La muestra GT-O tuvo mayor intensidad en este atributo que la muestra GT-P durante la totalidad del almacenaje, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las pendientes obtenidas mediante el modelo de regresión lineal (Tabla 3.6). Asensio *et al.* (2012) encontró que la intensidad de sabor orégano en muestras de aceite de oliva virgen disminuye significativamente durante el almacenaje como se demuestra en este capítulo. En otros trabajos también se observó la disminución en la intensidad de sabor a diferentes aceites esenciales (aceites esenciales de orégano, romero, laurel, aguaribay y cedrón) en productos adicionados por estos aceites esenciales (Olmedo *et al.*, 2008, 2012).

Tabla 3.6. Análisis de regresión lineal simple para los atributos sensoriales (sabor a aceite esencial, sabor a girasol tostado, sabor a cartón y sabor a oxidado) durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P)

Coeficientes de regresión lineal simple*					
Variable dependiente	Muestras	β_0	β_1	**	R ²
Sabor a aceite esencial	GT-P	18.9124 ± 2.6192	-0.2939 ± 0.0794	a	0.6970
	GT-O	26.9001 ± 0.6317	-0.2723 ± 0.0490	a	0.5670
Sabor a girasol tostado	GT-BHT	54.0250 ± 0.9975	-0.1577 ± 0.0141	a	0.7961
	GT-C	57.1146 ± 0.5925	-0.4702 ± 0.0330	b	0.9036
	GT-P	51.1108 ± 0.7529	-0.1353 ± 0.0189	a	0.8268
	GT-O	54.1214 ± 0.5407	-0.1898 ± 0.0157	a	0.8297
Sabor a cartón	GT-BHT	15.3511 ± 0.6050	0.3430 ± 0.0209	b	0.9113
	GT-C	17.6309 ± 0.4035	0.4938 ± 0.0285	a	0.8879
	GT-P	17.5564 ± 0.4194	0.3360 ± 0.0129	b	0.8491
	GT-O	15.5446 ± 0.5891	0.3255 ± 0.0584	b	0.8340
Sabor a oxidado	GT-BHT	6.9680 ± 0.1650	0.3062 ± 0.0120	d	0.8770
	GT-C	4.2890 ± 1.1092	0.9973 ± 0.0417	a	0.9664
	GT-P	5.5117 ± 0.7576	0.5615 ± 0.0211	b	0.9403
	GT-O	4.8309 ± 0.2683	0.4134 ± 0.0273	c	0.9292

* Ecuaciones de regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde Y = variable dependiente: indicadores químicos (IP, DC e Ip-A) y atributos sensoriales (sabores a aceite esencial, a girasol tostado, a cartón y a oxidado) y X variable independiente (días)

** ANOVA y test DGC: valores de pendiente (β_1) de cada variable seguidos por letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0,05$)

Análisis de componentes principales y correlación

El análisis de CPA es una técnica que reduce las dimensiones de un conjunto de datos. Es posible demostrar diferencias entre los diversos objetos, determinando al mismo tiempo cuales variables están principalmente involucradas. El Biplot obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) de CPA realizado con los datos de las variables químicas y sensoriales durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado (GT-C, GT-BHT, GT-O y GT-P) se muestra en la Figura 3.9. Además, en la Tabla 3.7 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables estudiadas.

Las dos primeras CP explican el 85,9% de la variabilidad total de las muestras durante el estudio de almacenamiento (Figura 3.9). Este porcentaje se considera aceptable para establecer correlaciones entre variables. La dispersión de los puntos indica alta variabilidad entre las muestras. Los indicadores químicos de oxidación lipídica (IP, DC e Ip-A) evaluados sobre las semillas de girasol tostadas durante el almacenaje se asociaron positivamente entre ellos y con los atributos sensoriales negativos de análisis descriptivo (oxidado y sabores de cartón) mostrando coeficientes de correlación de Pearson positivos superior a 0,86 (Tabla 3.7). Además, estas dos últimas variables se asociaron negativamente con el atributo positivo, sabor girasol tostado (coeficientes de correlación negativos entre 0,83 a 0,89). El atributo sabor a girasol tostado se puede considerar un atributo positivo en los productos, mientras que los sabores a oxidado y a cartón son atributos negativos relacionados con la oxidación de los lípidos y la rancidez. La muestra GT-C se asoció a los indicadores de oxidación químicos y a los atributos negativos, mientras que la muestra GT-BHT se encontró asociada al atributo positivo de sabor a girasol tostado. Las muestras con aceites esenciales se ubicaron en zonas intermedias en el Biplot, y la muestra GT-O se encontró más asociada a la muestra GT-BHT, mientras que la muestra GT-P se encontró más asociada al control (GT-C).

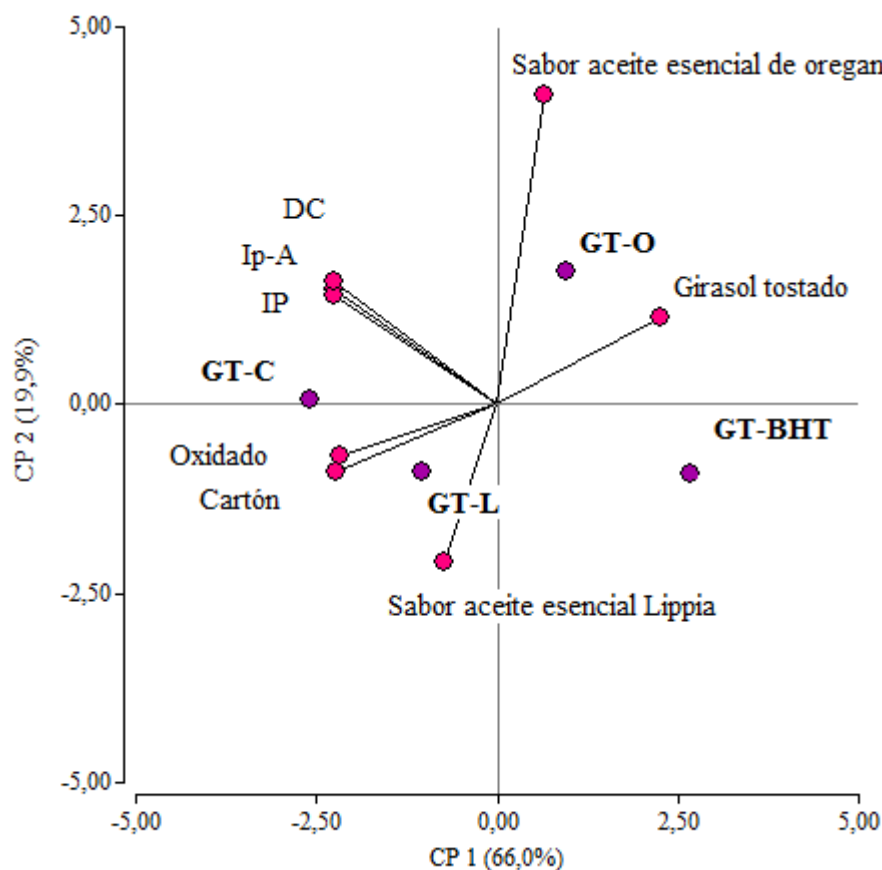


Figura 3.9 Biplot de las primera y segunda componentes principales del análisis de componentes principales. Variables: indicadores químicos (índice de peróxidos: IP, dienos conjugados: DC, índice de p-anisidina, Ip-A) y los atributos sensoriales (sabores a oxidado, cartón, girasol tostado y a aceite esencial), del estudio de almacenaje de muestras de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).

Otros autores encontraron correlaciones similares entre las variables sensoriales e indicadores químicos de oxidación de productos soja y maní (Jáuregui *et al.*, 2012; Olmedo *et al.*, 2012). Otros autores han analizado la actividad antioxidante de diferentes aceites esenciales sobre otros productos alimenticios y también han implementado el análisis de componentes principales. Asensio *et al.* (2011) estudiaron el efecto antioxidante del aceite esencial de orégano en aceite de oliva. En ese trabajo, los indicadores de oxidación lipídica (DC y Ip-A) se relacionaron negativamente con las muestras sin el agregado de los aceites esenciales. Olmedo *et al.* (2013) se plantearon estudiar el efecto de los aceites esenciales de orégano y romero aplicados sobre queso crema. Ellos encontraron una relación positiva entre los indicadores químicos de oxidación y atributos sensoriales negativos, y las muestras con aceites esenciales se relacionan con el sabor del aceite esencial y se relacionan negativamente con los indicadores químicos de oxidación y los atributos sensoriales negativos.

Tabla 3.7. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables químicas y atributos sensoriales del estudio del almacenaje de los productos de girasol tostado: control (GT-C), con BHT (GT-BHT), con aceite esencial de orégano (GT-O) y con aceite esencial de poleo (GT-P).

	IP	DC	<i>Ip</i> -A	Oxi- dado	Cartón	Girasol tostado	AE de orégano
DC	0.98**						
<i>Ip</i> -A	0.94**	0.92**					
Oxidado	0.89**	0.88**	0.90**				
Cartón	0.89**	0.87**	0.86**	0.92**			
Girasol tos- tado	-0.85**	-0.85**	-0.86**	-	-0.83**		
AE de orégano	-0.04	-0.04	-0.04	0.89**	-0.27*	-0.26*	0.20*
AE de poleo	-0.05	-0.08	-0.05	-0.11	-0.06	-0.11	-0.31*

* Coeficiente significativo, $p \leq 0.05$.

** Coeficiente significativo, $p \leq 0.01$.

IP índice de peróxidos, DC: índice de dienos conjugados, *Ip*-A índice de p-anisidina

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo indican que la adición de los aceites esenciales de orégano y poleo contribuye a mejorar la estabilidad de los productos previniendo la oxidación lipídica y el desarrollo de sabores rancios en los productos de girasol tostado. El agregado de los aceites esenciales produce un cambio en las características sensoriales y la generación de un nuevo atributo denominado sabor a aceite esencial. Este agregado modifica la intensidad de dos atributos, se observó aumento del sabor amargo y disminución del sabor a girasol tostado. Los productos con aceites esenciales tienen menor aceptabilidad en comparación con el control, sin embargo estos productos son aceptados por los consumidores. Esta disminución de la aceptabilidad puede deberse al aumento del sabor amargo otorgado por el agregado de los aceites esenciales. La tendencia actual en tecnología de alimentos se orienta al reemplazo de los aditivos sintéticos incorporando aditivos naturales. En base a estos resultados, los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. y *Lippia turbinata* Griseb. pueden ser considerados como aditivos de origen natural para la conservación de alimentos con elevado contenido de lípidos por sus propiedades antioxidantes.

Bibliografía citada

- Alabdulkarim, B., Bakeet, Z. A. N. y Arzoo, S. 2012. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *Journal of King Saud University - Science*. 24. 319-329
- AOAC 1995. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Ed). Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*. 76. 445-S450
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2012. Sensory Attribute Preservation in Extra Virgin Olive Oil with Addition of Oregano Essential Oil as Natural Antioxidant. *Journal of Food Science*. 77. S294-S301
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46. 446-475
- Belitz, H. D., Grosch, W. y Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. (4 Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 1070 pp. pp.
- Bozan, B. y Temelli, F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*. 99. 6354-6359
- Brăţfălean, D., Cristea, V. M., Agachi, P. Ş. y Irimie, D. F. 2008. Improvement of sunflower oil extraction by modelling and simulation. *Revue Roumaine de Chimie*. 53. 881-888
- COI 2001. Método de análisis prueba espectrofotométrica en el ultravioleta En: *International Olive Oil Council (IOOC)* Ed). Madrid. Document COI/T 20/ Doc nº 19/Rev 1. pp.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. y Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58. 1115-1120
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. *InfoStat*.
- Eguchi, Y., Curtis, O. F. y Shetty, K. 1996. Interaction of hyperhydricity-preventing *Pseudomonas* sp. with oregano (*Origanum vulgare*) and selection of high phenolics and rosmarinic acid-producing clonal lines. *Food Biotechnology*. 10. 191-202
- Frankel, E. N. 2005. *Lipid Oxidation*. (2nd Ed). Bridgewater. The Oily Press. pp.
- Grosso, N. R. y Resurreccion, A. V. A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science*. 67. 1530-1537
- Irshaid, F. I., Mansi, K., Bani-Khaled, A. y Aburjia, T. 2012. Hepatoprotective, cardioprotective and nephroprotective actions of essential oil extract of *Artemisia sieberi* in alloxan induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 11. 1227-1234
- IUPAC 1987. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. (7th ed Ed). Oxford, UK. Paquot, C., Hautfenne, A. . Method Number 2.504. pp.
- Jáuregui, M. P., Riveros, C., Nepote, V., Grosso, N. R. y Gayol, M. F. 2012. Chemical and sensory stability of fried-salted soybeans prepared in different vegetable oils. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 89. 1699-1711
- Johnson, R. A. y Wichern, D. W. 2007. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. (6 Ed). New Jersey, USA. Pearson. 773 pp.

- Kris-Etherton, P., Daniels, S. R., Eckel, R. H., Engler, M., Howard, B. V., Krauss, R. M., Lichtenstein, A. H., Sacks, F., St. Jeor, S., Stampfer, M., Grundy, S. M., Appel, L. J., Byers, T., Campos, H., Cooney, G., Denke, M. A., Kennedy, E., Marckmann, P., Pearson, T. A., Riccardi, G., Rudel, L. L., Rudrum, M., Sacks, F., Stein, D. T., Tracy, R. P., Ursin, V., Vogel, R. A., Zock, P. L., Bazzarre, T. L. y Clark, J. 2001. AHA scientific statement: Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health. *Journal of Nutrition*. 131. 1322-1326
- Lante, A., Nardi, T., Zocca, F., Giacomini, A. y Corich, V. 2011. Evaluation of red chicory extract as a natural antioxidant by pure lipid oxidation and yeast oxidative stress response as model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59. 5318-5324
- Larrauri, M., Barrionuevo, M. G., Riveros, C., Mestrallet, M. G., Zunino, M. P., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. y Nepote, V. 2013. Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93. 1751-1757
- Løvaas, E. 1992. A sensitive spectrophotometric method for lipid hydroperoxide determination. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 69. 777-783
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T. y Civille, G. V. 2010. *Sensory Evaluation Techniques*. (4 Ed). Boca Raton, Florida, USA. Taylor & Francis. 416 pp.
- Nepote, V., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2006a. Oxidative stability in fried-salted peanuts elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *International Journal of Food Science and Technology*. 41. 900-909
- Nepote, V., Mestrallet, M. G., Ryan, L., Conci, S. y Grosso, N. R. 2006b. Sensorial and chemical changes in honey roasted peanuts and roasted peanuts stored under different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86. 1057-1063
- Nepote, V., Olmedo, R. H., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science*. 74. S1-S8
- Olmedo, R. H., Nepote, V., Mestrallet, M. G. y 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. H., Asensio, C. M., Nepote, V., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89. 2128-2136
- Olmedo, R. H., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2012. Sensory and chemical stability in coated peanuts with the addition of essential oils and synthetic antioxidants. *Grasas y Aceites*. 63. 5-13
- Olmedo, R. H., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology*. 53. 409-417
- Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J. y Cruz, J. M. 2011. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 12. 50-55
- Peryam, D. R. y Pilgrim, F. J. 1957. Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology*. 9-14
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. y Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology*. 46. 2648-2655

- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A. y Nepote, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science and Technology*. 48. 642-649
- Riveros, C. G., Mestrallet, M. G., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2009. Chemical composition and sensory analysis of peanut pastes elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *Grasas y Aceites*. 60. 388-395
- Riveros, C. G., Mestrallet, M. G., Gayol, M. F., Quiroga, P. R., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2010. Effect of storage on chemical and sensory profiles of peanut pastes prepared with high-oleic and normal peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90. 2694-2699
- Ruberto, G., Tiziana Baratta, M., Sari, M. y Kaâbeche, M. 2002. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 17. 251-254
- Veldsink, J. W., Muuse, B. G., Meijer, M. M. T., Cuperus, F. P., van de Sande, R. L. K. M. y van Putte, K. P. A. M. 1999. Heat pretreatment of oilseeds: effect on oil quality. *Lipid / Fett*. 101. 244-248

Actividad antioxidante del aceite esencial de cuatro especies de orégano argentinas en relación con su composición química

Introducción

Origanum vulgare L. spp *vulgare* es la planta aromática más importante cultivada en la Argentina, no sólo por la superficie (80%), sino también por la demanda de la población (Di Fabio, 2000). Las principales áreas de cultivo se encuentran en la provincia de Mendoza (250 ha) seguido por las provincias Córdoba (113 ha) y San Juan (56 ha). En general, los cultivos de orégano son muy pequeños, ya que el tamaño del 56% de las fincas es de 5 hectáreas y casi el 75% de ellas tienen menos de 10 hectáreas. Las áreas bajo cultivo de *O. vulgare*, en Argentina, son las regiones del centro y el sudoeste (Barreyro *et al.*, 2005; Berzins y Romagnoli, 2005). El orégano comercial de Argentina cultivado en esta área de producción corresponde a cuatro subespecies diferentes identificadas como: *O. vulgare* spp. *Vulgare* (“Compacto”), *O. vulgare* spp. *Virens* (“Cordobés”), *O. × applii* (“Criollo”), y *O. × majoricum* (“Mendocino”) (Barreyro *et al.*, 2005; Di Fabio, 2008). Sin embargo, estas subespecies son pobres en aceite esencial (Russo *et al.*, 1998; Esen *et al.*, 2007). Por lo tanto, ninguna de las subespecies ricas en aceite esencial parece estar presente en la tierra cultivada de Argentina. Sin embargo, la exportación de orégano vegetal de Argentina está en expansión (Campos y Sabsay, 2007).

Las hojas y flores de orégano se utilizan como condimento y saborizante de alimentos frescos y para conservar salsas, y licores debido a las propiedades del sabor amargo del orégano (Torres *et al.*, 2010). Esta planta aromática también tiene beneficios terapéuticos (diaforético, antiséptico, antiespasmódico, y tónico) y se utiliza en muchos países en la medicina alternativa o la medicina homeopática o naturopatía. También se utilizan ampliamente en las industrias farmacéutica y cosmetológica (Souza *et al.*, 2007). Hoy en día, existe una demanda nacional de los productos obtenidos a partir de orégano sin satisfacer, especialmente su aceite esencial, que está estimulando el desarrollo de nuevas áreas edafoclimáticas para

la expansión de la producción agronómica y aumentando el volumen de la cosecha (Asensio *et al.*, 2011).

Los principales componentes identificados en el aceite esencial de *O. vulgare* spp. *vulgare* fueron sesquiterpenos, tales como β -bisaboleno, D germacreno, espatulenol y β -cariofileno, mientras que los monoterpenos fueron representados por terpinen-4-ol, R-terpineol, 1,8-cineol, sabineno, y timol (Sezik *et al.*, 1993; Kula *et al.*, 2007). Las plantas de *O. vulgare* subsp. *virens* producen aceite esencial con linalool, β -cariofileno, R-terpineol, terpinen-4-ol, carvacrol, sabineno y D germacreno como los componentes principales (Sezik *et al.*, 1993; Skoula *et al.*, 1999; Gaspar y Leeke, 2004; Esen *et al.*, 2007). *Origanum* \times *majoricum* Cambess es un híbrido conocido de *O. majorana* L. \times *O. vulgare* L. spp. *virens* (Hoffm. et Link) Ietswaart y también se cultiva en la Argentina. *Origanum* \times *majoricum* tiene un alto rendimiento de aceite esencial cuyos principales componentes son el de *trans* y *cis*-sabineno hidrato, terpinen-4-ol, seguido por sabineno, γ -terpineno y carvacrol (Tabanca *et al.*, 2004; Figuéredo *et al.*, 2005). Otro híbrido que crece en Argentina es *O.* \times *applii* (*O. vulgare* spp. *vulgare* \times *O. majorana*) (Barreyro *et al.*, 2005). Este híbrido, sin embargo, no es homogéneo en su composición de aceite esencial, ya que incluye dos quimiotipos principales: timol y *p*-cimeno (Dellacassa *et al.*, 1994; Rehder *et al.*, 2004). Anteriormente se ha demostrado que el contenido de aceite esencial y las propiedades antioxidantes pueden cambiar dependiendo de las diferencias en el cultivo, origen, estado vegetativo y estación de crecimiento de las plantas (Figuéredo *et al.*, 2005; Kula *et al.*, 2007).

En el capítulo anterior se demostró que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta mejor actividad antioxidante frente al aceite esencial de *L. turbinata*. Y teniendo en cuenta que en Argentina se cultivan cuatro diferentes especies e híbridos de esta variedad, el objetivo de este capítulo es determinar las diferencias entre la composición química y actividad antioxidante de los cuatro diferentes oréganos cultivados en Argentina.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se analizó la composición química del aceite esencial de cuatro especies de orégano: *O. vulgare* spp. *virens* (Hoffm. et Link) letsvaart, *Origanum* × *applii* (Domin) Boros, *Origanum* × *majoricum* Cambess, y *O. vulgare* L. spp. *vulgare*. Estas especies son conocidas en Argentina como orégano tipo “Cordobés” (Cor), “Criollo” (Cri), “Mendocino” (M) y “Compacto” (Com), respectivamente. Las plantas fueron cosechadas en 2008, en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Santa Lucia, San Juan, Argentina y en la “Universidad Nacional de La Pampa”, Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales se extrajeron por hidrodestilación, según el método de extracción descrito en el Capítulo II. Los aceites esenciales resultantes se secaron con sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en viales de vidrio color caramelo a -18 °C hasta su utilización.

Composición de los aceites esenciales

Se determinó la composición química de los aceites esenciales utilizando la misma metodología detallada en el capítulo II, por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa CG-EM, en un equipo Perkin Elmer Clarus 600 acoplado con un detector de masas de trampa de iones (Perkin Elmer, Shelton, CT, EE.UU.).

Actividad antioxidante

Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH

Se determinó la actividad secuestrante de radicales libres DPPH por la misma metodología utilizada en el Capítulo II (Quiroga *et al.*, 2011). Se calculó la concentración inhibitoria 50% (IC50) a partir de la curva obtenida de la gráfica del % de inhibición vs la concentración final del aceite esencial (Loizzo *et al.*, 2009).

Actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano en aceite de canola

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano se determinó por medio de un test de oxidación acelerada (Nepote *et al.*, 2002). Las muestras fueron preparadas mezclando 0,02% (p/p) del aceite esencial de orégano “Cordobés” (AE-Cor), “Criollo” (AE-Cri), “Mendocino” (AE-M) y “Compacto” (AE-Com) en aceite de canola. Se utilizó BHT (0.02%, p/p) en aceite de canola como referencia y aceite de canola sin el agregado de aditivos como muestra control. El Código Alimentario Argentino (CAA, 2012) permite un máximo de 0,02% de BHT y otros antioxidantes sintéticos en los aceites vegetales, por esta razón se utilizó esta concentración. El test de oxidación acelerada fue llevado a cabo en un horno de laboratorio (Reliance Enterprise, Kolkata, India) a 60 ± 1 °C durante 12 días. Se tomaron muestras a los 0, 5, 7, 9 y 12 días de almacenaje y sobre ellas se determinó la oxidación de los lípidos midiendo el índice de peróxidos (IP) (AOAC, 1995) y el índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) (IUPAC, 1987).

Análisis estadísticos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron utilizando el software InfoStat, versión 2012p (Di Rienzo *et al.*, 2012). Se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0,05$) y test de DGC para encontrar diferencias significativas entre las muestras. Se utilizaron ecuaciones de regresión lineal simple para determinar el efecto de la variable independiente (tiempo de almacenamiento) sobre los indicadores químicos (IP e *Ip*-A). Para el análisis de regresión se utilizó un modelo lineal simple: $y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde 'y' fue la variable dependiente (indicadores químicos); β_0 fue una constante que es igual al valor de la 'y' cuando el valor de 'X' = 0; β_1 es el coeficiente de 'X', 'X' es la variable independiente (tiempo). El análisis de componentes principales (ACP) (Johnson y Wichern, 2007) se realizó con el propósito de explorar las asociaciones entre las variables estudiadas (IC50 para DPPH, IP e *Ip*-A del estudio de almacenaje de aceite de canola) sobre los diferentes aceites esenciales de orégano, utilizando la matriz de correlación de los datos estandarizados (normalizados). Se realizó también un

análisis de conglomerados (AC) para encontrar grupos de especies de orégano con características similares. Las similitudes entre las muestra se calcularon sobre la base a la distancia euclidiana.

Resultados y discusión

Composición de los aceites esenciales de orégano

La composición del aceite esencial de las diferentes especies de orégano (Compacto: AE-Com, Córdoba: AE-Cor, Mendocino: AE-M, Criollo: AE-Cri) se muestra en la Tabla 4.1. Sólo se muestran los componentes con concentraciones mayores a 0,05%. Los principales compuestos que se encontraron en todas las muestras de orégano fueron los monoterpenos trans-sabineno hidrato, timol y γ -terpineno. Las especies de orégano estudiadas mostraron diferencia en su composición del aceite esencial. Los aceites esenciales AE-Com, AE-Cor y AE-M tuvieron altos contenidos de trans-sabineno hidrato (entre 27% y 38,2%). AE-Cri tuvo la menor cantidad de este compuesto (6,3%) y la mayor cantidad de γ -terpineno (18,2%). AE-Com y AE-Cor mostraron una mayor cantidad de timol (26,6-29,7%, respectivamente) que AE-M (17,1%) y EO-Cri (14,9%). AE-Cor se caracterizó por la presencia de 25 componentes, representando el 95,8% de su aceite esencial. Otros autores reportaron componentes similares en el aceite esencial de esta especie de orégano (Esen *et al.*, 2007; Dambolena *et al.*, 2010). Doce compuestos caracterizaron a AE-Com representando un 99,6% de su aceite esencial. Otros investigadores han encontrado que los aceites esenciales de las especies Com y Cor son ricos en compuestos acíclicos y sesquiterpenoides (Sezik *et al.*, 1993; Kula *et al.*, 2007). Veintiún compuestos se encontraron en AE-M que representan el 99,4% de su aceite esencial. Otros autores encontraron una composición similar de esta especie de orégano (Figuéredo *et al.*, 2005; Dambolena *et al.*, 2010). Treinta y tres compuestos fueron encontrados en AE-Cri que representa el 95,9% del total del aceite esencial. Otros autores reportaron altas cantidades de hidratos de timol y trans-sabineno en AE-Cri (Tabanca *et al.*, 2004; Dambolena *et al.*, 2010). Las diferencias en la composición de los aceites esenciales pueden atribuirse a diversos factores tales como el genotipo de subespecies y/o factores ambientales como las condiciones climáticas, temperatura, humedad y precipitación entre otros. Las especies de orégano de Argentina se caracterizan por ser ricas en compuestos sabinílicos (Dambolena *et al.*, 2010).

Tabla 4.1. Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en el aceite esencial de las cuatro especies de orégano según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo (%) *					
			O. Compacto	O. Cordobés	O. Criollo	O. Mendocino		
930	MS	α -tujeno	tr	a	ND	a	0,80 \pm 0,08 c	1,00 \pm 0,10 b
939	Co - MS	α -pineno	tr	a	0,50 \pm 0,06 b		0,90 \pm 0,09 c	0,50 \pm 0,05 b
954	MS	Camfeno	tr	a	0,20 \pm 0,04 b		0,90 \pm 0,09 b	tr a
975	MS	Sabineno	tr	a	0,30 \pm 0,02 a		4,00 \pm 0,33 b	tr a
979	MS	1-octen-3-ol	tr	a	tr	a	0,50 \pm 0,05 b	tr a
979	Co-MS	β -pineno	tr	a	tr	a	1,90 \pm 0,19 b	tr a
991	Co-MS	β -mirceno	2,80 \pm 0,33 d		1,40 \pm 0,13 b		0,90 \pm 0,09 a	1,90 \pm 0,17 c
1003	Co-MS	α -felandreno	2,00 \pm 0,17 b		tr	a	2,60 \pm 0,26 c	tr a
1017	Co-MS	α -terpineno	5,00 \pm 0,35 a		4,10 \pm 0,41 a		7,70 \pm 0,68 b	5,00 \pm 0,50 a
1025	Co-MS	p-cimeno	3,30 \pm 0,41 b		3,20 \pm 0,32 b		2,80 \pm 0,22 b	1,00 \pm 0,10 a
1029	Co-MS	Limoneno	1,70 \pm 0,18 a		3,30 \pm 0,24 b		3,10 \pm 0,22 b	7,30 \pm 0,50 c
1031	Co-MS	1,8-cineole	tr	a	tr	a	3,60 \pm 0,22 b	tr a
1037	MS	β -cis-ocimeno	tr	a	tr	a	2,00 \pm 0,20 b	tr a
1050	MS	β -trans-ocimeno	tr	a	tr	a	4,30 \pm 0,43 b	tr a

Tabla 4.1 (continuación). Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en el aceite esencial de las cuatro especies de orégano según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo (%) *			
			O, Compacto	O, Cordobés	O, Criollo	O, Mendocino
1060	Co-MS	γ -terpineno	12,40±1,36 b	5,10±0,43 a	18,20±1,90 c	6,80±0,68 a
1070	MS	cis-sabineno hidrato	2,10±0,21 b	3,00±0,30 c	0,70±0,07 a	3,40±0,34 c
1089		Terpinoleno	tr a	0,70±0,07 b	1,40±0,14 c	0,80±0,08 b
1098	Co-MS	trans-sabineno hidrato	33,00±2,80 c	27,00±2,60 b	6,30±0,43 a	38,20±1,54 d
1113	MS	Acetato de octen-3-ol	tr a	tr a	1,40±0,14 c	0,60±0,06 b
1144	MS	cis- β -terpineol	tr a	tr a	0,30±0,03 b	0,30±0,03 b
1163	MS	trans- β -terpineol	tr a	tr a	0,70±0,07 b	tr a
1169	MS	Borneol	tr a	1,00±0,10 c	tr a	0,20±0,02 b
1177	Co-MS	Terpinen-4-ol	6,00±0,53 c	2,20±0,20 b	0,00±0,00 a	5,70±0,50 c
1189	Co-MS	α -terpineol	tr a	2,90±0,10 c	0,10±0,01 a	2,00±0,15 b
1196	MS	cis-piperitol	tr a	0,70±0,07 d	0,10±0,01 b	0,30±0,03 c
1235	Co-MS	Timol metil eter	tr a	tr a	0,10±0,01 b	0,10±0,01 b
1245	Co-MS	Carvacrol metil eter	3,40±0,30 b	1,00±0,10 a	1,10±0,11 a	1,10±0,12 a
1290	Co-MS	Timol	26,60±3,00 b	29,70±2,90 b	14,90±1,40 a	17,10±1,88 a

Tabla 4.1 (continuación). Concentración de terpenoides (porcentaje relativo) presentes en el aceite esencial de las cuatro especies de orégano según su orden de elución en el análisis de CG-EM.

IR	MOI	Compuestos	Porcentaje relativo (%) *							
			O, Compacto		O, Cordobés		O, Criollo		O, Mendocino	
1299	Co-MS	Carvacrol	tr	a	1,00±0,10 b		7,60±0,18 d		4,20±0,11 c	
1362	MS	Acetate de neril	tr	a	1,00±0,10 c		0,30±0,03 b	tr	a	
1381	MS	Acetato de Geranil	tr	a	0,90±0,09 b		0,00±0,00 a	tr	a	
1419	MS	β-cariofileno	tr	a	2,30±0,23 c		0,00±0,00 a		1,00±0,10 b	
1437	MS	γ-elemeno	tr	a	1,10±0,11 b		2,70±0,16 c	tr	a	
1455	MS	α-humuleno	tr	a	tr	a	0,20±0,02 b	tr	a	
1480	MS	γ-muuroleno	tr	a	tr	a	1,30±0,09 b	tr	a	
1485	MS	D germacreno	1,10±0,09 b		1,20±0,12 b		1,40±0,11 c		0,90±0,09 a	
1506	MS	β-bisaboleno	tr	a	1,00±0,10 c		0,70±0,07 b	tr	a	
1098	MS	Espatulenol	0,20±0,02 B		0,50±0,05 d		0,40±0,02 c	tr	a	
1583	MS	Oxido de cariofileno	tr	A	0,50±0,05 b		tr	a	tr	a

* Los valores con letras distintas en las filas indican diferencias significativas entre muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha = 0,05$, $n = 3$), tr: trazas.
 RI = índice de retención, MOI = métodos de identificación: Co (co-inyección con estándar) y MS (datos de librería - Nist y Adams).

Actividad antioxidante

Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH

Los porcentajes de inhibición del radical DPPH a diferentes concentraciones (5,77, 2,77, 1,39 y 0,69 $\mu\text{g/mL}$) y los valores de concentración inhibitoria del 50% (IC50) de los aceites esenciales de las cuatro especies de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) se muestran en la Tabla 4.2. Los aceites esenciales de los oréganos Cordobés y Compacto tuvieron mayor actividad secuestrante de radicales libres que las otras especies. El aceite esencial del orégano Mendocino tuvo los menores porcentajes de inhibición del radical DPPH. Loizzo *et al.* (2009) informaron IC50 ($\mu\text{g/mL}$) entre 1,0 y 1,7 para aceites esenciales de *Origanum*. Un estudio realizado sobre extractos acuosos de material seco de plantas de orégano, a concentración de 40 mg de planta por mL, de diferentes localidades, informó el porcentaje de inhibición del radical DPPH entre 17,5 y 75,3%. Estos autores encontraron que el orégano tipo Compacto tuvo la mayor actividad secuestrante de radicales libres (Dambolena *et al.*, 2010).

Tabla 4.2. Promedios y desvíos estándar del porcentaje de inhibición de los cuatro aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) a diferentes concentraciones (5,77; 2,77; 1,39 y 0,69 $\mu\text{g/mL}$) y la concentración inhibitoria de 50% (IC50).

Aceites esenciales	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)				IC50 ($\mu\text{g/mL}$)*
	5,77*	2,77*	1,39*	0,69*	
Compacto	95,72 \pm 0,08 c	88,28 \pm 0,73 d	63,56 \pm 0,55 d	45,25 \pm 0,11 d	0,90 \pm 0,02 a
Criollo	90,06 \pm 0,32 b	80,53 \pm 0,72 b	56,87 \pm 0,87 b	39,11 \pm 0,99 b	1,12 \pm 0,01 c
Cordobés	92,03 \pm 1,21 c	84,34 \pm 0,04 c	61,47 \pm 0,54 c	42,44 \pm 0,10 c	0,98 \pm 0,01 b
Mendocino	75,63 \pm 4,81 a	71,16 \pm 2,19 a	45,57 \pm 1,28 a	24,63 \pm 0,57 a	2,38 \pm 0,02 d

*Los valores con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes (test DGC, $\alpha=0,05$, n = 3).

Actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano en aceite de canola

El índice de peróxidos es un indicador químico que se utiliza para determinar los productos de las reacciones de oxidación primaria en lípidos (Frankel, 2005). El cambio en los valores de IP de las muestras de aceite de canola (aceite de canola control y aceite de canola adicionado con los aceites esenciales de los diferentes oréganos (AE-Com, AE-Cor, AE-Cri y AE-M) y con BHT durante el almacenaje a 60 °C se muestra en la Figura 4.1. En general, los valores de IP de todos los tratamientos se incrementaron significativamente ($\alpha = 0,05$) con el tiempo de almacenamiento. Inicialmente, todos los tratamientos tuvieron valores de IP similares (entre 12,99 y 13,59 meq O₂/kg). En el día 5, el aceite de canola con BHT mostró el menor valor de IP. Desde el séptimo día en adelante, todos los tratamientos tuvieron valores menores comparados con el aceite de canola control y el aceite con BHT tuvo el menor valor de IP. En el día 12 del almacenamiento el aceite de canola enriquecido con los aceites esenciales de orégano tuvieron menores valores de IP (entre 37,00 y 40,96 meq O₂/kg) que la muestra de aceite de canola control (43,12 meq O₂/kg) y mayor que la muestra que contenía BHT (34,56 meq O₂/kg). En este día de almacenaje, la muestra de aceite de canola con AE-Cor y AE-M tuvieron los menores valores de IP en comparación con los otros aceites esenciales (AE-Cri y AE-Com). Estos resultados indican que los aceites esenciales de las especies de orégano estudiadas mostraron actividad antioxidante en el aceite de canola.

En etapas avanzadas de la oxidación lipídica los peróxidos orgánicos se descomponen en productos secundarios tales como alcoholes, ácidos carboxílicos y cetonas, que pueden ser medidos por el método de la *p*-anisidina (Frankel, 2005). El cambio en los valores de *I_p-A* de las diferentes muestras de aceite de canola (aceite de canola control y aceite de canola adicionado con AE-Com, AE-Cor, AE-Cri y AE-M, y con BHT) durante el almacenaje se muestra en la Figura 4.2. En general, los valores de *I_p-A* de todos los tratamientos aumentaron significativamente con el tiempo de almacenamiento. Inicialmente, todos los tratamientos muestran valores de *I_p-A* similares. Desde los días 5 – 12 de almacenamiento, las muestras de aceite de canola tuvieron diferencias significativas en el *I_p-A* y todas las muestras adicionadas con los aceites esenciales de orégano y BHT tuvieron los valores más bajos de este indicador en comparación con la muestra de aceite de canola control. En el día 12 de almacenamiento, las muestras con AE-Com, AE-Cor, y BHT tuvieron valores menores de *I_p-A* comparados con las adicionadas con AE-Cri y AE-M. El valor de *I_p-A* en el día 12 fueron

8,55; 5,47; 5,05; 5,84; 6,63 y 6,83 en las muestras de aceite de canola control, con BHT, AE-Cor, AE-Com, AE-M y AE -Cri, respectivamente. Según estos resultados, AE-Com y AE-Cor tienen actividad antioxidante similar a la del BHT en el aceite de canola.

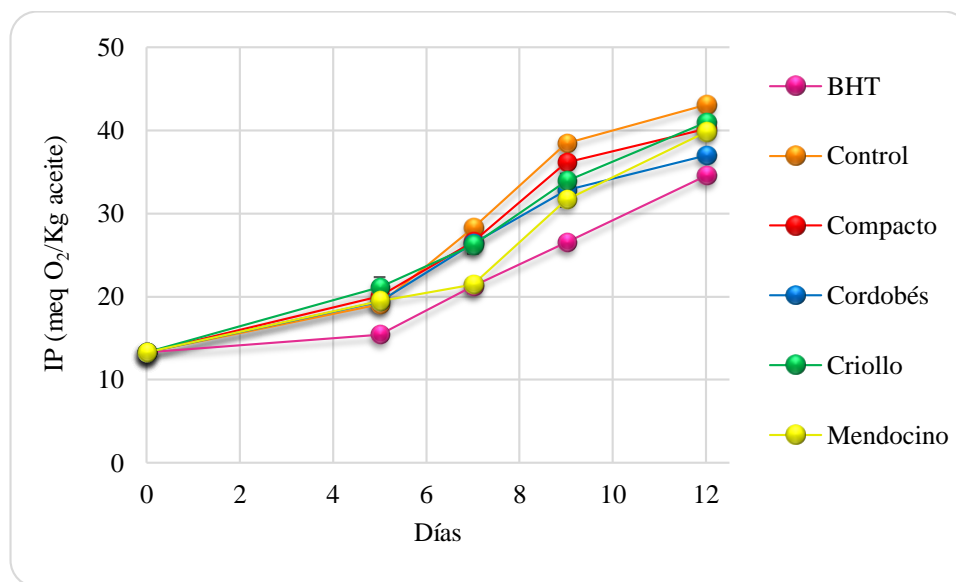


Figura 4.1. Índice de peróxidos (meq O₂/kg) de las diferentes muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola con los aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) y con BHT, almacenados a 60 °C.

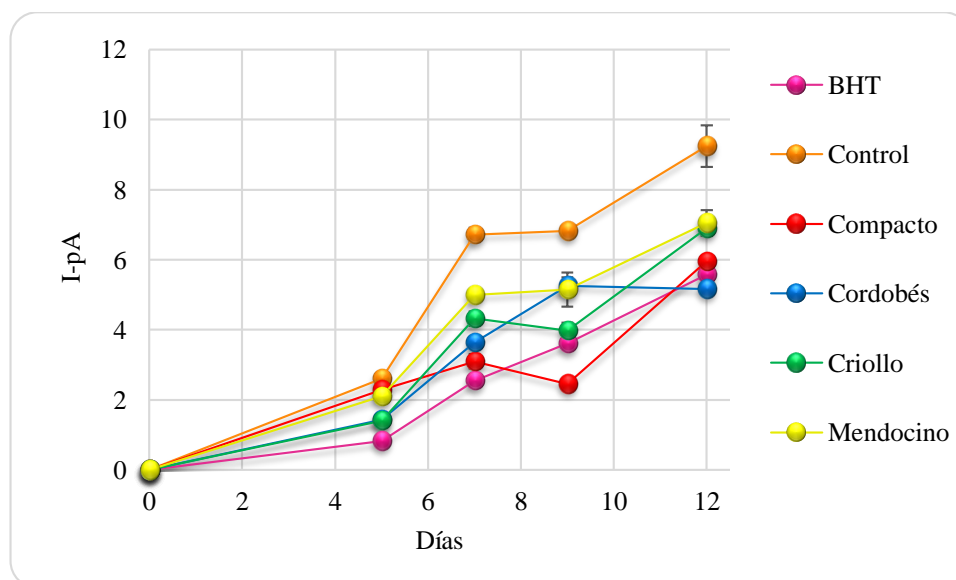


Figura 4.2. Índice de p-Anisidina de las diferentes muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola con los aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) y con BHT, almacenados a 60 °C.

Dambolena *et al.* (2010) estudiaron el contenido de fenoles totales y la actividad secuestrante de radicales libres para extractos acuosos de estas especies de orégano (Compacto, Criollo, Cordobés y Mendocino) de diferentes localidades de Argentina (Santa Lucia, La Pampa, La Consulta). En dicho trabajo, se encontraron diferencias en el contenido de fenoles totales y de actividad secuestrante de radicales libres entre las especies de orégano y las diferentes localidades. Los extractos de Santa Lucia mostraron mayor contenido de fenoles totales y actividad secuestrante de radicales libres. En aquel estudio, los autores también informaron que el extracto acuoso de orégano Mendocino tuvo la mayor cantidad de fenoles (19,36 mg/g) seguido por el extracto acuoso de orégano Compacto (18,88 mg/g), Cordobés (18,21 mg/g) y Criollo (18,09 mg/g), y en cuanto a la actividad secuestrante de radicales libres el extracto acuoso de orégano Compacto tuvo la mayor actividad (75,3%) seguido por el de orégano Criollo (67,3%), Mendocino (54,6%) y Cordobés (17,5%). Estos autores concluyeron que el extracto acuoso de O. Compacto de la localidad de Santa Lucia tendría mayor actividad antioxidante que las otras variedades de orégano.

Análisis de regresión lineal

Los coeficientes de regresión y R^2 de las variables dependientes, IP e I_p -A, en función del tiempo de almacenaje de las muestras de aceite de canola (aceite de canola control, con AE-Com, AE-Cor, AE-Cri y AE-M, y con BHT) obtenidos del estudio de almacenaje a 60 °C se muestran en la Tabla 4.3. En general los modelos de regresión mostraron un R^2 mayor a 0,76. Estas ecuaciones de regresión representan el efecto del tiempo en las variables químicas (IP e I_p -A) analizadas en el aceite de canola durante el almacenamiento. Las diferencias en la estabilidad ante la oxidación lipídica entre las muestras pudieron ser analizadas utilizando las pendientes de dichas ecuaciones de regresión (β_1). Mayor valor en la pendiente indica mayor tendencia para la oxidación lipídica. Se detectaron diferencias significativas entre las pendientes (β_1) obtenidas del análisis de regresión de las variables IP e I_p -A. La pendiente de IP en el aceite de canola con BHT fue menor que en el aceite de canola control. Las muestras de aceite de canola con los aceites esenciales de las cuatro especies de orégano no mostraron diferencias significativas entre ellas, ni con los tratamientos control y con BHT. Los valores de (β_1) de I_p -A en el aceite de canola con los aceites esenciales de orégano y BHT fueron menores que en la

muestra control. En general se observa que los aceites esenciales tuvieron menores tendencias a la oxidación que el control, indicando actividad antioxidante de los aceites esenciales de orégano en el aceite de canola.

Tabla 4.3. Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables dependientes: índice de peróxidos (IP) é índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) en función del tiempo de almacenaje (días) en las muestras de aceite de canola: control, con el agregado de los aceites esenciales de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) y con BHT.

Variable dependiente	Muestra	Coeficientes de regresión *		
		β_0	β_1^*	R^2
<i>Ip</i> -A	BHT	-0,6179 ± 0,0129	0,4741 ± 0,0064 c	0,9224
	Control	-0,1901 ± 0,08	0,7977 ± 0,0429 a	0,9361
	Compacto	-0,1379 ± 0,0467	0,4393 ± 0,0088 c	0,8544
	Cordobés	-0,1234 ± 0,0106	0,4880 ± 0,0143 c	0,8959
	Criollo	-0,4441 ± 0,0593	0,5700 ± 0,0094 b	0,9092
	Mendocino	-0,1301 ± 0,0241	0,6043 ± 0,0372 b	0,9441
PV	BHT	102,9960 ± 0,2648	18,028 ± 0,0284 e	0,8831
	Control	107,1860 ± 0,2803	26,869 ± 0,0218 a	0,9257
	Compacto	114,3480 ± 0,3503	23,9900 ± 0,0270 b	0,9427
	Cordobés	119,2750 ± 0,4053	20,9980 ± 0,0268 d	0,9555
	Criollo	115,3720 ± 0,7370	23,5800 ± 0,0032 b	0,9656
	Mendocino	104,6220 ± 0,2529	22,2330 ± 0,0423 c	0,9035

Ecuaciones de regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde Y = variable dependiente (IP e *Ip*-A) y X = variable independiente (días).

* ANOVA y test DGC: pendientes (β_1) de cada variable seguida con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes $\alpha = 0,05$.

Análisis de componentes principales

En la Figura 4.3 se presenta el biplot obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) de ACP. Estas componentes explican el 87,8% de la variabilidad total de las especies de orégano, este porcentaje se consideró aceptable para establecer correlaciones entre las variables. La dispersión de los puntos indica una gran variabilidad entre las muestras. Los indicadores de oxidación (IP e *Ip-A*) medidos en el estudio del almacenaje del aceite de canola están asociadas positivamente entre ellas y se asociaron negativamente con el contenido de timol y carvacrol metil éter. IC50 se correlacionó positivamente con el contenido de limoneno y con los indicadores de oxidación (IP e *Ip-A*). Los aceites esenciales Compacto y Cordobes tuvieron un alto contenido de timol, baja IC50 sobre el radical DPPH y relativamente bajos valores en IP e *Ip-A*. Estas especies de orégano mostraron actividad antioxidante en el aceite de canola.

El timol, es un compuesto fenólico que ha demostrado tener actividad antioxidante (Lagouri *et al.*, 1993; Aeschbach *et al.*, 1994; Baratta *et al.*, 1998; Neffati *et al.*, 2009). Timol junto con carvacrol son los componentes más activos entre los monoterpenos oxigenados (Ruberto y Baratta, 2000). Es conocido que los compuestos fenólicos son antioxidantes eficientes. (Yanishlieva *et al.*, 1999; Ruberto y Baratta, 2000). De hecho, timol y carvacrol son los responsables de la actividad antioxidante de muchos aceites esenciales que los contienen (Lagouri *et al.*, 1993; Aeschbach *et al.*, 1994; Baratta *et al.*, 1998; Neffati *et al.*, 2009). Las especies de orégano estudiadas, tienen bajo contenido de carvacrol pero su actividad antioxidante puede ser debida al alto contenido de timol. Timol y carvacrol son compuestos utilizados para caracterizar los quimiotipos de orégano. Timol y sabineno hidrato caracterizaron los aceites esenciales de *O. vulgare* subespecies *vulgare* y *virens*. Mientras que los oréganos Criollo y Mendocino son oréganos híbridos, la química de los aceites esenciales podría depender de sus padres (Skoula *et al.*, 1999; Skoula y Harborne, 2002). Un alto contenido de carvacrol en el aceite esencial es la clave para el concepto de orégano como especie y es un requisito previo para determinar la idoneidad de una planta para la preparación de este condimento. *Origanum heracleoticum*, la principal fuente de orégano en Grecia, es un especie químicamente no uniforme. Dentro de su población silvestre, hay por lo menos tres quimiovariedades que, aunque son similares en su aspecto exterior, difieren en sus olores. Sobre la base de sus sabores y composiciones de aceites esenciales, estas

variedades se podrían definir como tipos de orégano *marjoram*. El orégano que contiene principalmente carvacrol, tradicionalmente se recolecta sobre la base de su olor para la preparación de orégano como especia (Fleisher y Sneer, 1982).

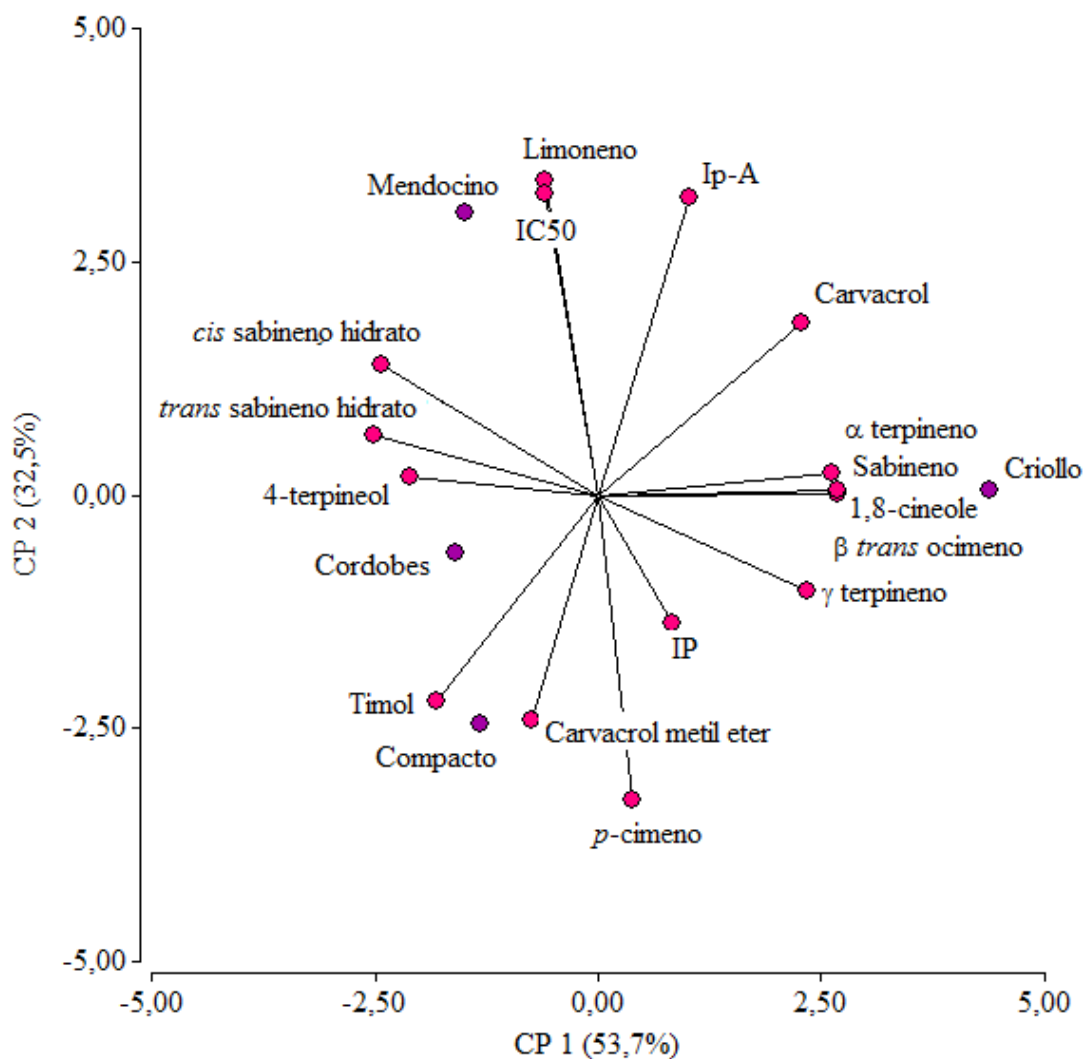


Figura 4.3. Biplot de la primera y segunda componentes del análisis de componentes principales. Variables: concentración inhibitoria 50% en DPPH (IC50) e indicadores químicos (IP e Ip-A) del estudio de estabilidad de las muestras de aceite de canola, para las especies de orégano estudiadas (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino).

El contenido de *cis* y *trans*-sabineno hidrato y de terpinen-4-ol se asociaron positivamente entre sí y negativamente con los contenidos de α -terpineno, 1,8-cineol, β -*trans*-ocimeno, sabineno y γ -terpineno en los aceites esenciales de las especies de orégano estudiadas. El aceite esencial de orégano Criollo tuvo mayores cantidades de estos últimos compuestos (α -terpineno, 1,8-cineol, β -*trans*-ocimeno, sabineno y γ -terpineno) y cantidades menores de *cis* y *trans*-sabineno hidrato y 4-terpineol que los aceites esenciales de las otras especies. El contenido de limoneno y el IC50 se asociaron negativamente principalmente con *p*-cimeno. El aceite esencial del orégano Mendocino tuvo mayor contenido de limoneno, *cis* y *trans*-sabineno hidrato, IC50 y menor cantidad de *p*-cimeno que los otros aceites esenciales de las especies de orégano. El biplot sugiere una pobre asociación entre los indicadores de oxidación en el aceite de canola (IP e *I_p*-A), la IC50, y los siguientes compuestos presentes en estas especies de orégano: *cis* y *trans*-sabineno hidrato, terpinen-4-ol, α -terpineno, 1,8-cineol, β -*trans*-ocimeno, sabineno y γ -terpineno. Otras investigaciones, demostraron la variabilidad en la composición y encontraron asociaciones entre la composición del aceite esencial de orégano, el contenido de fenoles y la actividad secuestrante de radicales libres en un extracto acuoso de orégano debido a diferentes factores ambientales (Dambolena *et al.*, 2010).

Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados (AC) es una técnica de clasificación que implica una medición de ya sea la distancia o la similitud entre los objetos a ser agrupados. Los objetos se conglomeran en grupos en función de su proximidad o similitud (Arvanitoyannis *et al.*, 1999, 2008). Los resultados logrados por el AC de las especies de orégano considerando los indicadores químicos del estudio de almacenamiento en aceite de canola (IP, *I_p*-A), el IC50 de DPPH y los compuestos principales de los aceites esenciales de orégano se presentan en el dendrograma de la Figura 4.4. Se observaron tres agrupaciones: el grupo 1 estaba formado por Compacto y Cordobés, grupo 2 y 3 fueron formados por Mendocino y Criollo, respectivamente. Estos resultados revelaron que se encontraron diferencias entre los grupos de especies de orégano. Estas variables pueden contener información suficiente para lograr la diferenciación de las especies de orégano de acuerdo con las clases establecidas. La Tabla 4.1 muestra que *O.*

vulgare spp *virens* (Cordobés) y *O. vulgare* spp *vulgare* (Compacto) tuvieron mayor concentración de timol y *trans*-sabineno hidrato. Esta composición agrupó las dos subespecies. Estos resultados son consistentes con la clasificación quimiotípica informada por (Skoula *et al.*, 1999). Por otro lado, la composición de los aceites esenciales de *Origanum* × *majoricum* (Mendocino) fue similar a la de sus antepasados (Dambolena *et al.*, 2010). Por último, *Origanum* × *aplli* (Criollo) tenía una composición enriquecida en los precursores biosintéticos de compuestos oxigenados como γ -terpineno, α -terpineno y sabineno. Todos estos resultados afectaron la agrupación de los cuatro oréganos estudiados determinando una mayor similitud entre las subespecies de *O. vulgare* (Cordobés y Compacto) que los híbridos (oréganos Criollo y Mendocino). Estos dos últimos oréganos tampoco fueron agrupados.

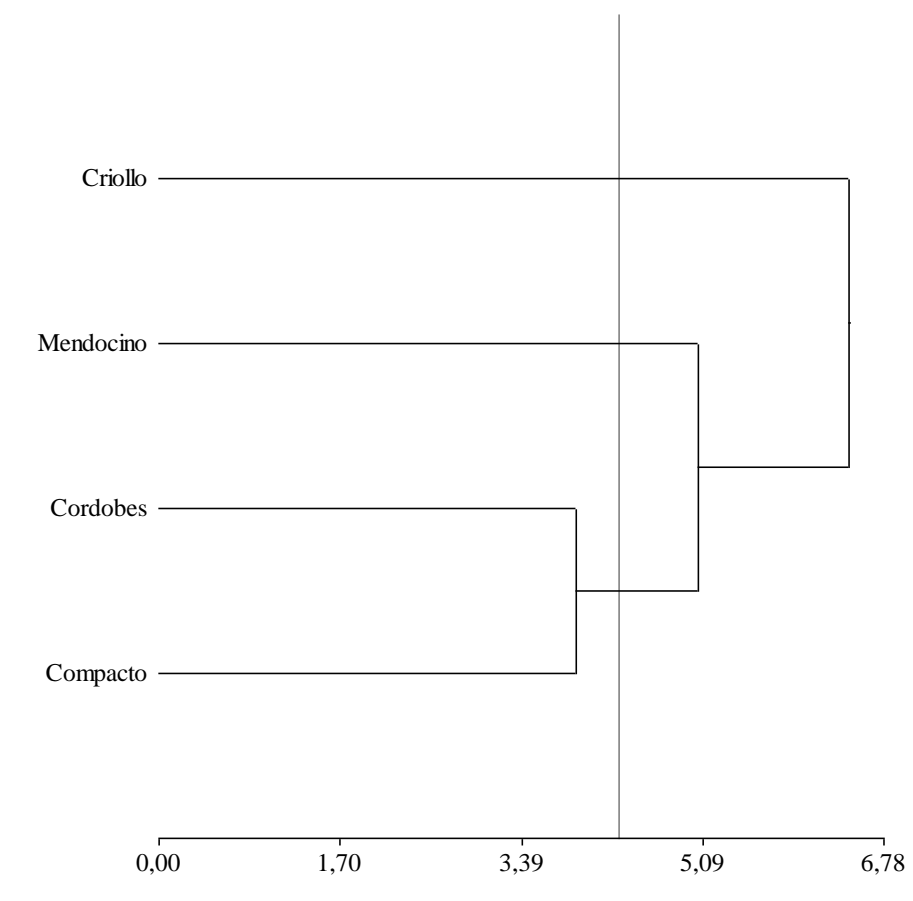


Figura 4.4. Dendrograma proveniente del análisis de conglomerados de las diferentes especies de orégano (Compacto, Cordobés, Criollo y Mendocino) considerando las variables: contenido de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales, concentración inhibitoria del 50% sobre el radical DPPH (IC50), y los indicadores químicos de oxidación (IP e I-pA) del estudio de estabilidad de aceite de canola.

Conclusiones

Los aceites esenciales de los diferentes oréganos de Argentina muestran variabilidad en los porcentajes relativos de los dos principales compuestos: timol y *trans*-sabineno hidrato. Las diferentes especies de orégano muestran diferencias en la actividad secuestrante de radicales libres y en la actividad antioxidante en el aceite de canola. En general, los aceites esenciales de oréganos Cordobés y Compacto están asociados a una mayor actividad secuestrante de radicales libres y actividad antioxidante que los aceites esenciales de oréganos Criollo y Mendocino. Esta actividad antioxidante podría ser asociada principalmente al mayor contenido de timol en estos aceites esenciales. La adición de estos aceites esenciales de orégano en el aceite de canola previene la oxidación lipídica. Estos resultados renuevan el interés en el uso de antioxidantes de origen natural en la industria alimentaria. Por esa razón, el aceite esencial de orégano como un antioxidante natural podría ser utilizado para reemplazar a los antioxidantes sintéticos en productos alimenticios con alto contenido de lípidos. Este estudio también proporcionó asociaciones entre la composición química de los aceites esenciales, la actividad secuestrante de radicales libres, y los indicadores de oxidación en el estudio de almacenamiento del aceite canola.

Bibliografía citada

- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. y Aruoma, O. I. 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*. 32. 31-36
- AOAC 1995. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Ed). Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Arvanitoyannis, I. S., Katsota, M. N., Psarra, E. P., Soufleros, E. H. y Kallithraka, S. 1999. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science and Technology*. 10. 321-336
- Arvanitoyannis, I. S., Vaitisi, O. y Mavromatis, A. 2008. Physico-chemical and sensory attributes in conjunction with multivariate analysis of two potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars after 90 days of storage: An exploratory authentication study. *International Journal of Food Science and Technology*. 43. 1960-1970
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*. 76. 445-S450
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. y Ruberto, G. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 13. 235-244
- Barreyro, R., Ringuelet, J. y Agrícola, S. 2005. Fertilización Nitrogenada y Rendimiento en Orégano (*Origanum x applii*). *Ciencia e investigación agraria*. 32. 39-43
- Berzins, M. L. y Romagnoli, S. 2005. Cultivo de plantas aromáticas. *Boletín-INTA*. 1-8
- CAA 2012. Capítulo VII. Alimentos Grasos Aceites Alimenticios (Artículo 523bis - Res 2012, 19.10.84). En: *Código Alimentario Argentino. Ley 18.284 (18.7.1969)*. Ed). pp.
- Campos, M. y Sabsay, C. E. 2007. 'ORÉGANO Dirección de Mercados Agroalimentarios. Secretaría de Agricultura Pesca y Alimentos. República Argentina'.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. y Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58. 1115-1120
- Dellacassa, E., Mahler, G., Szwedzki, D., Moyna, P., Alonso, E. y Maffei, M. 1994. New Chemotypes of *Origanum x applii* (Domin) Boros from Uruguay. *Journal of Essential Oil Research*. 6. 389-393
- Di Fabio, A. 2000. Perspectivas de producción de plantas aromáticas y medicinales en Latinoamérica. . Conferencia. XXIII Congreso Argentino, X Latinoamericano III Iberoamericano de Horticultura, Mendoza, Argentina.
- Di Fabio, A. 2008. El cultivo y su efecto sobre la calidad en orégano. *Boletín Cámara Argentina de especias y afines*. 1-11
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. *InfoStat*.
- Esen, G., Azaz, A. D., Kurkcuglu, M., Baser, K. H. C. y Tinmaz, A. 2007. Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letsvaart from the Marmara region, Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 22. 371-376

- Figu  r  do, G., Chalchat, J. C. y Pasquier, B. 2005. Studies of mediterranean oregano population IV - Chemical composition of essential oils of hybrids *Origanum x majoricum* cambrassesdes from France, *Origanum x intercedons* Rechinger and *Origanum x minoanum* davis from Turkey and Crete. *Journal of Essential Oil Research*. 17. 296-300
- Fleisher, A. y Sneer, N. 1982. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 33. 441-446
- Frankel, E. N. 2005. *Lipid Oxidation*. (2nd Ed). Bridgewater. The Oily Press. pp.
- Gaspar, F. y Leeke, G. 2004. Essential Oil from *Origanum vulgare* L. ssp. *virens* (Hoffm. et Link) Ietswaart: Content, Composition and Distribution Within the Bracts. *Journal of Essential Oil Research*. 16. 82-84
- IUPAC 1987. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. (7th ed Ed). Oxford, UK. Paquot, C., Hautfenne, A. . Method Number 2.504. pp.
- Johnson, R. A. y Wichern, D. W. 2007. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. (6 Ed). New Jersey, USA. Pearson. 773 pp.
- Kula, J., Majda, T., Stoyanova, A. y Georgiev, E. 2007. Chemical composition of *Origanum vulgare* L. essential oil from Bulgaria. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 10. 215-220
- Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S. y Boskou, D. 1993. Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift f  r Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 197. 20-23
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., Cindio, B. d., Houghton, P. J., Menichini, F. y Frega, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*. 117. 174-180
- Neffati, A., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Limem, I., Kilani, S., Skandrani, I., Bhouri, W., Le Dauphin, J., Barillier, D., Mosrati, R., Chekir-Ghedira, L. y Ghedira, K. 2009. Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 27. 187-194
- Nepote, V., Grosso, N. R. y Guzman, C. A. 2002. Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas y Aceites*. 53. 391-395
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. y Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology*. 46. 2648-2655
- Rehder, V. L. G., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Sartoratto, A., Figueira, G. M. y Duarte, M. C. T. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum applii* e *O. vulgare*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 6. 67-71
- Ruberto, G. y Baratta, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69. 167-174
- Russo, M., Galletti, G. C., Bocchini, P. y Carnacini, A. 1998. Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46. 3741-3746
- Sezik, E., Tumen, G., Kirimer, N., Ozek, T. y Baser, K. H. C. 1993. Essential oil composition of four *Origanum vulgare* subspecies of Anatolian origin. *Journal of Essential Oil Research*. 5. 425-431

- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G. y Johnson, C. B. 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (*Labiatae*). *Phytochemistry*. 52. 649-657
- Skoula, M. y Harborne, J. B. 2002. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. En: *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. Ed). London, UK. Taylor & Francis. pp. 67–108
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O. y Trajano, V. N. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. 18. 409-413
- Tabanca, N., Özek, T., Baser, K. H. C. y Türnen, G. 2004. Comparison of the essential oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum x majoricum cambess*. *Journal of Essential Oil Research*. 16. 248-252
- Torres, L. E., Chaves, A. G., Barboza, G., Brunetti, P., Bustos, J. A., Massuh, Y., Ocaño, S., Castillo, N. y Ojeda, M. S. 2010. Evaluation of the agronomic performance and taxonomic characterization of four clones of oregano (*Origanum* sp.). *Molecular Medicinal Chemistry*. 21. 91-93
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H. y Raneva, V. G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64. 59-66

Actividad antioxidante de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol y su efecto sinérgico con BHT

Introducción

La auto-oxidación de los lípidos ha sido reconocida como un proceso de deterioro importante que afecta la calidad sensorial y nutricional de los alimentos; la aplicación de antioxidantes es una de las maneras técnicamente más simple de la prevención de este proceso. Algunos trabajos demostraron la presencia de estos compuestos en plantas aromáticas seleccionadas y que timol, carvacrol, timoquinona y *p*-cimeno como componentes de diferentes aceites esenciales poseen una importante actividad antioxidante (Milos y Makota, 2012).

Los antioxidantes se han usado ampliamente como aditivos alimentarios para proporcionar una protección contra la degradación oxidativa por los radicales libres de los alimentos. La capacidad antioxidante de las especias que eran utilizadas para mejorar los sabores en diferentes tipos de alimentos es conocida desde hace mucho tiempo (Lindberg Madsen y Bertelsen, 1995). En las últimas décadas, los aceites esenciales de las plantas y sus componentes han sido de gran interés por provenir de fuentes naturales. Por otra parte, se han documentado efectos secundarios de algunos antioxidantes sintéticos tales como butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) utilizados en alimentos. Por este motivo se ha incrementado el interés sobre compuestos con actividad antioxidante presentes en fuentes naturales como frutas, verduras, hierbas y extractos de cereales (Wang *et al.*, 2008; Agourram *et al.*, 2013; Ferri *et al.*, 2013; Kaiser *et al.*, 2013).

Los fenoles son capaces de donar átomos de H de los grupos hidroxilo fenólicos cuando reaccionan con radicales peróxido que pueden producir radicales fenólicos estables, finalizando así una reacción en cadena de peroxidación de lípidos. La actividad antioxidante de los fenoles depende de los efectos electrónicos y estéricos del anillo, los sustituyentes, y

la fuerza de las interacciones de enlaces de hidrógeno entre el fenol y el disolvente (Mastelić *et al.*, 2008).

Los fenoles, tales como timol, carvacrol y eugenol, y los hidrocarburos monocíclicos, tales como terpinoleno, R-terpineno y γ -terpineno, pertenecen a los antioxidantes naturales más activos que se encuentra en los aceites esenciales (Mastelić *et al.*, 2008).

El timol y el carvacrol son moléculas isoméricas características de los aceites esenciales de las *Lamiaceae* como el orégano (Tsimidou y Boskou, 1994). Yanishlieva *et al.* (1999) observaron que estas moléculas tomaron parte en la iniciación de reacciones en cadena durante la oxidación de grasa de cerdo y triglicéridos de aceite de girasol. Además, estos autores observaron que los radicales de carvacrol participaron en una reacción de la cadena de propagación pero el timol no lo hizo. El timol resultó ser antioxidante más activo y eficaz que el carvacrol. Ambas moléculas difieren en el mecanismo de su acción inhibidora, dependiendo de la matriz lipídica.

Los compuestos fenólicos como timol y carvacrol poseen propiedades antioxidantes útiles sin efectos pro-oxidantes (Aeschbach *et al.*, 1994) y también se ha demostrado (Aeschbach *et al.*, 1994; Yanishlieva *et al.*, 1999) que timol es un antioxidante más eficaz que el carvacrol en la peroxidación de lípidos o auto-oxidación. (Kulisic *et al.*, 2004) han demostrado que el aceite esencial de orégano posee propiedades antioxidantes notables y que el efecto antioxidante es debido a la presencia de timol y carvacrol, sugiriendo un posible efecto sinérgico entre los compuestos que contienen oxígeno

En la naturaleza se encuentran presentes diferentes tipos de antioxidantes y la elección del antioxidante para la protección de alimentos depende del producto real, y han sido sistematizados los protocolos de evaluación para la protección de alimentos y beneficios para la salud (Becker *et al.*, 2007). Los antioxidantes se encuentran generalmente combinados, y parece ser importante para su efecto las interacciones entre ellos. Para algunas combinaciones de antioxidantes, se demostró que el efecto total era más pronunciado que el efecto que se espera de una simple suma de los efectos, lo cual se denomina sinergismo antioxidante. El mecanismo de la mayoría de los antioxidantes sobre la oxidación lipídica como intermediarios secuestrantes de radicales libres es bastante conocido. Sin embargo, el mecanismo de sinergismo antioxidante y el efecto opuesto, el antagonismo antioxidante, es

más especulativo ya que se han reportado observaciones contradictorias (Becker *et al.*, 2007). Estas observaciones contradictorias se han explicado por el hecho de que la actividad antioxidante no sólo depende de la actividad química de las moléculas antioxidantes, sino también del microambiente de los medios de reacción (Yin *et al.*, 2012).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la actividad antioxidante de los monoterpenos puros carvacrol, sabineno hidrato y timol, y su efecto sinérgico con BHT.

Materiales y Métodos

Se utilizaron los siguientes monoterpenos puros: carvacrol, sabineno hidrato y timol (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina). Se seleccionaron estos compuestos ya que el carvacrol y el timol son los compuestos que caracterizan al orégano y el sabineno hidrato fue encontrado en cantidades significativas en los aceites esenciales de los oréganos estudiados en el capítulo IV. Para los análisis de oxidación acelerada se utilizó aceite de canola provisto por Compañía Oleaginosa del Sur S.A., Lobería, Buenos Aires, Argentina.

Actividad antioxidante de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol

Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH

Se determinó la actividad secuestrante de radicales libres DPPH por la misma metodología utilizada en el capítulo II (Quiroga *et al.*, 2011). Se calculó la concentración inhibitoria 50% (DPPH-IC50) a partir de la curva obtenida de la gráfica del % de inhibición vs la concentración final del aceite esencial (Loizzo *et al.*, 2009).

Actividad antioxidante de los monoterpenos en aceite de canola

La actividad antioxidante de los monoterpenos se determinó por medio de un test de oxidación acelerada (Quiroga *et al.*, 2011). El Código Alimentario Argentino (CAA, 2012) permite un máximo de 0,02% de BHT y otros antioxidantes sintéticos en los aceites vegetales, por esta razón, las muestras fueron preparadas mezclando 0,02% (p/p) del monoterpeno “Carvacrol”, “Sabineno hidrato” y “Timol” en aceite de canola. Se utilizó BHT (0.02%, p/p) en aceite de canola como referencia y aceite de canola sin el agregado de aditivos como muestra control. El test de oxidación acelerada fue llevado a cabo en un horno de laboratorio (Reliance Enterprise, Kolkata, India) a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 12 días. Se analizaron las muestras a los 0, 5, 7, 9, 12 y 15 días de almacenaje. Se determinó la oxidación de los lípidos según la metodología descrita en el capítulo III, midiendo el índice de peróxidos (IP) (AOAC, 1995), el índice de dienos conjugados (DC) (COI, 2001) y el índice de *p*-anisidina (*Ip-A*) (IUPAC, 1987).

Efecto sinérgico de los monoterpenos junto al antioxidante sintético BHT en aceite de canola

Para determinar el efecto sinérgico de los monoterpenos junto al antioxidante sintético BHT se realizó un test de oxidación acelerada (Quiroga *et al.*, 2011). Se prepararon mezclas a una concentración final de 0.02% (p/p) del monoterpeno “Carvacrol” (Car), “Sabineno hidrato” (S) y “Timol” (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) en aceite de canola. Para determinar el efecto sinérgico, se realizaron mezclas binarias (monoterpeno:BHT) en las siguientes proporciones: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, 0:100 y 0:0, para cada uno de los monoterpenos con el antioxidante sintético BHT. Se utilizó aceite de canola control sin el agregado de antioxidante (proporción 0:0). El test de oxidación acelerada fue llevado a cabo en un horno de laboratorio (Reliance Enterprise, Kolkata, India) a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 días. Se analizaron las muestras a los 0 y 14 días. Se determinó la oxidación de los lípidos midiendo el índice de peróxidos (IP) (AOAC, 1995).

Análisis estadísticos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron utilizando el software InfoStat, versión 2012p (Di Rienzo *et al.*, 2012). Se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA, $\alpha = 0.05$) y test de DGC para encontrar diferencias significativas entre las muestras. Se utilizaron ecuaciones de regresión lineal simple para determinar el efecto de la variable independiente (tiempo de almacenamiento) sobre los indicadores químicos (IP, DC e I_p -A). Para el análisis de regresión se utilizó un modelo lineal simple: $y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde 'y' fue la variable dependiente (indicadores químicos); β_0 fue una constante que es igual al valor de la 'y' cuando el valor de 'X' = 0; β_1 es el coeficiente de 'X', 'X' es la variable independiente (tiempo). Los análisis de correlación se realizaron empleando el coeficiente de Pearson con el fin de obtener las asociaciones entre las variables químicas, IC50-DPPH y los indicadores químicos (IP, DC e I_p -A) del estudio de almacenamiento. El análisis de componentes principales (ACP) (Johnson y Wichern, 2007) se realizó sobre la matriz de correlación de los datos estandarizados de las variables químicas (IC50-DPPH y los indicadores químicos, IP, DC e I_p -A, del estudio de almacenamiento). El propósito de la ACP fue explorar las asociaciones entre las variables químicas y los diferentes tratamientos.

Resultados y Discusión

Actividad antioxidante de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol

Actividad secuestrante de radicales libres por DPPH

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las plantas aromáticas se atribuye principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (Olmedo *et al.*, 2008; Dambo-lena *et al.*, 2010; Asensio *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2011). La actividad antioxidante de los tres monoterpenos se comparó con la del antioxidante sintético BHT. Los porcentajes de inhibición del radical DPPH de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol y del antioxidante sintético BHT, a diferentes concentraciones se utilizaron para determinar la concentración inhibitoria 50% (DPPH-IC50) de los tres monoterpenos y del BHT (Tabla 5.1). En la Tabla 5.1 también se observa la relación de las DPPH-IC50 de los monoterpenos respecto al antioxidante BHT. El monoterpeno timol (0,0579 mg/mL) mostró una mayor actividad secuestrante de radicales libres, aproximadamente dos veces menor que el monoterpeno carvacrol (0,1022 mg/mL). Una menor DPPH-IC50 se relaciona con una mayor actividad secuestrante de radicales libres. El monoterpeno sabineno hidrato no demostró actividad secuestrante de radicales libres DPPH.

Tabla 5.1. Concentración inhibitoria 50% de DPPH (DPPH-IC50) medidos en BHT y en los monoterpenos: carvacrol, timol y sabineno hidrato.

	DPPH-IC50 (mg/mL)	IC50/IC50 BHT
BHT	0,0024 ± 0,0001 c	1
Carvacrol	0,1022 ± 0,0030 a	43
Timol	0,0579 ± 0,0026 b	24
Sabineno hidrato	ND	

*Medias ± desvíos estándar seguidos de letras distintas son significativamente diferentes (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$, $n=3$).

ND: no se detectó

En el capítulo IV se mostró la actividad antioxidante de aceites esenciales de diferentes especies de orégano observándose valores de DPPH-IC50 entre 0,90 y 2,38 $\mu\text{g/mL}$ (Quiroga et al., 2011). En otros trabajos se han informado valores similares de DPPH-IC50 para los monoterpenos carvacrol, timol y el antioxidante sintético BHT (Safaei-Ghomi *et al.*, 2009; Ojeda-Sana *et al.*, 2013).

Actividad antioxidante de los monoterpenos en aceite de canola

El índice de peróxidos (IP) y el índice de dienos conjugados (DC) son indicadores químicos que se utilizan para determinar los productos de las reacciones de oxidación primaria en lípidos (Frankel, 2005). Los cambios de los indicadores químicos IP y DC durante el almacenaje a 60°C se muestran en las Figuras 5.1 y 5.2.

En general, los valores de IP (Figura 5.1) de todos los tratamientos se incrementaron significativamente ($\alpha = 0,05$) con el tiempo de almacenamiento. Inicialmente, todos los tratamientos tuvieron el mismo valor de IP (1,3 meq O_2/kg). En el día 5, el aceite de canola con BHT mostró el menor valor de IP, el resto de los tratamientos no se diferenciaron significativamente. Desde el séptimo día en adelante, todos los tratamientos tuvieron valores menores de IP comparados con el aceite de canola control. En el día 12 del almacenamiento, las muestras de aceite de canola con los monoterpenos tuvieron valores de IP intermedios (entre 35,89 y 38,85 meq O_2/kg) entre la muestra control (42,71 meq O_2/kg) y la muestra BHT (34,56 meq O_2/kg). En el último día de almacenaje, la muestra BHT tuvo el menor valor de IP (39,11 meq O_2/kg) y la muestra control tuvo el mayor valor (53,97 meq O_2/kg). Las muestras de aceite con monoterpenos tuvieron valores intermedios. El aceite con sabineno hidrato (40,09 meq O_2/kg) tuvo menor valor que los aceites con timol (42,79 meq O_2/kg) y carvacrol (45,19 meq O_2/kg).

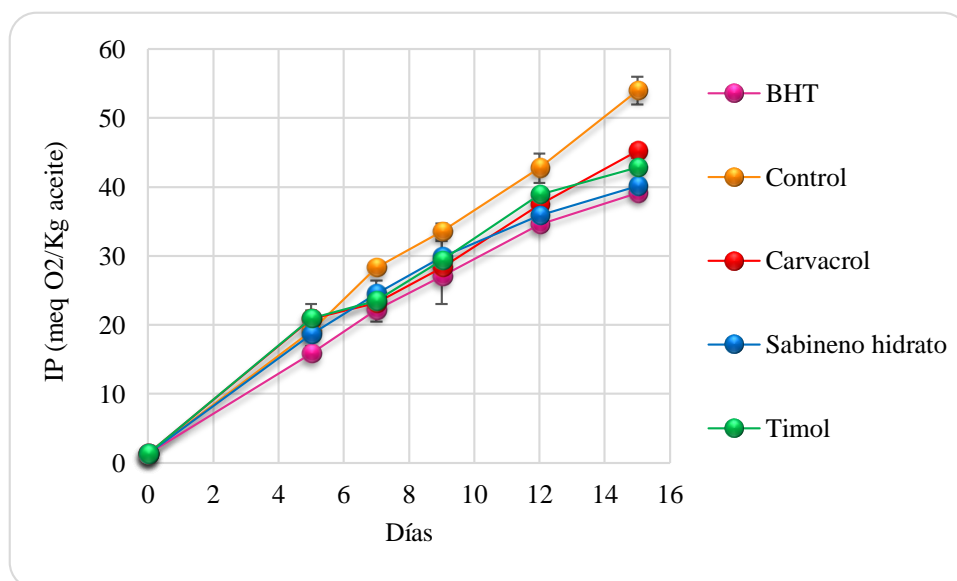


Figura 5.1 Índice de peróxidos (IP) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C) y aceite de canola con el agregado de los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidrato (S) y timol (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) almacenados a 60 °C.

Con respecto a dienos conjugados (Figura 5.2), de manera similar al IP, para todos los tratamientos los DC se incrementaron significativamente ($\alpha = 0,05$) con el tiempo de almacenamiento. Inicialmente, todos los tratamientos tuvieron el mismo valor de DC (0,22). A partir del día 5, el aceite de canola con BHT mostró los menores valores de DC. A partir del día 9, las muestras de aceite con los monoterpenos tuvieron valores de DC intermedios, menores al control, pero superiores al aceite con BHT.

Estos resultados demuestran que los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol tuvieron efecto antioxidante en las primeras etapas de la oxidación lipídica.

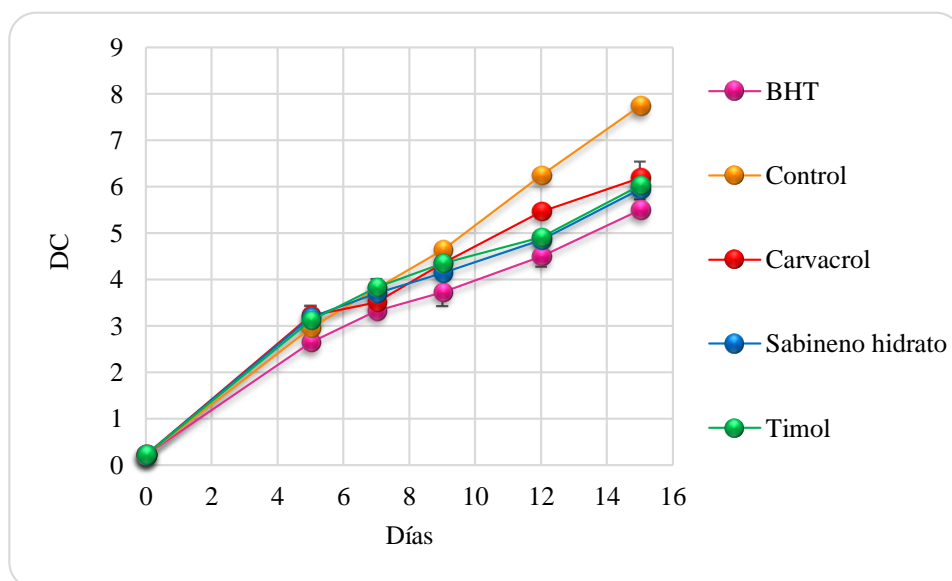


Figura 5.2 Índice de dienos conjugados (DC) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C) y aceite de canola con el agregado de los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidratado (S) y timol (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) almacenados a 60 °C.

Como ya se mencionó en capítulos anteriores, en etapas avanzadas de la oxidación lipídica los peróxidos orgánicos se descomponen en productos secundarios tales como alcoholes, ácidos carboxílicos y cetonas, que pueden ser medidos por el método de la *p*-anisidina (Frankel, 2005). El cambio en los valores del índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C), aceite de canola con los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidratado (S) y timol (T) y con el antioxidante sintético BHT (BHT) durante el almacenaje a 60°C se muestra en la Figura 5.3. En general los valores de *Ip*-A se incrementaron significativamente durante el tiempo de almacenaje en todos los tratamientos. En el día 5, el aceite con BHT mostró el menor valor de *Ip*-A. Desde el día 7 en adelante, los tratamientos con monoterpenos tuvieron valores menores comparados con el aceite control y superiores al aceite con BHT. En el último día de almacenaje, la muestra BHT tuvo el menor valor de *Ip*-A (5,86) y la muestra control tuvo el mayor valor (12,56). Las muestras de aceite de canola adicionadas con monoterpenos tuvieron valores intermedios. La muestra con carvacrol (9,75) tuvo el mayor valor comparado con las muestras de timol (8,54) y sabineno hidratado (7,52).

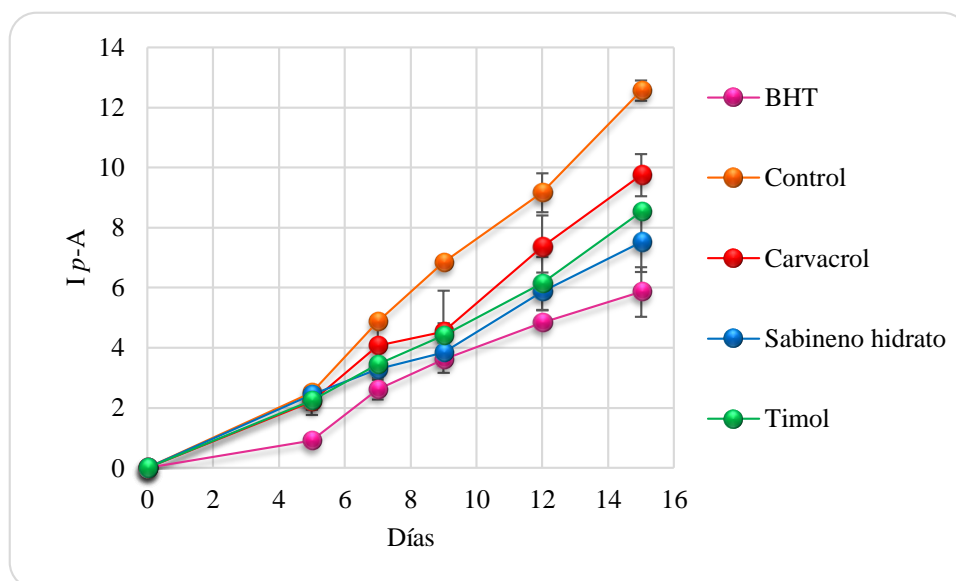


Figura 5.3 Índice de *p*-anisidina (*Ip-A*) de las diferentes muestras de aceite de canola: control (C) y aceite de canola con el agregado de los monoterpenos carvacrol (Car), sabineno hidratado (S) y timol (T) y el antioxidante sintético BHT (BHT) almacenados a 60 °C.

Análisis de regresión lineal

En la Tabla 5.2 se muestran los coeficientes de regresión y R^2 de las variables dependientes, IP, DC e *Ip-A*, en las muestras de aceite de canola obtenidos del estudio de almacenamiento a 60°C. En general, los modelos de regresión lineal simple mostraron R^2 mayores a 0,93, lo cual indica que estas ecuaciones representan eficientemente el efecto del tiempo en las variables químicas analizadas (IP, DC e *Ip-A*) sobre los diferentes tratamientos de aceite de canola durante el almacenamiento. Además, se detectaron diferencias significativas entre las pendientes (β_1) obtenidas del análisis de regresión lineal de las variables dependientes IP, DC e *Ip-A*. Mayores pendientes (β_1) indican mayor tendencia para la oxidación lipídica. En general, para los tres indicadores analizados, se observó que el tratamiento con BHT tuvo las menores pendientes, mientras que el control tuvo las mayores pendientes y las muestras con terpenos mostraron pendientes intermedias. Para el índice de peróxido (IP), el tratamiento con sabineno hidratado no tuvo diferencias significativas con el BHT, y tuvo menor pendiente que los tratamientos con carvacrol y timol. Las muestras con carvacrol y timol tuvieron menores pendientes que el control, pero superiores al BHT. En cuanto al índice de dienos conjugados (DC), los tratamientos con timol y sabineno hidratado resultaron con pendientes similares al BHT, y el tratamiento con carvacrol tuvo mayor pendiente que estos y menor que el control. Para el caso del índice de *p*-anisidina (*Ip-A*), los tratamientos con

terpenos tuvieron pendientes intermedias entre el control y el BHT. La muestra con BHT tuvo la menor pendiente, seguida por timol y sabineno hidrato, y luego por carvacrol, con diferencias significativas.

En otros trabajos se demostró que los monoterpenos timol y carvacrol son los compuestos más activos de la familia de monoterpenos oxigenados (Ruberto y Baratta, 2000). Es de gran conocimiento la alta actividad antioxidante de estos monoterpenos fenólicos (Beena *et al.*, 2013). De hecho, timol y carvacrol son los responsables de la actividad antioxidante de muchos aceites esenciales que los contienen (Safaei-Ghomi *et al.*, 2009; Ündeğera *et al.*, 2009; Ojeda-Sana *et al.*, 2013).

Tabla 5.2. Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables dependientes: índice de peróxidos (IP), índice de dienos conjugados (DC) e índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) en aceite de canola control y con el agregado de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol, y con el antioxidante sintético BHT durante su almacenaje.

Variable	Muestra	β_0^*	β_1^*	**	R^2
IP	BHT	4,6152 ± 0,2712	2,3830 ± 0,0323	c	0,9924
	Control	5,3684 ± 0,7618	3,2607 ± 0,2106	a	0,9927
	Carvacrol	5,7862 ± 0,4764	2,7789 ± 0,0713	b	0,9824
	Sabineno hidrato	7,1183 ± 0,1417	2,3801 ± 0,0294	c	0,9708
	Timol	6,9490 ± 0,7081	2,5321 ± 0,2004	c	0,9718
DC	BHT	1,2028 ± 0,0408	0,2815 ± 0,0145	c	0,9875
	Control	1,2912 ± 0,0406	0,3494 ± 0,0151	a	0,9906
	Carvacrol	1,4110 ± 0,0653	0,3222 ± 0,0049	b	0,9834
	Sabineno hidrato	1,4137 ± 0,0530	0,2977 ± 0,0026	c	0,9848
	Timol	1,4285 ± 0,1172	0,3100 ± 0,0145	b	0,9808
<i>Ip</i> -A	BHT	-0,3934 ± 0,0117	0,5044 ± 0,0042	c	0,9613
	Control	-0,7909 ± 0,2417	0,8317 ± 0,0651	a	0,9647
	Carvacrol	-0,6513 ± 0,1954	0,6233 ± 0,0459	b	0,9461
	Sabineno hidrato	-0,5792 ± 0,0967	0,4795 ± 0,0352	c	0,9471
	Timol	-0,0133 ± 0,1630	0,4815 ± 0,0094	c	0,9789

* Ecuaciones de regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$. donde Y = variable dependiente índice de peróxidos (IP), índice de dienos conjugados (DC) e índice de *p*-Anisidina (*Ip*-A) y X = variable independiente (días).

** ANOVA y test DGC: pendientes (β_1) de cada variable seguidas por letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos $\alpha = 0,05$.

Análisis de componentes principales

En la Figura 5.4 se muestra el Biplot obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) de ACP realizado con los datos de las variables químicas analizadas para estos compuestos antioxidantes: DPPH-IC50 de los antioxidantes, y los indicadores químicos (IP, *Ip*-A y DC) de las muestras de aceite de canola (control, con BHT, con carvacrol, sabineno hidrato y timol) durante el almacenaje. Las dos primeras CP explican el 97,3% de la variabilidad total de las muestras. Este porcentaje se considera aceptable para establecer correlaciones entre variables. La dispersión de los puntos indica la variabilidad entre las muestras. Los indicadores químicos de oxidación lipídica (IP, DC e *Ip*-A) evaluados sobre las muestras de aceite de canola se asociaron positivamente entre ellos, mostrando coeficientes de correlación de Pearson positivos superior a 0,83. La muestra control se encuentra asociada a mayores valores de los indicadores químicos de oxidación. Las muestras con BHT y con timol y sabineno-hidrato se asociaron entre ellas y opuestas a la muestra control. La muestra con carvacrol se ubicó en una zona intermedia en el Biplot. No se observó correlación significativa entre los valores de DPPH-IC50 de los compuestos y los indicadores químicos de oxidación en el aceite de canola. Esto puede deberse principalmente a que el sabineno hidrato no tuvo actividad como secuestrante del DPPH y tuvo buena actividad antioxidante sobre el aceite de canola, y el carvacrol presentó actividad frente al DPPH pero inferior estabilidad del aceite de canola, en comparación con los otros monoterpenos.

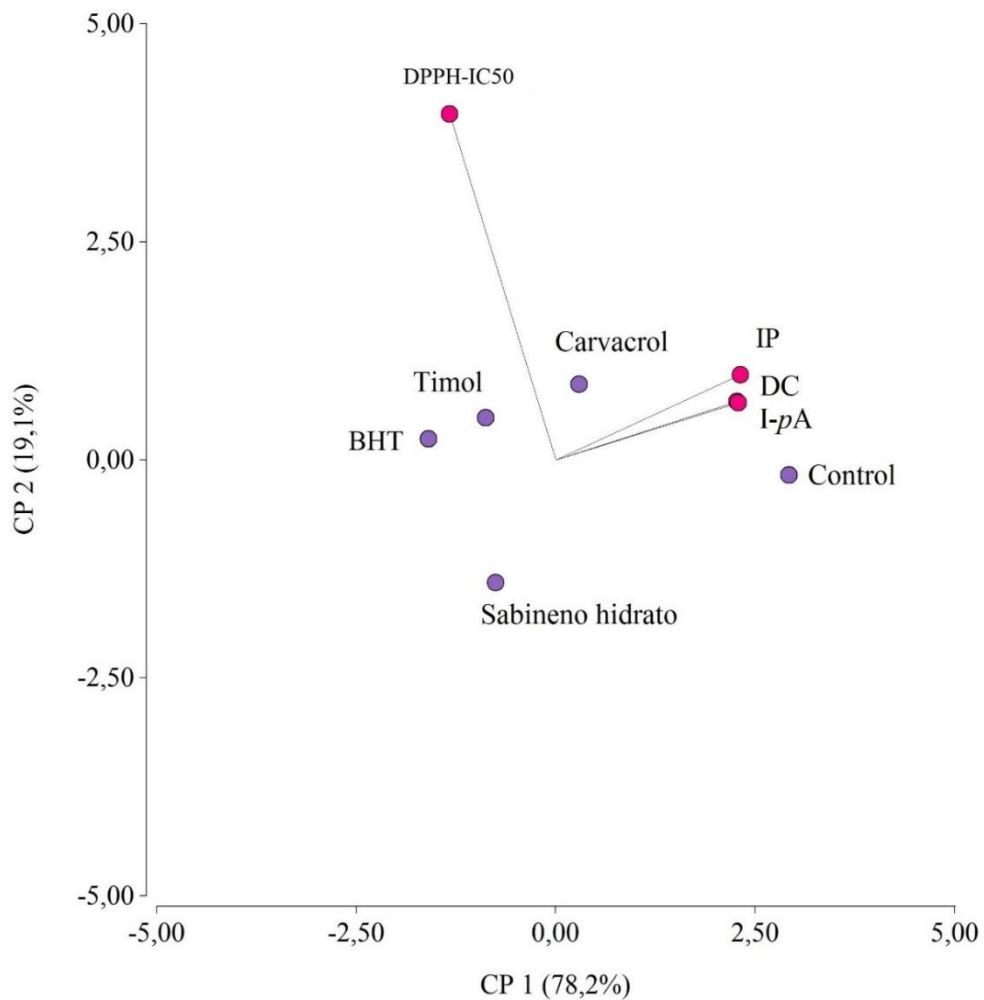


Figura 5.4 Biplot de las primera y segunda componentes principales del análisis de componentes principales. Variables: indicadores químicos (índice de peróxidos: IP, dienos conjugados: DC, índice de p-anisidina, Ip-A) del estudio de oxidación de aceite de canola: control, con el agregado de BHT y los monoterpenos: Carvacrol, Sabineno hidrato y Timol, y el IC50 de DPPH (DPPH-IC50) de los compuestos antioxidantes.

Efecto sinérgico de los monoterpenos junto al antioxidante sintético BHT en aceite de canola

El estudio del efecto sinérgico entre los monoterpenos (compuestos antioxidantes naturales) en combinación con BHT resulta de importancia ya que se busca sustituir a los antioxidantes sintéticos o disminuir su proporción y lograr un efecto antioxidante similar o superior. Los resultados del estudio de almacenaje para determinar el efecto antioxidante sinérgico entre los monoterpenos y el antioxidante sintético BHT en aceite de canola se presentan en las Figuras 5.5 (carvacrol-BHT), 5.6 (sabineno hidrato-BHT) y 5.7 (timol-BHT). En el día 0 de almacenaje todos las combinaciones de los tres monoterpenos con el BHT tuvieron valores de IP similares (1,61 meq O₂/kg). En general los valores de IP se incrementaron significativamente durante el tiempo de almacenaje en todos los tratamientos y se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, para los tres monoterpenos en las diferentes combinaciones con BHT. En todos los casos la muestra control (sin antioxidantes) resultó, al final del estudio (14 días de almacenaje) con mayor IP en comparación con los aceites que tenían antioxidantes agregados.

En la Figura 5.5 (combinaciones de carvacrol con BHT) se observa que las mezclas monoterpenos:BHT 0:100 (BHT puro) y 20:80 tuvieron los menores valores de IP (a los 14 días), sin diferencias significativas. Las mezclas con mayores cantidades de carvacrol tuvieron superiores IP, sin diferencias significativas entre ellas ni con el carvacrol puro. Esto indicaría que no se observa sinergismo significativo entre estos compuestos para las proporciones analizadas, sin embargo el uso de un 20% de carvacrol y un 80% de BHT proporcionó el mismo efecto antioxidante que utilizando el 100% de BHT.

En la Figura 5.6 (combinaciones sabineno hidrato-BHT) se muestra que los tratamientos BHT puro (0:100), sabineno puro (100:0) y las mezclas 40:60 y 80:20 tuvieron valores similares de IP, mientras que la mezcla 20:80 tuvo el menor valor de IP. Esto indicaría que para esta última proporción (monoterpeno:BHT 20:80) se puede decir que los compuestos estarían actuando sinérgicamente, y se logró un efecto antioxidante superior al combinar el 20% de los monoterpenos con el 80% de BHT, en comparación con el BHT y el monoterpeno puros. El resto de las combinaciones y el monoterpeno puro tuvieron similar actividad antioxidante que el BHT puro.

En la Figura 5.7 (combinaciones timol-BHT) se observa un efecto similar al del sabineno hidrato con el BHT, la proporción que mostró menor IP fue la 20:80, y el BHT puro y el timol puro y el resto de las mezclas tuvieron IP similares. Es decir que también para este monoterpeno se podría decir que actúa sinérgicamente con el BHT en la proporción 20:80.

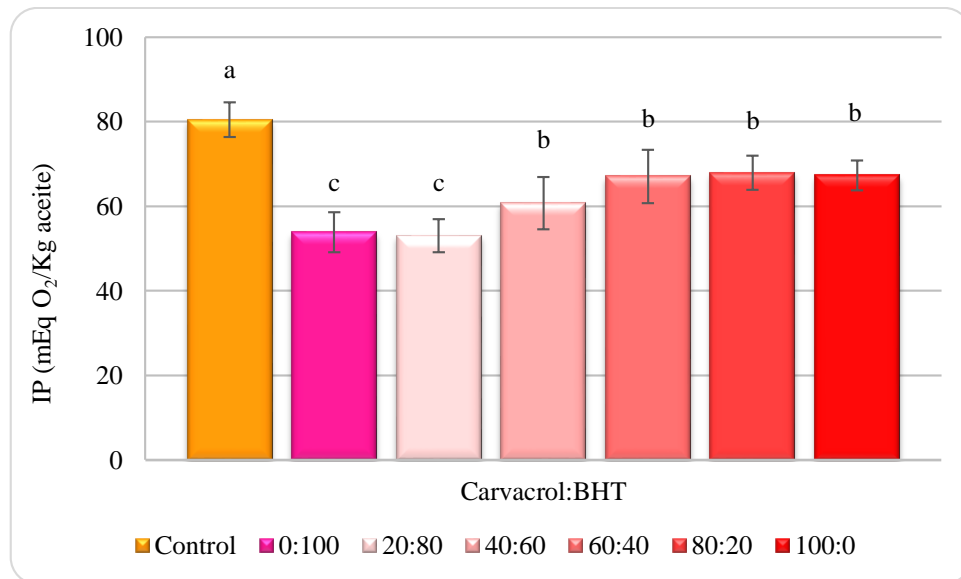


Figura 5.5 Índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola adicionado con el monoterpeno **Carvacrol** y el antioxidante sintético BHT en las siguientes proporciones monoterpeno:BHT: control, 0:100 (BHT), 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 observado en los días 0 y 14 del estudio de oxidación acelerada a 60 °C. Letras diferentes sobre las barras en un mismo día indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$).

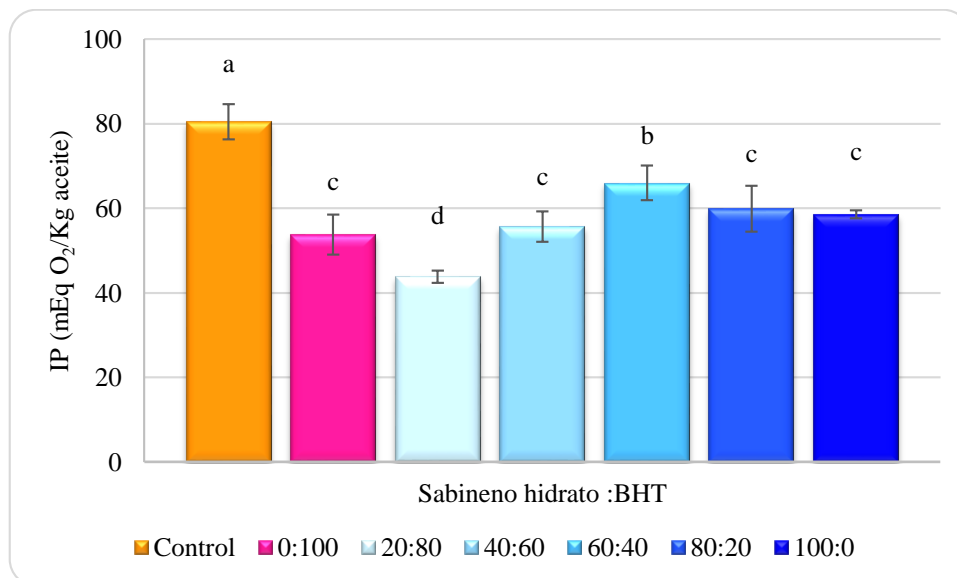


Figura 5.6 Índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola adicionado con el monoterpeno **Sabineno hidrato** y el antioxidante sintético BHT en las siguientes proporciones monoterpeno:BHT: control, 0:100 (BHT), 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 observado en los días 0 y 14 del estudio de oxidación acelerada a 60 °C. Letras diferentes sobre las barras en un mismo día indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$).

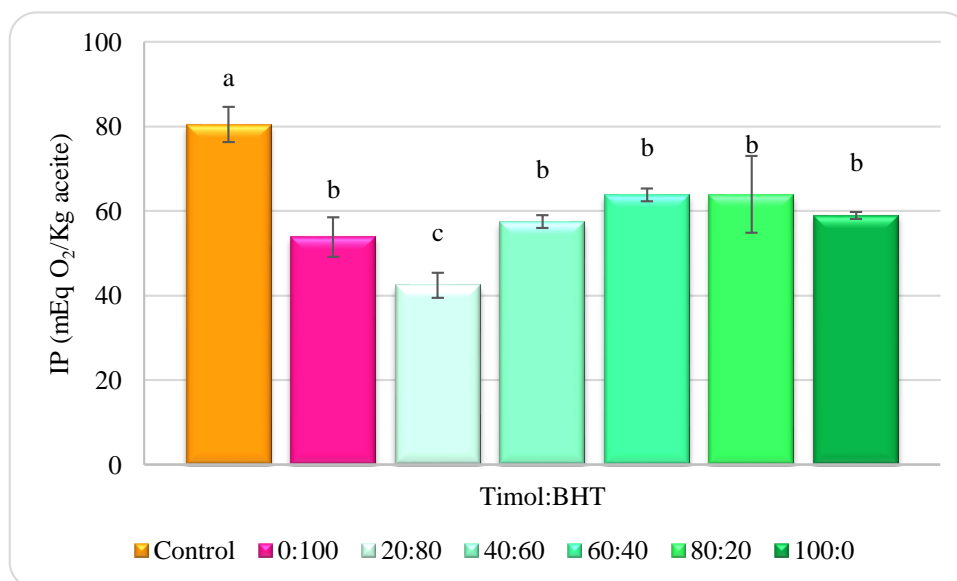


Figura 5.7 Índice de peróxidos (IP) de las muestras de aceite de canola: aceite de canola control y aceite de canola adicionado con el monoterpeno **Timol** y el antioxidante sintético BHT en las siguientes proporciones monoterpeno:BHT: control, 0:100 (BHT), 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 y 100:0 observado en los días 0 y 14 del estudio de oxidación acelerada a 60°C. Letras diferentes sobre las barras en un mismo día indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA y test DGC, $\alpha=0,05$).

Estos resultados permiten afirmar que posiblemente exista un comportamiento sinérgico entre estos monoterpenos y el BHT, sin embargo es necesario un estudio más profundo,

con mayor cantidad de combinaciones y concentraciones de los compuestos puros para confirmar dicho efecto sinérgico.

Es difícil determinar de antemano el poder antioxidante de un aceite esencial, solo teniendo en cuenta sus constituyentes. Milos y Makota, (2012) mostraron un efecto sinérgico más o menos pronunciado entre combinaciones de dos antioxidantes, indicando que la presencia del grupo hidroxilo en timol y carvacrol juega un papel crucial para este fenómeno. Confirmando un efecto sinérgico en la actividad antioxidante entre timol y carvacrol.

Conclusiones

Los resultados del estudio de estabilidad de aceite de canola con el agregado de los monoterpenos timol, carvacrol y sabineno hidrato indican que dichos compuestos presentaron actividad antioxidante. En general, los compuestos sabineno hidrato y timol tienen similar actividad al antioxidante sintético BHT y mayor actividad antioxidante que el carvacrol. En el caso de los monoterpenos carvacrol y timol, se puede atribuir esta actividad anti-oxidante a que actúan como secuestrantes de radicales peróxidos que se forman al oxidarse los ácidos grasos presentes en el aceite de canola y ambos al ser compuestos fenólicos estabilizan el radical formado por resonancia en su anillo aromático, ya que presentan actividad secuestrante del radical DPPH. En el caso del monoterpeno sabineno hidrato, se puede atribuir su actividad antioxidante a que actúa como inhibidor de la formación de los radicales peróxidos.

Se observa efecto sinérgico en la combinación de los monoterpenos sabineno hidrato y timol con el BHT en la proporción 20:80, es decir que para estos compuestos es conveniente utilizar una mezcla 20:80 de monoterpenos:BHT logrando mejor efecto antioxidante que con los compuestos puros. Para las mezclas carvacrol-BHT no se observa dicho efecto, sin embargo la combinación 20:80 resulta con similar actividad que el BHT puro, lo cual es importante para disminuir el uso de este antioxidante sintético. Un estudio más exhaustivo permitiría comprender el efecto que ocurre al combinar un monoterpeno y el antioxidante sintético BHT.

Podemos concluir que estos monoterpenos son compuestos antioxidantes de origen natural que podrían ser utilizados como aditivos en alimentos de alto contenido de lípidos para sustituir o disminuir el uso de los antioxidantes sintéticos.

Bibliografía Citada

- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. y Aruoma, O. I. 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*. 32. 31-36
- Agourram, A., Ghirardello, D., Rantsiou, K., Zeppa, G., Belviso, S., Romane, A., Oufdou, K. y Giordano, M. 2013. Phenolic content, antioxidant potential, and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. *International Journal of Food Properties*. 16. 1092-1104
- AOAC 1995. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Ed). Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*. 76. 445-S450
- Becker, E. M., Ntouma, G. y Skibsted, L. H. 2007. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. *Food Chemistry*. 103. 1288-1296
- Beena, Kumar, D. y Rawat, D. S. 2013. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23. 641-645
- CAA 2012. Capítulo VII. Alimentos Grasos Aceites Alimenticios (Artículo 523bis - Res 2012, 19.10.84). En: *Código Alimentario Argentino*. Ley 18.284 (18.7.1969). Ed). pp.
- COI 2001. Método de análisis prueba espectrofotométrica en el ultravioleta En: *International Olive Oil Council (IOOC)* Ed). Madrid. Document COI/T 20/ Doc n° 19/Rev 1. pp.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P. J. y Zygadlo, J. A. 2010. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of *Origanum* species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58. 1115-1120
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. *InfoStat*.
- Ferri, M., Gianotti, A. y Tassoni, A. 2013. Optimisation of assay conditions for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in cereal food components. *Journal of Food Composition and Analysis*. 30. 94-101
- Frankel, E. N. 2005. *Lipid Oxidation*. (2nd Ed). Bridgewater. The Oily Press. pp.
- IUPAC 1987. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. (7th ed Ed). Oxford, UK. Paquot, C., Hautfenne, A. . Method Number 2.504. pp.
- Johnson, R. A. y Wichern, D. W. 2007. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. (6 Ed). New Jersey, USA. Pearson. 773 pp.
- Kaiser, A., Kammerer, D. R. y Carle, R. 2013. Impact of blanching on polyphenol stability and antioxidant capacity of innovative coriander (*Coriandrum sativum* L.) pastes. *Food Chemistry*. 140. 332-339
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. y Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85. 633-640
- Lindberg Madsen, H. y Bertelsen, G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*. 6. 271-277

- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., Cindio, B. d., Houghton, P. J., Menichini, F. y Frega, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*. 117. 174-180
- Mastelić, J., Jerković, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrčeki, V., Žarković, N., Brčić-Kostić, K., Vikić-Topić, D. y Müller, N. 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 3989-3996
- Milos, M. y Makota, D. 2012. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and *p*-cymene in a model system using the Briggs-Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*. 131. 296-299
- Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A. y Moreno, S. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 31. 189-195
- Olmedo, R. H., Nepote, V., Mestrallet, M. G. y 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
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. y Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology*. 46. 2648-2655
- Ruberto, G. y Baratta, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69. 167-174
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z. y Batooli, H. 2009. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*. 115. 1524-1528
- Tsimidou, M. y Boskou, D. 1994. Antioxidant activity of essential oils from the plants of the *Lamiaceae* family. En: *Spices, Herbs and Edible Fungi* (1 Ed). Amsterdam. Elsevier. pp. 273-284
- Ündeğera, Ü., Başaranb, A., Degenc, G. H. y Başaran, N. 2009. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*. 47. 2037-2043
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G. y Fu, Y. J. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*. 108. 1019-1022
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H. y Raneva, V. G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64. 59-66
- Yin, J., Becker, E. M., Andersen, M. L. y Skibsted, L. H. 2012. Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. *Food Chemistry*. 135. 2195-2202

Efecto antioxidante de los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol sobre semillas de girasol tostadas

Introducción

Como se explicó en el capítulo III, debido a la composición del aceite de girasol, rico en ácidos grasos poliinsaturados tales como 18:2 (ácido linoleico) las semillas de girasol son consideradas de gran valor nutricional (Brătfălean *et al.*, 2008) y son principalmente utilizadas en la producción de aceites comestibles y para la alimentación animal. La susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación depende directamente de su grado de insaturación (Nepote *et al.*, 2006, 2009; Riveros *et al.*, 2009; Olmedo *et al.*, 2013). Las reacciones de oxidación implican considerables pérdidas de calidad, aceptación sensorial y valor nutricional limitando la vida útil de los alimentos lipídicos (Nepote *et al.*, 2006; Asensio *et al.*, 2011, 2012).

Los antioxidantes son compuestos que tienen la capacidad de retrasar, retardar o prevenir procesos de oxidación de lípidos (Decker, 2002). La aplicación de antioxidantes es la forma técnicamente más simple de reducir la oxidación de los lípidos. Los antioxidante naturales provenientes de plantas aromáticas comestibles tienen muchas ventajas tales como: son aceptados por los consumidores, son considerados seguros al provenir de fuentes naturales y tienen propiedades sensoriales funcionales (Olmedo *et al.*, 2009; Asensio *et al.*, 2012)

La estabilidad oxidativa es un indicador importante para determinar la calidad y vida útil de los aceites ya que los compuestos de bajo peso molecular que otorgan sabores desagradables son producidos durante el proceso de oxidación, logrando que el aceite sea inaceptable para los consumidores o para el uso industrial como ingrediente de los alimentos (Choe y Min, 2006)

El análisis de los gases del espacio de cabeza por micro-extracción en fase solida (HS-SPME) es un método rápido, sensible, sin disolventes y económico para la preparación de la muestra antes del análisis de cromatografía de gases (Lambropoulou *et al.*,

2007). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la determinación de compuestos volátiles en muestras de aceite comestibles frescos y oxidados (Vichi *et al.*, 2008).

La aplicación de componentes de aceites esenciales de planta aromáticas como antioxidantes en alimentos lipídicos no ha sido muy evaluada hasta el momento. Al igual que los aceites esenciales, sus componentes impartirían cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos. Por lo tanto, una caracterización química y sensorial simultánea nos permitiría lograr un balance entre aceptabilidad sensorial y propiedades antioxidantes.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto antioxidante de los monoterpenos carvacrol, timol y sabineno hidrato en semillas de girasol tostadas.

Materiales y Métodos

Materiales

Semillas de girasol sanas y limpias de la cosecha 2010, *Helianthus annuus*, provistas por la compañía “Argensun S.A.” de Buenos Aires, Argentina.

Los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Preparación de muestras y tratamientos

Las semillas de girasol fueron tostadas a 150 °C en un horno (Memert, model 600, Schwabach, Germany) por 30 minutos. Sobre las semillas tostadas, se agregó en forma de glaseado aceite de girasol refinado (Natura, Aceitera General Dehesa, General Cabrera, Córdoba, Argentina) en una proporción 2% (p/p). Se prepararon cinco productos: semillas de girasol tostadas sin el agregado de aditivos (GT-C), con el agregado de antioxidante sintético BHT (GT-BHT), y con el agregado de los monoterpenos: carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T). Los compuestos antioxidantes (BHT y monoterpenos) se incorporaron en el aceite de glaseado, para obtener una concentración final de 0,02% p/p de antioxidante sobre el producto final.

Almacenaje y muestreo

Cada muestra de semillas de girasol tostadas (100 g de cada producto) fue empaquetada en bolsas plásticas de 27 x 28 cm (Ziploc; SC Johnson & Son, Buenos Aires, Argentina) y almacenadas a temperatura ambiente (23 °C) en oscuridad, con 60-70% de humedad relativa, durante 35 días. Las muestras fueron extraídas del almacenaje cada 7 días para la evaluación de los cambios en los indicadores químicos y sensoriales. Las muestras también se evaluaron en el día “cero”.

Análisis químicos

Las muestras de semillas de girasol tostadas almacenadas se prensaron (prensa hidráulica de 20 toneladas, Hermes I. Dupraz S.R.L. Córdoba, Argentina) para extraer el aceite. El aceite obtenido fue sometido a los siguientes análisis químicos: índice de peróxidos (IP) (AOAC, 1995) e índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) (IUPAC, 1987).

Análisis de volátiles de oxidación (AV)

Condiciones de ES-MEFS. Para el análisis de análisis de gases en el espacio de cabeza (EC) se utilizó la metodología de microextracción en fase sólida (MEFS). Se utilizó una fibra de MEFS de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm , StableFlex, 1 cm de largo, montado en un conjunto de soporte manual de SPME de Supelco (Bellefonte, Pensilvania). Antes de su uso, la fibra se acondicionó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de extracción fueron seleccionadas de acuerdo a un método optimizado previamente en nuestro laboratorio. Se colocaron 2 gr de muestra de semillas de girasol tostadas en un vial dentro de un baño de agua mantenido a 60°C, para acelerar el equilibrio de los compuestos volátiles entre la muestra y el espacio de cabeza. Después de un período de equilibrio de la muestra de 10 min, la aguja del dispositivo de SPME se insertó en el vial a través del septo y la fibra se expuso al espacio de cabeza del vial durante 30 min. Después de ese tiempo, la fibra se retrajo hacia el conjunto de la aguja, se retiró del frasco, y se transfirió al puerto de inyección de la unidad de CG, donde fue desorbida inmediatamente.

Análisis de cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (CG-EM). El análisis de los compuestos volátiles se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer Clarus 600 acoplado a detector de masas de trampa de iones (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA). Se utilizó una columna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm i.d x 0,25 mm de espesor; Supelco, Bellefonte, Pensilvania). El programa de temperaturas fue: 10 minutos a 50 °C y luego una rampa de calentamiento de 4 °C/minuto hasta llegar a 280 °C y se mantuvo a esta temperatura por 5 minutos. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1 ml / min. Las temperaturas de la fuente de iones y de la línea de transferencia del GC-MS fueron 180 y 300 °C, respectivamente. La temperatura del inyector fue de 270 °C y el tiempo para la desorción de la fibra fue de 10 min en el modo *splitless* (1,5 min sin división del período).

La identificación de los compuestos volátiles en las muestras de semillas de girasol tostadas se llevó a cabo en el modo de barrido completo (m/z 40-550), por una combinación de biblioteca espectral de masas NIST, por comparación de sus índices de retención y datos publicados de espectros de masa (Beltrán *et al.*, 2011) y tiempos de retención de cromatografía de gases de los compuestos estándar. Se registraron las respuestas cromatográficas de los compuestos volátiles detectados (recuentos por área de pico) para las mediciones comparativas de cada compuesto en las muestras estudiadas.

Métodos sensoriales

Análisis descriptivo

Sobre las muestras extraídas del almacenaje se realizó un análisis descriptivo, con la finalidad de conocer cuantitativamente y cualitativamente los atributos sensoriales de los productos frescos (perfil sensorial inicial) y los cambios durante su almacenaje. A tal fin, se utilizó un panel constituido por 10 jueces (6 mujeres y 4 hombres) que fueron previamente entrenados de acuerdo a lo recomendado por Lawless y Heymann (2010) y por lo realizado sobre productos de maní por Grosso y Resurreccion (2002). La metodología del entrenamiento y evaluación de las muestras ya fue mencionada en el capítulo III (Plemmons y Resurreccion, 1998; Nepote *et al.*, 2009).

Durante el entrenamiento se describieron y definieron los atributos que se muestran en la Tabla 6.1. Para cada atributo se utilizaron productos de referencias, y fueron asignadas sus intensidades en una escala lineal no estructurada de 0-150 mm. Además para cada atributo se utilizó girasol tostado como referencia de todos los atributos, muestra que se denomina "*warm up*" (Plemmons y Resurreccion, 1998). En la Tabla 6.2 se muestran las intensidades asignadas a las referencias y a la muestra "*warm up*".

Tabla 6.1. Definición de atributos sensoriales evaluados sobre las muestras de girasol tostado.

Atributo	Definición
<i>Apariencia</i>	
<i>Color marrón</i>	Apariencia asociada al color marrón.
<i>Rugosidad</i>	Apariencia asociada con una superficie irregular, despereja.
<i>Brillo</i>	Cantidad de luz reflejada por la superficie.
<i>Sabor</i>	
<i>Girasol tostado</i>	Sabor y aroma asociado con un girasol tostado en un punto medio.
<i>Girasol oxidado</i>	Sabor y aroma asociado con aceite/grasa rancia o vieja.
<i>Cartón</i>	Sabor y aroma asociado a cartón húmedo.
<i>Esencia</i>	Sabor y aroma asociado a los monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol.
<i>Gusto</i>	
<i>Amargo</i>	El gusto percibido en la lengua asociado a una solución amarga como la cafeína.
<i>Ácido</i>	El gusto percibido en la lengua asociado a una agente ácido como el ácido cítrico.
<i>Factor de sensación</i>	
<i>Astringencia</i>	Sensación de sequedad en boca y lengua.
<i>Textura</i>	
<i>Crujiente</i>	Magnitud de sonido generado al masticar con los molares.
<i>Dureza</i>	Fuerza necesaria para comprimir y romper un alimento con los molares.

Tabla 6.2. Intensidades de referencias estándares y de muestra “*warm up*” utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de girasol tostado.

Atributos	Referencias estándares	Intensidad de atributos (escala 0-150 mm)	Intensidad “ <i>warm up</i> ”
Color marrón	Poroto ¹	10	52
	Café ²	120	
Rugosidad	Copos de maíz ³	110	14
Brillo	Poroto ¹	35	21
Sabor girasol tostado	Girasol tostado medio ⁴	44	57
Sabor girasol oxidado	Girasol oxidado ⁵	100	7
Sabor cartón	Cartón	30	20
Sabor carvacrol	Monoterpeno carvacrol al 0,02% p/p en granos de girasol tostados	40	0
Sabor sabineno hidrato	Monoterpeno sabineno hidrato al 0,02% p/p en granos de girasol tostados	30	0
Sabor timol	Monoterpeno timol al 0,02% p/p en granos de girasol tostados	35	0
Gusto amargo	Cafeína		
	0.05%	20	19
	0.08%	50	
0.15%	100		

Tabla 6.2. Intensidades de referencias estándares y de muestra “*warm up*” utilizados en las pruebas sensoriales descriptivas de girasol tostado.

Atributos	Referencias estándares	Intensidad de atributos (escala 0-150 mm)	Intensidad “ <i>warm up</i> ”
Gusto amargo	Cafeína		
	0.05%	20	19
	0.08%	50	
	0.15%	100	
Gusto ácido	Ácido cítrico		7
	0.05%	20	
	0.08%	50	
	0.15%	100	
Astringencia	Té ⁶	34	35
Crujiente	Copo de maíz ³	110	23
Dureza	Almendra ⁷	70	19

¹ Porotos obtenidos comercialmente en “Grandiet”, provincia de Córdoba, Argentina.

² Café Nescafé® clásico sabor intenso elaborado por Nestlé Brasil Ltda. Importado y fraccionado por Nestlé Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina.

³ Copos de maíz “Granix”, Buenos Aires, Argentina.

⁴ Girasol pelado tostado. El grado de tostado fue a punto medio.

⁵ Girasol pelado tostado que fue almacenado durante 126 días a 40°C.

⁶ Té Taragüí elaborado por Establecimiento Las Marías. Corrientes, Argentina.

⁷ Almendras obtenidas comercialmente en “Grandiet”, Córdoba, Argentina.

La evaluación de las muestras de estudio se realizó de manera individual teniendo siempre presente en la sala de evaluación un listado de los atributos con sus respectivas definiciones, un listado de las referencias estándares con sus respectivas intensidades para cada atributo y los valores de intensidades del “*warm up*”. A cada juez se le entregaron 5 gramos de muestra de cada producto a evaluar, el “*warm up*” y las referencias estándares. Las muestras fueron codificadas con número de tres dígitos y fueron presentadas al azar.

Los resultados de las evaluaciones se registraron en planillas, asignándoles valores de intensidades para cada atributo usando una escala lineal no estructurada de 0-150 mm.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico InfoStat, versión 2012p (Di Rienzo *et al.*, 2012). La evaluación sensorial descriptiva fue organizada en bloques por panelista. La variabilidad de bloque a bloque fue tomada en cuenta con el fin de aumentar la sensibilidad del estudio (Meilgaard *et al.*, 2010). Se calcularon para cada variable química y sensorial los promedios y las desviaciones estándar. Se realizó análisis de la varianza ($\alpha = 0,05$) y prueba posterior por el test de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) para encontrar diferencias significativas entre los promedios (Sokal y Michener, 1958). Se utilizaron las ecuaciones de regresión lineal simple para determinar el efecto de la variable independiente (tiempo de almacenamiento) sobre los parámetros químicos y sensoriales evaluados durante el almacenamiento de las muestras. Se ajustó un modelo lineal simple: $y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde 'y' fue la variable dependiente (indicadores químicos y atributos sensoriales); β_0 fue una constante que es igual al valor de la 'y' cuando el valor de 'X' = 0; β_1 es el coeficiente de 'X', 'X' es la variable independiente (tiempo). Los análisis de correlación se realizaron empleando el coeficiente de Pearson con el fin de obtener las asociaciones entre las variables químicas y sensoriales del estudio de almacenamiento. El análisis de componentes principales (ACP) (Johnson y Wichern, 2007) se realizó sobre la matriz de correlación de los datos estandarizados de los indicadores químicos (índice de peróxidos, dienos conjugados e índice de *p*-anisidina y volátiles de oxidación) del estudio de almacenamiento de semillas de girasol tostadas y los atributos sensoriales (oxidado, cartón, girasol tostado y el sabor del aceite esencial) de las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con los monoterpenos (GT-Car, GT-S y GT-T) y con BHT (GT-BHT). El propósito del ACP fue explorar las asociaciones entre las variables sensoriales y químicas de las muestras.

Resultados y Discusión

Análisis químicos y sensoriales de las semillas de girasol tostadas durante el almacenaje

Análisis químicos

El cambio en los valores de IP de las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con los monoterpenos (GT-Car, GT-S y GT-T) y con BHT (GT-BHT) durante el almacenaje se muestra en la Figura 6.1. En general, los valores de IP de todos los tratamientos se incrementaron significativamente ($\alpha = 0,05$) con el tiempo de almacenamiento. Inicialmente, todos los tratamientos tuvieron el mismo valor de IP (1,73 meq O₂/kg), y a partir del día 7 se observaron diferencias significativas en el IP de las muestras. La muestra con BHT mostró los menores valores de IP a partir del día 7 de almacenaje. A partir del día 21, la muestra control mostró los mayores valores de IP. Las muestras con monoterpenos (GT-Car, GT-S y GT-T) tuvieron valores intermedios de IP entre el control y el BHT. A partir del día 21, la muestra con sabineno (GT-S) presentó los menores valores de IP en comparación con los otros monoterpenos. Las muestras con carvacrol y timol no se diferenciaron significativamente en sus valores de IP durante todo el almacenaje. En el día 35, el último día de almacenaje, la muestra GT-BHT tuvo el menor valor de IP (27,74 meq O₂/kg) y la muestra GT-C el mayor valor de IP (145,35 meq O₂/kg). El tratamiento GT-S (58,05 meq O₂/kg) tuvo el menor valor de IP entre las muestras con monoterpenos y presentó diferencias significativas con ellos. Las muestras GT-Car (98,95 meq O₂/kg) y GT-T (89,2 meq O₂/kg) no mostraron diferencias significativas entre ellas.

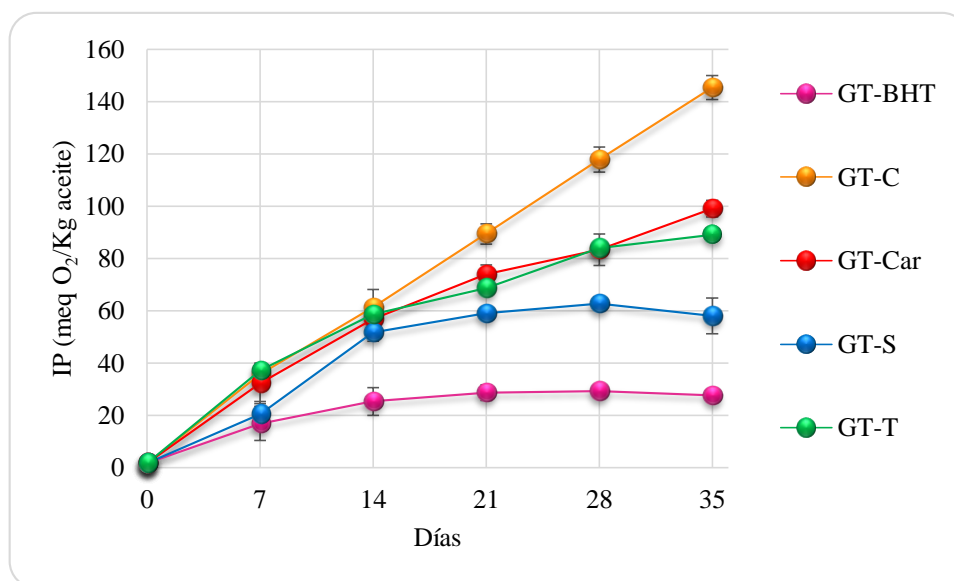


Figura 6.1 Índice de peróxidos (IP) de las muestras de semillas de girasol tostadas: control (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT), y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje a temperatura ambiente.

El cambio en los valores de I_p -A de las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con los monoterpenos (GT-Car, GT-S y GT-T) y con BHT (GT-BHT) durante el almacenaje se muestra en la Figura 6.2. En general, los valores de I_p -A de todos los tratamientos se incrementaron significativamente ($\alpha = 0,05$) con el tiempo de almacenamiento a excepción del tratamiento GT-BHT que no se modificó significativamente durante el almacenaje. Inicialmente, todos los tratamientos tuvieron el mismo valor de I_p -A (2,27) y mostraron diferencias significativas a partir del día 14. En el día 21 se observa que la muestra control tuvo los mayores valores, el tratamiento con BHT tuvo los menores valores, y las muestras con monoterpenos tuvieron valores de I_p -A intermedios, sin observarse diferencias significativas entre las muestras con monoterpenos. En el día 35, se observa el mismo comportamiento que en el día 21, la muestra GT-C presentó el mayor valor de I_p -A (9,05) y la muestra GT-BHT el menor valor (2,71). Las muestras de girasol tostado con el agregado de los monoterpenos GT-Car, GT-S y GT-T no presentaron diferencias significativas en sus valores de I_p -A (6,45; 5,95 y 6,48, respectivamente).

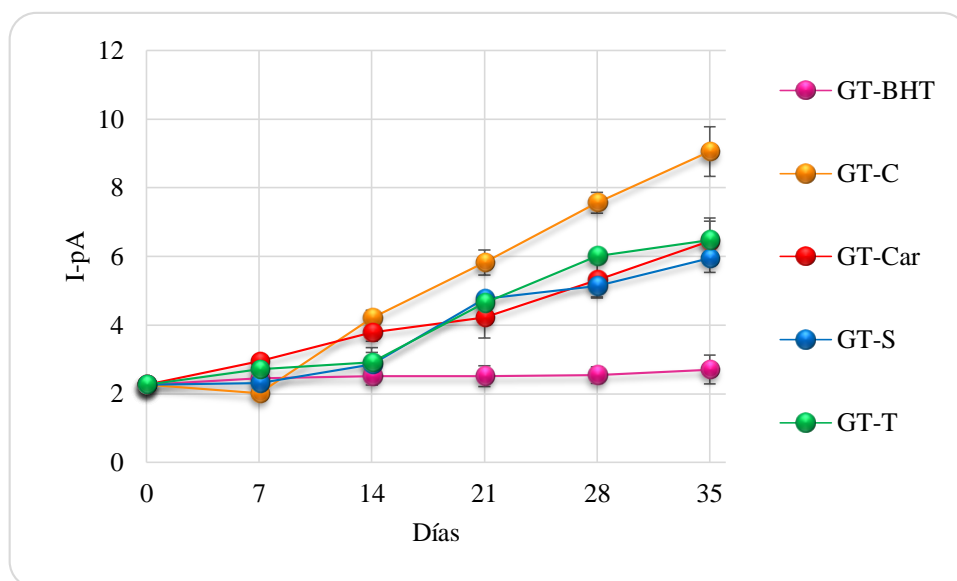


Figura 6.2 Índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) de las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT), y los monoterpénos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje a temperatura ambiente.

El principal aldehído seleccionado para la evaluación de la estabilidad oxidativa fue hexanal. Este es un compuesto volátil, y su contenido está directamente relacionado con el desarrollo del olor y sabor a oxidado o rancio, tiene un bajo umbral de olor y se considera un indicador de la calidad del aceite (Mexis *et al.*, 2009). El hexanal se deriva de 13-hidroperóxido, que es uno de los principales hidroperóxidos formados por auto-oxidación de ácido linoleico (Fullana *et al.*, 2004).

El área del pico obtenido (cuentas electrónicas) para el hexanal por medio del análisis de los volátiles (AV) de las muestras de girasol tostado por CG-EM se puede relacionar directamente con el contenido de este compuesto en las muestras, a los fines comparativos. El cambio en los valores de área de pico del hexanal, de las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con los monoterpénos (GT-Car, GT-S y GT-T) y con BHT (GT-BHT) durante el almacenaje se muestra en la Figura 6.3. En general, los contenidos de hexanal de todos los tratamientos se incrementaron significativamente ($\alpha = 0,05$) con el tiempo de almacenamiento a excepción del tratamiento GT-BHT que no se modificó significativamente. Inicialmente, todos los tratamientos tuvieron valores similares de área de pico del hexanal entre 1,05 y 1,89 (x 1.000.000), y se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a partir del día 7 de almacenaje. El tratamiento

control tuvo las mayores áreas y el BHT tuvo las menores áreas, mientras que los tratamientos con monoterpenos tuvieron áreas intermedias, sin diferencias significativas entre ellos. En el día 35, los valores de las áreas reflejan este comportamiento: GT-C tuvo el mayor valor final (20,30), GT-BHT tuvo el menor valor (2,16), y las muestras con monoterpenos mostraron valores intermedios GT-Car (12,82), GT-S (11,66) y GT-T (11,72) (x 1.000.000).

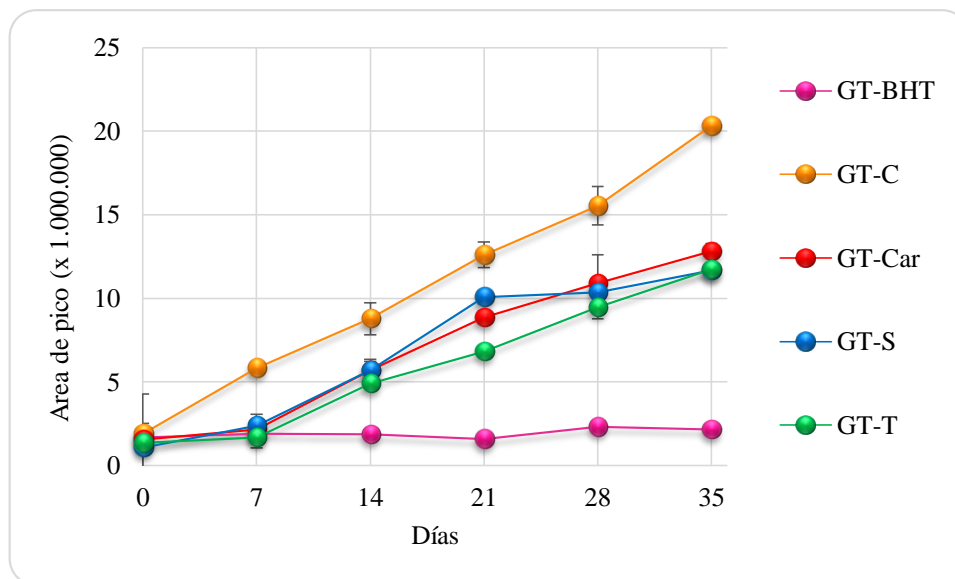


Figura 6.3 Áreas de pico (cuentas electrónicas x 1000000, obtenidas por CG-EM de los volátiles de las muestras) para el hexanal en las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT), y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje a temperatura ambiente.

El análisis de los compuestos volátiles de las muestras por CG-EM también permitió detectar el contenido de los antioxidantes agregados (BHT, carvacrol, timol y sabineno hidrato). La variación del área del pico (cuentas electrónicas) para los antioxidantes agregados a las semillas de girasol tostadas durante el almacenaje se muestra en la Figura 6.4.

En la Figura 6.4 se puede observar el decaimiento en la cantidad de antioxidante agregado en las semillas de girasol tostadas. En general todos los antioxidantes disminuyeron durante el tiempo de almacenaje. Se puede ver que los antioxidantes agregados disminuyen más rápidamente al comienzo del almacenaje (0-14 días), siendo mayor la

tendencia en el tratamiento GT-S. Los tratamientos GT-Car y GT-T no mostraron diferencias significativas entre ellos durante todo el tiempo de almacenaje, y la tendencia de disminución de estos compuestos resultó similar a la del BHT.

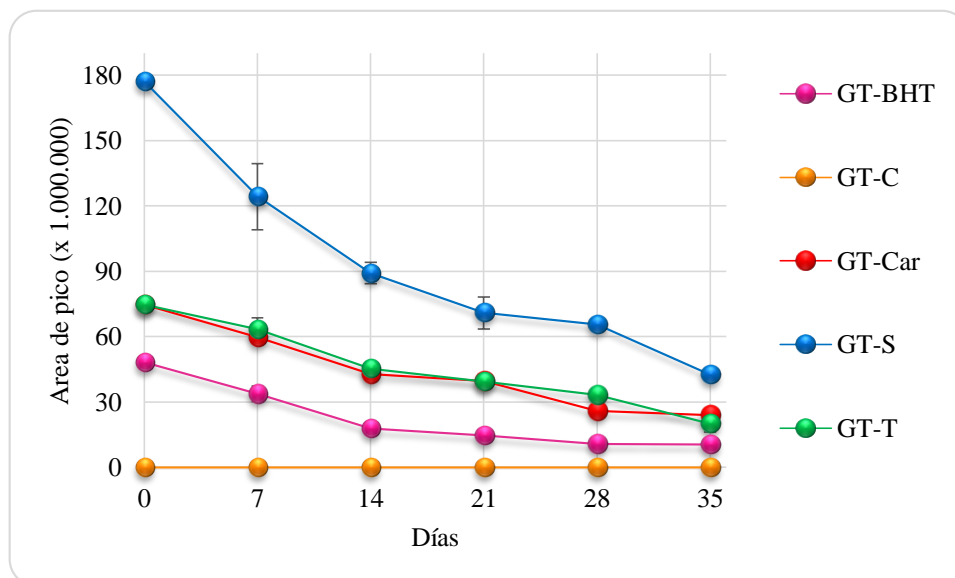


Figura 6.4 Áreas de pico (cuentas electrónicas x 1000000, obtenidas por CG-EM de los volátiles de las muestras) para los compuestos antioxidantes agregados (BHT, carvacrol, sabineno hidrato y timol) en las muestras de semillas de girasol tostadas control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T) durante el almacenaje.

Según los resultados químicos (IP, I_p -A y contenido de hexanal), la adición de BHT y monoterpenos carvacrol, sabineno hidrato y timol proporciona protección a las semillas de girasol tostadas contra la oxidación de los lípidos. Trabajos previos indican el efecto antioxidante del aceite esencial de orégano, rico en su composición química en timol y carvacrol, aplicado a otros alimentos como el aceite de oliva y productos de maní (Olmedo *et al.*, 2008; Asensio *et al.*, 2011, 2012). Estos resultados se relacionan con el estudio de las diferentes especies de orégano (Capítulo IV), ya que las especies que muestran mayor actividad son las que también tienen elevados contenidos de los monoterpenos timol y sabineno hidrato (Cordobés y Compacto).

Análisis sensoriales

La descripción sensorial de las muestras en el día “cero” del almacenamiento se muestra en la Tabla 6.4. Los atributos que más se destacaron en todas las muestras antes del almacenaje fueron el color (intensidades entre 53,25-54,17 en una escala 0-150) y el sabor a girasol tostado (57,50-60,42), mientras que los atributos negativos como el sabor a oxidado y cartón resultaron con valores bajos (menores a 17). En general no se observaron diferencias significativas entre las muestras para la mayoría de los atributos evaluados en los productos frescos, excepto para el atributo sabor a monoterpeno. La muestra GT-Car (33,5) tuvo mayor intensidad para este atributo, seguido por las muestras GT-S (25,13) y GT-T (17,25).

Tabla 6.3. Promedios y desviaciones estándares (n=3) de los atributos sensoriales en el día cero de almacenaje de las muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T)

Atributo	GT-BHT	GT-C	GT-Car	GT-S	GT-T
Color	53,25±0,66	54,17±0,58	53,75±1,25	54,00±0,50	53,42±0,29
Rugosidad	14,25±0,25	14,25±0,25	14,25±0,25	14,25±0,25	14,00±0,25
Brillo	18,25±0,50	18,08±0,29	18,42±0,52	18,25±0,25	18,25±0,50
Girasol tostado	59,42±0,80	60,42±2,90	58,67±1,89	57,5±1,95	59,08±0,52
Oxidado	4,00±1,32	4,33±1,61	4,00±1,32	4,00±1,32	4,00±1,32
Cartón	16,00±0,25	15,75±0,25	15,83±0,29	16,33±0,58	15,92±0,38
Sabor a monoterpenos	0,00±0,00 d	0,00±0,00 d	33,50±2,25 a	25,13±1,88 b	17,25±1,39 c
Amargo	18,67±0,38	17,67±1,04	19,33±1,89	19,42±1,81	19,67±1,59
Acido	0,13±0,13	0,25±0,25	0,13±0,13	0,13±0,13	0,13±0,13
Astringencia	30,50±0,66	30,00±1,50	31,17±1,15	30,5±0,66	30,67±0,76
Crujiente	20,75±0,75	20,00±1,32	21,25±0,25	21,5±0,25	20,67±0,63
Dureza	21,58±1,51	22,00±0,50	21,92±0,14	21,75±0,25	21,08±0,95

* Promedio ± desviación estándar seguidos por letras diferentes en cada fila muestran diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (ANOVA y DGC test, $\alpha = 0,05$).

Los atributos que mostraron cambios en sus intensidades durante el almacenaje de las muestras fueron los sabores a oxidado, a cartón, a girasol tostado y a los monoterpenos. Estos cambios se presentan en las Figuras 6.5-6.8.

Todas las muestras de girasol tostado presentaron incrementos en las intensidades de los atributos sabor a oxidado (Figura 6.5) y sabor a cartón (Figura 6.6), durante el almacenaje. Se detectaron diferencias significativas en estos atributos entre las muestras luego del día 14. La muestra GT-C mostró los mayores valores de estos atributos.

En cuanto al sabor a oxidado (Figura 6.5), en general se observó que el tratamiento con carvacrol (GT-Car) tuvo las menores intensidades, seguido por el GT-BHT, luego el GT-T y el GT-S. Al final del almacenaje (35 días), la muestra GT-C (52,00) tuvo el valor más alto en el atributo sabor oxidado, mostrando diferencias significativas con los demás tratamientos. El tratamiento GT-Car tuvo la menor intensidad (23,00), sin diferencias con GT-BHT (27,00) Los tratamientos GT-T (31,00) y GT-S (34,00) resultaron con intensidades intermedias y sin diferencias entre ellos.

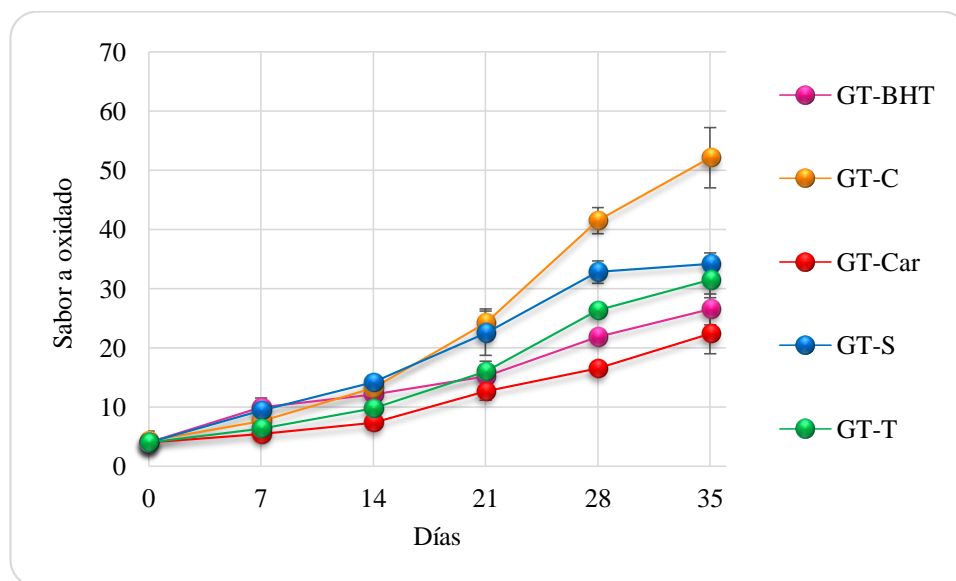


Figura 6.5 Atributo sensorial sabor oxidado de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T)

En cuanto al sabor a cartón (Figura 6.6), se observa que la muestra GT-C presentó mayor incremento y el menor incremento fue para GT-Car, seguido por GT-T, mientras que GT-S y GT-BHT presentaron incrementos similares e intermedios. En el día 35, el último día de almacenaje, la muestra GT-C (40,00) tuvo el valor más alto en el atributo sabor cartón, mostrando diferencias significativas con los demás tratamientos. Las muestras GT-S (34,00) y GT-BHT (32,00) no mostraron diferencias significativas entre ellas y las muestras GT-Car (23,00) y GT-T (26,00) tuvieron los valores más bajos en este atributo, sin diferencias significativas entre ellas y con diferencias en comparación con el resto de los tratamientos.

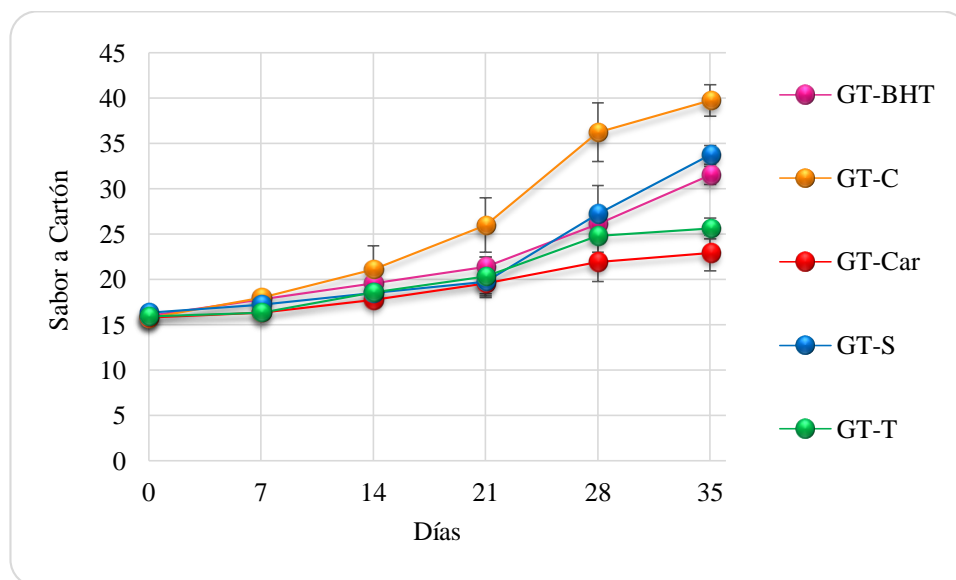


Figura 6.6 Atributo sensorial sabor cartón de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpénos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T)

El sabor a girasol tostado es considerado un atributo sensorial positivo. En todos los productos, la intensidad de sabor a girasol tostado disminuyó durante el almacenaje (Figura 6.7). Como se explicó en el Capítulo III, la disminución de este atributo durante el almacenaje se considera un efecto negativo en la calidad sensorial del producto ya que durante el proceso de tostado se desarrolla un aroma o sabor agradable como a nuez (Bozan y Temelli, 2008). Inicialmente, todos los tratamientos presentaron similares intensidades para este atributo cercano a 60. Las diferencias significativas entre las muestras se observan a partir del día 21, donde GT-C presentó la menor intensidad para este atributo y se diferenció significativamente del resto de los tratamientos, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos.

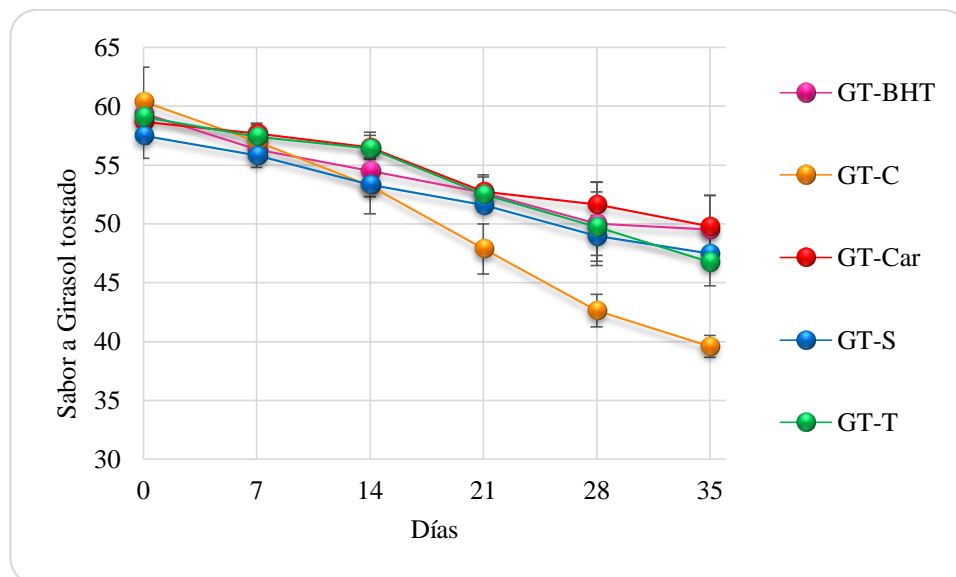


Figura 6.7. Atributo sensorial sabor a girasol tostado de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidratado (GT-S) y timol (GT-T).

El atributo sabor a monoterpenos también disminuyó en las muestras de GT-Car, GT-S y GT-T durante el almacenaje (Figura 6.8). Este comportamiento concuerda con los resultados observados para los volátiles de los antioxidantes agregados en las muestras (Figura 6.4).

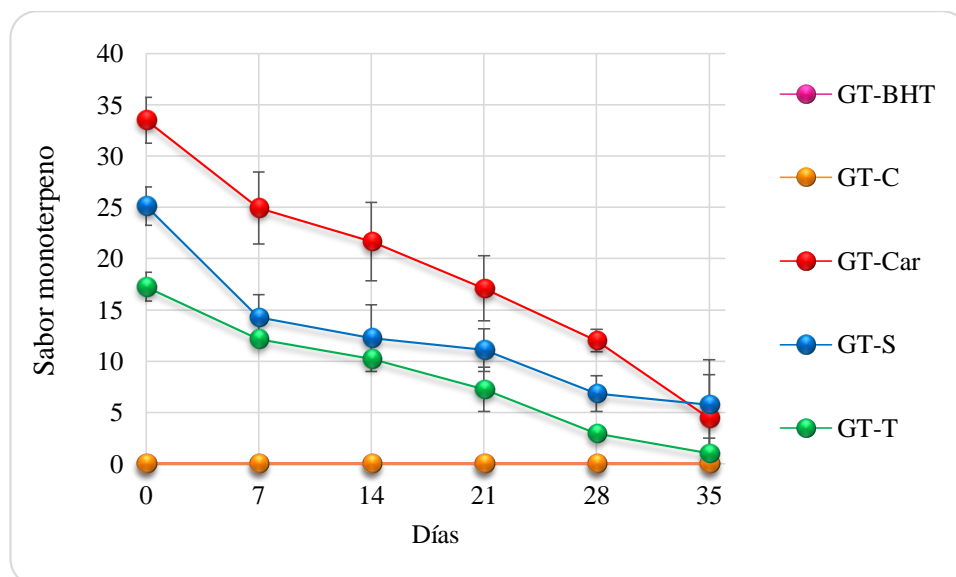


Figura 6.8 Atributo sensorial sabor a monoterpeno de las diferentes muestras de semillas de girasol tostadas (GT-C), con el agregado de BHT (GT-BHT) y los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidratado (GT-S) y timol (GT-T).

Los resultados del análisis sensorial descriptivo de las muestras de girasol tostadas indican que el agregado de monoterpenos protegió al producto inhibiendo la formación de sabores no deseable que provienen del proceso secundario de la oxidación de lípidos (sabor a oxidado y a cartón), y previno la pérdida de atributos positivos como el sabor a girasol tostado. Este efecto protector se condice con los resultados obtenidos en los indicadores químicos de oxidación presentados anteriormente. Otros investigadores, también informaron un aumento en la intensidad de los atributos negativos (sabor oxidado y cartón) y disminución del atributo positivo a tostado durante el almacenaje de maní y productos relacionados indicando un deterioro de sus propiedades organolépticas (Riveros *et al.*, 2010; Olmedo *et al.*, 2012, 2013). El agregado de antioxidantes naturales como aceites esenciales y extractos de tegumento de maní aportaron protección frente a la oxidación de los lípidos en este tipo de productos (Nepote *et al.*, 2004; Olmedo *et al.*, 2008).

Análisis de regresión lineal

En las Tablas 6.4 y 6.4 se presentan las ecuaciones de regresión lineal simple para los indicadores químicos y sensoriales, respectivamente, evaluados sobre las muestras de girasol durante su almacenaje.

Los modelos de regresión lineal de los indicadores químicos (IP, *Ip*-A, hexanal por AV y antioxidantes por AV) del estudio de estabilidad de las muestras de girasol tostadas se ajustaron correctamente al tiempo de almacenamiento ($R^2 > 0,81$) (Tabla 6.4). El análisis de las pendientes (β_1) de esas ecuaciones lineales indica la tendencia al deterioro de cada tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras en las pendientes de estos indicadores químicos. La muestra GT-BHT mostró la mayor estabilidad química, mientras que GT-C tuvo la estabilidad química más baja comparada con las otras muestras. Las semillas de girasol tostadas con los monoterpenos (GT-Car, GT-S y GT-T) tuvieron pendientes intermedias, mostrando diferencias significativas entre ellas para IP, siendo GT-S el tratamiento con menor pendiente de IP. Con respecto al análisis de los antioxidantes por CG-EM, se observó mayor disminución en la muestra GT-S y la muestra con menor pendiente fue GT-BHT, indicando una menor pérdida de este antioxidante durante el almacenaje. GT-Car y GT-T tuvieron pendientes intermedias, sin diferencias entre ellos.

Tabla 6.4. Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables químicas: índice de peróxidos (IP), índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) y contenidos de hexanal y de los antioxidantes (por análisis de los volátiles (AV) por CG-EM) durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).

Variable	Muestra	β_0^*	β_1^{***}	R^2
IP	GT-BHT	9,4611±3,911	0,6959±0,089 d	0,657
	GT-C	4,4038±1,257	4,0475±0,147 a	0,993
	GT-Car	10,9654±4,462	2,6789±0,188 b	0,948
	GT-S	12,5965±2,406	1,6982±0,16 c	0,768
	GT-T	12,1524±9,207	2,4773±0,621 b	0,868
<i>Ip</i> -A	GT-BHT	2,4486±0,462	0,0052±0,015 c	0,047
	GT-C	1,4271±0,153	0,2129±0,017 a	0,947
	GT-Car	2,1307±0,138	0,116±0,022 b	0,922
	GT-S	1,8216±0,127	0,1176±0,015 b	0,900
	GT-T	1,8429±0,047	0,1332±0,009 b	0,919
Hexanal (por AV)	GT-BHT	1,6716±0,221	0,0139±0,012 c	0,351
	GT-C	1,8873±0,273	0,5104±0,042 a	0,966
	GT-Car	0,8617±0,314	0,3506±0,018 b	0,943
	GT-S	1,0513±0,699	0,3322±0,023 b	0,932
	GT-T	0,4773±0,38	0,3146±0,022 b	0,966
Antioxidantes (por AV)	GT-BHT	41,2325±3,032	-1,065±0,118 b	0,833
	GT-Car	69,9065±3,33	-1,459±0,155 c	0,938
	GT-S	156,724±7,531	-3,534±0,275 d	0,893
	GT-T	72,2522±3,412	-1,504±0,18 c	0,957

* Ecuaciones de regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, donde Y = variables químicas: índice de peróxidos (IP), índice de *p*-anisidina (*Ip*-A) y contenidos de hexanal y de los antioxidantes, y X variable independiente (días),

** ANOVA y test DGC: la pendiente (β_1) de cada variable seguida con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes $\alpha = 0,05$

Para el caso de los atributos sensoriales, en la Tabla 6.5 se puede observar que las ecuaciones de regresión lineal simple tuvieron buenos ajustes ($R^2 > 0,75$). La muestra GT-C mostró la mayor pendiente en los atributos sensoriales negativos y positivos (sabor a oxidado, a cartón y a girasol tostado). Para el sabor a oxidado, las muestras con BHT y carvacrol tuvieron menor pendiente que los otros monoterpenos (sabineno hidrato y timol). Para el sabor a cartón, las muestras con menor pendiente fueron GT-Car y GT-T. Para el sabor a girasol tostado, todos los antioxidantes resultaron con menor pendiente que el control, sin diferencias entre ellos. Por último, para el sabor a monoterpenos, se observó que a pesar de que el carvacrol tuvo los mayores valores durante todo el almacenaje, su intensidad disminuyó con mayor pendiente que los otros monoterpenos, sin diferencias entre timol y sabineno hidrato.

Tabla 6.5. Ecuaciones de regresión y R^2 de las variables sensoriales: sabores a oxidado, cartón, girasol tostado y monoterpeno durante el almacenaje de las muestras de girasol tostado control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).

Variable dependiente	Muestra	β_0	β_1^*	R^2
Sabor a oxidado	GT-BHT	4,3492 ± 1,1760	0,6149 ± 0,0430 c	0,9450
	GT-C	-1,0318 ± 0,9090	1,4272 ± 0,0620 a	0,9290
	GT-Car	2,2063 ± 1,6470	0,5374 ± 0,1030 c	0,9120
	GT-S	3,4762 ± 0,3900	0,9252 ± 0,0130 b	0,9500
	GT-T	1,2857 ± 0,8340	0,8218 ± 0,0750 b	0,9200
Sabor a cartón	GT-BHT	14,6190 ± 0,0480	0,4313 ± 0,0370 b	0,9020
	GT-C	13,4445 ± 0,3990	0,7333 ± 0,0730 a	0,9060
	GT-Car	15,2698 ± 0,7530	0,2259 ± 0,0760 c	0,8350
	GT-S	13,7302 ± 0,7470	0,4885 ± 0,0650 b	0,8080
	GT-T	14,7778 ± 0,3060	0,3143 ± 0,0270 c	0,8650
Sabor a girasol tostado	GT-BHT	59,1111 ± 0,8520	-0,2950 ± 0,0290 a	0,8040
	GT-C	61,254 ± 1,9300	-0,6270 ± 0,0620 b	0,9480
	GT-Car	59,6349 ± 1,2380	-0,2780 ± 0,1060 a	0,8360
	GT-S	57,8254 ± 1,7470	-0,2980 ± 0,1030 a	0,8710
	GT-T	60,3016 ± 0,6470	-0,3730 ± 0,0540 a	0,8910
Sabor a monoterpeno	GT-Car	32,3968 ± 3,2850	-0,7690 ± 0,0970 c	0,9070
	GT-S	21,1270 ± 0,8390	-0,4900 ± 0,1140 b	0,7540
	GT-T	16,5397 ± 0,732	-0,4530 ± 0,0150 b	0,9430

* Ecuaciones de regresión: $Y = \beta_0 + \beta_1 X$ donde Y = variable atributos sensoriales (sabor a monoterpeno, sabor a girasol tostado, sabor a cartón y sabor a oxidado) y X variable independiente (días).

** ANOVA y test DGC: la pendiente (β_1) de cada variable seguida con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes $\alpha = 0,05$

Análisis de correlación y de componentes principales

Como se explicó en el capítulo III, el análisis de componentes principales es una técnica que reduce la dimensionalidad en un conjunto de datos. En la Figura 6.9 se muestra el biplot obtenido a partir de las dos primeras componentes principales (CP) de ACP. Las dos primeras CP explican el 70.2% de la variabilidad total de las muestras en el estudio de almacenamiento de las semillas de girasol tostadas. Este porcentaje se considera aceptable para evaluar la correlación entre las variables. La dispersión de los puntos indica alta variabilidad entre las muestras, observándose una clara diferencia entre las muestras con el agregado de los monoterpenos y las muestras controles GT-C y GT-BHT. Los indicadores de oxidación (IP, *Ip*-A y hexanal) del estudio de almacenamiento de las muestras se asociaron positivamente entre ellos y con los atributos negativos del análisis sensorial (oxidado y cartón) agrupándose todos ellos en el lado derecho del biplot. Para corroborar esta asociación, se calcularon también los coeficientes de correlación de Pearson (Tabla 6.6), allí se pueden observar coeficientes positivos y mayores a 0,69 entre los indicadores químicos y los atributos sensoriales negativos. Estos, se asociaron de forma negativamente con el atributo sensorial positivo, sabor de girasol tostado (coeficientes de correlación entre -0,81 y -0,94). En el Capítulo III mencionamos que los aceites esenciales de orégano con mayor contenido de timol (AE-Com y AE-Cor), tuvieron un menor valor de IC50 de DPPH, y relativamente menor pendiente para los indicadores químicos de oxidación IP e *Ip*-A mostrando actividad antioxidante en el aceite de canola (Quiroga *et al.*, 2011). Timol es un compuesto fenólico con demostrada actividad antioxidante. Junto con carvacrol son los componentes más activos de la familia de los monoterpenos oxigenados (Ruberto y Baratta, 2000).

El Biplot sugiere una pobre asociación entre los indicadores químicos de oxidación (IP, *Ip*-A y hexanal), los atributos sensoriales (sabor a oxidado, cartón y girasol tostado) con los diferentes sabores a los monoterpenos, que se corrobora observando los bajos coeficientes de correlación (Tabla 6.7).

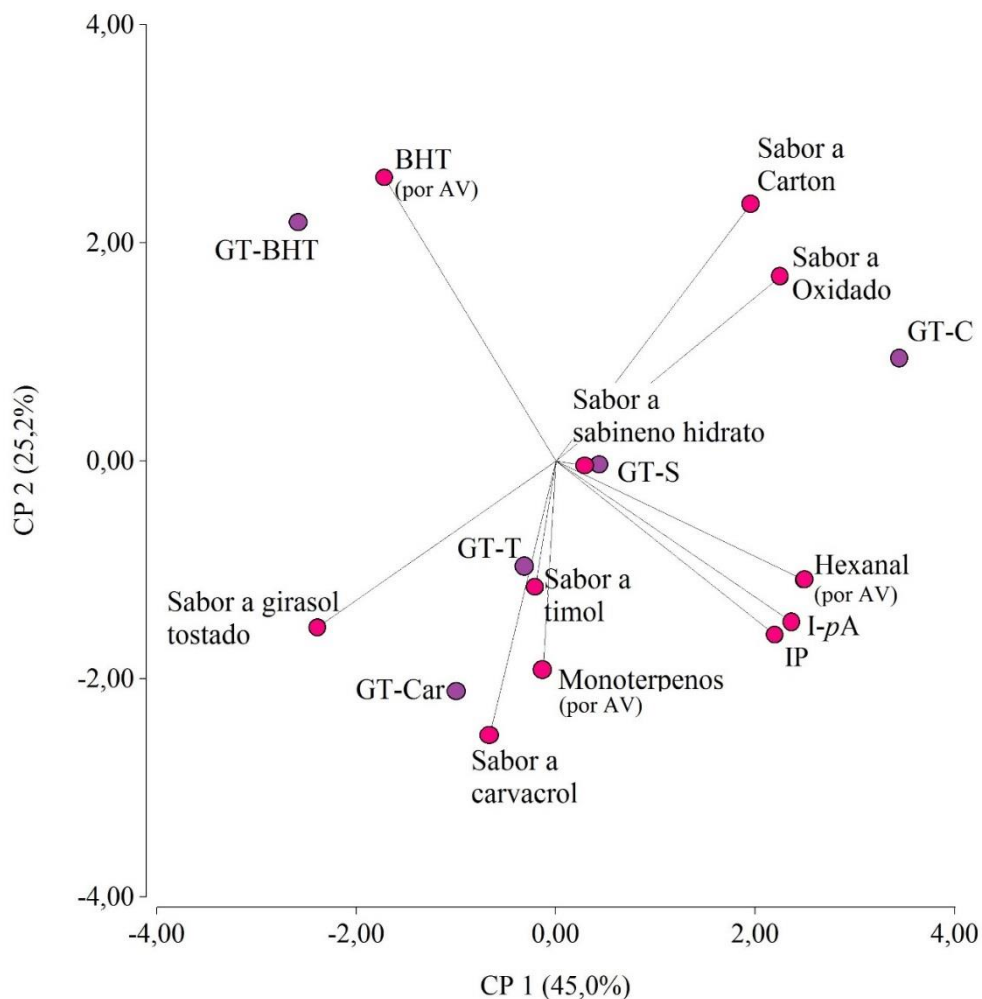


Figura 6.9 Biplot de la primera y segunda componentes del análisis de componentes principales. Variables: indicadores químicos: índice de peróxidos (IP), índice de p-anisidina (I-p-A), hexanal y monoterpenos (por análisis de volátiles, AV), y los atributos sensoriales: sabor a oxidado, a cartón, a girasol tostado y a monoterpenos, del estudio de almacenaje de girasol tostado control (GT-C), con BHT (GT-BHT), y con los monoterpenos carvacrol (GT-Car), sabineno hidrato (GT-S) y timol (GT-T).

Tabla 6.6. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables químicas y atributos sensoriales del estudio del almacenaje de semillas de girasol tostadas.

	IP	<i>Ip</i> -A	BHT (por AV)	Hexanal (por AV)	Monoterpe- nos (por AV)	Sabor a oxidado	Sabor a cartón	Sabor a girasol tostado	Sabor a carvacrol	Sabor a sabineno hidrato
<i>Ip</i> -A	0,92**									
BHT (por AV)	-0,39**	-0,32**								
Hexanal (por AV)	0,93**	0,95**	-0,38**							
Monoterpenos (por AV)	-0,30**	-0,26**	-0,36**	-0,27**						
Sabor a oxidado	0,78**	0,84**	-0,20*	0,81**	-0,32**					
Sabor a cartón	0,69**	0,75**	-0,16	0,72**	-0,38**	0,93**				
Sabor a girasol tostado	-0,81**	-0,83**	0,23*	-0,8**	0,31**	-0,94**	-0,89**			
Sabor a carvacrol	-0,10	-0,12	-0,18	-0,13	0,16	-0,31**	-0,28**	0,27**		
Sabor a sabineno hidrato	-0,22*	-0,17	-0,18	-0,12	0,81**	-0,09	-0,16	0,1	-0,19	
Sabor a timol	-0,16	-0,18	-0,17	-0,23*	0,19	-0,26*	-0,25*	0,27*	-0,18	-0,17

* Significante a $p \leq 0,05$

** Significante a $p \leq 0,01$

IP índice de peróxidos, *Ip*-A índice de p-anisidina

Conclusiones

El agregado de los monoterpenos (carvacrol, timol y sabineno hidrato) mejora la estabilidad de las semillas de girasol tostadas, previene la oxidación lipídica y el desarrollo de los sabores y olores rancios, elevando la vida útil de los productos. El resultado de los análisis de componentes principales y de correlación sugiere que los tratamientos con monoterpenos se asocian con los atributos sensoriales positivos de las semillas de girasol tostadas. Además, los resultados de este capítulo muestran que el monoterpeno carvacrol es el compuesto que tiene la mejor actividad como conservante de la calidad química y sensorial del producto. El agregado de este tipo de compuestos naturales como conservante en alimentos ricos en lípidos puede resultar una alternativa útil para reemplazar a los antioxidantes sintéticos como el BHT.

Bibliografía citada

- AOAC 1995. Official Methods of Analysis of the AOAC. Ed). Washington, DC, USA. Association of Official Analytical Chemists. pp.
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*. 76. 445-S450
- Asensio, C. M., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2012. Sensory Attribute Preservation in Extra Virgin Olive Oil with Addition of Oregano Essential Oil as Natural Antioxidant. *Journal of Food Science*. 77. S294-S301
- Beltrán, A., Ramos, M., Grané, N., Martín, M. L. y Garrigós, M. C. 2011. Monitoring the oxidation of almond oils by HS-SPME-GC-MS and ATR-FTIR: Application of volatile compounds determination to cultivar authenticity. *Food Chemistry*. 126. 603-609
- Bozan, B. y Temelli, F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*. 99. 6354-6359
- Brătfălean, D., Cristea, V. M., Agachi, P. Ş. y Irimie, D. F. 2008. Improvement of sunflower oil extraction by modelling and simulation. *Revue Roumaine de Chimie*. 53. 881-888
- Choe, E. y Min, D. B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5. 169-186
- Decker, E. A. 2002. Antioxidant Mechanisms. En: *Food Lipids (Chemistry, Nutrition and Biotechnology)*. (2 Ed). New York, USA. Dekker, USA. pp.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. 2012. InfoStat.
- Fullana, A., Carbonell-Barrachina, Á. A. y Sidhu, S. 2004. Volatile aldehyde emissions from heated cooking oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84. 2015-2021
- Grosso, N. R. y Resurreccion, A. V. A. 2002. Predicting consumer acceptance ratings of cracker-coated and roasted peanuts from descriptive analysis and hexanal measurements. *Journal of Food Science*. 67. 1530-1537
- IUPAC 1987. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. (7th ed Ed). Oxford, UK. Paquot, C., Hautfenne, A. . Method Number 2.504. pp.
- Johnson, R. A. y Wichern, D. W. 2007. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. (6 Ed). New Jersey, USA. Pearson. 773 pp.
- Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K. y Albanis, T. A. 2007. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. *Journal of Chromatography A*. 1152. 70-96
- Lawless, H. T. y Heymann, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. (2 Ed). New York, USA. Springer. 596 pp.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T. y Civille, G. V. 2010. *Sensory Evaluation Techniques*. (4 Ed). Boca Raton, Florida, USA. Taylor & Francis. 416 pp.
- Mexis, S. F., Badeka, A. V. y Kontominas, M. G. 2009. Quality evaluation of raw ground almond kernels (*Prunus dulcis*): Effect of active and modified atmosphere packaging, container oxygen barrier and storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10. 580-589
- Nepote, V., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2004. Natural antioxidant effect from peanut skins in honey-roasted peanuts. *Journal of Food Science*. 69. S295-S300

- Nepote, V., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2006. Oxidative stability in fried-salted peanuts elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *International Journal of Food Science and Technology*. 41. 900-909
- Nepote, V., Olmedo, R. H., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2009. A study of the relationships among consumer acceptance, oxidation chemical indicators, and sensory attributes in high-oleic and normal peanuts. *Journal of Food Science*. 74. S1-S8
- Olmedo, R. H., Nepote, V., Mestrallet, M. G. y 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. H., Asensio, C. M., Nepote, V., Mestrallet, M. G. y Grosso, N. R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89. 2128-2136
- Olmedo, R. H., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2012. Sensory and chemical stability in coated peanuts with the addition of essential oils and synthetic antioxidants. *Grasas y Aceites*. 63. 5-13
- Olmedo, R. H., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Science and Technology*. 53. 409-417
- Plemmons, L. E. y Resurreccion, A. V. A. 1998. A warm-up sample improves reliability of responses in descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies*. 13. 359-376
- Quiroga, P. R., Riveros, C. G., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. y Nepote, V. 2011. Antioxidant activity of essential oil of oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology*. 46. 2648-2655
- Riveros, C. G., Mestrallet, M. G., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2009. Chemical composition and sensory analysis of peanut pastes elaborated with high-oleic and regular peanuts from Argentina. *Grasas y Aceites*. 60. 388-395
- Riveros, C. G., Mestrallet, M. G., Gayol, M. F., Quiroga, P. R., Nepote, V. y Grosso, N. R. 2010. Effect of storage on chemical and sensory profiles of peanut pastes prepared with high-oleic and normal peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90. 2694-2699
- Ruberto, G. y Baratta, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69. 167-174
- Sokal, R. R. y Michener, C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 38. 1409-1438
- Vichi, S., Romero, A., Tous, J., Tamames, E. L. y Buxaderas, S. 2008. Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance. *Journal of Chromatography A*. 1211. 1-7

Conclusiones Generales

El creciente interés en el uso de antioxidantes de origen natural para reemplazar a los antioxidantes sintéticos sobre alimentos fue el principio motivador del presente trabajo. Para ello se trabajó con diferentes compuestos antioxidantes provenientes de aceites esenciales de especies aromáticas como el orégano y el poleo, diferentes especies de orégano producidos en nuestro país y monoterpenos puros. El objetivo fue evaluar las propiedades antioxidantes de estos antioxidantes naturales al ser aplicados sobre alimentos ricos en lípidos para mejorar la conservación de sus propiedades nutricionales y sensoriales.

A continuación se detallan las principales conclusiones alcanzadas a lo largo de esta tesis en cuanto a cada uno de estos compuestos:

1. Aceites esenciales de orégano y poleo

El aceite esencial de *Origanum vulgare* L. presenta en su composición química monoterpenos como γ -terpineno, α -terpineno, *p*-cimeno, timol, β -felandreno y carvacrol, entre otros. El aceite esencial de *Lippia turbinata* Griseb. muestra una gran concentración de limoneno y 1,8-cineole. Estos compuestos podrían ser responsables de la actividad antioxidante demostrada por estos aceites esenciales. El aceite esencial de orégano, tiene mayor contenido de fenoles totales, mayor actividad secuestrante del radical DPPH y actividad anti-lipasa que el aceite esencial de poleo. Probablemente, esta mayor actividad es influenciada por la presencia de componentes fenólicos como timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano.

La adición de los aceites esenciales de orégano y poleo sobre semillas de girasol tostadas contribuye a mejorar la estabilidad de los productos previniendo la oxidación lipídica y el desarrollo de sabores rancios en los productos. El aceite esencial de orégano presenta mayor actividad antioxidante en el producto de girasol. La aplicación de los aceites esenciales modifican las propiedades sensoriales de las semillas de girasol tostadas. Los productos con aceites esenciales tienen menor aceptabilidad en comparación con el control, sin embargo estos productos son aceptados por los consumidores, sin diferencias significativas entre las esencias.

En el análisis sensorial descriptivo aparece un nuevo atributo sensorial denominado “sabor a aceite esencial”. Al agregar el aceite esencial a las semillas de girasol tostadas se produce un aumento en el sabor amargo y la disminución del sabor a girasol tostado. Durante el almacenaje se observó que los aceites esenciales protegen las semillas de girasol tostadas del aumento en la intensidad de los atributos negativos, sabor oxidado y sabor cartón en comparación con las semillas de girasol tostadas sin el agregado de los aceites esenciales. El agregado de los aceites esenciales mantiene la calidad química y sensorial de las semillas de girasol tostadas.

2. Aceites esenciales de diferentes oréganos

Los aceites esenciales de los diferentes oréganos de Argentina, Cordobés, Compacto, Criollo y Mendocino, muestran variabilidad en los porcentajes relativos de los dos principales compuestos: timol y *trans*-sabineno hidrato. La adición de todos estos aceites esenciales en el aceite de canola previene la oxidación lipídica. En general, los aceites esenciales de oréganos Cordobés y Compacto están asociados a una mayor actividad secuestrante de radicales libres y actividad antioxidante que los aceites esenciales de oréganos Criollo y Mendocino. Esta actividad antioxidante podría ser asociada principalmente al mayor contenido de timol en estos aceites esenciales.

3. Monoterpenos: carvacrol, timol y sabineno hidrato

Los monoterpenos timol y carvacrol muestran actividad secuestrante de radicales libres frente al DPPH, indicando tener posible actividad antioxidante, mientras que el *trans*-sabineno hidrato no mostró esta actividad.

Al evaluar estos compuestos como antioxidantes en aceite de canola, se observa que los tres monoterpenos mejoraron la estabilidad del aceite de canola frente al proceso de oxidación lipídica. Los compuestos sabineno hidrato y timol tienen actividad similar al antioxidante sintético BHT y mayor actividad antioxidante que carvacrol. Estos resultados se relacionan con el estudio de las diferentes especies de orégano, ya que las especies que muestran mayor actividad son las que también tienen elevados contenidos de los monoterpenos timol y sabineno hidrato (Cordobés y Compacto).

Se observa efecto sinérgico en la combinación de sabineno hidrato y timol con BHT en la proporción 20:80, es decir que para estos compuestos es conveniente utilizar una mezcla 20:80 de monoterpenos:BHT logrando mejor efecto antioxidante que con los compuestos puros. Para las mezclas carvacrol-BHT no se observa dicho efecto, sin embargo la combinación 20:80 resultó con similar actividad que el BHT puro, lo cual es importante para disminuir el uso de este antioxidante sintético. Estos monoterpenos son compuestos antioxidantes de origen natural que podrían ser utilizados como aditivos en alimentos de alto contenido de lípidos para sustituir o disminuir el uso de los antioxidantes sintéticos.

A partir de los resultados obtenidos del estudio de almacenaje de semillas de girasol tostadas con el agregado de estos monoterpenos puros se puede observar que la presencia de dichos compuestos incrementa la estabilidad de los productos, previniendo la oxidación lipídica y el desarrollo de los sabores y olores rancios, lo cual implica un incremento en la vida útil de los mismos. Los tratamientos con monoterpenos se asocian con los atributos sensoriales positivos de las semillas de girasol tostadas. El carvacrol es el monoterpeno que tiene la mejor actividad como conservante de la calidad química y sensorial de este producto.

Este estudio aporta conocimientos sobre el efecto antioxidante de compuestos de origen natural (aceites esenciales y monoterpenos puros) al ser aplicados sobre alimentos de alto contenido lipídico como son los aceites y granos de oleaginosas tales como canola y girasol. Estos productos naturales disminuyen las reacciones de deterioro oxidativo de los lípidos prolongando la estabilidad química, nutricional y sensorial de alimentos de este tipo. El agregado de este tipo de compuestos naturales como conservante en alimentos ricos en lípidos puede resultar una alternativa útil para reemplazar a los antioxidantes sintéticos como el BHT que están cuestionados por sus efectos sobre la salud humana.

En función de los resultados obtenidos se proponen algunos interrogantes para continuar investigando:

Continuar con investigaciones sobre los aceites esenciales de plantas aromáticas y sus componentes mayoritarios puros para determinar cuál de todos ellos es el que ejerce el mayor efecto antioxidante.

Investigar el efecto sinérgico entre los componentes puros de los aceites esenciales para determinar si existe o no este efecto en el aceite esencial completo.

Profundizar las investigaciones sobre el efecto sinérgico entre los monoterpenos y el antioxidante sintético BHT.

Realizar estudios sobre la seguridad de los aceites esenciales y los monoterpenos puros antes de ser utilizados como un aditivo en productos alimenticios.