



**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE NUEZ**  
**(*Juglans regia* L.): INFLUENCIA DEL CULTIVAR Y DE**  
**FACTORES TECNOLÓGICOS SOBRE SU COMPOSICIÓN Y**  
**ESTABILIDAD OXIDATIVA**

Tesis Doctoral

**Marcela Lilian Martínez**

**Córdoba, 2010**



**Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE NUEZ  
(*Juglans regia* L.): INFLUENCIA DEL CULTIVAR Y DE  
FACTORES TECNOLÓGICOS SOBRE SU COMPOSICIÓN Y  
ESTABILIDAD OXIDATIVA**

**Marcela Lilian Martínez**

Tesis Doctoral

Córdoba, 2010

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE NUEZ (*Juglans regia* L.): INFLUENCIA DEL CULTIVAR Y DE FACTORES TECNOLÓGICOS SOBRE SU COMPOSICIÓN Y ESTABILIDAD OXIDATIVA

Comisión Asesora de Tesis

Director:

- Dr. Damián M. Maestri

Asesores:

- Dr. Damián M. Maestri
- Dr. Miguel A. Mattea
- Dr. Carlos A. Guzmán

## AGRADECIMIENTOS

*En este momento tan especial y esperado de mi vida, en el que se aproxima una meta más en mis proyectos soñados, se acumulan un sin número de sensaciones en mi, alegre cansancio, tiempos compartidos con muchos, momentos de soledad y autoevaluación para retomar fuerzas y fundamentalmente un sentimiento enorme de gratitud a todos aquellos que estuvieron a mi lado, siendo firmes puntales en distintas medidas, formas y tiempos, dándose desinteresadamente, anónimos para muchos, importantes para mi, en mi realización personal.-*

*¡Cómo poder agradecer a todos, con qué palabras, que realmente traduzcan todo lo que atesora mi corazón, hacia ellos en estos momentos!*

*Me arriesgaré en encontrarlas:*

*Dr. Damián **Maestri**.-*

*Fue la persona que estuvo a mi lado en todo momento, guiándome y acompañándome a lo largo de toda la realización de la tesis. Su sencillez incomparable, junto a su responsabilidad y seriedad me marcaron con huellas imborrables en mi crecimiento en la investigación. Gracias por brindarme todo de Ud., sus conocimientos, su formación, su temple de investigador y por sobre todo su hombría de bien que son las que alimentaron mi espíritu en las horas de cansancio y desazón. Se, que la palabra gracias suena a poco en comparación con su entrega pero sepa que su figura ocupa un lugar muy importante en la historia de mi vida, como becaria, como universitaria pero sobre todas las cosas como persona.-*

*Dr. Miguel **Mattea**.-*

*Se estremece mi corazón al tener que escribir SU NOMBRE, si con mayúscula porque así se encuentra Ud. en mi. Un ser que me demostró, seriedad, empeño, constancia y búsqueda constante de la excelencia. Muchas veces duro, muchas veces frío, dentro suyo escondía una gran sensibilidad, marcándome los caminos correctos en una investigación, sacándome de mi ímpetu juvenil mi tozudez, mi obsecuencia, enseñándome que no debo tener vergüenza, ante un error, todo el que trabaja o investiga se equivoca, y Ud. me enseñó a reconocerlo.*

*El destino, la desgracia, o no se como justificarlo, me lo quitó de mi camino en el medio de la travesía, su joven vida se tronchó en un abrir y cerrar de ojos, encontrándolo con su guardapolvo puesto, firme en el timón de la enseñanza, de la entrega, de la búsqueda constante, me sentí sola, junto a su familia lo lloramos, pero luego me di cuenta que debía recordarlo con alegría por todo lo compartido.*

*A pesar de que no pude terminar de disfrutarlo en plenitud, debo decirle gracias por todo lo que me brindó, y que mejor manera desde mi creencia, un gracias en una oración que*

*llegue hasta donde Ud. se encuentre, sintiendo que desde allí comparte el arribo a la meta que Ud. también me señaló.*

*Dr. Carlos **Guzmán** y Dra. María Angélica **Perillo**.-*

*Debo reconocer en Uds. vuestra desinteresada colaboración abriéndome las puertas de vuestro Instituto, sin condicionamiento alguno, permitiéndome libremente desarrollar las actividades que requería mi proyecto. Un gracias sentido que parte de los más profundo de mi, y sepan que parte de lo logrado es también de Ud.*

*Al Ing. Ricardo **Lagier** junto a Pablo y Santiago y al Ing. Oscar **Vanella**.-*

*Cumplieron desde el anonimato, una tarea muy importante para mi y para la realización de mi trabajo; ¿qué somos nosotros los investigadores sin nuestros equipos en condiciones y confiables?, nada. Allí estuvieron Uds. totalmente anónimos, brindándome la seguridad necesaria para trabajar con ellos. Por su entrega y colaboración, en demostración de mi gratitud quiero compartir mi logro con Uds.*

*Sr. Ricardo **Valdez**.-*

*Se preguntará: porque yo entre los agradecimientos, (porque su humildad y sencillez seguro lo llevará a preguntarse eso), pero deseo en estos momentos que sepa cuan importante fue para mi, desde lo simple que me aportó, su compañía, su silencioso apoyo, su constante predisposición a allanarme los problemas con los equipos, a veces hasta sin que se lo solicitara. Su bonhomía me lleva a tener con Ud. un emocionado reconocimiento de gratitud.*

*Ing. Carlos **Vélez**.-*

*Sin el material a investigar, la nuez, nada podía realizar, Ud. desinteresadamente me abrió las puertas de su finca, para que no solamente seleccionara los frutos que necesitaba, sino que también pudiera investigar, en terreno, sus cuidados nogales. También me cobijó en la intimidad de su hogar, abriéndome las puertas del mismo los días en que me encontré en Belén, Catamarca. Por su colaboración y hospitalidad mi profundo agradecimiento a Ud. y a su hermosa familia.*

*Ing. Ricardo **Márquez**.-*

*No puedo dejar pasar por alto en estos momentos, a quien sin conocerme me proveyó de la materia prima fundamental en mi proyecto desde la Prov. de La Rioja. Gracias por esas nueces que tanto valoré en mis horas de investigación.*

*Ings. Domingo y Augusto **Montaño**.-*

*Gracias por confiar en mi proyecto, y apoyarme incondicionalmente en él, fundamentalmente con la información que requería; vuestra confianza me alentó a ponerle todo mi empeño en su desarrollo, pues me demostraron con vuestra actitud, que*

mi trabajo de investigación era importante; renovando mis fuerzas para lograr los objetivos. Objetivos que hoy quiero compartir con Uds. en señal de gratitud.

Lic. Guillermina **Barrionuevo** y Dra. Valeria **Nepote**.-

No podía dejar de tener presente en estos momentos, a quienes me asesoraron y ayudaron, junto con el panel sensorial, en el análisis de los aceites investigados en mi proyecto; fueron sin duda, pieza fundamental en el desarrollo del mismo, por ello mi sentido agradecimiento.

Ing. Oscar **Marchi**.-

Debo reconocer en Ud. a la persona que desinteresadamente me facilitó uno de sus equipos para uno de los pasos en la investigación, que requería mi trabajo, de allí mi eterno agradecimiento.-

Debo realizar un agradecimiento especial, que surge de lo más profundo de mi sentir al **Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV- CONICET)** y al **Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA- Fac. Cs. Ex. Fis. Nat.)**, por brindarme la oportunidad y la confianza para la realización de este trabajo.-

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

Ahora tendré que poner a prueba toda mi memoria para recordar a aquellos, y son muchos, que estuvieron a mi lado de una u otra manera con su cariño, su aliento, su apoyo, su ayuda y asesoramiento, sus fuerzas, su estímulo y muchas veces su consuelo, prestándome su hombro o su corazón, en algunos momentos difíciles de este camino recorrido. A: Ma. Andrea **Marin**, Pablo D. **Ribotta**, Sebastián **Dambolena**, Marina **Sosa**, Agustín **Luna**, Rodrigo **Molina**, Diana **Labuckas**, Laura **Moiraghi**, José **Meriles**, Mariela **Torres**, Pierluigi **Pierantozzi**, Alicia **Lamarque**, Abel **López**, Ma. Laura **Albanese**, Agustín **Nasjleti**, Lucila **Galdi**, Paula **Zunino**, Liza **López**, Hernán **Severini**, Alcides **Bufa**, Julio **Zygodlo**, Guillermo **Cámara**, Cecilia **Penci** y a todos aquellos a quienes por la emoción olvido, un GRACIAS grandote, por ser mis amigos, mis compañeros, los seres con quienes compartí hermosos momentos de mi vida, aquellos a quienes busqué y encontré, pedí y recibí, y de quienes siempre sentí el cariño y el amor; sentimientos fundamentales que necesita todo ser humano para no sentirse en soledad. De ustedes también es este logro mío.

Un espacio aparte a dos seres que desde el silencio, siempre estuvieron a mi lado alentándome: los padres de Adrián, ellos son **Susana y Roberto**, hoy mis queridos suegros.-

Ahora me detendré en los seres más importantes de mi vida, **mi familia**, a quien tengo que agradecerle todo:

***A mi Madre:***

*Compañera incansable, por su paciencia, su escucha tranquilo, su bondad, su comprensión, su gran amor, ella serenó mi espíritu en los momentos de claudicación.*

***A mi Padre:***

*Por su ejemplo de tenacidad, lucha y persistencia, fue mi constante aliento, fue la fortaleza que necesite, el empuje que muchas veces me alentó a seguir, el espejo en donde siempre me miré.*

*Ambos enjugaron mis lágrimas y compartieron mis alegrías para ellos mi agradecimiento y el valor de esta meta alcanzada.-*

***A mis hermanos:***

*Quienes de una u otra forma siempre estuvieron a mi lado, con quienes compartimos horas y momentos de intimidad inolvidables y que mucho me alentaron en mis momentos de cansancio.*

***Y el agradecimiento especial que faltaba a dos seres:***

***A Adrián:***

*Hombre a quien la vida me dio la dicha de conocer y de quien me enamoré, fue quien durante nuestro noviazgo nunca dejó de alentarme en mi vocación de ingeniera e investigadora, fueron horas que no compartimos por mis actividades, pero que vivimos intensamente por nuestro amor.*

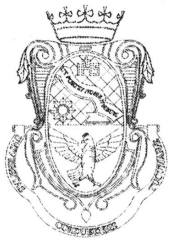
*Hoy Mi Esposo, con su silenciosa entrega siempre estuvo a mi lado, fue quien más me retó a no dejar, quien allanó mis tiempos para que pudiera disponer más de él, y en este momento tan especial fue el quien con su amor gestó en mi ese ser que hoy compartimos con dulzura y amor, Milagros, a través de quien logré la plenitud personal y como mujer al permitirme experimentar en mi ser, el misterio de dar vida.*

***Para Adrián y Mili, seres a quienes profundamente amo, les dedico este momento de plena felicidad compartida.***

## DEDICATORIA

*A mi familia  
por haberme brindado un ambiente de unidad,  
amor y alegría, en donde pude desarrollar las mejores cualidades  
a las que aspira todo ser humano.  
Y a mis amigos sin quienes la vida transcurriría en soledad.*





Doctorado en Ciencias de la Ingeniería  
Escuela de Cuarto Nivel Académico  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba  
República Argentina  
Avda. Vélez Sarsfield 1601 – Tel. 54 351 4333075 - 5000 Córdoba

### Acta Tribunal de Tesis de Doctorado

En la Ciudad de Córdoba a los 30 días del mes de Marzo de 2010 se reúne el Tribunal de Tesis del Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, de la Inga. Qca. Marcela Lilian Martínez, cuya tesis se denomina “Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia* L.): Influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa”.

El tribunal, integrado por la Dra. Amalia A. Carelli, el Dr. Daniel A. Wunderlin y el Dr. Pablo D. Ribotta, después de haber analizado la tesis durante el período previo a su defensa y de presenciar su exposición oral, acuerda por unanimidad calificar la Tesis como:

APROBADA

A los efectos de dejar constancia se firma la presente acta.

Dra. Amalia A. Carelli  
Universidad Nacional del Sur

Dr. Daniel A. Wunderlin  
Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Pablo D. Ribotta  
Universidad Nacional de Córdoba

## ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESUMEN</b>  | <b>1</b>   |
| <b>SUMMARY</b>  | <b>2</b>   |
| <b>RIASSUNTO</b>  | <b>3</b>   |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>  | <b>4</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>6</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>  | <b>8</b>   |
| <br>  |            |
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>   | <b>10</b>  |
| <br>  |            |
| <b>CAPÍTULO I: Caracterización pomológica y composición química del aceite de variedades de nuez cultivadas en Argentina.</b> |            |
| <b>Antecedentes</b>   | <b>13</b>  |
| <b>Objetivos Específicos</b>  | <b>14</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>   | <b>15</b>  |
| <b>Resultados y Discusión</b>   | <b>24</b>  |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>44</b>  |
| <br>  |            |
| <b>CAPÍTULO II: Extracción del aceite de nuez</b>   |            |
| <b>Antecedentes</b>   | <b>46</b>  |
| <b>Objetivos Específicos</b>  | <b>49</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>   | <b>50</b>  |
| <b>Resultados y Discusión</b>   | <b>58</b>  |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>85</b>  |
| <br>  |            |
| <b>CAPÍTULO III: Estabilidad y conservación del aceite de nuez</b>  |            |
| <b>Antecedentes</b>   | <b>88</b>  |
| <b>Objetivos Específicos</b>  | <b>91</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>   | <b>93</b>  |
| <b>Resultados y Discusión</b>   | <b>97</b>  |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>112</b> |
| <br>  |            |
| <b>CONCLUSIONES FINALES y PERSPECTIVAS FUTURAS</b>  | <b>114</b> |
| <br>  |            |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>116</b> |
| <br>  |            |
| <b>Divulgación de resultados y actividades de transferencia</b>   | <b>127</b> |

## RESUMEN

El presente trabajo aborda aspectos relacionados a la caracterización de genotipos de nuez cultivados en Argentina y al análisis de alternativas tecnológicas para la extracción y conservación del aceite. Los resultados indican que las características pomológicas y la composición de los aceites muestran una fuerte influencia varietal y, en menor medida, del año y de la localidad de producción. Se realizaron ensayos de extracción del aceite mediante disolvente (n-hexano, CO<sub>2</sub> en estado supercrítico) y prensa de tornillo helicoidal (a escala piloto e industrial). Esta última metodología resulta asequible para la obtención de altos rendimientos de aceite, de buena calidad química. No obstante, por su elevado nivel de insaturación, el aceite es altamente susceptible al deterioro termo y foto-oxidativo. La adición de antioxidantes (TBHQ, palmitato de ascorbilo) y el empleo de procedimientos de protección contra la foto-oxidación constituyen alternativas tecnológicas para la conservación del aceite.

## SUMMARY

This work addresses issues related to the characterization of walnut genotypes grown in Argentina and the analysis of alternative technologies for oil extraction and conservation. The results indicate that both, the pomological characteristics and the composition of the oils, show a strong influence due to the variety and, in a lesser extent, to the year and the production location. Experiments were performed to extract the oil by solvent (n-hexane, in a supercritical CO<sub>2</sub>) and screw pressing (at pilot and industrial scales). This last method is affordable for obtaining high oil yields, of good chemical quality. However, due to its high unsaturation level, the oil is highly susceptible to thermal and photo-oxidative degradation. The addition of antioxidants (TBHQ, ascorbyl palmitate) and the use of protecting procedures against photo-oxidation are technological alternatives for the conservation of the oil.

## RIASSUNTO

Il seguente studio concerne numerosi aspetti relazionati alla caratterizzazione di genotipi di noci coltivati in Argentina e all'analisi di alternative tecnologiche per l'estrazione e conservazione del loro olio. I risultati indicano che le caratteristiche pomologiche e la composizione degli oli di noci sono strettamente dipendendenti dalla varietà e, in misura minore, dell'anno e dalla località di produzione. Si sono realizzate prove di estrazione mediante solvente (n-hexano, CO<sub>2</sub> in stato supercritico) e pressa ad ingranaggi elicoidali (in scala pilota e industriale). Quest'ultima metodologia è risultata idonea per l'ottenimento di alto rendimento d'olio, di buone caratteristiche chimiche. Nonostante, a causa dell'elevata presenza di acidi grassi insaturi, questo è altamente suscettibile al deterioramento termo e fotossidativo. L'aggiunta di antiossidanti (TBHQ, palmitato di ascorbilo) e l'impiego di tecniche di protezione contro la foto-ossidazione costituiscono alternative tecnologiche possibili per la conservazione dell'olio.

## LISTA DE TABLAS

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Tabla 1:</b>  | Distribución porcentual de tamaños de fruto con cáscara (TF) y de pulpa (TP), color de la pulpa (CP) y relación peso pulpa/peso fruto (PP/PF) en variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006. | <b>25</b> |
| <b>Tabla 2:</b>  | Contenido de aceite, características físicas y químicas y composición de ácidos grasos y tocoferoles de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.                           | <b>28</b> |
| <b>Tabla 3:</b>  | Análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en frutos y aceites de las variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.                                    | <b>31</b> |
| <b>Tabla 4:</b>  | Valores promedio (campañas de producción 2004, 2005 y 2006) del contenido de aceite, características químicas y composición de ácidos grasos y tocoferoles de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca.            | <b>32</b> |
| <b>Tabla 5:</b>  | Contenido de material insaponificable (MI) y composición de esteroides, metil-esteroides e hidrocarburos de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.                       | <b>34</b> |
| <b>Tabla 6:</b>  | Componentes volátiles (% áreas normalizadas) de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.   | <b>35</b> |
| <b>Tabla 7:</b>  | Distribución porcentual de tamaños de fruto con cáscara (TF) y de pulpa (TP), color de la pulpa (CP) y relación peso pulpa/peso fruto (PP/PF) en variedades de nuez producidas en La Rioja durante las campañas 2007 y 2008.        | <b>40</b> |
| <b>Tabla 8:</b>  | Contenido de aceite, características químicas y composición de ácidos grasos de los aceites de variedades de nuez producidas en La Rioja durante las campañas 2007 y 2008.  | <b>41</b> |
| <b>Tabla 9:</b>  | Análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en frutos y aceites de las variedades de nuez producidas en La Rioja durante las campañas 2007 y 2008.   | <b>42</b> |
| <b>Tabla 10:</b> | Análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en frutos y aceites de las variedades Chandler y Franquette cultivadas en las dos localidades (Belén y Guanchín).                                | <b>42</b> |
| <b>Tabla 11:</b> | Tratamientos utilizados para la extracción a escala industrial, mediante prensa de tornillo helicoidal, del aceite de nuez.   | <b>57</b> |
| <b>Tabla 12:</b> | Rendimientos de la extracción pasiva (25 °C).   | <b>59</b> |
| <b>Tabla 13:</b> | Parámetros considerados para la extracción continua del aceite y rendimientos obtenidos.  | <b>61</b> |
| <b>Tabla 14:</b> | Características químicas de los aceites obtenidos del ensayo de equilibrio (Pasivo) y extracción continua (Dinámico).   | <b>63</b> |
| <b>Tabla 15:</b> | Efecto de distintos tratamientos (contenido de humedad del material x temperatura de prensado) sobre los rendimientos de prensado y parámetros de calidad del aceite de nuez.   | <b>65</b> |
| <b>Tabla 16:</b> | Análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en los aceites obtenidos de los distintos tratamientos.  | <b>67</b> |
| <b>Tabla 17:</b> | Definición de los atributos sensoriales evaluados, rangos de intensidad del <i>warm up</i> y de las referencias utilizadas en el análisis descriptivo.  | <b>69</b> |
| <b>Tabla 18:</b> | Parámetros sensoriales y químicos del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C).   | <b>70</b> |

|                  |   |            |
|------------------|---|------------|
| <b>Tabla 19:</b> | Coeficientes de regresión lineal (* significativos, $p \leq 0.05$ y ** altamente significativos, $p \leq 0.01$ ) de las variables sensoriales y químicas analizadas.  | <b>74</b>  |
| <b>Tabla 20:</b> | Coeficientes de regresión lineal (* significativos, $p \leq 0.05$ y ** altamente significativos, $p \leq 0.01$ ) para las variables astringente, picante, rancio, oleoso y pintura respecto a índice de peróxidos.  | <b>75</b>  |
| <b>Tabla 21:</b> | Parámetros del proceso, rendimiento de extracción y composición química de los aceites obtenidos mediante el empleo de SC - CO <sub>2</sub> .   | <b>76</b>  |
| <b>Tabla 22:</b> | Efecto de distintos tratamientos [temperatura de prensado (°C) – diámetro de boquilla (mm) – tipo de ranura del limitador de presión (estándar, ST; estrellada, E)] sobre los rendimientos de prensado y parámetros químicos del aceite de nuez extraído mediante prensa de tornillo helicoidal, escala industrial. | <b>82</b>  |
| <b>Tabla 23:</b> | Características químicas del aceite de la variedad Franquette utilizado para determinar la capacidad antioxidante del extracto fenólico crudo deslipidizado y de las fracciones purificadas.  | <b>95</b>  |
| <b>Tabla 24:</b> | Tratamientos utilizados para evaluar la estabilidad del aceite de nuez frente a la foto-oxidación (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) en un ensayo de almacenamiento prolongado.   | <b>96</b>  |
| <b>Tabla 25:</b> | Contenido de fenoles totales [CFT, mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto crudo deslipidizado (ECD) o de cada una de las fracciones purificadas (FP)], porcentaje de inhibición frente al DPPH· y valores de EC <sub>50</sub> (ug/ml).  | <b>98</b>  |
| <b>Tabla 26:</b> | Factores de protección de los extractos fenólicos, obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 110 °C).  | <b>99</b>  |
| <b>Tabla 27:</b> | Composición de ácidos grasos (% respecto del total) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo cero (0) y a los 180 días de almacenamiento (ensayo dinámico, tratamientos LA – OH; ensayo estático, tratamientos LK – OX).  | <b>110</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| <b>Figura 1:</b>  | Carta de colores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.  | <b>17</b> |
| <b>Figura 2:</b>  | Reacciones de auto-oxidación del ácido linoleico y formación de los principales compuestos volátiles en los aceites de nuez analizados.  | <b>36</b> |
| <b>Figura 3:</b>  | Análisis de componentes principales (PCA) para algunos parámetros seleccionados evaluados en frutos y aceites de las variedades de nuez producidas en Catamarca y La Rioja.  | <b>43</b> |
| <b>Figura 4:</b>  | Esquema de la prensa de tornillo helicoidal utilizada para la extracción del aceite.   | <b>53</b> |
| <b>Figura 5:</b>  | Esquema de la planta de extracción supercrítica escala piloto.   | <b>55</b> |
| <b>Figura 6:</b>  | Forma estándar y estrellada del limitador de presión.  | <b>56</b> |
| <b>Figura 7:</b>  | Curvas de equilibrio de extracción a 25 y 50 °C obtenidas con hexano y un tamaño de partícula comprendido entre 0.5 – 1 mm.  | <b>58</b> |
| <b>Figura 8:</b>  | Evaluación de la cantidad óptima de solvente (extracción pasiva).  | <b>59</b> |
| <b>Figura 9:</b>  | Relación entre la masa de aceite total extraída sobre la masa de material inerte respecto al tiempo de extracción.   | <b>61</b> |
| <b>Figura 10:</b> | Relación entre la masa de aceite residual sobre la masa de material inerte respecto al tiempo de extracción.   | <b>62</b> |
| <b>Figura 11:</b> | Relación entre el porcentaje de aceite extraído y la temperatura de prensado a diferentes contenidos de humedad.   | <b>66</b> |
| <b>Figura 12:</b> | Relación entre el porcentaje de aceite extraído y el porcentaje de humedad del material a diferentes temperaturas de prensado.   | <b>66</b> |
| <b>Figura 13:</b> | Relación entre la intensidad de color amarillo y el porcentaje de humedad del material a diferentes temperaturas de prensado.  | <b>68</b> |
| <b>Figura 14:</b> | Perfil sensorial del aceite de nuez.   | <b>71</b> |
| <b>Figura 15:</b> | Evolución de la intensidad del atributo rancio del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C). La línea gris corresponde al valor de la intensidad del atributo “rancio” para un índice de peróxidos de 20 meq. de O <sub>2</sub> /kg de aceite.   | <b>72</b> |
| <b>Figura 16:</b> | Evolución de la intensidad del atributo pintura del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C). La línea gris corresponde al valor de la intensidad del atributo “pintura” para un índice de peróxidos de 20 meq. de O <sub>2</sub> /kg de aceite. | <b>72</b> |
| <b>Figura 17:</b> | Evolución del índice de peróxidos del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C). La línea gris corresponde a un índice de peróxidos de 20 meq. de O <sub>2</sub> /kg de aceite.   | <b>73</b> |
| <b>Figura 18:</b> | Evolución del coeficiente de extinción específica ( $k_{232}$ ) del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C).  | <b>73</b> |
| <b>Figura 19:</b> | Evolución del coeficiente de extinción específica ( $k_{270}$ ) del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C).  | <b>74</b> |
| <b>Figura 20:</b> | Relación entre la masa total extraída y la masa de solvente utilizada en función de la masa de material inerte.  | <b>77</b> |
| <b>Figura 21:</b> | Contenido de aceite residual en función del tiempo de extracción.  | <b>77</b> |
| <b>Figura 22:</b> | Porcentajes de agua y aceite total extraídos durante la parte lineal de las curvas de extracción.  | <b>80</b> |
| <b>Figura 23:</b> | Porcentajes de aceite extraído (% AE) y finos en el aceite (% F)   | <b>83</b> |



|                   |   |            |
|-------------------|---|------------|
|                   | obtenidos mediante los tratamientos indicados en la tabla 11.   |            |
| <b>Figura 24:</b> | Antioxidantes de Tipo I - Compuestos fenólicos sintéticos.  | <b>89</b>  |
| <b>Figura 25:</b> | Antioxidantes de Tipo II – Quelantes o secuestrantes de metales.  | <b>90</b>  |
| <b>Figura 26:</b> | Ácido ascórbico y palmitato de ascorbilo.   | <b>90</b>  |
| <b>Figura 27:</b> | Compuestos polifenólicos presentes en la semilla del nogal.   | <b>98</b>  |
| <b>Figura 28:</b> | Evolución del índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /kg aceite) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.                         | <b>101</b> |
| <b>Figura 29:</b> | Evolución del coeficiente de extinción específica (k <sub>232</sub> , dienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.  | <b>102</b> |
| <b>Figura 30:</b> | Evolución del coeficiente de extinción específica (k <sub>270</sub> , trienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas. | <b>103</b> |
| <b>Figura 31:</b> | Evolución de la actividad antirradicalaria (DPPH remanente) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.                               | <b>105</b> |
| <b>Figura 32:</b> | Evolución del contenido de tocoferoles totales (TT, µg/g aceite) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.                          | <b>105</b> |
| <b>Figura 33:</b> | Evolución de la estabilidad oxidativa (tiempo de inducción, Rancimat) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.                     | <b>106</b> |
| <b>Figura 34:</b> | Índices de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /kg aceite) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.   | <b>107</b> |
| <b>Figura 35:</b> | Valores de dienos conjugados (k <sub>232</sub> ) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.   | <b>107</b> |
| <b>Figura 36:</b> | Valores de trienos conjugados (k <sub>270</sub> ) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.  | <b>108</b> |
| <b>Figura 37:</b> | Grado de acidez (% ácido oleico) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.   | <b>109</b> |
| <b>Figura 38:</b> | Análisis de componentes principales (PCA) de los tratamientos utilizados para evaluar la estabilidad del aceite de nuez frente a la foto-oxidación en un ensayo de almacenamiento prolongado.                                 | <b>111</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: microgramo  
µl: microlitro  
µm: micrometro  
A<sub>0</sub>: absorbancia del blanco  
A<sub>1</sub>: absorbancia de la solución del extracto  
Ac: ácido  
ACP: análisis de componentes principales  
AE: aceite extraído  
AG: ácidos grasos  
AGL: ácidos grasos libres  
ANAVA: análisis de la varianza  
AO: actividad antioxidante  
AR: aceite residual  
°C: grados centígrados  
BHT: 2,6-diterbutil-4-metilfenol  
C: concentración de pigmentos totales  
CA: contenido de aceite  
CAA: Código Alimentario Argentino  
CC: contenido de pigmentos carotenoides  
CCD: cromatografía en capa delgada  
CFT: contenido de fenoles totales  
CG: cromatografía gaseosa  
cm: centímetro  
cm<sup>2</sup>: centímetro cuadrado  
cm<sup>3</sup>: centímetro cúbico  
CP: color de la pulpa  
DPPH·: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
DPPH<sub>r</sub>: DPPH remanente  
E: absorbancia a la longitud de onda específica  
E<sub>1%</sub>: absorbancia específica en una solución al 1 % medida en una cubeta de 1 cm de paso óptico  
EAG: equivalentes de ácido gálico  
EC<sub>50</sub>: actividad antioxidante  
ECD: extracto crudo deslipidizado  
EM: espectrometría de masa  
EO: estabilidad oxidativa  
F: finos en el aceite  
FP: fracciones purificadas  
FP1: fracción extraída con agua destilada  
FP2: fracción extraída con etanol (10 %, v/v)  
FP3: fracción extraída con etanol (20 %, v/v)  
FP4: fracción extraída con etanol (100 %)  
FProt: factor de protección  
g: gramo  
GA: grado de acidez  
h: hora  
ha: hectárea  
HPLC: cromatografía líquida de alta presión  
IC: intercambiador de calor  
IP: índice de peróxidos  
IR: índice de refracción

IY: índice de yodo  
kg: kilogramo  
l: litro  
LSD: test a posteriori de comparaciones múltiples  
m: metro  
M: molaridad  
meq: miliequivalentes  
MF: medidor de flujo de masa  
mg: miligramo  
MI: material insaponificable  
min: minutos  
ml: mililitro  
mm: milímetro  
N: normalidad  
n: número de réplicas  
nm: nanometro  
P: peso de la muestra de aceite  
p/p: peso/peso  
p/v: peso/volumen  
p: nivel de significación  
PA: palmitato de ascorbilo  
PM: peso molecular del ácido oleico  
PP/PF: peso pulpa/peso fruto  
ppm: partes por millón  
r: coeficiente de correlación  
R<sup>2</sup>: coeficiente de regresión lineal  
rpm: revoluciones por minuto  
S: mililitros de solución de tiosulfato de sodio  
s: segundos  
SC – CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono en estado supercrítico  
SO: sudoeste  
T°: temperatura  
TBHQ: 2,5-diterbutil hidroquinona  
TF: tamaño de fruto con cáscara  
tn: tonelada  
TP: tamaño de pulpa  
Tr: valores traza  
TT: tocoferoles totales  
UV: ultravioleta  
v/v: volumen/volumen  
V: mililitros de solución etanólica de KOH utilizados en la titulación  
VCP: válvula controladora de la presión  
Vf : volumen final de la solución aceite: ciclohexano

## INTRODUCCION GENERAL

El nogal (*Juglans regia* L.) pertenece a la familia *Juglandaceae*, orden Juglandales. Es una especie originaria de Asia central, de la región geográfica comprendida entre los Cárpatos y Afganistán, sur de Rusia y norte de India (Fernández-López *et al.*, 2000). Su cultivo se remonta aproximadamente al año 1000 antes de Cristo (Ducci *et al.*, 1997), siendo una especie apreciada no sólo por sus frutos comestibles, sino también por la calidad de su madera, utilizada en ebanistería.

En la actualidad, el nogal se cultiva comercialmente en el sur de Europa, norte de África, este de Asia, Estados Unidos y en la región SO de Sudamérica. La producción mundial de nuez con cáscara es de aproximadamente 1.100.000 tn (USDA, Foreign Agricultural Service, 2008); China y Estados Unidos constituyen los principales países productores, con alrededor del 45 y 30 % del total, respectivamente. En el hemisferio sur, la producción se localiza casi exclusivamente en Argentina y Chile con aproximadamente el 1 y 2 % del total mundial, respectivamente. Si bien en nuestro país la superficie destinada al cultivo de nogal es superior a la del país trasandino, éste ostenta una producción más elevada, resultado del mayor rendimiento por unidad de superficie de las variedades cultivadas.

La siguiente tabla muestra la evolución de la producción mundial de nuez cáscara durante los últimos tres años.

| País                     | Producción por campañas (en miles de toneladas) |         |         |
|--------------------------|---|---------|---------|
|                          | 2006/07   | 2007/08 | 2008/09 |
| China                    | 425.000   | 460.000 | 490.000 |
| Estados Unidos           | 313.886   | 294.835 | 340.200 |
| Turquía                  | 75.000  | 90.000  | 85.000  |
| México                   | 68.359  | 69.000  | 70.000  |
| Unión Europea            | 52.235  | 44.230  | 44.500  |
| India                    | 32.000  | 33.000  | 37.000  |
| Chile                    | 22.200  | 23.200  | 25.500  |
| Argentina (puesto N° 20) | 9.300   | 9.600   | >11.000 |

El principal país exportador de nueces con cáscara es Estados Unidos, seguido por Francia, México, Ucrania y Chile. En cuanto a la exportación de nueces sin cáscara Estados Unidos también se ubica en el primer puesto, le siguen China, Ucrania, Moldava y Rumania.

Entre los principales países importadores se encuentran España, Italia, Alemania, Francia, Moldava, Turquía y Japón.

En Argentina y en la última década, el cultivo de nogal ha experimentado un crecimiento sostenido (aproximadamente del 22 %), principalmente en las provincias de Catamarca y La Rioja que aportan, en forma conjunta, cerca del 68 % de la producción nacional de nuez. La superficie cultivada es de aproximadamente 12000 ha, de las cuales el 75 % se halla en plena producción. En términos generales, el rendimiento promedio es de 1000 kg/ha.

El sector nogalero ha recibido el apoyo de políticas específicas para el control fitosanitario y la reconversión orientada al reemplazo de los nogales criollos o tradicionales - de bajo rendimiento - por variedades modernas de alta productividad. Cabe señalar que gran parte de los montes nogaleros existentes están conformados por plantas provenientes de semillas, sin ningún tipo de selección y con una alta heterogeneidad genética, por lo que en algunos casos los mismos no poseen una identidad varietal definida (Parra, 2006). Se estima que el 60 % de la producción proviene del nogal criollo y el 40 % restante de plantas injertadas con variedades introducidas (californianas y francesas). Las nueces tradicionales en su mayor parte son producidas por pequeños productores y tipificadas de acuerdo a criterios regionales. Por el contrario, las variedades introducidas (Chandler, Franquette, Serr, Lara, Hartley, Howard, Mayette, Sorrento y Tulare, entre otras) pertenecen por lo general a grandes explotaciones conducidas con modernas técnicas de cultivo (Doreste, 2008).

Catamarca es la principal provincia productora de Argentina con alrededor de 4800 ha (40 % del total) que proporcionan aproximadamente 4500 tn anuales de nuez cáscara. Gran parte de la producción se localiza en el Departamento Belén. La provincia de La Rioja posee un total de 3200 ha (27 % del total) que proporcionan aproximadamente 3000 tn anuales de nuez cáscara. La mayor parte de la producción se concentra en áreas de faldeos o pendientes de los valles Antinaco - Los Colorados (83 % de la producción de nuez a nivel provincial), Valle del Bermejo y la llamada Costa Riojana. Las provincias de Mendoza y San Juan poseen un total de 1700 ha (14 %) y 1200 ha (10 %), respectivamente.

El principal destino de la producción nogalera de nuestro país es la industria alimentaria; prácticamente el total de la misma se destina al mercado interno y se consume en forma no procesada. La nuez reúne la doble condición de ser un alimento rico tanto en energía como en proteínas de alta calidad. La semilla del nogal – que representa aproximadamente un tercio del peso del fruto entero – contiene entre un 63 y un 70 % de aceite. El mismo está compuesto fundamentalmente por triglicéridos y una pequeña

proporción de ácidos grasos libres, fosfolípidos, material insaponificable y vitaminas liposolubles (Demir y Çetin, 1999; Tsamouris *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2003, 2004; Crews *et al.*, 2005; Oskan y Koyuncu, 2005; Li *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). La composición acídica se presenta altamente insaturada, lo que se refleja en un elevado índice de yodo. Los ácidos poliinsaturados representan entre el 65 y 75 %, los monoinsaturados entre el 15 y 25 %, mientras que los ácidos saturados no superan el 10 % del total de los ácidos grasos presentes en el aceite. Dos ácidos grasos poliinsaturados esenciales, linoleico y linolénico, están presentes en cantidades relativamente altas: 50 – 58 % y 11 – 19 %, respectivamente. Los ácidos monoinsaturados están representados casi exclusivamente por el oleico.

La semilla contiene además entre 13 y 18 % de proteínas, 12 - 16 % de hidratos de carbono, 1.5 - 2 % de fibras, 1.7 - 2 % de minerales (entre los que se destacan hierro, magnesio, potasio y fósforo), vitaminas (ácido fólico, tiamina y riboflavina) y otros compuestos hidrosolubles como ácido fítico, polifenoles y pigmentos (Wardlaw, 1999; Lavedrine *et al.*, 2000; Sze-Tao y Sathe, 2000; Li *et al.*, 2006; Labuckas *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

En Argentina, la producción de aceites comestibles ha mostrado en los últimos años un crecimiento sostenido y en la actualidad es una actividad económica de gran relevancia. Dentro de este gran rubro de la economía, la elaboración de aceites no tradicionales, como los de nuez, almendra o avellana, ofrece una oportunidad que no ha sido prácticamente explotada. En nuestro país no existe producción comercial de aceite de nuez. El principal obstáculo para este tipo de emprendimiento es la falta de instalaciones para el procesamiento de los frutos y la extracción de los aceites. Asimismo, la carencia de información relativa a los aspectos químicos y tecnológicos del proceso de obtención del aceite y de las propiedades y usos del mismo, han contribuido en forma negativa para el desarrollo de esta actividad.

Este trabajo pretende avanzar en la caracterización pomológica de variedades de nuez cultivadas en Argentina, profundizar en el conocimiento de la composición química de sus aceites y en el análisis de alternativas tecnológicas para su extracción y conservación.

# **CAPITULO I**

**Caracterización pomológica y  
composición química del aceite de  
variedades de nuez cultivadas en  
Argentina**



## **Caracterización pomológica y composición química del aceite de variedades de nuez cultivadas en Argentina**

### **ANTECEDENTES**

El fruto del nogal es una drupa globosa de 4 - 5 cm de longitud. El mesocarpio, que es verde y ennegrece rápidamente, encierra un hueso o carozo (la nuez propiamente dicha), formado por el endocarpio leñoso, debido a su elevado contenido en lignina. El mismo consta de dos valvas indehiscentes y encierra a la semilla, con sus característicos cotiledones muy lobulados, casi cerebriformes. Esta última constituye la parte comestible.

Como resultado de procesos de selección y mejoramiento varietal existe una gran diversidad de genotipos de nuez (Yarilgac *et al.*, 2001; Solar *et al.*, 2002; Oskan y Koyuncu, 2005; Zeneli *et al.*, 2005; Balta *et al.*, 2007; Sharma y Sharma, 2001; Ebrahimi *et al.*, 2009), los cuales presentan una elevada variabilidad en las características físicas y atributos químicos y organolépticos de frutos y semillas.

Entre las variedades comerciales cultivadas en Argentina, las nueces de la variedad tradicional (Criolla) configuran una oferta informal, destinada en su mayor parte al mercado interno. Esta variedad posee bajos rendimientos (800 - 900 kg de frutos/ha) debido en parte al elevado porte de los árboles, lo que ha generado plantaciones de baja densidad, y al pequeño tamaño de los frutos.

El significativo incremento de la producción registrado en nuestro país en la última década, se debe en gran medida a la introducción de variedades de alta densidad y rendimiento, provenientes principalmente de Francia y Estados Unidos (California). Entre las primeras, la variedad Franquette es la más utilizada. Su entrada en producción es relativamente rápida y su brotación, retrasada con respecto a la de otras variedades, la tornan particularmente apta para regiones más frías o con riesgo de heladas tardías. Su productividad (2500 – 3000 kg de frutos/ha) puede considerarse media – alta. Entre las variedades californianas, Chandler es la de mayor difusión en Argentina. Se caracteriza por sus árboles de porte pequeño, lo que permite el desarrollo de huertos densos, de rápida entrada en producción y de elevada productividad (3500 – 4000 kg de frutos/ha).

En relación a las características químico-nutricionales, la mayor parte de los trabajos han sido realizados sobre materiales cultivados en Europa y muestran una fuerte influencia genética sobre el rendimiento y la composición de los aceites. Esta componente varietal se evidencia fundamentalmente en la variación porcentual del contenido de los ácidos grasos



insaturados (Amaral *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008), tocoferoles (Lavedrine *et al.*, 1999) y esteroides (Amaral *et al.*, 2003) del aceite.

Con respecto a la influencia del medio agro-ecológico, su incidencia sobre la composición de los aceites es, en general, menor que la debida al genotipo. No obstante, se han detectado variaciones importantes en los patrones de composición de triglicéridos y tocoferoles de aceites de nuez provenientes de diferentes orígenes (Zwarts *et al.*, 1999; Amaral *et al.*, 2004; Crews *et al.*, 2005).

La carencia de información científica relacionada a la calidad de las nueces que se producen en Argentina y a la composición de sus aceites motivó la realización de un estudio sistemático de las variedades más representativas de la producción nacional con el propósito de contribuir a su conocimiento y establecer bases sólidas para la potencial elaboración de aceite de nuez a nivel industrial.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar algunos aspectos pomológicos y la composición química de los aceites de variedades de nuez cultivadas en Argentina.
- Evaluar los efectos de la variedad, de la campaña de producción y del ambiente sobre los parámetros físicos y químicos mencionados anteriormente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción de los sitios y materiales de estudio

Se utilizaron variedades de nuez (*Juglans regia* L.) cultivadas en las localidades de Belén (provincia de Catamarca) y Guanchín (provincia de La Rioja). El clima imperante en ambas localidades es árido, con precipitaciones del orden de los 300 mm anuales, concentradas en el periodo estival. Las plantaciones reciben, además, riego suplementario (en promedio, 400 mm planta/año). En la localidad de Belén, durante tres campañas de producción sucesivas, se estudiaron las siguientes variedades: Criolla, Chandler y Franquette. En la localidad de Guanchín (dos campañas de producción) se analizaron las variedades Chandler, Franquette, Serr, Sorrento, Tulare, Lara, Hartley y Mayette.

Para cada combinación variedad x localidad x año de producción, se recolectaron y analizaron, en forma independiente, tres lotes de frutos de 1 kg cada uno. Los frutos, libres de epicarpio y mesocarpio, se obtuvieron en su estado óptimo de madurez, descartándose aquéllos que presentaban defectos como rajaduras o síntomas visuales de contaminación microbiológica. Los frutos seleccionados se secaron a 30 °C, hasta peso seco constante.

### Características pomológicas

De cada lote de frutos proveniente de cada combinación variedad x localidad x año de producción, se seleccionaron 50 frutos al azar los cuales se utilizaron para determinar los parámetros que se describen a continuación (SEAG, Resolución N° 1352, 1967).

#### *Tamaño de nuez con cáscara*

Se entiende por nuez con cáscara al endocarpio lignificado conteniendo la semilla comestible. Para determinar su tamaño se tomó la medida transversalmente a su parte más ancha, consignándose los siguientes tamaños de nuez:

- Gigantes: mayor de 35 mm.
- Grandes: mayor de 30 y hasta 35 mm.
- Medianas: mayor de 28 y hasta 30 mm.
- Chicas: mayor de 25 y hasta 28 mm.
- Enanas: menor a 25 mm.

### *Tamaño de nuez sin cáscara (pulpa)*

Se entiende por nuez sin cáscara al fruto del nogal al que se le ha eliminado la cáscara y los tabiques internos, es decir, la semilla comestible, sin el endocarpio lignificado. Para determinar su tamaño se tomó la medida transversalmente a la parte más ancha de la semilla, consignándose los siguientes tamaños:

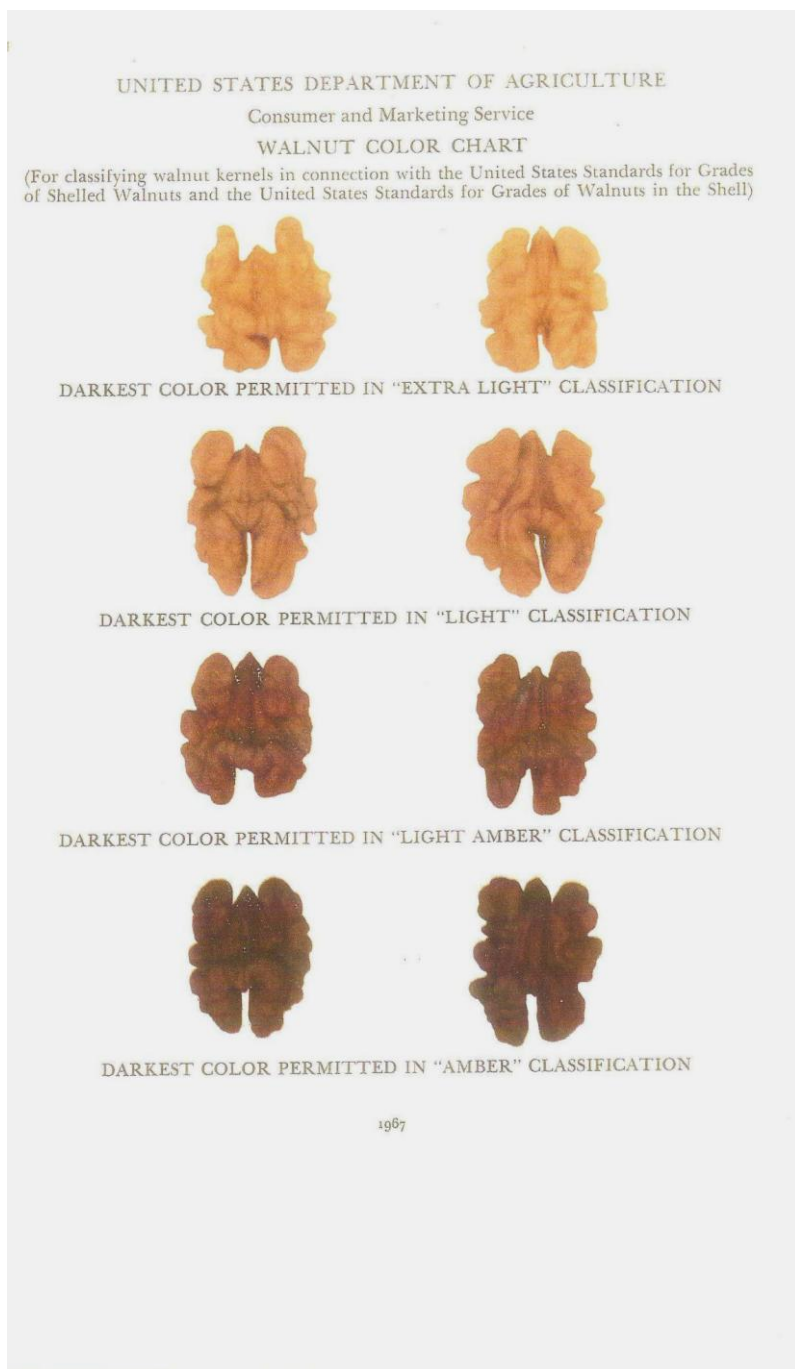
- Gigantes: mayor de 35 mm.
- Grandes: mayor de 30 y hasta 35 mm.
- Medianas: mayor de 28 y hasta 30 mm.
- Chicas: mayor de 25 y hasta 28 mm.
- Enanas: menor a 25 mm.

### *Color de nuez sin cáscara*

Se determinó el color de la pulpa o semilla por comparación con una carta de colores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (figura 1), que establece las siguientes categorías:

- Extra Claro.
- Claro.
- Ámbar Claro.
- Ámbar.

Figura 1: Carta de colores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.



### *Peso de nuez con y sin cáscara*

Se determinó por gravimetría utilizando una balanza analítica con una sensibilidad 0.1 mg.

## **Rendimiento en aceite**

De cada lote de frutos, se pesaron 10 g de pulpa, se molieron en molino de cuchillas, se deshidrataron en estufa (105 °C) y se sometieron a extracción continua sólido-líquido en equipo Soxhlet, durante 12 horas, utilizando como disolvente n-hexano. El contenido de aceite se cuantificó por diferencia de pesos previo y posterior a la extracción (AOCS, 1998). El rendimiento en aceite se expresa como %, base seca.

## **Extracción de los aceites para el análisis de características físicas y químicas**

Se utilizó una prensa hidráulica de acero inoxidable escala piloto, a una presión máxima de 30 kg/cm<sup>2</sup>. La temperatura del proceso se mantuvo a 18 ± 2 °C. Los aceites obtenidos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se almacenaron en envases de vidrio ámbar a -10 °C hasta el momento de su utilización.

### *Índice de refracción*

Las determinaciones se realizaron según el método 28.008 de la AOCS (1998) utilizando un refractómetro tipo Abbe a una temperatura de 22 °C.

### *Densidad*

Mediante el empleo de un picnómetro se determinó la masa de la unidad de volumen (ml) a una temperatura de 25 ± 1 °C.

### *Grado de acidez*

Se pesaron 5 g de aceite, con una aproximación de 0.01 g, y se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml. El aceite se disolvió en una mezcla de 10 ml de etanol desnaturalizado, 10 ml de éter etílico y 0.3 ml de solución de fenolftaleína (1 % p/v). El grado de acidez (GA) del aceite se obtuvo al titular esta mezcla con una solución etanólica de KOH (0.02 N) y se expresó como porcentaje (p/p) de ácido oleico.

$$GA = (V \times PM \times N) / (10 \times g \text{ de aceite})$$

Donde: V = ml de solución etanólica de KOH utilizados para la titulación.

PM = peso molecular del ácido oleico.

N = normalidad de la solución de KOH.

### *Índice de peróxidos*

Se pesaron 5 g de aceite, con una aproximación de 0.05 g, y se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml. Se agregaron 30 ml de solución de ácido acético: cloroformo (3:2, v/v) y se agitó vigorosamente hasta disolución. Se adicionaron 0.5 ml de solución saturada de ioduro de potasio, se agitó y luego se dejó en reposo en oscuridad durante 1 min. Posteriormente, se agregaron 30 ml de agua destilada y se tituló, agitando continuamente, con solución 0.1 N de tiosulfato de sodio hasta desaparición del color amarillo. Se adicionaron 0.5 ml de solución de almidón (1 %, p/v) y se continuó titulado hasta desaparición del color azul. El índice de peróxidos (expresado como miliequivalentes de oxígeno/kg de aceite) se calculó en base a la siguiente ecuación:

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

Donde: S = ml de solución de tiosulfato de sodio consumidos.

N\* = normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

\* Cuando se utilizaron menos de 0.5 ml de solución 0.1 N, se repitió la determinación con solución 0.01 N.

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

Se pesaron 0.15 g ( $k_{232}$ ) y 0.90 g ( $k_{270}$ ) de aceite con una aproximación de 0.01 g y se colocaron separadamente en matraces aforados de 25 ml. El volumen final se completó con ciclohexano de calidad espectrofotométrica. Las soluciones resultantes se homogeneizaron y una alícuota de cada una de las mismas se utilizó para medir la absorbancia a 232 nm ( $k_{232}$ ) y 270 nm ( $k_{270}$ ), utilizando el disolvente puro como referencia. Cuando los valores de extinción específica obtenidos no estuvieron comprendidos en el intervalo entre 0.1 y 0.8, se realizaron nuevas determinaciones utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según el caso.

### *Contenido de pigmentos y color*

Se pesaron 7.5 g de aceite con una aproximación de 0.01 g y se diluyeron en ciclohexano grado espectrofotométrico hasta un volumen final de 25 ml. Una alícuota de esta solución se utilizó para cuantificar la concentración de pigmentos carotenoides, mediante la medida de la absorbancia a 470 nm (correspondiente al máximo de absorción

de la luteína), y de clorofilas (670 nm, máximo de absorción de la feofitina), de acuerdo a la metodología propuesta por Minguez-Mosquera *et al.* (1991).

La concentración de cada fracción de pigmentos se obtuvo aplicando la siguiente ecuación (Papaseit, 1986):

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

Donde: C = concentración de pigmentos totales (mg de clorofilas o carotenoides/kg de aceite).

E = absorbancia a la longitud de onda específica.

V<sub>f</sub> = volumen final de la solución aceite: ciclohexano (ml).

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

E<sub>1%</sub> = absorbancia específica en una solución al 1 % medida en una cubeta de 1 cm de paso óptico (E<sub>1%</sub> feofitina = 613; E<sub>1%</sub> luteína = 2000).

El color de los aceites se evaluó mediante el método Lovibond (AOCS, 1998).

#### *Contenido de tocoferoles*

Los tocoferoles se analizaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de acuerdo con el procedimiento propuesto por Pocklington y Dieffenbacher (1988). Se pesó 1 g de aceite con una aproximación de 0.01 g y se colocó en un matraz aforado de 25 ml. El volumen final se completó con n-hexano calidad espectrofotométrica. Una alícuota de 20 µl de la solución previamente filtrada (filtro de nylon, poro 0.45 µm) se inyectó en una columna de sílica de fase normal (Lichrosorb Si 60). Como fase móvil se utilizó n-hexano:2-propanol (99.5:0.5 v/v) con un flujo de 1 ml/min. Se empleó un detector UV a una longitud de onda de 292 nm. Los componentes de la mezcla (α-, γ- y δ-tocoferol) se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con respecto a patrones corridos bajo idénticas condiciones y datos publicados (Lavedrine *et al.*, 1997; Savage *et al.*, 1999; Amaral *et al.*, 2003). Para la cuantificación de los componentes individuales se valoró la respuesta del detector (como porcentaje de área) a diferentes diluciones de cada uno de los patrones puros. La concentración se expresó como µg de tocoferol/g de aceite.

#### *Actividad antioxidante*

Para evaluar la actividad antioxidante (AO) de los aceites se llevaron a cabo dos tipos de ensayo. Para el primero, se pesaron 100 mg de aceite, se agregó 1 ml de tolueno y se agitó vigorosamente durante 20 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente, se

agregaron 3.9 ml de solución  $10^{-4}$  M de DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en tolueno, seguido de agitación. Finalmente, se midió la absorbancia a 515 nm luego de 1, 30 y 60 min de incubación, utilizando tolueno puro como blanco de reacción. La AO al DPPH· se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

Donde,  $\text{DPPH}_r$  expresa la cantidad de DPPH· que permanece en el medio una vez que los antioxidantes presentes en el aceite son consumidos.

En el segundo ensayo, se prepararon tres concentraciones de aceite (75, 100 y 150 mg de aceite en un 1 ml de tolueno). Se agregaron 3.9 ml de una solución  $10^{-4}$  M de DPPH·, se agitó vigorosamente durante 20 segundos a temperatura ambiente y, luego de 30 min de reposo, se midió la absorbancia a 515 nm. En este ensayo, la AO se expresó como  $\text{EC}_{50}$  que se define como la cantidad de aceite necesaria para reducir al 50 % la absorbancia inicial.

#### *Estabilidad oxidativa*

Se evaluó el periodo de inducción de los aceites mediante el método Rancimat (Frankel, 2005). Se utilizaron 3.5 g de aceite para cada determinación. Los ensayos se llevaron a cabo a 110 °C con un caudal de aire de 20 l/h.

#### *Composición acídica de los aceites*

La identificación y cuantificación de ácidos grasos de los aceites se llevaron a cabo por cromatografía gaseosa (CG). Los aceites crudos (0.5 g) se saponificaron con 30 ml de solución de KOH 1 N en metanol mediante reflujo durante 45 min. El material insaponificable se extrajo con n-hexano (3 x 30 ml). Los ácidos grasos hidrolizados se esterificaron con 50 ml de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N en metanol mediante reflujo durante 45 min. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron con n-hexano (3 x 40 ml). La solución resultante se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y concentró en evaporador rotatorio a 40 °C. La mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos se analizó en un cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna de fase Supelcowax-10, de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase. Se empleó nitrógeno como gas portador (1 ml/min) y el siguiente programa



de temperatura: T° inicial 180 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta 240 °C (10 min). Los tiempos de retención relativos se consideraron en relación al del palmitato de metilo y el contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos (Maestri *et al.*, 1998).

### *Índice de Yodo*

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

$$IY = (\% \text{ Oleico} \times 0.899) + (\% \text{ Linoleico} \times 1.814) + (\% \text{ Linolénico} \times 2.737)$$

### *Fracción insaponificable*

Para el estudio de los componentes de la fracción insaponificable, los aceites crudos (1 g) se saponificaron con 20 ml de una solución de KOH 1 N en metanol mediante reflujo durante 45 min. El material insaponificable se extrajo con n-hexano (3 x 30 ml), se concentró en evaporador rotatorio y se analizó mediante cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel (0.5 mm de espesor) utilizando tolueno/acetona (95:5, v/v) como fase móvil. Una vez finalizado el desarrollo de la placa cromatográfica, se extrajo la placa de la cuba y se colocó bajo campana hasta evaporación del disolvente. Posteriormente, la placa se asperjó con solución etanólica de 2,7-diclorofluoresceína (3 %, p/v) y se observó bajo luz UV. Se observaron tres fracciones, las cuales fueron identificadas mediante el empleo de patrones, como esteroides, metil-esteroides, alcoholes triterpénicos e hidrocarburos. Cada una de estas fracciones fue removida de la placa en forma separada, resuspendida en cloroformo y purificada nuevamente por CCD bajo las condiciones señaladas anteriormente. Las fracciones identificadas tentativamente como esteroides, metil-esteroides y alcoholes triterpénicos se analizaron, separadamente, mediante CG y CG – espectrometría de masa (CG – EM), bajo las siguientes condiciones:

CG: se utilizó una columna capilar (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm de espesor de fase) VF - 5ms (5 % fenil, 95 % polidimetilsiloxano); gas portador, nitrógeno (1 ml/min); temperatura de horno programada desde 240 °C (1 min) hasta 290 °C (2 °C/min); temperaturas de inyector y detector, 300 °C.

GC - MS: se utilizó una columna capilar (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm de espesor de fase) HP 5 (5 % fenil metil siloxano); gas portador, helio (1 ml/min). Las temperaturas de horno, inyector y detector fueron iguales a las utilizadas en el análisis por GC.

Los esteroides, metil-esteroides y alcoholes triterpénicos se identificaron mediante comparación con espectros de masa de compuestos de referencia y datos publicados (Itoh *et al.*, 1974; Padley *et al.*, 1986).

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

### *Compuestos volátiles*

El análisis de la fracción de compuestos volátiles se llevó a cabo mediante micro-extracción en fase sólida seguida de CG - EM (Torres *et al.*, 2005). Las muestras de aceite fresco (5 ml), se colocaron en viales de vidrio de 10 ml de capacidad, los que fueron sellados con tapón de silicona y almacenados a -10 °C hasta el momento de su análisis. Para la extracción de los compuestos volátiles (adsorción) se utilizó una microfibra de 100 µm recubierta con divinilbenceno/carboxeno sobre polidimetilsiloxano. Una vez que la misma se introdujo en el espacio de cabeza del vial, la muestra se calentó a 50 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la fibra fue retirada del vial e inmediatamente insertada en el puerto de inyección de un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa. La separación de los componentes de la mezcla se realizó en una columna capilar HP 5 (30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de fase). Se empleó helio como gas portador (1 ml/min). La temperatura del horno se programó desde 50 °C (2 min) hasta 250 °C a razón de 5 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250 °C. Los compuestos volátiles se identificaron por comparación con datos de espectros de masa obtenidos de compuestos puros (estándares) de referencia.

### **Análisis estadístico de los resultados**

La base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2009p. Para cada uno de los parámetros físicos y químicos estudiados, se realizó análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías, considerando a la variedad y a la campaña de producción como

fuentes de variabilidad. En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples (LSD). Para estimar correlaciones entre los parámetros evaluados se utilizó el test de correlación de Pearson. También se realizó análisis multivariado (componentes principales) para establecer relaciones entre las variedades y parámetros estudiados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se presentan los resultados de la caracterización pomológica de las variedades de nuez cultivadas en Catamarca. La variedad Chandler presentó los frutos de mayor tamaño (más del 80 % de los mismos se clasificaron como grandes) y también una mayor regularidad en este carácter a lo largo de las tres campañas de producción. En coincidencia con lo anterior, esta variedad mostró, en proporción, semillas de tamaño más grande que las observadas en las variedades Criolla y Franquette. Asimismo, la relación PP/PF (peso pulpa/peso fruto) resultó superior en la variedad Chandler.

Aunque la variedad Criolla ha sido tradicionalmente caracterizada por sus frutos pequeños y por una baja relación pulpa/cáscara, los resultados encontrados en este estudio mostraron una distribución de tamaños de frutos similar a la observada en la variedad Franquette. No obstante, la distribución de tamaños, especialmente de frutos sin cáscara, fue más heterogénea en la variedad Criolla y presentó mayor variabilidad entre campañas de producción.

En la variedad Franquette se observaron, en proporción, los frutos y especialmente las semillas de menor tamaño. Esto redundó en una baja relación PP/PF. Por otra parte, esta variedad presentó la más alta regularidad en la distribución de tamaños y pesos de frutos y semillas a lo largo de las tres campañas de producción analizadas.

Al examinar la distribución del carácter color de pulpa, se puso en evidencia una gran variabilidad entre campañas en las tres variedades evaluadas. Sin embargo, si se analizan los promedios de las tres campañas, las nueces de la variedad Chandler mostraron una distribución de tipo exponencial, con una gran proporción de pulpas en las categorías “extra claro” (62.7 %) y “claro” (28.7 %). La variedad Criolla presentó una distribución más regular en las diferentes categorías, aunque con mayores porcentajes de pulpas “ámbar” (31.3 %) y “ámbar claro” (33.1 %). En la variedad Franquette predominaron pulpas “ámbar claro” (49.9 %) y “extra claro” (24.9 %).

Tabla 1: Distribución porcentual de tamaños de fruto con cáscara (TF) y de pulpa (TP), color de la pulpa (CP) y relación peso pulpa/peso fruto (PP/PF) en variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.

| Parámetro          | Variedad    |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                    | Chandler    |             |             | Criolla     |             |             | Franquette  |             |             |
|                    | 2004        | 2005        | 2006        | 2004        | 2005        | 2006        | 2004        | 2005        | 2006        |
| TF (mm)            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| <i>Gigantes</i>    | -           | 3.33 ± 4.16 | 6.67 ± 11.5 | -           | 1.33 ± 1.15 | -           | 3.33 ± 4.16 | 12.7 ± 10.3 | 8.67 ± 9.87 |
| <i>Grandes</i>     | 80.7 ± 3.06 | 86.0 ± 3.46 | 82.7 ± 9.02 | 55.3 ± 9.87 | 93.3 ± 3.06 | 83.3 ± 4.62 | 78.0 ± 5.29 | 69.3 ± 3.06 | 68.7 ± 7.57 |
| <i>Medianas</i>    | 17.3 ± 1.15 | 9.33 ± 5.03 | 8.0 ± 7.21  | 41.3 ± 6.11 | 5.33 ± 3.06 | 16.0 ± 5.29 | 12.7 ± 3.06 | 12.7 ± 9.02 | 12.0 ± 2.0  |
| <i>Chicas</i>      | 2.0 ± 2.0   | 1.33 ± 2.31 | 2.0 ± 3.46  | 3.33 ± 4.16 | -           | 0.67 ± 1.15 | 2.67 ± 1.15 | 4.67 ± 4.16 | 10.0 ± 3.46 |
| <i>Enanas</i>      | -           | -           | 0.67 ± 1.15 | -           | -           | -           | 3.33 ± 1.15 | 0.67 ± 1.15 | 0.67 ± 1.15 |
| TP (mm)            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| <i>Gigantes</i>    | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| <i>Grandes</i>     | -           | -           | -           | -           | 0.67 ± 1.15 | -           | -           | -           | -           |
| <i>Medianas</i>    | 7.26 ± 2.68 | 7.65 ± 3.38 | 4.0 ± 5.29  | -           | 9.33 ± 1.15 | 2.67 ± 2.31 | 1.96 ± 3.39 | 1.01 ± 1.75 | 1.33 ± 1.15 |
| <i>Chicas</i>      | 42.6 ± 7.56 | 56.2 ± 7.40 | 42.7 ± 7.02 | 9.03 ± 1.0  | 44.7 ± 4.16 | 32.0 ± 3.46 | 18.9 ± 1.45 | 19.7 ± 1.62 | 18.7 ± 13.0 |
| <i>Enanas</i>      | 50.2 ± 10.2 | 36.1 ± 9.10 | 53.3 ± 9.24 | 91.0 ± 1.0  | 45.3 ± 5.77 | 65.3 ± 5.03 | 79.1 ± 4.84 | 79.2 ± 3.19 | 80.0 ± 14.0 |
| CP                 |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| <i>Extraclaro</i>  | 2.67 ± 4.62 | 90.6 ± 4.98 | 94.7 ± 3.06 | -           | -           | 33.3 ± 7.02 | -           | -           | 74.7 ± 17.0 |
| <i>Claro</i>       | 78.7 ± 8.33 | 6.0 ± 6.0   | 1.33 ± 1.15 | 8.67 ± 9.87 | 8.0 ± 2.0   | 56.7 ± 7.57 | 12.7 ± 6.43 | 15.6 ± 6.29 | 24.0 ± 18.0 |
| <i>Ambar Claro</i> | 18.0 ± 14.0 | 2.03 ± 2.05 | 0.67 ± 1.15 | 45.3 ± 7.57 | 44.0 ± 0.01 | 10.0 ± 3.46 | 76.0 ± 4.0  | 73.6 ± 5.56 | -           |
| <i>Ambar</i>       | 0.67 ± 1.15 | 1.33 ± 1.15 | 3.33 ± 3.06 | 46.0 ± 7.21 | 48.0 ± 2.0  | -           | 11.3 ± 7.02 | 10.8 ± 6.32 | 1.33 ± 1.15 |
| PP/PF              | 0.47 ± 0.01 | 0.45 ± 0.01 | 0.43 ± 0.05 | 0.43 ± 0.01 | 0.45 ± 0.01 | 0.43 ± 0.01 | 0.38 ± 0.05 | 0.37 ± 0.04 | 0.36 ± 0.03 |

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar.

La tabla 2 muestra los contenidos de aceite y algunos parámetros físicos y químicos de los mismos en las variedades de nuez producidas en Catamarca.

El rendimiento en aceite estuvo comprendido entre 67.6 % (variedad Criolla, campaña 2005) y 74 % (variedad Franquette, campaña 2006). El genotipo fue la principal fuente de variación para este carácter (tabla 3). La variabilidad debida a la campaña de producción y su interacción con el genotipo no resultaron significativas. Al analizar los promedios de las tres campañas (tabla 4), la variedad Franquette presentó un contenido en aceite significativamente más elevado (72.7 %) que aquellos observados en las variedades Chandler (70.4 %) y Criolla (68.9 %). Estos valores, en conjunto, resultaron superiores a un valor promedio (69 %) determinado por Prasad (2003) a partir de nueces de diferentes variedades y orígenes geográficos. Por otra parte, el contenido promedio de aceite en la variedad Franquette fue similar al informado por Pereira *et al.* (2008) para nueces de esta variedad cultivada en Portugal.

La densidad y el índice de refracción presentaron valores coincidentes con los de numerosos aceites vegetales comestibles (Padley *et al.*, 1986). No se registraron variaciones debidas al genotipo y a la campaña de producción para estos parámetros.

El grado de acidez de los aceites resultó extremadamente bajo ( $< 0.01$  % Ac. oleico) indicando que los mismos, cuando se obtienen a partir de frutos frescos, se encuentran efectivamente protegidos frente a procesos de degradación hidrolítica y/o microbiológica que conllevan a la hidrólisis de glicéridos con el consiguiente incremento de los valores de acidez. No se observaron diferencias significativas entre genotipos ni entre años de producción para este parámetro.

Los coeficientes de extinción específica, que se relacionan con la estabilidad oxidativa de los aceites y corresponden a la máxima absorción de dienos y trienos conjugados, resultaron similares ( $k_{232} < 1.5$ ,  $k_{270} \leq 0.1$ ) a los obtenidos por Crowe *et al.* (2002) para aceites de nuez obtenidos mediante disolventes. No se detectaron peróxidos en ninguno de los aceites analizados.

Los principales ácidos grasos de los aceites de las variedades estudiadas (tabla 2) fueron: palmítico (hexadecanoico, 6.61 – 7.81 %), esteárico (octadecanoico, 1.50 – 2.54 %), oleico (*cis* 9-octadecenoico, 15.4 – 30.2 %), linoleico (*cis* 9, *cis* 12-octadecadienoico, 47.9 – 57.8 %) y linolénico (*cis* 9, *cis* 12, *cis* 15-octadecatrienoico, 11.9 – 18.6 %). También se detectaron cantidades traza ( $< 0.3$  %) de los ácidos palmitoleico (*cis* 9-hexadecenoico), araquídico (eicosanoico) y *cis* 11-eicosenoico.

El genotipo resultó la principal fuente de variabilidad para todos los ácidos analizados, aunque la influencia de la campaña de producción y su interacción con el genotipo también resultaron significativos (tabla 3).

Tabla 2: Contenido de aceite, características físicas y químicas y composición de ácidos grasos y tocoferoles de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.

| Parámetro              | Variedades   |             |              |              |              |              |              |              |              |
|------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                        | Chandler     |             |              | Criolla      |              |              | Franquette   |              |              |
|                        | 2004         | 2005        | 2006         | 2004         | 2005         | 2006         | 2004         | 2005         | 2006         |
| CA (g/100 g pulpa)     | 70.8 ± 1.07  | 69.5 ± 0.74 | 70.9 ± 1.88  | 69.9 ± 0.24  | 67.6 ± 0.10  | 69.4 ± 0.99  | 71.8 ± 0.82  | 72.4 ± 2.17  | 74.0 ± 1.60  |
| IR                     | 1.48 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01 | 1.48 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01  | 1.47 ± 0.01  |
| Densidad (g/ml)        | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01 | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01  | 0.92 ± 0.01  |
| GA (% Ac oleico)       | 0.05 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01 | 0.05 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.07 ± 0.01  | 0.07 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01  |
| k <sub>232</sub>       | 1.41 ± 0.01  | 1.16 ± 0.02 | 1.12 ± 0.01  | 1.32 ± 0.02  | 1.23 ± 0.03  | 1.12 ± 0.01  | 1.41 ± 0.01  | 1.11 ± 0.04  | 1.08 ± 0.02  |
| k <sub>270</sub>       | 0.09 ± 0.01  | 0.10 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01  | 0.08 ± 0.01  | 0.10 ± 0.01  | 0.09 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.08 ± 0.01  | 0.07 ± 0.01  |
| Color rojo             | 1.20 ± 0.00  | 0.95 ± 0.07 | 0.40 ± 0.14  | 1.10 ± 0.00  | 1.00 ± 0.00  | 0.90 ± 0.00  | 1.10 ± 0.00  | 1.05 ± 0.07  | 1.50 ± 0.00  |
| Color amarillo         | 11.5 ± 0.71  | 14.5 ± 0.71 | 8.50 ± 0.71  | 14.0 ± 0.00  | 14.0 ± 0.00  | 12.0 ± 0.00  | 11.5 ± 0.71  | 14.0 ± 0.00  | 12.5 ± 0.71  |
| Ácidos grasos (%)      |              |             |              |              |              |              |              |              |              |
| <i>Palmitico</i>       | 6.95 ± 0.15  | 6.61 ± 0.28 | 7.12 ± 0.07  | 7.68 ± 0.14  | 7.81 ± 0.06  | 7.79 ± 0.02  | 7.54 ± 0.09  | 6.59 ± 0.10  | 6.82 ± 0.06  |
| <i>Estearico</i>       | 1.50 ± 0.01  | 1.69 ± 0.15 | 1.69 ± 0.19  | 1.71 ± 0.02  | 1.88 ± 0.08  | 2.02 ± 0.02  | 2.12 ± 0.01  | 2.16 ± 0.14  | 2.54 ± 0.05  |
| <i>Oleico</i>          | 16.5 ± 0.22  | 17.8 ± 1.22 | 15.4 ± 0.04  | 17.3 ± 0.09  | 21.2 ± 0.76  | 21.8 ± 0.02  | 26.3 ± 0.06  | 28.4 ± 2.42  | 30.2 ± 0.31  |
| <i>Linoleico</i>       | 56.5 ± 0.23  | 56.7 ± 0.45 | 57.7 ± 0.12  | 57.8 ± 0.03  | 57.3 ± 0.23  | 56.0 ± 0.09  | 52.1 ± 0.04  | 50.2 ± 1.21  | 47.9 ± 0.37  |
| <i>Linolénico</i>      | 18.6 ± 0.06  | 17.0 ± 1.14 | 18.1 ± 0.09  | 15.6 ± 0.21  | 11.9 ± 0.63  | 12.4 ± 0.07  | 11.9 ± 0.01  | 12.5 ± 1.17  | 12.6 ± 0.73  |
| Índice de yodo         | 168.1 ± 0.31 | 165.4 ± 2.8 | 168.0 ± 0.28 | 163.2 ± 0.56 | 155.4 ± 1.47 | 155.0 ± 0.04 | 150.9 ± 0.14 | 151.0 ± 3.23 | 148.4 ± 1.05 |
| Tocoferoles (%)        |              |             |              |              |              |              |              |              |              |
| $\alpha$ - tocoferol   | Tr           | 1.50 ± 1.47 | 6.0 ± 0.64   | Tr           | Tr           | 5.31 ± 0.66  | Tr           | 2.55 ± 0.16  | 5.94 ± 0.01  |
| $\gamma$ - tocoferol   | 86.4 ± 0.56  | 83.4 ± 1.77 | 79.3 ± 1.22  | 88.3 ± 0.73  | 86.8 ± 0.26  | 80.1 ± 0.01  | 86.9 ± 0.55  | 83.7 ± 0.33  | 75.5 ± 2.28  |
| $\delta$ - tocoferol   | 13.6 ± 0.56  | 15.1 ± 0.97 | 14.7 ± 0.58  | 11.7 ± 0.73  | 13.2 ± 0.27  | 14.6 ± 0.67  | 13.1 ± 0.55  | 13.7 ± 0.42  | 18.3 ± 2.28  |
| TT ( $\mu$ g/g aceite) | 328 ± 1.61   | 326 ± 0.23  | 347 ± 0.70   | 357 ± 0.95   | 386 ± 5.84   | 369 ± 11.4   | 301 ± 30.3   | 323 ± 0.84   | 316 ± 9.80   |
| CC ( $\mu$ g/g aceite) | 0.95 ± 0.04  | 0.93 ± 0.09 | 0.87 ± 0.07  | 1.02 ± 0.12  | 1.42 ± 0.04  | 1.05 ± 0.38  | 0.67 ± 0.01  | 0.87 ± 0.01  | 1.20 ± 0.07  |
| EO (horas)             | 2.37 ± 0.02  | 2.50 ± 0.03 | 2.15 ± 0.24  | 2.94 ± 0.02  | 3.38 ± 0.06  | 2.89 ± 0.02  | 3.18 ± 0.08  | 3.09 ± 0.45  | 2.82 ± 0.40  |

Abreviaturas: CA, contenido de aceite; IR, índice de refracción; GA, grado de acidez; TT, tocoferoles totales; CC, contenido de pigmentos carotenoides; EO, estabilidad oxidativa. Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Tr: valores traza (< 0.3 %).

El ácido oleico presentó la mayor variabilidad entre genotipos; la variedad Franquette tuvo el contenido promedio más elevado (28.3 %) y Chandler el más bajo (16.6 %) (tabla 4). Los ácidos poliinsaturados mostraron la tendencia opuesta: sus porcentajes resultaron significativamente menores en la variedad Franquette. Estas tendencias se confirmaron mediante una correlación inversa altamente significativa entre el contenido de ácido oleico y el de cada uno de los ácidos poliinsaturados: linoleico ( $r = -0.94$ ,  $p \leq 0.0001$ ) y linolénico ( $r = -0.81$ ,  $p \leq 0.0001$ ).

El análisis de la bibliografía disponible en relación a la composición de ácidos grasos de aceites de nuez de diversos orígenes, muestra que los contenidos de ácido oleico en cultivares comerciales están comprendidos entre 13 y 22 % del total de ácidos grasos (Amaral *et al.*, 2003; Crews *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Los valores obtenidos en este trabajo para la variedad Franquette resultan significativamente más elevados, inclusive con respecto a esta misma variedad cultivada en Portugal (17 – 22 % de ácido oleico) (Amaral *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2008). No obstante, deben mencionarse algunos trabajos de prospección y mejoramiento en genotipos no comerciales de nuez en donde se han registrado valores de hasta el 40 % de ácido oleico (Ozkan y Koyuncu, 2005).

Los índices de yodo de los aceites analizados estuvieron comprendidos entre 150 (variedad Franquette) y 167 (variedad Chandler) (tabla 4), y resultan coincidentes con los valores hallados por Crews *et al.* (2005) para aceites de nuez de diferentes orígenes geográficos. En consecuencia y atendiendo a este parámetro, los mismos se clasifican como aceites secantes.

Entre las sustancias naturales con actividad antioxidante en aceites vegetales, se destacan, por su distribución relativamente ubicua, los tocoferoles y, en menor medida, ácidos fenólicos y polifenoles tales como flavonoides y taninos (Maestri *et al.*, 2006). Numerosos trabajos han puesto en evidencia la presencia de una abundante cantidad de estos compuestos en la semilla del nogal (Lavedrine *et al.*, 1997; Fukuda, *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006, 2007; Labuckas *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), fundamentalmente de ácidos fenólicos y de un tipo particular de taninos conocidos como elagitaninos (Fukuda, *et al.*, 2003).

Se examinó la presencia de compuestos fenólicos, diferentes a los tocoferoles, en los aceites y harinas de extracción, utilizando la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Labuckas *et al.*, 2008). El contenido promedio de compuestos fenólicos en las harinas fue de 25.6 (mg/g harina, base seca). Sin embargo, no se detectaron los compuestos mencionados en ninguna de las muestras de aceite analizadas. Estos resultados son



coincidentes con los observados por otros investigadores (Espín *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2008 a, b). La carencia de ácidos fenólicos y polifenoles en la fracción de aceite puede atribuirse a la baja solubilidad de los mismos en esta fracción.

La comparación con otros aceites vegetales comestibles (Padley *et al.*, 1986) permite afirmar que los aceites de nuez poseen un contenido medio de tocoferoles totales. El examen de la bibliografía revela valores comprendidos entre 260 y 570  $\mu\text{g/g}$  de aceite (Lavedrine *et al.*, 1997; Crews *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se obtuvieron concentraciones en el rango 301 – 386  $\mu\text{g/g}$  de aceite (tabla 2). La variabilidad observada puede explicarse en su mayor parte por la influencia del genotipo (tabla 3). La campaña de producción y su interacción con la variedad no fueron significativas. Los valores promedio de las tres campañas mostraron las concentraciones más elevadas en la variedad Criolla (370.6  $\mu\text{g/g}$  de aceite) y algo menores en Chandler y Franquette (tabla 4).

En coincidencia con datos publicados por diferentes autores (Lavedrine *et al.*, 1997; Crews *et al.*, 2005; Li *et al.* 2007), el  $\gamma$ -tocoferol fue el componente más abundante de la fracción de tocoferoles (79.3 – 88.3 %), seguido por el  $\delta$ -tocoferol (11.7 – 18.3 %) y pequeñas cantidades de  $\alpha$ -tocoferol ( $\leq 6$  %) (tabla 2).

El contenido de pigmentos carotenoides, responsables en parte del color de los aceites, estuvo comprendido en el rango 0.67 – 1.42 ( $\mu\text{g/g}$  de aceite). Se detectaron cantidades extremadamente bajas de fósforo en los aceites estudiados, la cantidad promedio hallada fue de 24.7 mg/kg de aceite. No se conoce un factor para la conversión del contenido de fósforo a fosfolípidos, específico para aceite de nuez. En los últimos años se ha generalizado el uso de un factor igual a 30, calculado originalmente para aceite crudo de soja (AOCS, 1998). Sin embargo, teniendo en cuenta la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos individuales, Chapman (1980) ha determinado un valor de 25 para aceites de soja y girasol. A su vez, Carelli *et al.* (2002) han estimado un factor teórico de conversión de 24.7 para aceite crudo de girasol. En base a estos antecedentes, la aplicación de una factor de 25 a los aceites de nuez analizados en este trabajo, da lugar a un contenido de fosfolípidos totales de alrededor del 0.06 %, valor que resulta marcadamente inferior al encontrado en algunos aceites vegetales crudos (Gunstone, 2002).

Los aceites presentaron una coloración ámbar claro. Las determinaciones de color (sistema Lovibond) indicaron valores entre 0.85 – 1.22 (rojo) y 11.5 – 13.3 (amarillo). No se encontraron datos publicados sobre estos parámetros en aceites de nuez.

La estabilidad oxidativa (EO, Rancimat) se caracterizó por los bajos tiempos de inducción (2.15 – 3.38 horas, tabla 2) confirmando que los aceites de nuez son inestables frente a la termo-oxidación, en comparación con otros aceites vegetales (Arranz *et al.*, 2008). Los valores promedio de las tres campañas indicaron que en la variedad Chandler la EO fue significativamente menor a la de las variedades Criolla y Franquette (tabla 4). Estos valores resultan similares a los obtenidos por Amaral *et al.* (2003) quienes informaron un rango comprendido entre 2.7 y 3.4 h, pero inferiores al informado por Arranz *et al.* (2008) que resultó igual a 4.7 h. Se obtuvo correlación positiva, estadísticamente significativa, entre EO y el contenido de ácido oleico ( $r = 0.58$ ,  $p \leq 0.01$ ), y negativa entre EO y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados ( $r = -0.61$ ,  $p \leq 0.007$ ).

Tabla 3: Análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en frutos y aceites de las variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.

| Parámetro                | Variedad | F     | Campaña | F     | V x C   | F     |
|--------------------------|----------|-------|---------|-------|---------|-------|
| Peso pulpa/peso fruto    | 55.45**  | 17.75 | 3.32    | 1.03  | 4.25    | 0.68  |
| Contenido de aceite      | 57.46**  | 20.56 | 9.86    | 3.53  | 7.51    | 1.34  |
| Ac. palmítico            | 64.92**  | 122.2 | 10.79** | 20.28 | 19.52** | 18.41 |
| Ac. esteárico            | 72.90**  | 99.92 | 16.41** | 22.52 | 4.20*   | 2.97  |
| Ac. oleico               | 88.65**  | 362.9 | 4.85**  | 19.87 | 4.30**  | 8.80  |
| Ac. linoleico            | 88.12**  | 673.1 | 3.54**  | 27.03 | 7.16**  | 27.35 |
| Ac. linolénico           | 81.13**  | 194.2 | 5.94**  | 14.20 | 9.18**  | 10.99 |
| Índice de yodo           | 87.01**  | 269.1 | 4.85**  | 15.00 | 5.24**  | 8.10  |
| Material insaponificable | 17.86**  | 8.63  | 57.14** | 26.02 | 7.14    | 1.97  |
| Tocoferoles totales      | 76.74**  | 38.41 | 7.64    | 3.83  | 6.62    | 1.66  |
| Estabilidad oxidativa    | 67.11**  | 20.91 | 13.76*  | 4.31  | 4.69    | 0.75  |

Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

Tabla 4: Valores promedio (campañas de producción 2004, 2005 y 2006) del contenido de aceite, características químicas y composición de ácidos grasos y tocoferoles de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca.

| Parámetro                           | Variedades                |                           |                           |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                     | Chandler                  | Criolla                   | Franquette                |
| Contenido de aceite (g/100 g pulpa) | 70.4 <sup>b</sup> ± 1.33  | 68.9 <sup>a</sup> ± 1.15  | 72.7 <sup>c</sup> ± 1.71  |
| Grado de acidez (% Ac oleico)       | 0.05 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.06 <sup>ab</sup> ± 0.01 | 0.06 <sup>b</sup> ± 0.01  |
| k <sub>232</sub>                    | 1.23 <sup>a</sup> ± 0.14  | 1.22 <sup>a</sup> ± 0.09  | 1.20 <sup>a</sup> ± 0.16  |
| k <sub>270</sub>                    | 0.09 <sup>b</sup> ± 0.01  | 0.09 <sup>b</sup> ± 0.01  | 0.07 <sup>a</sup> ± 0.01  |
| Ácidos grasos (%)                   |                           |                           |                           |
| <i>Palmítico</i>                    | 6.89 <sup>a</sup> ± 0.28  | 7.76 <sup>b</sup> ± 0.10  | 6.98 <sup>a</sup> ± 0.44  |
| <i>Esteárico</i>                    | 1.63 <sup>a</sup> ± 0.15  | 1.87 <sup>b</sup> ± 0.14  | 2.27 <sup>c</sup> ± 0.22  |
| <i>Oleico</i>                       | 16.6 <sup>a</sup> ± 1.22  | 20.1 <sup>b</sup> ± 2.14  | 28.3 <sup>c</sup> ± 2.08  |
| <i>Linoleico</i>                    | 57.0 <sup>b</sup> ± 0.63  | 57.0 <sup>b</sup> ± 0.81  | 50.1 <sup>a</sup> ± 1.95  |
| <i>Linolénico</i>                   | 17.9 <sup>b</sup> ± 0.91  | 13.3 <sup>a</sup> ± 1.79  | 12.3 <sup>a</sup> ± 0.76  |
| Índice de yodo                      | 167.2 <sup>c</sup> ± 1.94 | 157.9 <sup>b</sup> ± 4.06 | 150.1 <sup>a</sup> ± 2.10 |
| Tocoferoles (%)                     |                           |                           |                           |
| <i>α- tocoferol</i>                 | 2.36 <sup>a</sup> ± 2.72  | 1.52 <sup>a</sup> ± 2.61  | 2.79 <sup>a</sup> ± 2.44  |
| <i>γ- tocoferol</i>                 | 83.1 <sup>a</sup> ± 3.16  | 85.3 <sup>a</sup> ± 3.64  | 82.3 <sup>a</sup> ± 4.83  |
| <i>δ- tocoferol</i>                 | 14.5 <sup>a</sup> ± 0.94  | 13.2 <sup>a</sup> ± 1.25  | 14.9 <sup>a</sup> ± 2.57  |
| Tocoferoles totales (µg/g aceite)   | 333.7 <sup>b</sup> ± 10.2 | 370.6 <sup>c</sup> ± 14.0 | 313.4 <sup>a</sup> ± 17.6 |
| Carotenoides (µg/g aceite)          | 0.92 <sup>a</sup> ± 0.07  | 1.16 <sup>a</sup> ± 0.27  | 0.91 <sup>a</sup> ± 0.24  |
| Estabilidad oxidativa (horas)       | 2.34 <sup>a</sup> ± 0.19  | 3.07 <sup>b</sup> ± 0.24  | 3.03 <sup>b</sup> ± 0.32  |

Valores medios (n = 9) ± desvío estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.05) entre variedades.

En la tabla 5 se presenta la composición de la fracción insaponificable de los aceites. En conjunto, esta fracción constituyó entre 0.3 y 0.55 % del total del aceite, porcentajes que resultan bajos si se los compara con los encontrados en otros aceites vegetales (Padley et al., 1986). Los esteroides estuvieron representados por el β-sitosterol (85 – 92 % del total de esteroides), el campesterol (4.3 – 5.4 %) y el Δ<sup>5</sup>-avenasterol (2.8 – 9.5 %). No se detectó colesterol en ninguna de las muestras analizadas. La composición descrita coincide, en términos generales, con la informada por Tsamouris *et al.* (2002), Amaral *et al.* (2003) y Crews *et al.* (2005).

En relación a metil-esteroides y acoholes triterpénicos, los aceites estudiados en este trabajo presentaron cicloartenol (valores promedio 75 – 86 % del total de esta fracción),

cicloeucaleanol (7.5 – 10.7 %), 24-metilencicloartanol (6.5 – 14 %) y cantidades traza (< 0.3 %) de ciclolaudenol. No se encontraron datos publicados acerca de la presencia de estos compuestos en aceites de nuez. En estudios realizados en otros aceites vegetales, Itoh *et al.* (1974) y Gaydou *et al.* (1983) observaron que el cicloartenol y el 24-metilencicloartanol eran los componentes más abundantes de esta fracción.

Los hidrocarburos constituyeron una fracción minoritaria del material insaponificable. Esta fracción estuvo representada, en su mayor parte, por alcanos normales y una pequeña proporción de alcanos ramificados y alquenos (tabla 5). Entre los primeros, el tetradecano (6.7 – 13.9 % del total de hidrocarburos), el hexadecano (15.9 – 22.9 %), el octadecano (14.9 – 34.6 %) y el eicosano (11.4 – 18.4 %) fueron los componentes más abundantes. Estos resultados difieren de los informados McGill *et al.* (1993) en aceites de origen comercial, en los cuales predominan alcanos de mayor peso molecular y de número impar de átomos de carbono.

La fracción de compuestos volátiles estuvo representada por hidrocarburos y alcoholes de bajo peso molecular, aldehídos saturados e insaturados y derivados del furano (tabla 6). Algunos de los componentes determinados en este estudio han sido hallados en aceites de nuez de origen europeo (Caja *et al.*, 2000). Aunque con diferencias importantes entre variedades y campañas de producción, se destacaron, por su abundancia relativa, el n-pentano (8.9 – 31 % del total de compuestos volátiles), el hexanal (7.8 – 19.1 %) y el 2,4-decadienal (11.5 – 39.8 %). El origen de los mismos puede explicarse por medio de reacciones oxidativas y posterior descomposición de hidroperóxidos provenientes de los ácidos insaturados del aceite, en particular del ácido linoleico (figura 2) (Frankel, 2005).

Tabla 5: Contenido de material insaponificable (MI) y composición de esteroides, metil-esteroides e hidrocarburos de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.

| Parámetro               | Variedades  |             |             |             |             |             |             |             |             |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                         | Chandler    |             | Criolla     |             | Franquette  |             |             |             |             |
|                         | 2004        | 2005        | 2006        | 2004        | 2005        | 2006        |             |             |             |
| MI (g/100 g aceite)     | 0.39 ± 0.02 | 0.42 ± 0.01 | 0.32 ± 0.03 | 0.53 ± 0.02 | 0.55 ± 0.08 | 0.37 ± 0.04 | 0.53 ± 0.13 | 0.49 ± 0.04 | 0.28 ± 0.02 |
| Esteroides (%)          |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| Campesterol             | 5.34 ± 0.06 | 5.25 ± 0.02 | 4.84 ± 0.07 | 5.38 ± 0.26 | 5.11 ± 0.01 | 4.77 ± 0.04 | 5.17 ± 0.12 | 4.51 ± 0.11 | 4.33 ± 0.20 |
| $\beta$ -Sitosterol     | 91.6 ± 0.50 | 85.2 ± 0.32 | 86.5 ± 0.18 | 91.8 ± 0.12 | 87.5 ± 0.10 | 88.5 ± 1.24 | 91.5 ± 0.11 | 88.6 ± 0.17 | 89.8 ± 1.09 |
| $\Delta$ 5-Avenasterol  | 3.01 ± 0.57 | 9.54 ± 0.34 | 8.61 ± 0.11 | 2.84 ± 0.37 | 7.35 ± 0.12 | 6.71 ± 1.20 | 3.34 ± 0.24 | 6.87 ± 0.06 | 5.87 ± 1.28 |
| Metilesteroides (%)     |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| Cicloartenol            | 62.6 ± 0.93 | 78.6 ± 1.71 | 84.6 ± 0.15 | 80.7 ± 1.72 | 85.9 ± 0.63 | 91.2 ± 0.34 | 81.8 ± 0.09 | 84.1 ± 0.82 | 84.5 ± 0.21 |
| Cicloaudenol            | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |
| Cicloleucalenol         | 10.6 ± 0.40 | 10.7 ± 0.75 | 10.7 ± 0.23 | 8.10 ± 0.46 | 8.77 ± 0.47 | 5.58 ± 0.14 | 7.27 ± 0.23 | 7.59 ± 0.32 | 9.17 ± 0.13 |
| 24-Metilenciclobartanol | 26.8 ± 0.53 | 10.7 ± 0.97 | 4.64 ± 0.08 | 11.1 ± 2.18 | 5.29 ± 0.17 | 3.17 ± 0.20 | 10.9 ± 0.33 | 8.29 ± 0.51 | 6.30 ± 0.34 |
| Hidrocarburos (%)       |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
| Dodecano                | 1.0 ± 0.41  | 2.0 ± 0.01  | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |
| Tetradecano             | 13.8 ± 0.40 | 11.8 ± 0.23 | 13.3 ± 1.91 | 13.9 ± 1.10 | 6.70 ± 0.38 | 12.4 ± 0.39 | 8.03 ± 1.06 | 8.27 ± 0.23 | 12.3 ± 1.54 |
| Hexadecano              | 22.3 ± 0.43 | 20.9 ± 0.30 | 17.6 ± 0.25 | 22.9 ± 0.70 | 17.5 ± 1.07 | 18.3 ± 0.49 | 18.8 ± 2.69 | 20.3 ± 0.35 | 15.9 ± 0.07 |
| Octadecano              | 28.9 ± 0.24 | 23.0 ± 0.37 | 16.2 ± 0.01 | 21.9 ± 0.13 | 34.6 ± 1.30 | 14.9 ± 0.07 | 29.3 ± 5.02 | 24.5 ± 0.37 | 16.1 ± 0.26 |
| 1-Pentadeceno           | 2.51 ± 0.12 | 2.39 ± 0.01 | Tr          | 2.25 ± 0.04 | 0.10 ± 0.01 | Tr          | 1.84 ± 0.04 | 2.07 ± 0.04 | Tr          |
| 2,4-Dimetileicosano     | 0.89 ± 0.01 | 1.27 ± 0.38 | Tr          | 1.42 ± 0.03 | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |
| Eicosano                | 11.4 ± 0.10 | 13.1 ± 0.14 | 15.6 ± 0.10 | 14.7 ± 0.33 | 18.4 ± 0.26 | 15.9 ± 0.06 | 15.5 ± 0.23 | 15.6 ± 0.25 | 15.8 ± 0.10 |
| 1-Hexadeceno            | 1.39 ± 0.02 | 1.50 ± 0.02 | Tr          | 2.16 ± 0.09 | 0.10 ± 0.01 | Tr          | 0.97 ± 0.21 | 1.95 ± 0.95 | Tr          |
| 5-Metilheicosano        | 2.07 ± 0.04 | 1.90 ± 0.09 | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          | 0.10 ± 0.01 | Tr          |
| Docosano                | 7.0 ± 0.03  | 8.74 ± 0.13 | 13.9 ± 0.17 | 2.29 ± 0.09 | 5.37 ± 0.47 | 13.7 ± 0.63 | 10.1 ± 0.11 | 10.4 ± 0.16 | 14.5 ± 0.07 |
| Tetracosano             | 3.86 ± 0.08 | 5.44 ± 0.40 | 10.1 ± 0.01 | 7.38 ± 0.63 | 5.93 ± 0.68 | 10.1 ± 0.02 | 6.75 ± 0.27 | 6.94 ± 0.13 | 9.95 ± 0.12 |
| Hexacosano              | 2.39 ± 0.08 | 3.49 ± 0.08 | 6.69 ± 0.34 | 4.48 ± 0.41 | 3.36 ± 0.61 | 7.06 ± 0.27 | 4.0 ± 0.14  | 4.98 ± 0.56 | 7.88 ± 1.58 |
| 1-Docoseno              | 0.71 ± 0.02 | 1.37 ± 0.47 | Tr          | 1.40 ± 0.48 | 0.10 ± 0.01 | Tr          | 0.88 ± 0.04 | 0.10 ± 0.01 | Tr          |
| Octacosano              | 1.36 ± 0.04 | 2.07 ± 0.01 | 5.01 ± 1.01 | 2.90 ± 0.03 | 4.97 ± 0.12 | 4.65 ± 0.17 | 2.47 ± 0.06 | 2.91 ± 0.01 | 4.57 ± 0.09 |
| Triacontano             | 0.80 ± 0.06 | 1.34 ± 0.01 | 1.46 ± 2.06 | 2.0 ± 0.10  | 3.06 ± 0.18 | 2.90 ± 0.04 | 1.79 ± 0.32 | 1.94 ± 0.01 | 3.10 ± 0.15 |

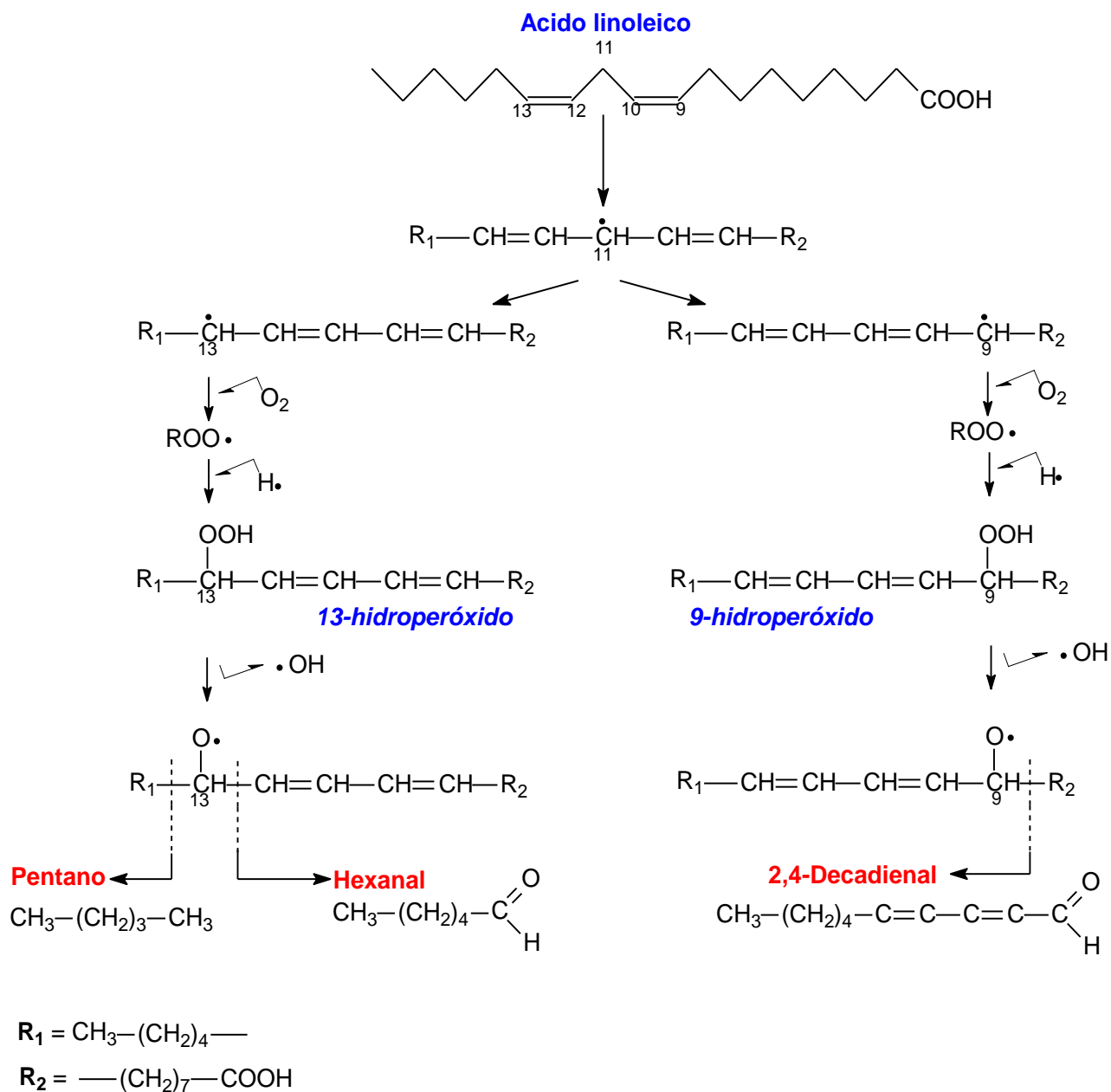
Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Tr: valores traza (< 0.3 %).

Tabla 6: Componentes volátiles (% áreas normalizadas) de los aceites de variedades de nuez producidas en Catamarca durante las campañas 2004, 2005 y 2006.

| Compuestos           | Variedades  |             |             |             |              |             |             |             |             |  |  |  |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|--|--|
|                      | Chandler    |             |             | Criolla     |              |             | Franquette  |             |             |  |  |  |
|                      | 2004        | 2005        | 2006        | 2004        | 2005         | 2006        | 2004        | 2005        | 2006        |  |  |  |
| <i>n</i> -Pentano    | 26.8 ± 0.02 | 14.6 ± 0.91 | 8.99 ± 1.40 | 13.6 ± 0.03 | 15.2 ± 0.02  | 10.7 ± 0.01 | 31.0 ± 0.01 | 11.3 ± 1.0  | 11.7 ± 0.84 |  |  |  |
| <i>n</i> -Octano     | 6.52 ± 0.03 | 0.14 ± 0.01 | Tr          | 0.15 ± 0.01 | Tr           | Tr          | 9.22 ± 0.03 | 0.23 ± 0.05 | Tr          |  |  |  |
| <i>n</i> -Nonano     | Tr          | Tr          | Tr          | 0.59 ± 0.01 | Tr           | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |  |  |  |
| <i>E</i> tanol       | 6.83 ± 0.03 | 0.12 ± 0.03 | Tr          | 3.26 ± 0.01 | Tr           | Tr          | 0.16 ± 0.01 | 0.21 ± 0.05 | Tr          |  |  |  |
| <i>C</i> iclobutanol | 0.16 ± 0.01 | 0.14 ± 0.01 | Tr          | 3.42 ± 0.01 | Tr           | Tr          | 0.15 ± 0.01 | 1.43 ± 0.01 | Tr          |  |  |  |
| 1-Pentanol           | Tr          | 1.15 ± 0.43 | Tr          | 1.31 ± 0.01 | 1.91 ± 0.05  | Tr          | Tr          | 0.45 ± 0.26 | Tr          |  |  |  |
| 1-Hexanol            | Tr          | Tr          | Tr          | 0.88 ± 0.01 | Tr           | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |  |  |  |
| 1-Heptanol           | Tr          | Tr          | Tr          | 2.03 ± 0.05 | Tr           | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |  |  |  |
| 1-Octanol            | Tr          | Tr          | Tr          | 1.74 ± 0.06 | Tr           | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |  |  |  |
| <i>B</i> utanol      | 0.16 ± 0.01 | 2.86 ± 0.05 | 2.87 ± 4.06 | 0.15 ± 0.01 | Tr           | 5.33 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 | 0.23 ± 0.05 | 6.19 ± 2.02 |  |  |  |
| <i>P</i> entanal     | 8.53 ± 0.02 | 4.11 ± 1.74 | 4.27 ± 0.26 | 9.37 ± 0.03 | 5.57 ± 0.001 | 5.85 ± 0.01 | 13.3 ± 0.01 | 4.06 ± 0.68 | 4.13 ± 1.68 |  |  |  |
| <i>H</i> exanal      | 8.89 ± 0.01 | 17.8 ± 1.37 | 18.8 ± 2.87 | 10.4 ± 0.03 | 16.4 ± 0.02  | 17.7 ± 0.02 | 7.80 ± 0.06 | 19.1 ± 0.35 | 17.8 ± 1.10 |  |  |  |
| 2-Hexenal            | 0.14 ± 0.01 | 0.14 ± 0.01 | Tr          | 0.15 ± 0.01 | Tr           | Tr          | 0.18 ± 0.01 | 0.22 ± 0.05 | Tr          |  |  |  |
| <i>H</i> eptanal     | 5.82 ± 0.05 | 0.14 ± 0.01 | 0.05 ± 0.07 | 6.97 ± 0.01 | Tr           | 1.44 ± 0.01 | 0.14 ± 0.01 | 0.23 ± 0.05 | 1.87 ± 0.27 |  |  |  |
| 2-Heptenal           | 0.16 ± 0.01 | 5.44 ± 1.28 | 5.56 ± 0.87 | 0.15 ± 0.01 | 7.18 ± 0.03  | 5.62 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 | 6.25 ± 0.53 | 5.19 ± 0.25 |  |  |  |
| 2,4-Heptadienal      | Tr          | 0.14 ± 0.01 | 3.89 ± 5.36 | 1.37 ± 0.01 | Tr           | 5.23 ± 0.02 | Tr          | 1.88 ± 0.29 | 8.85 ± 0.22 |  |  |  |
| <i>O</i> ctanal      | 7.23 ± 0.03 | 0.14 ± 0.01 | Tr          | 8.62 ± 0.01 | Tr           | Tr          | 0.16 ± 0.01 | 0.23 ± 0.05 | Tr          |  |  |  |
| 2-Octenal            | 0.15 ± 0.01 | 3.72 ± 0.15 | 4.07 ± 1.33 | 0.15 ± 0.01 | 3.25 ± 0.03  | 3.39 ± 0.01 | 0.15 ± 0.01 | 2.26 ± 0.82 | 2.91 ± 0.18 |  |  |  |
| <i>N</i> onanal      | 9.59 ± 0.01 | 3.12 ± 0.03 | 3.86 ± 2.16 | 9.80 ± 0.02 | 2.39 ± 0.04  | 3.28 ± 0.02 | 11.5 ± 0.02 | 4.07 ± 0.67 | 2.85 ± 0.17 |  |  |  |
| 2-Nonenal            | Tr          | 3.41 ± 0.05 | Tr          | 2.12 ± 0.05 | 3.37 ± 0.03  | Tr          | Tr          | 3.91 ± 0.26 | 0.48 ± 0.68 |  |  |  |
| <i>D</i> ecanal      | Tr          | Tr          | Tr          | 1.02 ± 0.08 | Tr           | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |  |  |  |
| 2-Decenal            | 5.66 ± 0.05 | 0.14 ± 0.01 | 4.50 ± 2.05 | 9.22 ± 0.02 | Tr           | 3.52 ± 0.01 | 10.0 ± 0.03 | 0.20 ± 0.05 | 3.42 ± 1.07 |  |  |  |
| 2,4-Decadienal       | 13.1 ± 0.03 | 37.6 ± 0.26 | 36.7 ± 1.80 | 11.5 ± 0.03 | 39.8 ± 0.01  | 31.7 ± 0.02 | 15.7 ± 0.01 | 37.1 ± 0.76 | 29.1 ± 2.13 |  |  |  |
| 2-Undecenal          | 0.16 ± 0.01 | 2.47 ± 0.24 | 5.74 ± 2.82 | 0.15 ± 0.01 | 1.75 ± 0.05  | 4.79 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 | 3.98 ± 0.92 | 5.14 ± 1.97 |  |  |  |
| 2-Pentilfurano       | Tr          | 1.74 ± 0.11 | 0.76 ± 0.94 | 1.19 ± 0.07 | 1.45 ± 0.01  | 2.09 ± 0.02 | Tr          | 2.56 ± 0.25 | 0.10 ± 0.01 |  |  |  |
| 2-Octilfurano        | Tr          | Tr          | Tr          | 0.69 ± 0.09 | Tr           | Tr          | Tr          | Tr          | Tr          |  |  |  |

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Tr: valores traza (< 0.1 %).

Figura 2: Reacciones de auto-oxidación del ácido linoleico y formación de los principales compuestos volátiles en los aceites de nuez analizados.



Durante las campañas de producción 2007 y 2008 y a modo de complementar la caracterización llevada a cabo con los materiales producidos en la provincia de Catamarca, se analizaron muestras de frutos procedentes de variedades cultivadas en la localidad de Guanchín (provincia de La Rioja). En la tabla 7 se muestran las características pomológicas. La variedad Tulare presentó los frutos y pulpas de mayor tamaño (en promedio, el 83 % de los frutos se clasificaron como “Gigantes”). En las variedades Hartley, Chandler y Mayette se observó una gran proporción de frutos en la categoría “Grandes” (95.4, 95.3 y 82.5 %, respectivamente) pero las pulpas resultaron de menor tamaño a las de la variedad Tulare. Las variedades Franquette y Sorrento mostraron, en proporción, los frutos y pulpas de menor tamaño. En relación al color de la pulpa, y a semejanza de lo observado con los materiales de Catamarca, la variedad Chandler arrojó los mejores resultados: en promedio, el 90 % de las mismas se clasificaron como “extra claras”.

El rendimiento de aceite (tabla 8) se ubicó dentro de un rango de variación relativamente estrecho (69.7 – 73.4 g/100 g de pulpa). El genotipo fue la principal fuente de variabilidad para este carácter, aunque la campaña de producción y su interacción con la variedad también resultaron significativas (tabla 9). Los porcentajes promedio de aceite en las variedades Chandler y Franquette no mostraron diferencias significativas con los registrados en la provincia de Catamarca.

El grado de acidez y los coeficientes de extinción específica ( $k_{232}$  y  $k_{270}$ ) presentaron valores muy bajos, en coincidencia con los aceites obtenidos a partir de las variedades cultivadas en Catamarca. Se detectaron, además, bajos niveles de peróxidos (0.04 – 0.43 meq  $O_2$ /kg de aceite).

La composición de ácidos grasos respondió al patrón general para aceites de nuez: se detectaron elevados porcentajes de ácido linoleico (52.5 – 59.2 %), niveles intermedios de oleico (16.1 – 29.5 %) y linolénico (9.46 – 16.5 %) y bajos contenidos de ácidos saturados (palmítico 6.10 – 8.16 %, esteárico 0.94 – 2.18 %). Para todos los ácidos grasos mencionados, la mayor parte de la variabilidad fue debida al genotipo (tabla 9). Al igual que lo observado para los aceites procedentes de los frutos producidos en Catamarca, la variedad Chandler registró los mayores porcentajes promedio de ácidos poliinsaturados (linoleico 59.1 %, linolénico 16.5 %). Por su parte, las variedades Franquette, Mayette y Tulare presentaron las concentraciones promedio más elevadas de ácido oleico (23.2, 25.9 y 23.6 %, respectivamente). Los valores medio de los índices de yodo resultaron superiores a 150 en todas las variedades analizadas.



El contenido promedio de tocoferoles totales estuvo comprendido entre 268 (variedad Serr) y 367  $\mu\text{g/g}$  de aceite (variedad Sorrento). El genotipo dio cuenta de más del 90 % de la variabilidad total observada (tabla 9).

La determinación de la EO de los aceites analizados (tabla 8) ratificó la propensión de los mismos al deterioro termo-oxidativo. Se detectaron variaciones significativas debidas al genotipo, al año de producción y a la interacción entre ambos (tabla 9). Los aceites de la variedad Chandler resultaron los menos estables (valor promedio 2.5 horas), mientras que los de la variedad Mayette presentaron la EO más elevada (3.6 horas). El valor obtenido en la variedad Franquette (3.3 horas) fue similar al registrado para el aceite de esta variedad producida en Catamarca.

Entre las herramientas analíticas que permiten examinar la actividad antioxidante de los componentes de un aceite, la reacción con radicales libres estables, tales como ABTS y DPPH, esta siendo utilizada cada vez en mayor grado (Frankel, 2005; Ramadan y Moersel, 2006; Arranz *et al.*, 2008 a). El ensayo con DPPH cuantifica la capacidad inhibitoria de una sustancia o grupo de sustancias frente al radical sintético 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), utilizado como patrón. La capacidad inhibitoria de los aceites evaluados en este trabajo, se situó en el rango 587 – 782 mg aceite/mg DPPH. Estos valores, en su conjunto, resultaron inferiores a los publicados por Li *et al.* (2007) y Arranz *et al.* (2008 a) para aceites de nuez de diferentes orígenes. Se ha mencionado anteriormente la ausencia de ácidos fenólicos y polifenoles en los aceites analizados. Esto permitiría asumir que la capacidad inhibitoria de radicales libres en aceites de nuez es debida a la actividad antioxidante de los tocoferoles presentes en los mismos. La correlación negativa, altamente significativa ( $r = -0.90$ ,  $p \leq 0.01$ ), entre los valores de  $EC_{50}$  y las concentraciones de tocoferoles totales, y los resultados obtenidos en este sentido por otros investigadores (Espín *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2008 a, b), contribuyen a favor de tal hipótesis.

El análisis conjunto de los materiales producidos a partir de las variedades Chandler y Franquette cultivadas en las dos localidades (Belén y Guanchín), puso en evidencia la escasa influencia del ambiente sobre los principales parámetros de los frutos y aceites analizados (tabla 10). En consecuencia, y con el propósito de establecer relaciones entre los genotipos y algunos parámetros seleccionados, se realizó un análisis multivariado considerando la totalidad de las variedades estudiadas en ambos ambientes. Los resultados se muestran en gráficos de componentes principales (CP) (figura 3). Respecto a la CP1, las variedades Franquette, Mayette, Tulare y Serr, aparecieron asociadas con los contenidos más altos de ácido oleico y de aceite y mayor estabilidad oxidativa de este último. Por otra

parte, las variedades Chandler, Hartley, Sorrento y Criolla, se relacionaron con niveles elevados de ácidos poliinsaturados y contenidos más altos de tocoferoles totales. Respecto a CP2, las variedades Tulare y Serr, se vincularon con una mayor relación peso de pulpa/peso de fruto y con contenidos más altos de aceite. Por otro lado, las variedades Lara y Criolla, se encontraron ligadas a contenidos más altos de tocoferoles totales y niveles elevados de ácidos grasos saturados. La CP3 agrupó a las variedades Lara, Serr y Criolla, por su mayor relación peso de pulpa/peso de fruto y a diferencia del análisis realizado en la CP1 y CP2, relacionó a la variedad Serr con niveles elevados de ácidos grasos saturados junto a las variedades Lara y Criolla. Por último, el análisis multivariado discriminante, que podría ser de utilidad a los fines de seleccionar caracteres que permitan discriminar a las variedades estudiadas, no pudo ser aplicado a los datos analizados en este trabajo debido a que el número de muestras para cada variedad fue inferior al total de variables examinadas.

Tabla 7: Distribución porcentual de tamaños de fruto con cáscara (TF) y de pulpa (TP) y de pulpa (TP), color de la pulpa (CP) y relación peso pulpa/peso fruto (PP/PF) en variedades de nuez producidas en La Rioja durante las campañas 2007 y 2008.

| Parámetro          | Variedades  |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |      |  |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|--|
|                    | Chandler    |             | Franquette  |             | Hartley     |             | Lara        |             | Mayette     |             | Serr        |             | Sorrento    |             | Tulare      |      |  |
|                    | 2007        | 2008        | 2007        | 2008        | 2007        | 2008        | 2007        | 2008        | 2007        | 2008        | 2007        | 2008        | 2007        | 2008        | 2007        | 2008 |  |
| TF (mm)            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |      |  |
| <i>Gigantes</i>    | 4.50 ± 0.71 | -           | 0.50 ± 0.71 | 2.0 ± 2.83  | 7.15 ± 10.1 | 52.5 ± 0.66 | 56.8 ± 3.21 | 2.0 ± 2.83  | 16.5 ± 4.95 | 37.3 ± 3.80 | 70.6 ± 8.32 | -           | -           | 93.5 ± 3.56 | 73.0 ± 15.6 |      |  |
| <i>Grandes</i>     | 94.0 ± 2.83 | 96.5 ± 4.95 | 41.0 ± 4.24 | 61.0 ± 2.83 | 92.9 ± 10.1 | 47.5 ± 0.66 | 43.2 ± 3.21 | 82.0 ± 7.07 | 83.0 ± 4.24 | 62.3 ± 3.21 | 29.4 ± 8.32 | 15.5 ± 0.71 | 26.5 ± 9.19 | 6.52 ± 3.56 | 27.0 ± 15.6 |      |  |
| <i>Medianas</i>    | 1.50 ± 2.12 | 3.50 ± 4.95 | 42.0 ± 5.66 | 32.5 ± 4.95 | -           | -           | -           | 13.0 ± 7.07 | 0.50 ± 0.71 | 1.93 ± 2.72 | -           | 52.0 ± 4.24 | 65.5 ± 9.19 | -           | -           |      |  |
| <i>Chicas</i>      | -           | -           | 16.5 ± 2.12 | 6.0 ± 2.83  | -           | -           | -           | 3.0 ± 2.83  | -           | -           | -           | 29.0 ± 4.24 | 8.0 ± 0.0   | -           | -           |      |  |
| <i>Enanas</i>      | -           | -           | 0.50 ± 0.71 | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 3.50 ± 0.71 | -           | -           | -           |      |  |
| TP (mm)            |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |      |  |
| <i>Gigantes</i>    | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 2.59 ± 2.16 | -           |      |  |
| <i>Grandes</i>     | 0.50 ± 0.71 | 3.0 ± 1.41  | -           | -           | -           | 7.29 ± 7.37 | 9.10 ± 6.43 | -           | 0.50 ± 0.71 | -           | 11.8 ± 4.16 | -           | -           | 31.2 ± 27.9 | 20.5 ± 0.71 |      |  |
| <i>Medianas</i>    | 14.1 ± 4.07 | 10.5 ± 0.71 | 1.50 ± 0.71 | -           | 1.67 ± 2.35 | 24.5 ± 5.16 | 25.0 ± 3.21 | 7.0 ± 4.24  | 11.0 ± 1.41 | 1.04 ± 1.47 | 28.0 ± 2.08 | 1.52 ± 2.15 | -           | 29.9 ± 10.0 | 33.5 ± 7.78 |      |  |
| <i>Chicas</i>      | 65.2 ± 4.57 | 64.5 ± 2.12 | 10.0 ± 5.66 | 3.0 ± 1.41  | 19.0 ± 12.7 | 51.0 ± 10.3 | 54.5 ± 12.9 | 38.0 ± 18.4 | 53.5 ± 0.71 | 39.9 ± 3.40 | 52.9 ± 4.16 | 6.65 ± 0.62 | 16.5 ± 9.19 | 28.2 ± 12.7 | 40.0 ± 11.3 |      |  |
| <i>Enanas</i>      | 20.1 ± 1.21 | 22.0 ± 2.83 | 88.5 ± 4.95 | 97.0 ± 1.41 | 79.3 ± 10.4 | 17.2 ± 2.21 | 11.4 ± 3.22 | 55.0 ± 22.6 | 35.0 ± 1.41 | 59.1 ± 1.93 | 7.35 ± 6.24 | 91.8 ± 1.53 | 83.5 ± 9.19 | 8.17 ± 3.01 | 6.0 ± 2.83  |      |  |
| CP                 |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |      |  |
| <i>Extraclaro</i>  | 96.0 ± 2.79 | 84.0 ± 2.83 | 46.0 ± 4.24 | 71.5 ± 3.54 | 46.2 ± 3.10 | 17.2 ± 2.21 | 54.5 ± 6.43 | 67.5 ± 3.54 | 53.5 ± 10.6 | 50.0 ± 0.0  | 58.8 ± 8.32 | 23.3 ± 4.14 | 55.0 ± 9.90 | 46.0 ± 3.86 | 74.5 ± 9.19 |      |  |
| <i>Claro</i>       | 4.02 ± 2.80 | 15.5 ± 3.54 | 51.5 ± 3.54 | 28.5 ± 3.54 | 47.0 ± 7.11 | 80.7 ± 5.16 | 36.4 ± 0.0  | 29.0 ± 1.41 | 43.5 ± 12.0 | 48.0 ± 0.0  | 39.7 ± 6.24 | 68.5 ± 1.27 | 38.5 ± 12.0 | 49.6 ± 5.71 | 21.5 ± 6.36 |      |  |
| <i>Ambar claro</i> | -           | 0.50 ± 0.71 | 0.50 ± 0.71 | -           | 1.0 ± 1.41  | 2.09 ± 2.95 | 6.82 ± 3.21 | 3.50 ± 2.12 | 2.50 ± 0.71 | 2.0 ± 0.0   | 1.47 ± 2.08 | 6.63 ± 2.18 | 6.50 ± 2.12 | 2.98 ± 1.32 | 3.0 ± 4.24  |      |  |
| <i>Ambar</i>       | -           | -           | 2.0 ± 1.41  | -           | 5.84 ± 5.43 | -           | 2.28 ± 3.22 | -           | 0.50 ± 0.71 | -           | -           | 1.51 ± 0.69 | -           | 1.42 ± 0.53 | 1.0 ± 1.41  |      |  |
| PP/PF              | 0.49 ± 0.01 | 0.47 ± 0.01 | 0.38 ± 0.02 | 0.38 ± 0.0  | 0.41 ± 0.04 | 0.45 ± 0.01 | 0.43 ± 0.01 | 0.42 ± 0.0  | 0.34 ± 0.01 | 0.52 ± 0.01 | 0.55 ± 0.01 | 0.42 ± 0.01 | 0.44 ± 0.01 | 0.49 ± 0.01 | 0.50 ± 0.01 |      |  |

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar.

Tabla 8: Contenido de aceite, características químicas y composición de ácidos grasos de los aceites de variedades de nuez producidas en La Rioja durante las campañas 2007 y 2008.

| Parámetro                              | Variedades   |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|  | Chandler     |              | Franquette   |              | Hartley      |              | Lara         |              | Mayette      |              | Serr         |              | Sorrento     |              | Tulare       |              |
|  | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         | 2007         | 2008         |
| CA (g/100 g pulpa)                     | 72.5 ± 0.06  | 72.1 ± 0.54  | 72.0 ± 0.42  | 72.3 ± 0.43  | 71.4 ± 0.03  | 71.0 ± 0.04  | 71.2 ± 0.26  | 68.3 ± 0.02  | 73.2 ± 0.66  | 69.4 ± 1.80  | 72.8 ± 0.01  | 71.1 ± 0.17  | 73.9 ± 0.92  | 71.6 ± 0.11  | 73.6 ± 0.69  | 73.2 ± 0.02  |
| GA (% Ac oleico)                       | 0.05 ± 0.01  | 0.04 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01  | 0.03 ± 0.0   | 0.07 ± 0.01  | 0.07 ± 0.0   | 0.23 ± 0.01  | 0.39 ± 0.0   | 0.05 ± 0.01  | 0.05 ± 0.0   | 0.08 ± 0.0   | 0.04 ± 0.0   | 0.11 ± 0.03  | 0.57 ± 0.01  | 0.05 ± 0.01  | 0.04 ± 0.0   |
| IP (meq O <sub>2</sub> / kg aceite)    | 0.08 ± 0.001 | 0.08 ± 0.001 | 0.05 ± 0.01  | 0.10 ± 0.001 | 0.08 ± 0.001 | 0.10 ± 0.001 | 0.47 ± 0.001 | 0.39 ± 0.001 | 0.16 ± 0.001 | 0.06 ± 0.001 | 0.13 ± 0.01  | 0.10 ± 0.001 | 0.26 ± 0.06  | 0.10 ± 0.001 | 0.06 ± 0.001 | 0.02 ± 0.001 |
| k <sub>232</sub>                       | 1.10 ± 0.0   | 1.10 ± 0.01  | 1.06 ± 0.02  | 1.07 ± 0.01  | 1.15 ± 0.03  | 1.30 ± 0.01  | 1.05 ± 0.01  | 1.43 ± 0.01  | 1.05 ± 0.01  | 1.05 ± 0.03  | 1.09 ± 0.02  | 1.12 ± 0.01  | 1.21 ± 0.07  | 1.20 ± 0.0   | 1.04 ± 0.0   | 1.06 ± 0.0   |
| k <sub>270</sub>                       | 0.05 ± 0.0   | 0.07 ± 0.0   | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.0   | 0.07 ± 0.01  | 0.09 ± 0.01  | 0.06 ± 0.0   | 0.07 ± 0.0   | 0.06 ± 0.0   | 0.06 ± 0.01  | 0.05 ± 0.0   | 0.06 ± 0.0   | 0.07 ± 0.0   | 0.09 ± 0.01  | 0.06 ± 0.01  | 0.06 ± 0.0   |
| AG (%)                                 |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |
| <i>Palmitico</i>                       | 6.81 ± 0.10  | 6.18 ± 0.03  | 7.06 ± 0.19  | 7.06 ± 0.19  | 8.14 ± 0.06  | 6.80 ± 0.08  | 8.16 ± 0.28  | 6.94 ± 0.22  | 6.63 ± 0.02  | 6.55 ± 0.11  | 6.60 ± 0.08  | 6.73 ± 0.06  | 7.16 ± 0.42  | 7.57 ± 0.06  | 6.38 ± 0.08  | 6.10 ± 0.08  |
| <i>Estearico</i>                       | 1.66 ± 0.05  | 1.54 ± 0.01  | 1.89 ± 0.03  | 1.89 ± 0.03  | 0.94 ± 0.05  | 1.31 ± 0.04  | 1.63 ± 0.35  | 1.82 ± 0.04  | 1.77 ± 0.01  | 2.18 ± 0.07  | 1.80 ± 0.01  | 1.87 ± 0.02  | 1.71 ± 0.08  | 1.47 ± 0.06  | 2.17 ± 0.11  | 2.0 ± 0.02   |
| <i>Oleico</i>                          | 16.1 ± 0.01  | 16.5 ± 0.11  | 23.2 ± 0.18  | 23.2 ± 0.18  | 17.9 ± 0.22  | 16.7 ± 0.01  | 19.7 ± 0.01  | 24.9 ± 0.09  | 22.3 ± 0.06  | 29.5 ± 0.01  | 25.4 ± 0.15  | 20.4 ± 0.03  | 17.2 ± 0.02  | 19.1 ± 0.09  | 24.1 ± 0.11  | 23.0 ± 0.13  |
| <i>Linoleico</i>                       | 58.9 ± 0.03  | 59.2 ± 0.11  | 55.3 ± 0.48  | 55.3 ± 0.48  | 58.4 ± 0.95  | 59.2 ± 0.11  | 58.0 ± 0.09  | 56.9 ± 0.11  | 55.4 ± 0.29  | 51.9 ± 0.12  | 52.5 ± 0.51  | 56.3 ± 0.11  | 58.9 ± 0.06  | 59.3 ± 0.02  | 55.9 ± 0.06  | 56.9 ± 0.04  |
| <i>Linolénico</i>                      | 16.5 ± 0.19  | 16.5 ± 0.27  | 12.5 ± 0.45  | 12.5 ± 0.45  | 14.6 ± 1.10  | 16.0 ± 0.02  | 12.5 ± 0.01  | 9.46 ± 0.24  | 13.9 ± 0.38  | 9.88 ± 0.05  | 13.6 ± 0.71  | 14.7 ± 0.12  | 15.0 ± 0.43  | 12.6 ± 0.23  | 11.4 ± 0.19  | 12.0 ± 0.11  |
| IY                                     | 166.5 ± 0.46 | 167.5 ± 0.57 | 155.5 ± 0.20 | 155.5 ± 0.20 | 162.0 ± 1.07 | 166.2 ± 0.26 | 157.1 ± 0.13 | 151.5 ± 0.77 | 158.7 ± 0.47 | 147.7 ± 0.37 | 155.5 ± 0.90 | 160.7 ± 0.14 | 163.5 ± 1.26 | 159.2 ± 0.52 | 154.4 ± 0.31 | 156.7 ± 0.12 |
| TT (µg/g aceite)                       | 280 ± 0.22   | 294 ± 0.04   | 318 ± 0.13   | 299 ± 2.17   | 328 ± 1.24   | 353 ± 4.45   | 335 ± 1.42   | 356 ± 1.77   | 299 ± 5.37   | 302 ± 1.47   | 247 ± 1.10   | 289 ± 4.17   | 365 ± 13.2   | 369 ± 6.08   | 279 ± 1.24   | 275 ± 1.55   |
| EC <sub>50</sub> (mg aceite / mg DPPH) | 693 ± 10.7   | 722 ± 3.27   | 655 ± 8.45   | 690 ± 1.0    | 621 ± 19.9   | 617 ± 5.78   | 609 ± 9.72   | 637 ± 0.61   | 639 ± 1.23   | 712 ± 8.91   | 796 ± 7.79   | 768 ± 5.20   | 569 ± 8.67   | 605 ± 0.67   | 737 ± 4.76   | 762 ± 4.90   |
| EO (horas)                             | 2.64 ± 0.16  | 2.33 ± 0.30  | 3.39 ± 0.16  | 3.14 ± 0.13  | 3.13 ± 0.24  | 2.21 ± 0.01  | 2.87 ± 0.25  | 3.32 ± 0.02  | 3.40 ± 0.19  | 3.77 ± 0.33  | 3.04 ± 0.06  | 2.56 ± 0.16  | 3.02 ± 0.02  | 2.78 ± 0.01  | 3.44 ± 0.01  | 2.81 ± 0.06  |

Abreviaturas: CA, contenido de aceite; GA, grado de acidez; IP, índice de peróxidos; AG, ácidos grasos; IY, índice de yodo; TT, tocoferoles totales; EC<sub>50</sub>, actividad antioxidante; EO, estabilidad oxidativa. Valores medios (n = 3) ± desvío estándar.

Tabla 9: Análisis de la varianza (ANOVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en frutos y aceites de las variedades de nuez producidas en La Rioja durante las campañas 2007 y 2008.

| Parámetro             | Variedad | F     | Campaña | F     | V x C   | F     |
|-----------------------|----------|-------|---------|-------|---------|-------|
| Peso del fruto        | 91.85**  | 169.0 | 2.07**  | 26.71 | 4.84**  | 8.91  |
| Peso de la pulpa      | 90.69**  | 45.95 | 0.05    | 0.16  | 4.74    | 2.40  |
| Contenido de aceite   | 48.79**  | 13.91 | 23.72** | 47.35 | 19.48** | 5.55  |
| Ac. palmítico         | 61.25**  | 36.41 | 9.97**  | 41.62 | 24.89** | 14.82 |
| Ac. esteárico         | 80.39**  | 34.85 | 0.96    | 3.17  | 13.50** | 5.83  |
| Ac. oleico            | 75.17**  | 2232  | 1.48**  | 308.0 | 23.27** | 691.1 |
| Ac. linoleico         | 80.74**  | 166.4 | 0.22    | 3.24  | 17.92** | 36.95 |
| Ac. linolénico        | 73.18**  | 85.75 | 3.74**  | 30.69 | 21.13** | 24.77 |
| Índice de yodo        | 75.50**  | 286.0 | 0.88**  | 23.42 | 23.02** | 87.21 |
| Tocoferoles totales   | 90.68**  | 274.9 | 2.36**  | 49.99 | 6.20**  | 18.81 |
| Estabilidad oxidativa | 58.11**  | 17.56 | 8.45**  | 17.77 | 25.84** | 7.82  |

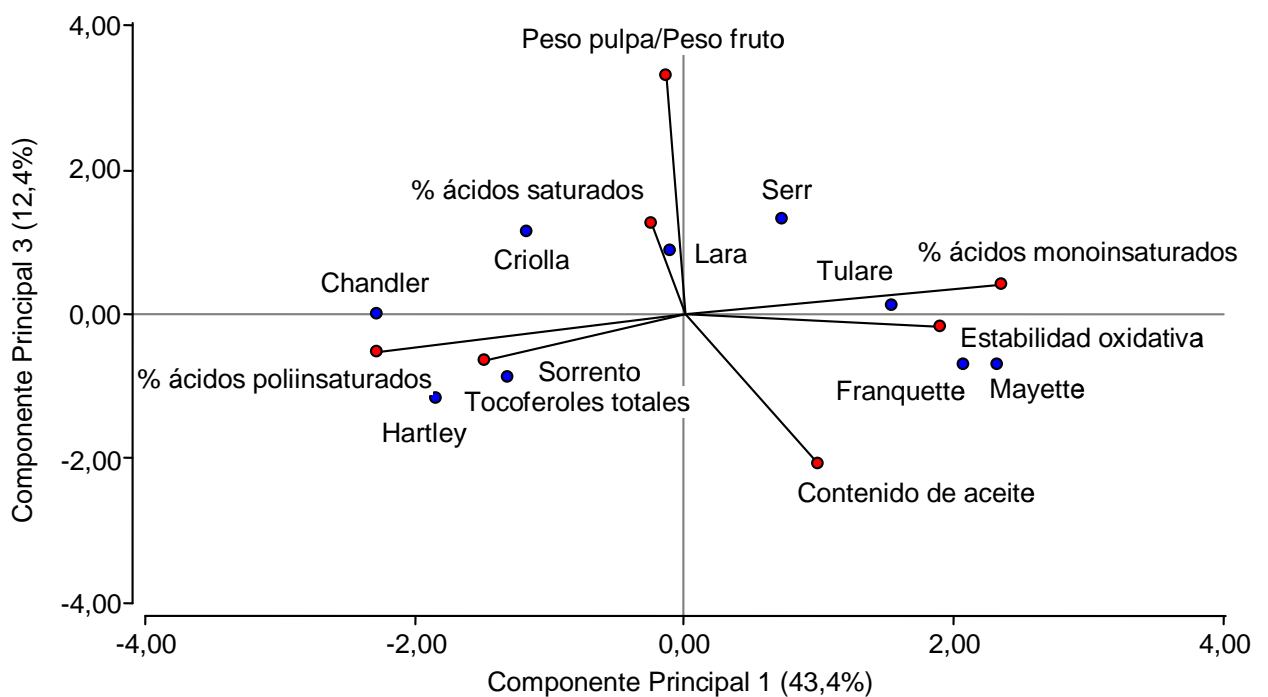
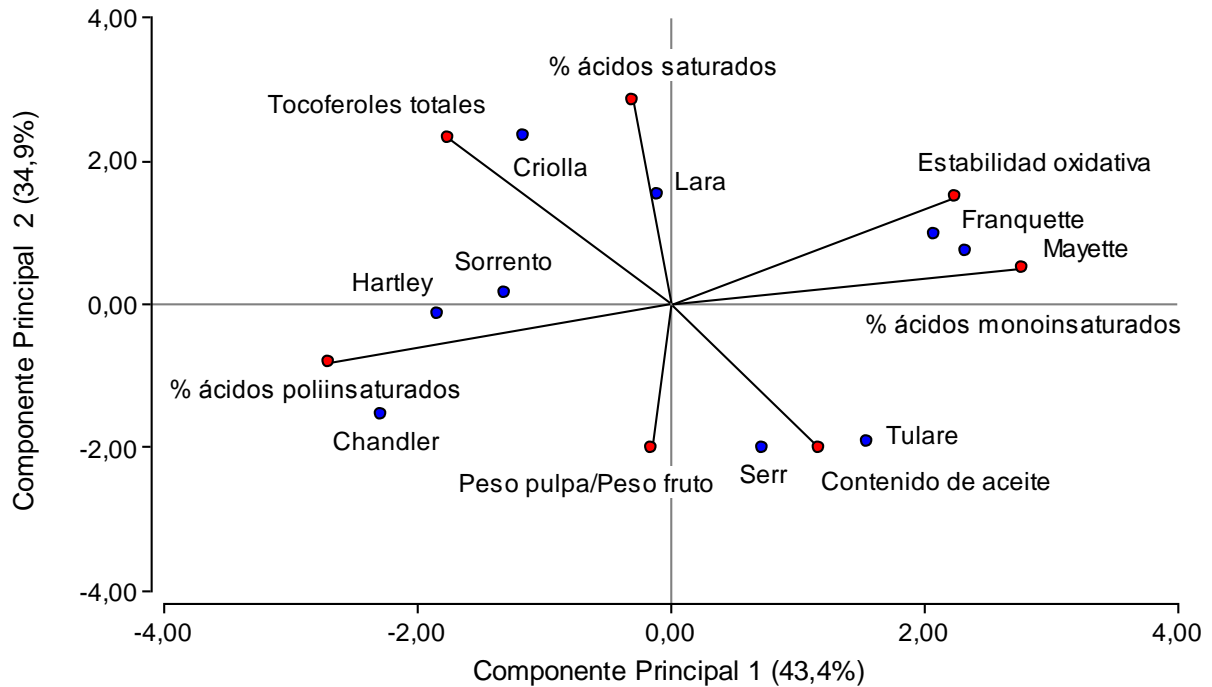
Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

Tabla 10: Análisis de la varianza (ANOVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en frutos y aceites de las variedades Chandler y Franquette cultivadas en las dos localidades (Belén y Guanchín).

| Parámetro             | Variedad | F      | Ambiente | F     | V x A   | F     |
|-----------------------|----------|--------|----------|-------|---------|-------|
| PP/PF                 | 64.59**  | 47.65  | 2.10     | 1.54  | 1.02    | 0.72  |
| Contenido de aceite   | 15.13*   | 4.85   | 4.39     | 1.41  | 11.90   | 3.81  |
| Ac. palmítico         | 16.12*   | 4.98   | 4.10     | 1.23  | 8.20    | 2.53  |
| Ac. esteárico         | 55.20**  | 46.33  | 10.86**  | 9.00  | 7.69*   | 6.57  |
| Ac. oleico            | 80.00**  | 223.71 | 6.67**   | 18.64 | 5.47**  | 15.29 |
| Ac. linoleico         | 55.90**  | 100.90 | 26.99**  | 48.71 | 4.93**  | 8.89  |
| Ac. linolénico        | 87.98**  | 235.17 | 1.41     | 3.77  | 2.37*   | 6.33  |
| Índice de yodo        | 88.34**  | 370.96 | 3.00**   | 12.62 | 3.41**  | 14.34 |
| Tocoferoles totales   | 40.23**  | 19.56  | 0.04     | 0.02  | 26.81** | 13.03 |
| Estabilidad oxidativa | 68.52**  | 41.38  | 4.76     | 2.83  | 0.26    | 0.18  |

Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

Figura 3: Análisis de componentes principales (ACP) para algunos parámetros seleccionados evaluados en frutos y aceites de las variedades de nuez producidas en Catamarca y La Rioja.



## CONCLUSIONES

Se evaluaron algunas características pomológicas y la composición de los aceites de las principales variedades de nuez cultivadas en Argentina. La mayor parte de los parámetros mostraron variaciones significativas entre las muestras analizadas. El genotipo (variedad) fue la principal fuente de variabilidad, siendo de menor importancia la influencia de la campaña de producción y del ambiente.

La variedad tuvo un efecto particularmente significativo sobre el tamaño del fruto, tamaño y color de la pulpa, composición de ácidos grasos, estabilidad oxidativa y contenido de aceite. En relación a este último, se realizó por primera vez una caracterización completa de las tres fracciones (saponificable, insaponificable y componentes volátiles) que lo constituyen.

El perfil de ácidos grasos se presentó altamente insaturado (índices de yodo superiores a 150). Este hecho, sumado a una concentración relativamente baja de tocoferoles y a la ausencia de otros compuestos fenólicos con potencialidad antioxidante, presentes en las semillas pero no extraídos con los aceites, contribuyó a la escasa estabilidad termo-oxidativa de estos últimos. No obstante, los parámetros indicadores de degradación hidrolítica (grado de acidez) y oxidativa (índice de peróxido, dienos y trienos conjugados) en los aceites frescos, mostraron valores extremadamente bajos en comparación con los de otros aceites vegetales crudos.

Los aceites estudiados presentaron un escaso contenido de fosfolípidos y de material insaponificable. La composición de esteroides respondió al patrón usual encontrado en numerosos aceites vegetales comestibles, siendo el  $\beta$ -sitosterol el componente mayoritario. Se determinó, además, la presencia de metil-esteroides, alcoholes triterpénicos e hidrocarburos no reportados hasta el momento en aceites de nuez.

Los compuestos volátiles más abundantes fueron hidrocarburos y aldehídos de bajo y medio peso molecular ( $C_5 - C_{11}$ ), posiblemente originados a partir de reacciones de oxidación de los ácidos grasos insaturados.

La caracterización llevada a cabo permitió ampliar el conocimiento de las variedades de nuez más utilizadas comercialmente en nuestro país y, al mismo tiempo, sentar bases científicas para la tipificación de sus frutos y aceites. Como resultado de estos estudios, se seleccionó a la variedad Franquette (poco atractiva para uso como confitura por su pulpa de pequeño tamaño, pero con alto contenido de

aceite y un perfil de ácidos grasos favorable en relación a la estabilidad) como materia prima para evaluar alternativas para la extracción y conservación del aceite.



# CAPITULO II

**Extracción del aceite de nuez**



## Extracción del aceite de nuez

### ANTECEDENTES

Uno de los principales objetivos para la producción del aceite de nuez radica en encontrar el método de extracción adecuado. Los rendimientos de extracción y la calidad del aceite obtenido son de suma importancia para determinar la viabilidad de su producción comercial.

La extracción por solvente, principalmente hexano, es uno de los métodos más tradicionales para la obtención de aceites de semillas oleaginosas. El principio de extracción por solvente es simple y se basa en el hecho de que un componente (solute) se distribuye entre dos fases según la relación de equilibrio determinada por la naturaleza del componente y las dos fases (Bockish, 1998). Para facilitar el proceso de extracción es necesario reducir el tamaño de la semilla o grano mediante el quebrado e inclusive el laminado (King, 1944; Karnofsky, 1949, 1986, 1987; Wingard, 1949; Myers, 1977; Patricelli *et al.*, 1979; Pramparo *et al.*, 2003). La aplicación de un tratamiento térmico antes o durante la extracción produce la rotura de la emulsión celular, reduce la viscosidad del aceite, facilitando su fluidez y desplazamiento y disminuye la tensión superficial del aceite, pero puede afectar negativamente la calidad química del mismo, incrementando los parámetros de oxidación. Patricelli *et al.* (1979) realizaron experiencias con girasol parcialmente descascarado en un sistema “batch”, estudiando la influencia de la granulometría, el contenido de humedad, la temperatura de extracción y la relación sólido-solvente. Estos autores determinaron que la etapa limitante es la difusiva y que la extracción aumenta cuando disminuye el tamaño de partícula y se incrementa la temperatura de extracción.

Crowe *et al.* (2002) realizaron extracciones de aceite de nuez utilizando distintos sistemas de solvente (cloruro de metileno, cloroformo/metanol y hexano) obteniendo rendimientos similares (69.8, 69.9 y 67.2 % p/p, respectivamente). Asimismo, no observaron diferencias estadísticamente significativas entre los aceites en la composición de ácidos grasos, grado de acidez, índice de peróxidos y el coeficiente de extinción específica,  $k_{232}$ .

En los últimos años, se ha intensificado el interés por la obtención de aceites a través de tecnologías de prensado. En el caso de la obtención de aceites vegetales no tradicionales, el prensado, tanto mediante prensa hidráulica como de tornillo, provee

un método sencillo para obtener aceites de pequeños lotes de semillas (Wiesenborn *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003). A pesar que los rendimientos en aceite obtenidos mediante esta tecnología son menores que en la extracción por solvente, resulta apropiado para materiales con alto contenido en aceite, requiere instalaciones menos costosas e implica operaciones más seguras y de menor riesgo para el ambiente. El principio de extracción por prensado se basa en que cada partícula retiene el aceite en su interior y el objetivo del prensado es lograr que el mismo salga del sistema hacia el exterior. El aceite, en la estructura celular, se encuentra dentro de pequeños orgánulos de forma esférica (esferosomas), rodeados por una fina membrana. La aplicación de una fuerza externa durante el prensado, produce una serie de alteraciones (deformaciones) tanto a nivel microscópico (células) como macroscópico. Se comprime cada partícula y se reacomoda en el conjunto. Las membranas que limitan a cada esferosoma se destruyen, al igual que las paredes celulares, permitiendo al aceite salir de la partícula y luego, a través del sistema macroscópico, hacia el exterior. Estos dos últimos efectos resultan de la deformación producida por la fuerza y la consecuente reducción del espacio físico disponible (Mattea, 1999).

El rendimiento en la extracción por prensa de tornillo depende de varios factores, entre ellos, el acondicionamiento del material, que consiste en una serie de operaciones como la limpieza, molienda, calentamiento, secado o humedecimiento hasta alcanzar el contenido de humedad óptimo (Fils, 2000; Singh *et al.*, 2002). La aplicación de un tratamiento térmico antes o durante el prensado generalmente mejora la extracción del aceite ya que influye sobre la viscosidad del fluido y la resistencia mecánica de las partículas (Ward, 1976). El efecto del contenido de humedad de la semilla en el momento del prensado ha sido ampliamente estudiado en una gran variedad de materiales (Singh y Bargale, 1990; Fils, 2000; Singh y Bargale, 2000; Wiesenborn, 2001; Singh *et al.*, 2002). El porcentaje de humedad resulta muy importante ya que no sólo aumenta la plasticidad del material sino también contribuye en el prensado por su acción lubricante. Sin embargo, altos contenidos de humedad pueden afectar negativamente la extracción o alterar la calidad química del aceite, por ejemplo mediante la hidrólisis de glicéridos y el consiguiente incremento de la acidez.

Singh y Bargale (2000), desarrollaron un expeller de dos etapas, en el cual analizaron la influencia de la humedad del material y de la temperatura de prensado sobre la cantidad de aceite extraído, relacionando estos parámetros con el tiempo de prensado y la energía consumida. En concordancia con Singh *et al.* (2002) y Zheng *et*

*al.* (2003), concluyeron que existe un porcentaje de humedad óptimo para lograr la máxima extracción de aceite. Asimismo, observaron que la energía consumida disminuye al aumentar el contenido de humedad, lo cual fue atribuido a una reducción del coeficiente de fricción por efecto de una mayor plasticidad del material.

Por otro lado, Oseni *et al.* (2002) compararon el rendimiento, la calidad del aceite y los costos de obtención del producto utilizando una prensa de tornillo helicoidal y una hidráulica en la extracción del aceite de palma. No observaron diferencias en la calidad de los aceites obtenidos y concluyeron que el empleo de la prensa de tornillo resulta más eficiente y económica.

En los últimos años, la extracción de aceites con solventes bajo condiciones supercríticas se ha propuesto como un método alternativo para reemplazar los métodos convencionales (prensado, extracción con solvente). Este método asegura la ausencia de trazas de solvente en el aceite extraído y puede preservar de manera más eficiente las cualidades químicas y organolépticas del mismo (Herrero *et al.*, 2006; Zaidul *et al.*, 2006, 2007 a b c; Norulaini *et al.*, 2009).

Dentro de los solventes utilizados en este método extractivo se pueden mencionar al etileno, dióxido de carbono, etano, propano, n-hexano, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, agua, entre otros (Brunner, 1994). El dióxido de carbono es el fluido supercrítico más comúnmente utilizado para la extracción de productos alimenticios (Brunner, 2005) ya que presenta una serie de ventajas: es de bajo costo, se comercializa en un grado de alta pureza, no contamina al ambiente, no es tóxico ni inflamable, es fácilmente removible del producto de interés (a través de una simple despresurización una vez finalizada la extracción) y resulta ideal para extraer compuestos termo-sensibles (su temperatura y presión crítica son 31.1 °C y 73.8 bar, respectivamente). Además, el dióxido de carbono en estado supercrítico (SC - CO<sub>2</sub>) presenta alta densidad y baja viscosidad, lo cual aumenta su capacidad para solubilizar compuestos y permite una mejor penetración hacia el interior de los sólidos. La manipulación de la temperatura y presión por encima del punto crítico modifica las propiedades del fluido y mejora su habilidad para penetrar en las estructuras y extraer determinadas moléculas de diferentes tipos de materiales (Dunford *et al.*, 2003; Boutin *et al.*, 2009). El principio de extracción se basa en que el fluido es llevado a un estado supercrítico específico para extraer un soluto determinado: el material a extraer es expuesto al fluido bajo condiciones de tiempo, temperatura y presión controladas, lo que permite la disolución de los solutos de interés en el fluido supercrítico. El soluto

disuelto es separado posteriormente del fluido supercrítico mediante la disminución de la presión de la solución (Nielsen, 1998).

La utilización de SC – CO<sub>2</sub> para la extracción de aceites ha sido estudiada en almendras (Marrone *et al.*, 1998), maní (Goordrum y Kilgo, 1987), avellana y pistacho (Palazoglu y Balaban, 1998; Ozkal *et al.*, 2005) y nuez (Oliveira *et al.*, 2002; Crowe y White, 2003). En este tipo de semillas, con alto contenido de aceite, la extracción del mismo se encuentra limitada por la solubilidad en el SC – CO<sub>2</sub> (Catchpole *et al.*, 2009). Para semillas con alto contenido lipídico, se puede utilizar el prensado como pre-tratamiento con el objeto de reducir el contenido de aceite (Esquivel *et al.*, 1999; Eggers *et al.*, 2000) y, a su vez, romper estructuras celulares y facilitar el flujo de solvente a través del lecho (Williams, 1997; del Valle *et al.*, 2003), lo que mejora la velocidad y el rendimiento del proceso extractivo. La combinación del prensado seguida de extracción con SC – CO<sub>2</sub> ha sido realizada a escala experimental (Martínez y Vance, 2008) y comercial (Catchpole *et al.*, 2009). A una presión de 300 bar se ha observado una importante reducción en la cantidad de dióxido de carbono requerido para extraer el aceite residual de la torta obtenida del prensado, y a presiones superiores la extracción es rápidamente completada (Catchpole *et al.*, 2009).

En este capítulo se pretende analizar alternativas tecnológicas para la obtención del aceite de nuez.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Analizar algunos parámetros relativos a la extracción del aceite de nuez con hexano y evaluar su composición química.
- 2) Evaluar diferentes condiciones de extracción del aceite mediante prensa de tornillo helicoidal escala piloto y analizar su influencia sobre el rendimiento y la calidad química y sensorial de los aceites obtenidos.
- 3) Examinar la utilización de CO<sub>2</sub> en estado supercrítico para la extracción del aceite del residuo proveniente del prensado.
- 4) Realizar experiencias de extracción del aceite mediante prensa de tornillo helicoidal escala industrial.
- 5) Valorar y comparar los principales parámetros de composición química de los aceites obtenidos mediante las metodologías enunciadas anteriormente.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Objetivo específico 1**

#### **Material vegetal**

Se trabajó con semillas (pulpa) de la variedad Franquette, con un contenido de humedad del 2.32 % (p/p) y un contenido total de aceite (Soxhlet, base seca), del 72.4 % (p/p).

#### **Elección de tamaño de partícula**

Las semillas fueron trituradas en un molino de rodillos de acero inoxidable, de apertura regulable. La separación de tamaños de partícula se realizó mediante una serie de tamices de apertura de malla comprendidos entre 0.5 y 5 mm, los que se sometieron a vibración continua durante 20 min. Con esta metodología se obtuvieron tres rangos de tamaños de partículas: 0.5 – 1 mm, 1 – 3 mm y 3 – 5 mm.

El solvente empleado fue n-hexano (grado analítico, CAS N°: 110–54–3, valoración: mínimo 96 %, punto de ebullición: 69 °C).

En erlenmeyers de 250 ml de capacidad, se pesaron 20 g de material de cada una de las granulometrías y se agregaron 100 ml de hexano (relación 1:5, p/v) a cada muestra. El ensayo se llevó a cabo bajo dos condiciones: con agitación cada 1 hora y sin agitación. El tiempo de contacto total fue de 24 h y la temperatura se mantuvo constante a 25 °C. Las muestras se filtraron mediante aplicación de vacío. La evaporación del solvente se llevó a cabo en un evaporador rotatorio. Se determinó la relación g de aceite/ml de solución lixiviada.

#### **Determinación de las condiciones de equilibrio a 25 y 50 °C**

En recipientes de vidrio transparente, se pesaron 5 g de material de granulometría 0.5 – 1 mm. Posteriormente, se agregó la cantidad de hexano necesaria para alcanzar las siguientes relaciones sólido: solvente: 1:5, 1:6, 1:8, 1:10 y 1:12 (p/v). Los recipientes se cerraron herméticamente y se colocaron en un baño termostático. La temperatura (25 ó 50 °C) se mantuvo constante durante 24 h. Las muestras se filtraron mediante aplicación de vacío. Una parte del sólido lixiviado se pesó en un recipiente herméticamente cerrado y se determinó el contenido de disolvente (A), sólido inerte (B) y soluto (C). El sólido lixiviado (A + B + C) se dejó en reposo para permitir la evaporación del disolvente y se pesó nuevamente. Por último, se realizó

una extracción con aparato de Soxhlet (según metodología descrita en el Capítulo I), para determinar C (aceite retenido en el sólido + aceite que formaba parte de la miscela que rodeaba la partícula). A la solución lixiviada se le determinó el volumen recuperado, la densidad y el contenido de aceite (g de aceite/ml de solución lixiviada). Con los datos de densidad se calcularon las relaciones C/A y C/B.

La composición del soluto en los sistemas analizados se expresó como fracciones peso en base libre de B: X = fracción peso de C en la solución lixiviada (A + C); Y = fracción peso de C en el sólido lixiviado. El valor de Y incluye el soluto que está disuelto en la solución adherida (A + C) y el soluto no disuelto o adsorbido.

### **Elección de la cantidad óptima de solvente**

En erlenmeyers de 125 ml de capacidad, se pesaron 5 g de material de las siguientes granulometrías: 0.5 – 1 mm y 1 – 3 mm. Se trabajó con las siguientes relaciones sólido: solvente: 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 (p/v). Los sistemas se agitaron cada 1 hora. El tiempo de contacto total fue de 24 h y la temperatura se mantuvo constante a 25 °C.

### **Extracción continua**

En columnas de 3 cm de diámetro y 45 cm de altura se colocaron 68 y 63 g de material de las granulometrías 0.5 – 1 mm y 1 – 3 mm, respectivamente (70 % de la altura de la columna). El volumen de solvente necesario para llevar a cabo la extracción se calculó según la relación sólido: solvente 1:12 (p/v). Se determinó el caudal de entrada de solvente y el caudal de impregnación para cada una de las granulometrías ensayadas. Se tomaron muestras de la solución lixiviada a lo largo de toda la extracción. Para calcular el rendimiento de extracción, se determinó el contenido de aceite residual en el sólido lixiviado mediante extracción por Soxhlet (según metodología descrita en el capítulo I).

En función de los resultados obtenidos en este ensayo y con la finalidad de analizar el comportamiento del lecho de partículas de granulometría 0.5 – 1 mm, se llevó a cabo una extracción bajo las condiciones señaladas anteriormente, utilizando una columna de 4 cm de diámetro y 66 cm de altura que corresponde al tamaño de los tubos que conforman un lixivador escala piloto.

## **Objetivo específico 2**

### **Material vegetal, acondicionamiento y prensado**

Se trabajó con nueces de la variedad Franquette. Las semillas presentaron un contenido de aceite del 74 % (p/p) (Soxhlet, base seca) y humedad inicial del 4 % (p/p). Las mismas fueron molidas y tamizadas según se indicó en el objetivo específico 1 hasta alcanzar un tamaño de partícula comprendido entre 2.4 y 4.8 mm. Este tamaño se seleccionó en función de ensayos preliminares que permitieron determinar un rango de tamaño óptimo para la alimentación de la prensa. Para las operaciones de prensado se realizaron diferentes tratamientos teniendo en cuenta:

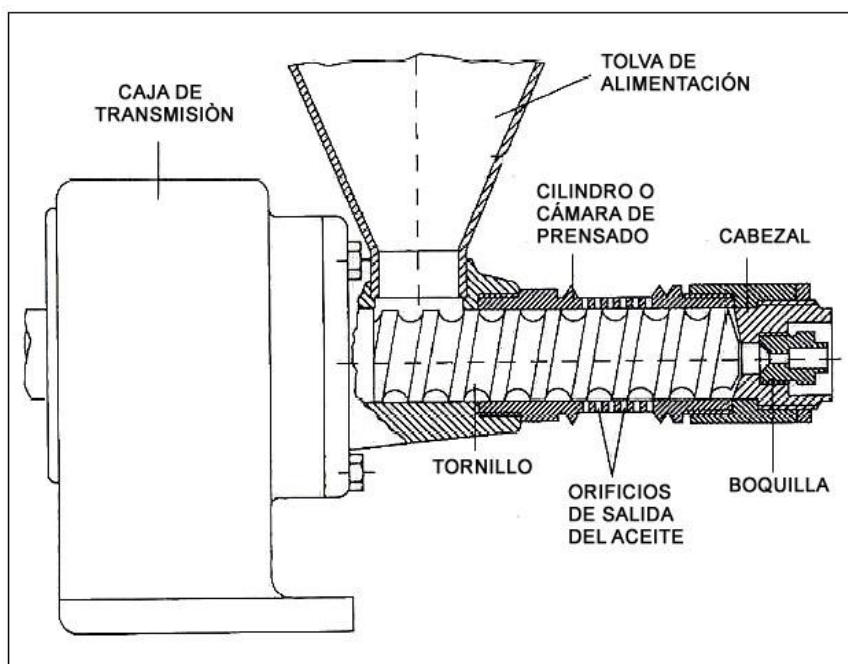
- Contenido de humedad: se ajustó mediante humidificación o secado del material en estufa de vacío. Se trabajó con tres niveles de humedad: 2.5 - 3, 4.5 - 5 y 7.5 %. La humidificación se llevó a cabo según la metodología propuesta por Singh y Bargale (2000). El agua se agregó a la muestra (material molido) mediante aspersion. Luego se colocó en un recipiente metálico con cierre hermético y se almacenó durante 48 h hasta alcanzar el equilibrio. El recipiente fue sometido a agitación, a intervalos regulares de tiempo, para asegurar una distribución uniforme de la humedad en el material. Para ajustar el contenido de humedad al 2.5 %, las muestras se colocaron en estufa de vacío a 25 °C. Antes de ingresar a la prensa, se determinó el contenido de humedad de cada muestra según metodología descrita en el capítulo I.
- Temperatura de prensado: se trabajó con tres temperaturas: 25, 50 y 70 °C. Las mismas se lograron ajustando la temperatura del material mediante calentamiento en estufa. La temperatura del barral se ajustó a cada una de las temperaturas de trabajo mediante una camisa termostatizada en forma de anillo que envolvía al mismo.

La extracción del aceite se llevó a cabo en una sola etapa en una prensa de tornillo helicoidal a escala piloto marca Komet (Modelo CA 59 G) (figura 4). Las muestras fueron suministradas a la prensa desde la tolva por gravedad según la demanda. La longitud, total y efectiva, y el diámetro interno del barral de la prensa fueron de 7 cm, 3 cm y 3.5 cm, respectivamente. La longitud y diámetro del tornillo fueron de 15 cm y 3 cm, respectivamente. Se utilizó una restricción de 5 mm y la velocidad de prensado fue de 20 rpm (la cual se estableció mediante ensayos preliminares). La prensa se encendió 15 min antes de cada extracción para que entre en régimen. Se controló la temperatura de salida de la torta o residuo de extracción con un termómetro digital colocado en el orificio de salida (reducción) de la prensa.



Cada ensayo (combinación contenido de humedad del material x temperatura de prensado) se realizó por triplicado. Los dispositivos de la prensa fueron lavados y secados en estufa luego de cada extracción.

Figura 4: Esquema de la prensa de tornillo helicoidal utilizada para la extracción del aceite.



#### Cantidad total de aceite extraído (% AE)

Se calculó en base al contenido inicial de aceite en el material de partida ( $X_i$ ) y al contenido de aceite residual en la torta ( $X_f$ ). Los mismos se determinaron según el método oficial AOCS Ba 3-38 (AOCS, 1998).

$$AE = \left[ \frac{x_i - x_f}{x_i} \right] \times 100$$

#### Cantidad de finos en el aceite (% F)

Los aceites obtenidos del prensado se centrifugaron a 11000 xg por 30 min. Los sólidos precipitados fueron recuperados, lavados con hexano, secados y pesados en balanza analítica (sensibilidad 0.1 mg). El porcentaje de finos en el aceite se calculó por diferencia de pesada.

## **Análisis sensorial**

Se realizó un análisis descriptivo del aceite de nuez obtenido a través del tratamiento que presentó el mayor porcentaje de aceite extraído. El mismo se llevó a cabo con un panel de 10 jueces entrenados (9 mujeres y 1 hombre). Todos los panelistas tenían 2 años de experiencia evaluando aceite de oliva y fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios: a) ausencia de alergias a algún tipo de alimento, b) no fumadores, c) edades comprendidas entre 18 y 64 años, d) consumidores de aceites vegetales no tradicionales como el aceite de oliva, e) disponibilidad para todas las sesiones, f) interés en participar y g) capacidad para comunicar verbalmente las observaciones sobre el producto. Los jueces fueron entrenados y calibrados en 24 sesiones de 2 horas cada una, durante 3 meses. Para el entrenamiento de los jueces se siguió la metodología descrita por Meilgaard *et al.* (1991) y Grosso y Resurrección (2002). Los atributos evaluados fueron: frutado, dulce, amargo, astringente, picante, rancio, pintura y oleoso. Todas las muestras fueron valoradas bajo condiciones de luz y temperatura controladas. En cada sesión y a cada panelista se le entregó un recipiente codificado con 3 dígitos de manera aleatoria, conteniendo 10 g de aceite. Para la puntuación de cada atributo se utilizó una escala de 10 cm (0 a 10).

Los atributos del aceite de nuez se evaluaron a lo largo de un ensayo de estabilidad bajo condiciones de luz y temperatura controladas (1100 Lux y 25 °C) simulando condiciones de almacenamiento utilizadas en el comercio.

### **Objetivo específico 3**

Se utilizó el residuo de extracción del prensado realizado a 50 °C y 7.5 % de humedad. El mismo (contenido de aceite, 17 % p/p, base seca; contenido de humedad, 7.9 % p/p) se molió y tamizó hasta alcanzar un tamaño de partícula comprendido entre 1.2 – 2.4 mm. Se realizaron extracciones con CO<sub>2</sub> (grado alimenticio) en estado supercrítico empleando una planta a escala piloto (volumen de la cámara, 2.3 l; volumen de la canasta o dispositivo de extracción, 1.5 l), con un sistema de separación en una sola etapa (volumen del separador, 0.5 l) y recirculación del solvente (figura 5).

Figura 5: Esquema de la planta de extracción supercrítica escala piloto.

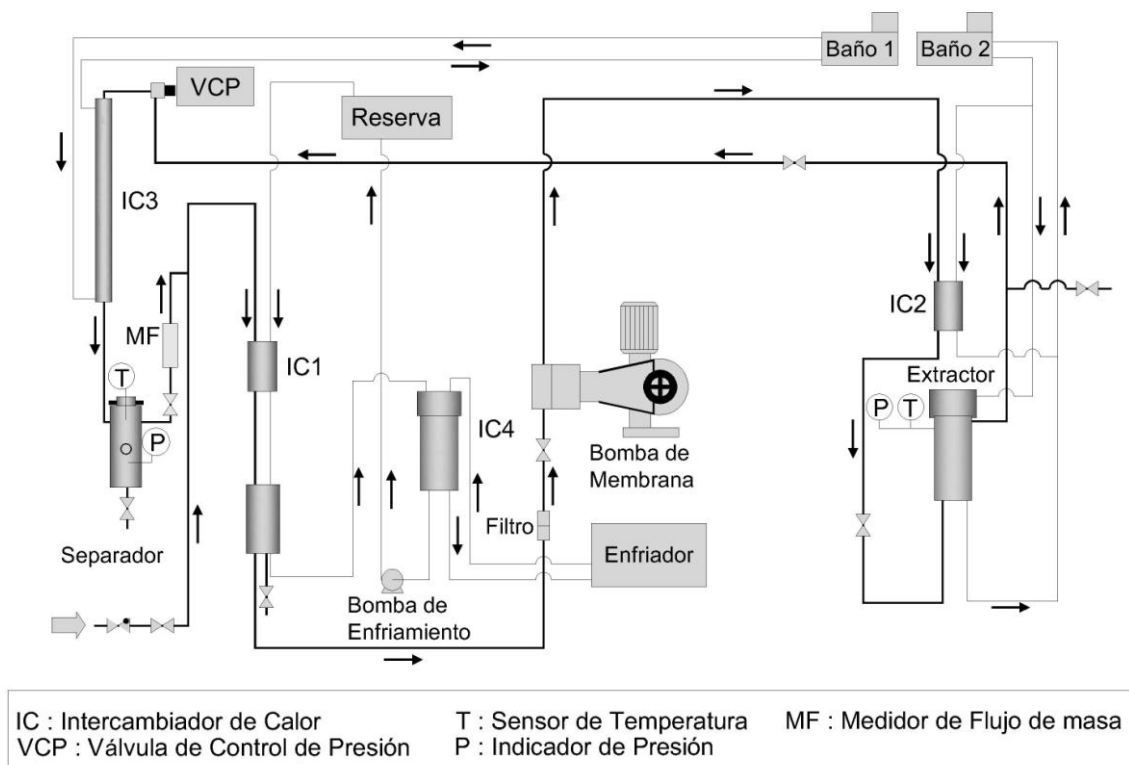


Diagrama del proceso: El CO<sub>2</sub> sale del cilindro contenedor que posee un sistema de sifón adjunto, pasa a través de un intercambiador de calor (IC1) y se almacena en un buffer termostatzado. Luego, el CO<sub>2</sub> subenfriado es comprimido mediante una bomba de membrana hasta alcanzar la presión de trabajo. Posteriormente, el CO<sub>2</sub> comprimido pasa a través de un intercambiador de calor (IC2) donde alcanza la temperatura de trabajo. En este punto, el CO<sub>2</sub>, en estado supercrítico (SC – CO<sub>2</sub>) entra al extractor. Una camisa termostatzada que cubre al extractor permite controlar la temperatura de extracción. La presión con la que salen del extractor el SC - CO<sub>2</sub> con la masa extraída disuelta, es reducida a través de una válvula controladora de la presión (VCP). En esta etapa, el CO<sub>2</sub> pasa a estado gaseoso y el extracto precipita. Luego de la VCP, un intercambiador de calor (IC3) provee la energía necesaria para compensar el enfriamiento producido por el efecto Joule-Thompson. Los extractos son recogidos en la parte inferior del separador (60 bar y 40 °C) y el solvente regresa al buffer pasando a través de un medidor de flujo de masa (MF).

Las extracciones se llevaron a cabo a dos presiones (200 y 400 bares) y dos temperaturas (50 y 70 °C) con un flujo másico de CO<sub>2</sub> de 10.5 kg/h. Para cada

tratamiento (presión x temperatura) se utilizaron 400 g de torta residual. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Los tratamientos se evaluaron en función de la cantidad total de aceite extraído (% AE) determinado según se determinó en el objetivo específico 2.

#### **Objetivo específico 4**

##### **Material vegetal y equipo de extracción**

El estudio se llevó a cabo con nueces (calidad comercial). Para cada extracción se utilizaron 10 kg de pulpa con un contenido de humedad del 4 % (p/p) y un contenido aceite del 73.9 % (p/p, base seca). Este material fue procesado en un molino quebrantador y posteriormente suministrado a la prensa por medio de un dispositivo dosificador.

La extracción del aceite se llevó a cabo en una sola etapa utilizando una prensa de tornillo helicoidal marca Komet (Modelo DD 85) escala industrial, con dos cabezales. La longitud, total y efectiva, y el diámetro interno del barril de la prensa fueron 14.7 cm, 6.8 cm y 5.6 cm, respectivamente, mientras que la longitud y el diámetro del tornillo fueron 20.2 cm y 5.56 cm, respectivamente. Se utilizaron dos tamaños de restricciones (8 y 10 mm) y dos tipos de ranuras del limitador de presión (estrellada y estándar, figura 6). La velocidad de prensado fue de 20 rpm.

Figura 6: Forma estándar y estrellada del limitador de presión.



Se realizaron ocho tratamientos (tabla 11) teniendo en cuenta la temperatura de extracción (25 y 50 °C), diámetro de boquilla (8 y 10 mm) y tipo de ranura del limitador de presión (estándar y estrellada). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 11: Tratamientos utilizados para la extracción a escala industrial, mediante prensa de tornillo helicoidal, del aceite de nuez.

| Tratamiento | Temperatura (°C) | Diámetro de boquilla (mm) | Ranura del limitador de presión |
|-------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|
| A           | 25               | 10                        | Estándar (1)                    |
| B           | 25               | 8                         | Estándar (1)                    |
| C           | 25               | 10                        | Estrellada (2)                  |
| D           | 25               | 8                         | Estrellada (2)                  |
| E           | 50               | 10                        | Estrellada (2)                  |
| F           | 50               | 8                         | Estrellada (2)                  |
| G           | 50               | 10                        | Estándar (1)                    |
| H           | 50               | 8                         | Estándar (1)                    |

El proceso de extracción se llevó a cabo según metodología descrita en el objetivo específico 2. De los extractos (aceite + sólidos) obtenidos en cada uno de los ensayos, se tomaron muestras de 250 ml, las que se almacenaron en envases de vidrio color ámbar, en atmósfera de nitrógeno y se congelaron (- 10 °C) hasta el momento de ser analizadas. La cantidad total de aceite extraído, aceite residual en la torta y finos en el aceite se determinaron de acuerdo a los procedimientos descritos en el objetivo específico 2.

### **Análisis químicos de los aceites extraídos**

Todos los aceites obtenidos de acuerdo a los objetivos específicos 1, 2, 3 y 4 del presente capítulo se evaluaron en su grado de acidez, índice de peróxidos, coeficientes de extinción específica ( $k_{232}$  y  $k_{270}$ ), contenido de tocoferoles totales y de pigmentos carotenoides, composición de ácidos grasos, color y estabilidad oxidativa, según metodologías descritas en el capítulo I.

### **Análisis estadístico**

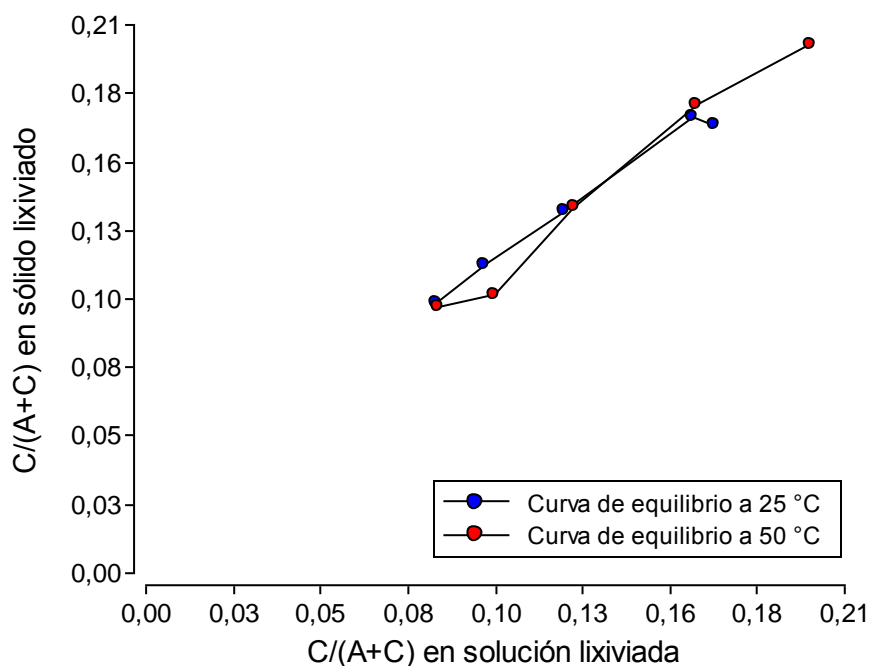
Se realizó análisis de la varianza (ANAVA). En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples (LSD). Para establecer correlaciones entre las variables analizadas se utilizó el test de correlación de Pearson.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Objetivo específico 1

Las curvas de equilibrio de extracción (figura 7) para las dos temperaturas consideradas (25 y 50 °C) presentaron las siguientes pendientes: 0.8525 ( $R^2 = 0.9891$ , 25 °C) y 0.9598 ( $R^2 = 0.982$ , 50 °C). En concordancia con los resultados hallados por Abraham *et al.* (1988) los valores de las pendientes de las curvas de equilibrio del hexano fueron cercanas a 1. Este comportamiento indica que el aceite es completamente soluble en hexano, por lo que la fuerza impulsora no es función de la concentración.

Figura 7: Curvas de equilibrio de extracción a 25 y 50 °C obtenidas con hexano y un tamaño de partícula comprendido entre 0.5 – 1 mm.



En relación al rendimiento de extracción (g de aceite/ml de solución lixiviada), las granulometrías 0.5 – 1 mm y 1 – 3 mm, resultaron ser las más convenientes. Se observó, además un aumento significativo del rendimiento en los tratamientos con agitación (tabla 12). A medida que disminuye el tamaño de partícula, aumenta el daño celular, lo que favorece, por un lado, la remoción del aceite de la superficie de la partícula (lavado) y, por otro, la difusión que es el factor limitante en una extracción con hexano (Osburn y Katz, 1944; Fan *et al.*, 1948; Patricelli *et al.*, 1979; Sasmaz, 1996).

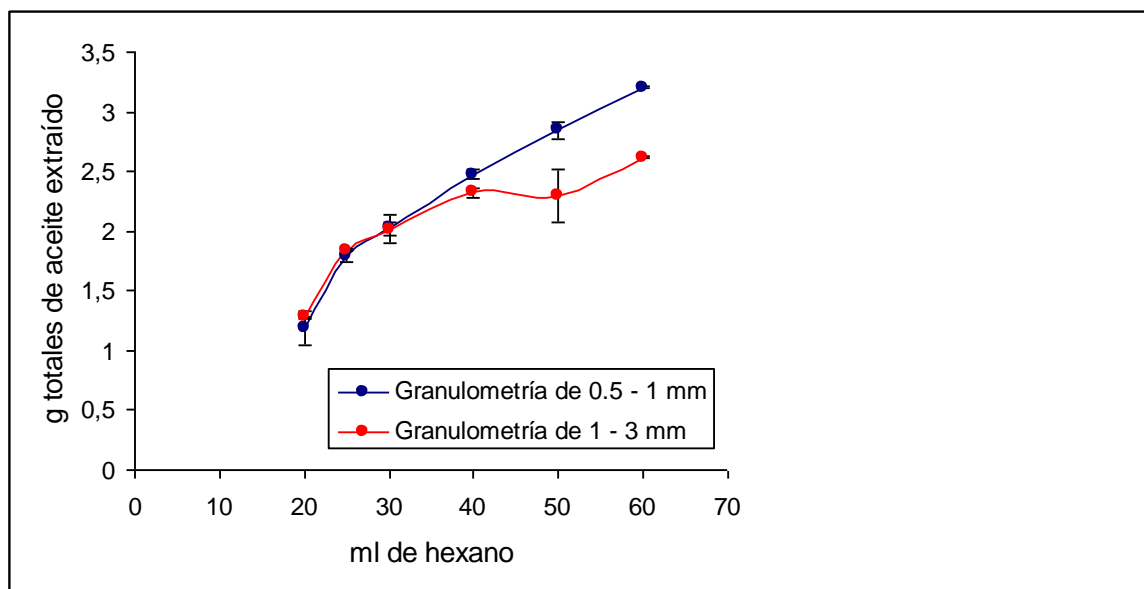
Tabla 12: Rendimientos de la extracción pasiva (25 °C).

| Granulometría (mm) | g de aceite/ml de solución lixiviada |                               |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
|                    | Con agitación                        | Sin agitación                 |
| 0.5 - 1            | 0.1393 <sup>CA</sup> ± 0.001         | 0.1189 <sup>bA</sup> ± 0.011  |
| 1 - 3              | 0.1274 <sup>bB</sup> ± 0.003         | 0.1053 <sup>abA</sup> ± 0.002 |
| 3 - 5              | 0.0968 <sup>aA</sup> ± 0.003         | 0.0887 <sup>aA</sup> ± 0.003  |

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios para cada granulometría seguidos por letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para un mismo tratamiento y valores medios para cada granulometría seguidos por letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

En cuanto a la cantidad óptima de solvente para lograr la máxima extracción de aceite, la relación sólido: solvente 1:12 (p/v) resultó ser la más conveniente (figura 8).

Figura 8: Evaluación de la cantidad óptima de solvente (extracción pasiva).



La tabla 13 muestra los parámetros considerados para la extracción continua del aceite y los rendimientos obtenidos. En las figuras 9 y 10 se presentan las curvas de extracción resultantes. Los mayores rendimientos de extracción (95.5 y 92 %) se obtuvieron con la granulometría de menor tamaño (0.5 – 1 mm). Mientras menor es el tamaño de partícula, mayor es el daño celular, por lo tanto aumenta la cantidad de

aceite disponible en la superficie del sólido. Como se observa en la figura 9, durante la primera etapa de extracción, la masa de aceite extraída está determinada por la solubilidad del aceite en el hexano, observándose una relación lineal, donde la pendiente corresponde a la solubilidad del aceite en hexano bajo esas condiciones. Luego de esa etapa, la velocidad de extracción esta gobernada por la difusión. El tiempo de permanencia del solvente en contacto con el sólido (tiempo de percolación) es mayor para el lecho formado por las partículas de menor tamaño, lo que conlleva a una lixiviación más completa.

En las extracciones llevadas a cabo con el material de menor granulometría se produce arrastre de sólidos a la solución lixiviada (2.3 g y 5.7 g totales para las columnas de menor y mayor tamaño, respectivamente). Este hecho, que resulta inevitable durante la operación extractiva, es minimizado posteriormente mediante una filtración de la miscela, previo a la desolventización.

Si bien en la tabla 14 se muestran las características químicas del aceite obtenido de la extracción continua a 50 °C, no se presentan los datos de la cinética de extracción debido a problemas operacionales derivados de la falta de hermeticidad de la columna y el bajo  $\Delta H$  de evaporación del hexano que ocasionó pérdidas importantes de masa de solvente.



Tabla 13: Parámetros considerados para la extracción continua del aceite y rendimientos obtenidos.

| <b>Extracción Continua</b>                     |             |             |             |
|--|-------------|-------------|-------------|
| <b>Características de la columna</b>           |             |             |             |
| Diámetro (cm)                                  | 3           | 4           |             |
| Altura (cm)                                    | 45          | 66          |             |
| <b>Características de la extracción</b>        |             |             |             |
| Granulometría del material (mm)                | 0.5 – 1     | 1 - 3       | 0.5 - 1     |
| Cantidad de material (g)                       | 68          | 63          | 302         |
| Volumen de solvente (ml)                       | 820         | 760         | 3630        |
| Altura inicial de sólido en la columna (cm)    | 31.5        | 31.5        | 48          |
| Caudal de impregnación (cm <sup>3</sup> /s)    | 0.62        | 2.32        | 6.05        |
| Caudal de hexano promedio (cm <sup>3</sup> /s) | 2.17        | 3.87        | 4.7         |
| Altura final de sólido en la columna (cm)      | 26          | 30.5        | 44          |
| Tiempo de extracción (min)                     | 20.3        | 8           | 21          |
| <b>Rendimientos</b>                            |             |             |             |
| Sólidos en la solución lixiviada (g)           | 2.34 ± 0.15 | 0           | 5.74 ± 0.36 |
| Aceite Extraído (%)                            | 95.5 ± 2.01 | 54.9 ± 1.60 | 92 ± 1.12   |
| Aceite Retenido (%)                            | 9.03 ± 0.56 | 41.3 ± 2.25 | 10 ± 0.77   |

Figura 9: Relación entre la masa de aceite total extraída sobre la masa de material inerte respecto al tiempo de extracción.

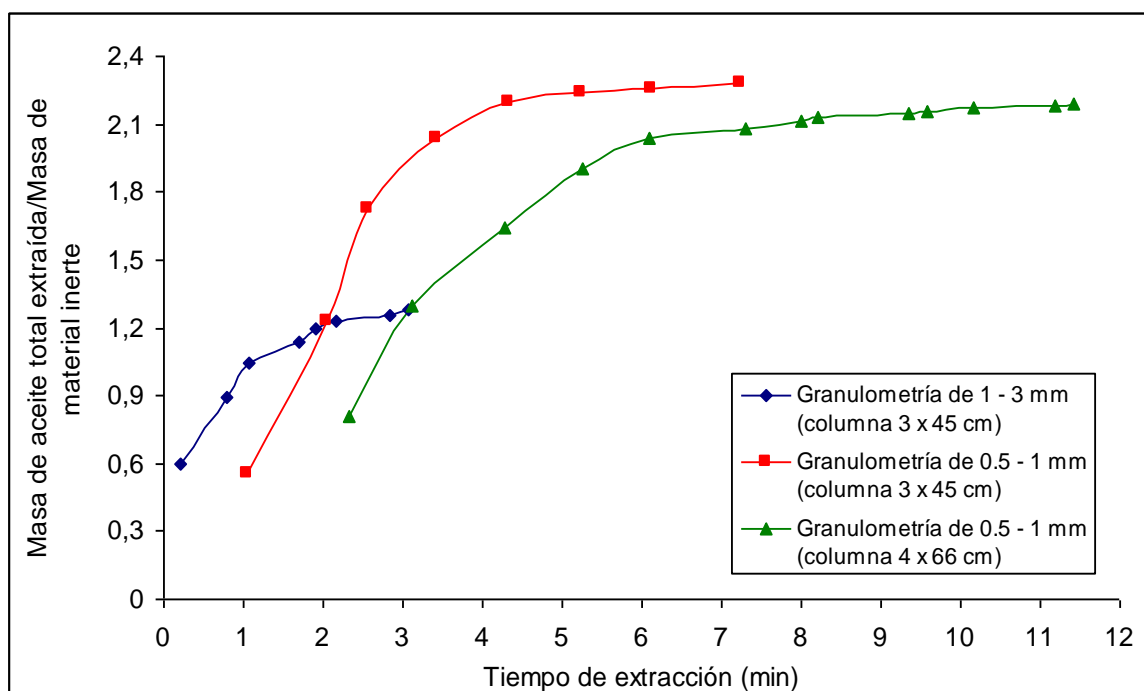
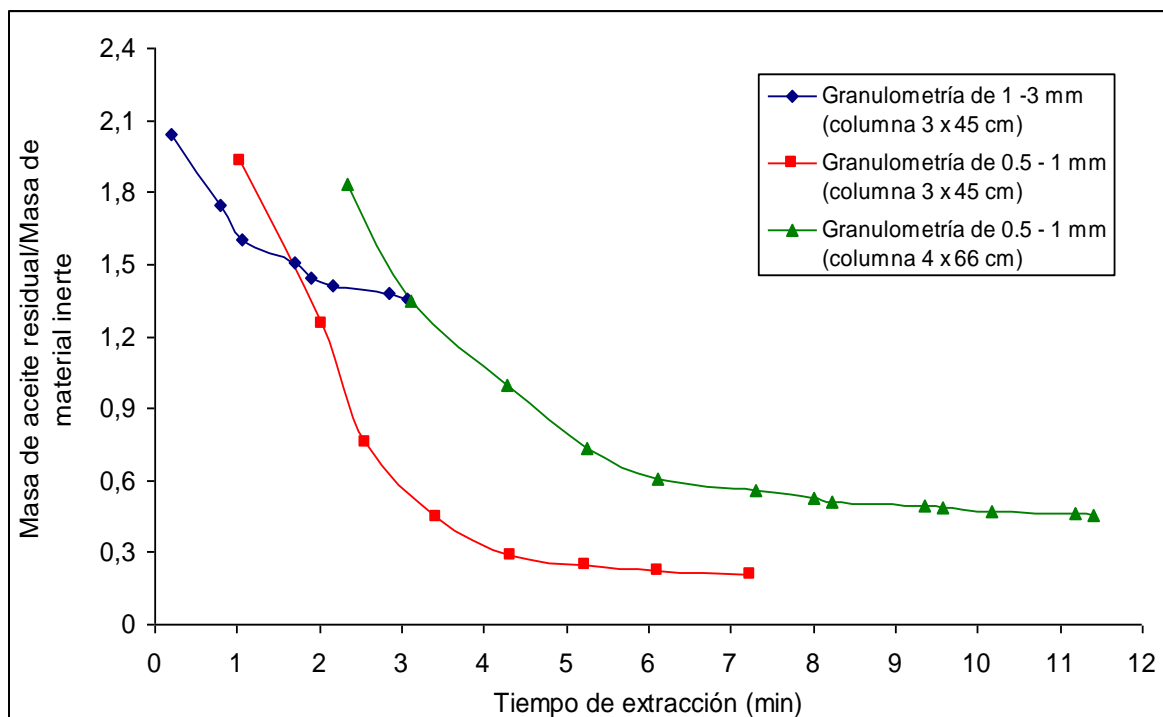


Figura 10: Relación entre la masa de aceite residual sobre la masa de material inerte respecto al tiempo de extracción.



Las diferentes condiciones de extracción analizadas no afectaron en mayor medida la composición de los aceites (tabla 14). No obstante, pudo observarse un incremento de la acidez y de contenido de pigmentos carotenoides al aumentar la temperatura de extracción. Los aceites obtenidos con hexano presentaron un mayor contenido de tocoferoles totales respecto a los obtenidos por prensado hidráulico, siendo esta diferencia aún mayor en los aceites resultantes de la extracción continua tanto a 25 como a 50 °C (23 y 29 % superior, respectivamente). Este resultado concuerda con la mayor estabilidad oxidativa que presentaron estos últimos. Se observaron diferencias menores entre los tratamientos en la composición de ácidos grasos, valores de dienos y trienos conjugados.

Tabla 14: Características químicas de los aceites obtenidos del ensayo de equilibrio (Pasivo) y extracción continua (Dinámico).

| Condición Extractiva<br>Parámetro | Equilibrio (Pasivo)        |                            | Continua (Dinámico)       |                           |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                   | 25 °C                      | 50 °C                      | 25 °C                     | 50 °C                     |
| GA                                | 0.08 <sup>aA</sup> ± 0.00  | 0.11 <sup>bB</sup> ± 0.01  | 0.08 <sup>aA</sup> ± 0.01 | 0.11 <sup>bB</sup> ± 0.01 |
| k <sub>232</sub>                  | 1.12 <sup>aA</sup> ± 0.01  | 1.13 <sup>aA</sup> ± 0.01  | 1.13 <sup>aA</sup> ± 0.00 | 1.13 <sup>aA</sup> ± 0.00 |
| k <sub>270</sub>                  | 0.07 <sup>aAB</sup> ± 0.00 | 0.07 <sup>aAB</sup> ± 0.00 | 0.06 <sup>aA</sup> ± 0.00 | 0.07 <sup>aB</sup> ± 0.00 |
| Color (R)                         | 1.35 <sup>aA</sup> ± 0.07  | 1.40 <sup>aA</sup> ± 0.14  | 1.15 <sup>aA</sup> ± 0.07 | 1.40 <sup>aA</sup> ± 0.14 |
| Color (A)                         | 40.0 <sup>bC</sup> ± 0.00  | 28.0 <sup>aB</sup> ± 0.00  | 20.5 <sup>aA</sup> ± 2.12 | 37.0 <sup>bC</sup> ± 4.24 |
| Ácidos grasos (%)                 |                            |                            |                           |                           |
| <i>Palmítico</i>                  | 7.48 <sup>aA</sup> ± 0.04  | 8.07 <sup>bB</sup> ± 0.15  | 7.41 <sup>aA</sup> ± 0.14 | 7.47 <sup>aA</sup> ± 0.05 |
| <i>Esteárico</i>                  | 2.63 <sup>aA</sup> ± 0.03  | 2.62 <sup>aA</sup> ± 0.11  | 2.57 <sup>aA</sup> ± 0.02 | 2.60 <sup>aA</sup> ± 0.01 |
| <i>Oleico</i>                     | 26.6 <sup>bB</sup> ± 0.10  | 22.2 <sup>aA</sup> ± 0.20  | 26.1 <sup>aB</sup> ± 0.55 | 26.1 <sup>aB</sup> ± 0.02 |
| <i>Linoleico</i>                  | 52.4 <sup>aA</sup> ± 0.08  | 53.7 <sup>bB</sup> ± 0.05  | 52.6 <sup>aA</sup> ± 0.45 | 52.6 <sup>aA</sup> ± 0.01 |
| <i>Linolénico</i>                 | 11.1 <sup>aA</sup> ± 0.02  | 13.1 <sup>aB</sup> ± 0.82  | 11.2 <sup>aA</sup> ± 0.26 | 11.2 <sup>aA</sup> ± 0.03 |
| TT                                | 359 <sup>aAB</sup> ± 45.5  | 330 <sup>aA</sup> ± 18.3   | 409 <sup>aBC</sup> ± 5.16 | 442 <sup>aC</sup> ± 16.7  |
| CC                                | 0.84 <sup>aA</sup> ± 0.01  | 1.46 <sup>bC</sup> ± 0.11  | 1.27 <sup>aB</sup> ± 0.05 | 2.17 <sup>bD</sup> ± 0.00 |
| EO                                | 3.09 <sup>bB</sup> ± 0.09  | 2.23 <sup>aA</sup> ± 0.15  | 3.51 <sup>aC</sup> ± 0.11 | 3.86 <sup>bD</sup> ± 0.01 |

Abreviaturas y unidades: GA, grado de acidez (% ácido oleico); color (R, rojo), (A, amarillo); ácidos grasos (% del total de ácidos grasos); TT, contenido de tocoferoles totales (µg/g de aceite); CC, contenido de pigmentos carotenoides (µg/g de aceite); EO, estabilidad oxidativa (horas).

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0.05) entre 25 y 50 °C bajo una misma condición de extracción; letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre tratamientos (pasivo y dinámico) para una misma temperatura.

## **Objetivo específico 2**

En la tabla 15 y figuras 11 y 12 se muestran los porcentajes de aceite extraído (% AE) en las diferentes condiciones de humedad y temperatura. El % AE se incrementó al aumentar el contenido de humedad de la semilla. El ANAVA a dos vías (tabla 16) indicó que la humedad del material fue la principal fuente de variabilidad para este parámetro. La influencia de la temperatura no fue significativa. Resultados similares fueron reportados por Singh y Bargale (1990 y 2000). Estos autores, trabajando en un rango de contenidos de humedad comprendido entre el 5 y 12 %, observaron máximos de extracción de aceite en materiales (semillas de lino y colza) con 7 - 7.5 % de humedad. Más aún, Li *et al.* (1999) demostraron que la aplicación de tratamientos térmicos y de humidificación previo al prensado provoca una expansión y ruptura de las estructuras celulares e incrementa la plasticidad y permeabilidad del material, lo que facilitaría la salida del aceite y el consiguiente aumento del rendimiento

de prensado. La extracción a 50 °C y 7.5 % de humedad arrojó el porcentaje más alto de AE (89.3 % respecto del total de aceite disponible). Bajo estas condiciones de humedad, un incremento en la temperatura de 50 a 70°C produjo una disminución significativa en AE. Se observó un excesivo endurecimiento del material a la salida de la prensa, producto del calentamiento, la aglutinación y compactación en el interior del dispositivo de prensado, lo que daría origen a una matriz menos porosa y a una menor fluidificación del aceite. La caída en AE a 7.5 % y 50 °C se genera principalmente al final del prensado. A medida que aumentó el % AE se produjo la consecuente disminución del % AR en el residuo de extracción; por lo tanto, la extracción a 50 °C y 7.5 % de humedad fue la que arrojó el porcentaje más bajo de AR (10.6 % respecto del total de aceite disponible).

Tabla 15: Efecto de distintos tratamientos (contenido de humedad del material x temperatura de prensado) sobre los rendimientos de prensado y parámetros de calidad del aceite de nuez.

| Parámetro        | Tratamientos [contenido de humedad (%) – temperatura de prensado (°C)] |                           |                           |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|------------------|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  | 2.5 %-25 °C  | 2.5 %-50 °C               | 2.5 %-70 °C               | 4.5 %-25 °C               | 4.5 %-50 °C               | 4.5 %-70 °C               | 7.5 %-25 °C               | 7.5 %-50 °C               | 7.5 %-70 °C               |
| AE               | 61.0 <sup>a</sup> ± 3.9  | 64.7 <sup>b</sup> ± 0.5   | 65.4 <sup>b</sup> ± 1.4   | 73.0 <sup>d</sup> ± 2.1   | 68.7 <sup>c</sup> ± 2.4   | 87.8 <sup>d</sup> ± 0.3   | 83.5 <sup>f</sup> ± 0.2   | 89.3 <sup>g</sup> ± 0.6   | 78.3 <sup>e</sup> ± 0.5   |
| AR               | 38.9 <sup>g</sup> ± 3.9  | 35.2 <sup>f</sup> ± 0.5   | 34.5 <sup>f</sup> ± 1.4   | 26.9 <sup>d</sup> ± 2.1   | 31.2 <sup>e</sup> ± 2.4   | 12.1 <sup>a</sup> ± 0.3   | 16.4 <sup>b</sup> ± 0.2   | 10.6 <sup>a</sup> ± 0.6   | 21.6 <sup>c</sup> ± 0.5   |
| F                | 13.9 <sup>e</sup> ± 1.2  | 16.8 <sup>f</sup> ± 1.4   | 16.7 <sup>f</sup> ± 0.6   | 13.1 <sup>e</sup> ± 1.2   | 11.4 <sup>d</sup> ± 1.00  | 7.88 <sup>b</sup> ± 0.5   | 9.65 <sup>c</sup> ± 1.2   | 7.87 <sup>b</sup> ± 0.5   | 5.74 <sup>a</sup> ± 0.2   |
| GA               | 0.07 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.07 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.14 <sup>d</sup> ± 0.01  | 0.07 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.09 <sup>bc</sup> ± 0.01 | 0.31 <sup>e</sup> ± 0.01  | 0.09 <sup>c</sup> ± 0.01  | 0.10 <sup>c</sup> ± 0.01  | 0.46 <sup>f</sup> ± 0.01  |
| k <sub>232</sub> | 1.02 <sup>b</sup> ± 0.01   | 1.07 <sup>d</sup> ± 0.01  | 1.17 <sup>e</sup> ± 0.02  | 0.99 <sup>a</sup> ± 0.01  | 1.05 <sup>c</sup> ± 0.01  | 1.17 <sup>e</sup> ± 0.01  | 1.02 <sup>b</sup> ± 0.02  | 1.03 <sup>bc</sup> ± 0.02 | 1.17 <sup>e</sup> ± 0.01  |
| k <sub>270</sub> | 0.09 <sup>d</sup> ± 0.01   | 0.09 <sup>d</sup> ± 0.01  | 0.09 <sup>d</sup> ± 0.01  | 0.06 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.08 <sup>cd</sup> ± 0.01 | 0.09 <sup>d</sup> ± 0.01  | 0.06 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.07 <sup>bc</sup> ± 0.01 | 0.08 <sup>cd</sup> ± 0.01 |
| Color (R)        | 2.2 <sup>c</sup> ± 0.001   | 2.2 <sup>c</sup> ± 0.21   | 1.4 <sup>ab</sup> ± 0.07  | 1.5 <sup>ab</sup> ± 0.07  | 2.2 <sup>c</sup> ± 0.14   | 1.4 <sup>a</sup> ± 0.001  | 1.6 <sup>b</sup> ± 0.06   | 1.6 <sup>b</sup> ± 0.1    | 1.6 <sup>b</sup> ± 0.07   |
| Color (A)        | 18.5 <sup>b</sup> ± 0.71   | 20.0 <sup>c</sup> ± 0.01  | 16.0 <sup>a</sup> ± 0.4   | 18.0 <sup>b</sup> ± 0.01  | 20.5 <sup>c</sup> ± 0.01  | 60.0 <sup>d</sup> ± 0.01  | 65.0 <sup>e</sup> ± 0.01  | 65.0 <sup>e</sup> ± 0.01  | 65.0 <sup>e</sup> ± 0.01  |
| AG (%)           |  |                           |                           |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
| Palmitico        | 7.1 <sup>ab</sup> ± 0.12   | 8.4 <sup>d</sup> ± 0.26   | 7.6 <sup>bc</sup> ± 0.43  | 7.1 <sup>ab</sup> ± 0.14  | 7.0 <sup>a</sup> ± 0.15   | 7.6 <sup>bc</sup> ± 0.10  | 7.1 <sup>ab</sup> ± 0.18  | 7.2 <sup>abc</sup> ± 0.33 | 7.3 <sup>abc</sup> ± 0.21 |
| Estearico        | 2.9 <sup>ab</sup> ± 0.06   | 3.1 <sup>b</sup> ± 0.14   | 2.7 <sup>a</sup> ± 0.20   | 3.4 <sup>c</sup> ± 0.02   | 2.8 <sup>ab</sup> ± 0.21  | 2.7 <sup>a</sup> ± 0.01   | 2.8 <sup>ab</sup> ± 0.06  | 2.7 <sup>a</sup> ± 0.12   | 2.7 <sup>a</sup> ± 0.20   |
| Oleico           | 26.4 <sup>bcd</sup> ± 0.7  | 26.4 <sup>bcd</sup> ± 0.3 | 25.6 <sup>a</sup> ± 0.27  | 26.6 <sup>cd</sup> ± 0.48 | 27.1 <sup>d</sup> ± 0.01  | 25.8 <sup>ab</sup> ± 0.15 | 26.5 <sup>bcd</sup> ± 0.2 | 26.5 <sup>bcd</sup> ± 0.1 | 26.0 <sup>abc</sup> ± 0.3 |
| Linoleico        | 51.9 <sup>bc</sup> ± 0.3   | 50.6 <sup>a</sup> ± 0.6   | 52.0 <sup>c</sup> ± 0.23  | 51.2 <sup>ab</sup> ± 0.09 | 51.6 <sup>bc</sup> ± 0.12 | 51.3 <sup>abc</sup> ± 0.3 | 51.9 <sup>bc</sup> ± 0.05 | 51.3 <sup>abc</sup> ± 0.7 | 51.6 <sup>bc</sup> ± 0.2  |
| Linolénico       | 11.8 <sup>abc</sup> ± 0.4  | 11.3 <sup>a</sup> ± 0.4   | 12.0 <sup>abc</sup> ± 0.7 | 11.8 <sup>abc</sup> ± 0.4 | 11.5 <sup>ab</sup> ± 0.2  | 12.5 <sup>c</sup> ± 0.3   | 11.7 <sup>abc</sup> ± 0.1 | 12.2 <sup>abc</sup> ± 0.5 | 12.3 <sup>bc</sup> ± 0.4  |
| TT               | 314 <sup>ab</sup> ± 13.5   | 333 <sup>bc</sup> ± 20.5  | 366 <sup>d</sup> ± 9.2    | 312 <sup>a</sup> ± 8.7    | 316 <sup>ab</sup> ± 11.2  | 352 <sup>cd</sup> ± 8.3   | 339 <sup>c</sup> ± 19.4   | 318 <sup>ab</sup> ± 4.4   | 360 <sup>d</sup> ± 4.8    |
| CC               | 1.04 <sup>a</sup> ± 0.06   | 2.14 <sup>bc</sup> ± 0.5  | 2.28 <sup>c</sup> ± 0.6   | 1.22 <sup>a</sup> ± 0.1   | 1.56 <sup>ab</sup> ± 0.5  | 2.03 <sup>bc</sup> ± 0.4  | 2.77 <sup>c</sup> ± 0.04  | 2.18 <sup>bc</sup> ± 0.04 | 2.10 <sup>bc</sup> ± 0.09 |
| EO               | 3.2 <sup>bcd</sup> ± 0.04  | 3.3 <sup>cd</sup> ± 0.06  | 3.1 <sup>abc</sup> ± 0.04 | 3.2 <sup>bcd</sup> ± 0.2  | 3.3 <sup>cd</sup> ± 0.14  | 2.9 <sup>a</sup> ± 0.01   | 3.3 <sup>cd</sup> ± 0.11  | 3.2 <sup>bcd</sup> ± 0.07 | 3.0 <sup>ab</sup> ± 0.09  |

Abreviaturas y unidades: AE, aceite extraído (%); AR, aceite residual (%); F, finos en el aceite (%); GA, grado de acidez (% ácido oleico); color (R, rojo), (A, amarillo); ácidos grasos (% del total de ácidos grasos); TT, contenido de tocoferoles totales (µg/g de aceite); CC, contenido de pigmentos carotenoides (µg/g de aceite); EO, estabilidad oxidativa (horas).

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.05) entre los tratamientos.

Figura 11: Relación entre el porcentaje de aceite extraído y la temperatura de prensado a diferentes contenidos de humedad.

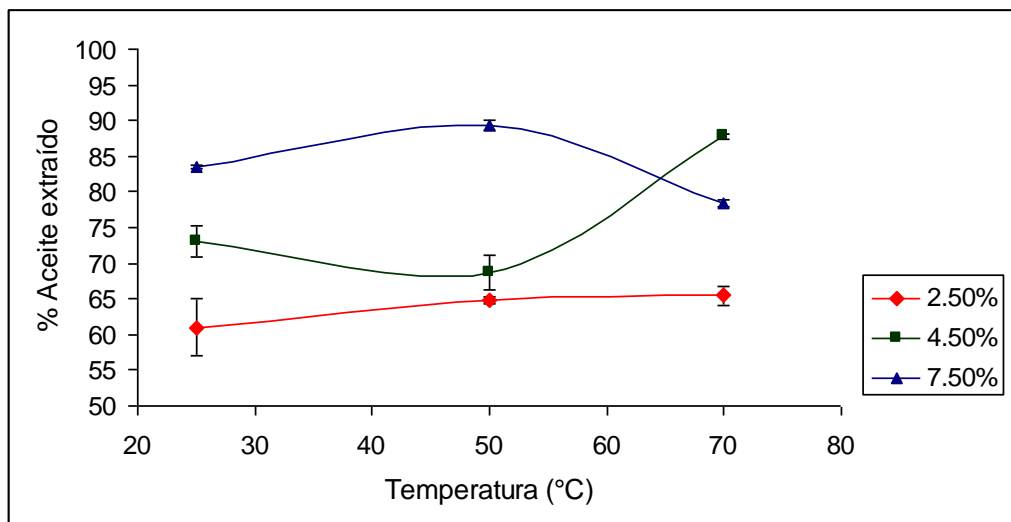
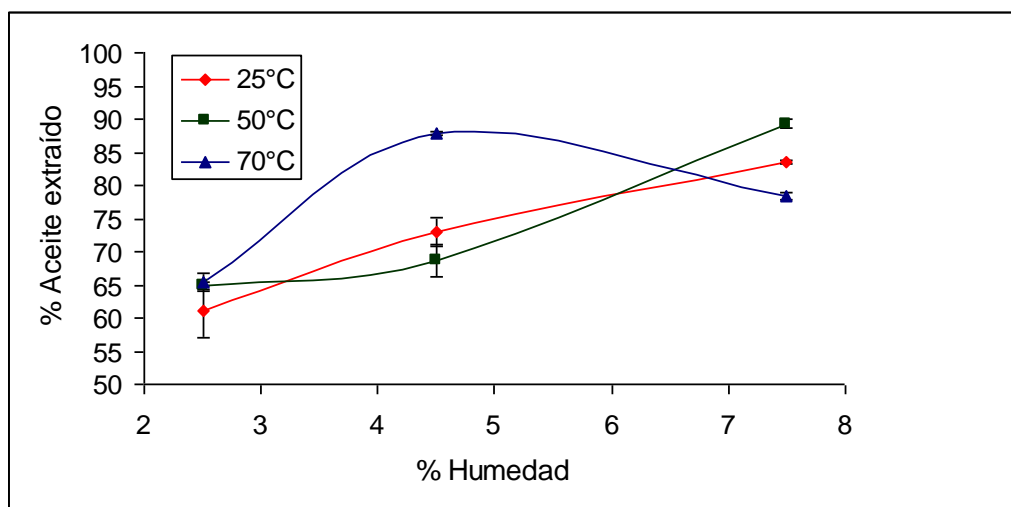


Figura 12: Relación entre el porcentaje de aceite extraído y el porcentaje de humedad del material a diferentes temperaturas de prensado.



En relación al contenido de sólidos (F) en el extracto, Vargas-López *et al.* (1999) y Singh *et al.* (2002) han observado que el mismo se incrementa al disminuir el contenido de humedad del material (semillas de Crambe). Los incrementos de F fueron desde 1.1 a 5.4 % y desde 2.9 a 4.4 % cuando el % de humedad (% H) disminuyó de 9.2 a 3.6 % y de 12.1 a 4.3 %, respectivamente. En el presente estudio, F varió entre 5.7 y 16.8 %. El menor valor fue obtenido a 7.5 % H y 70 °C. Ya se mencionó que bajo estas condiciones, la torta de prensado se torna más compacta provocando que una menor cantidad de sedimentos atraviesen los orificios del barral y

sean co-extraídos con el aceite. El ANAVA a dos vías muestra que las variaciones en AE y F entre los tratamientos pueden ser explicadas principalmente por las diferencias en el contenido de humedad (tabla 16).

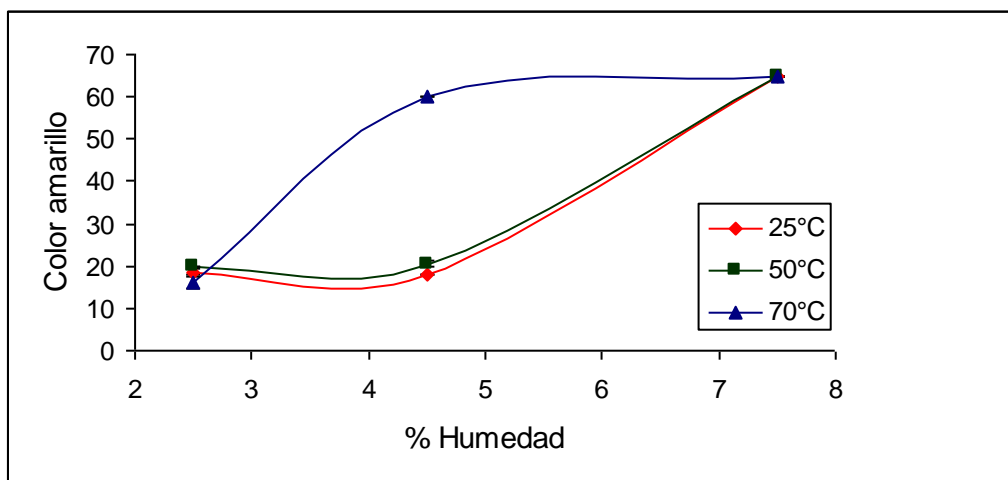
Tabla 16: Análisis de la varianza (ANAVA) a dos vías para los principales parámetros medidos en los aceites obtenidos de los distintos tratamientos.

| Parámetro           | % H    | F     | TP     | F     | % H x TP | F     |
|---------------------|--------|-------|--------|-------|----------|-------|
| Aceite extraído     | 67.82* | 286.4 | 3.64   | 15.39 | 26.40*   | 55.73 |
| Finos en el aceite  | 75.05* | 69.56 | 6.34   | 20.01 | 14.57    | 25.39 |
| Grado de acidez     | 13.61* | 630.3 | 65.77* | 2952  | 20.41*   | 431.2 |
| K <sub>232</sub>    | 1.40   | 5.33  | 93.46* | 361.9 | 2.73     | 5.06  |
| Tocoferoles totales | 6.34   | 2.83  | 63.16* | 28.15 | 10.30    | 2.29  |
| Color (Amarillo)    | 77.68* | 14614 | 6.38   | 1200  | 15.90    | 1496  |

Abreviaturas: H, humedad del material (%) y TP, temperatura de prensado. Significancia estadística: \*  $p \leq 0.05$ .

Los aceites obtenidos mediante los distintos tratamientos mostraron variaciones significativas para todos los parámetros químicos evaluados (tabla 15). Se observaron incrementos en el contenido de tocoferoles totales (321.7 a 359.3  $\mu\text{g/g}$  de aceite), en los valores de acidez (0.08 a 0.30 % ácido oleico) y  $k_{232}$  (1.01 a 1.17), con el aumento de la temperatura de prensado. El ANAVA a dos vías permitió confirmar estas tendencias: la temperatura del proceso de extracción fue la principal fuente de variabilidad para los parámetros mencionados (tabla 16). Por el contrario, las variaciones de color (amarillo) en los aceites pueden explicarse mejor a través de las diferencias en el contenido de humedad (figura 13), observándose además una correlación positiva estadísticamente significativa ( $r = 0.88$ ,  $p \leq 0.001$ ) entre ambos parámetros.

Figura 13: Relación entre la intensidad de color amarillo y el porcentaje de humedad del material a diferentes temperaturas de prensado.



Se detectaron diferencias menores entre los tratamientos en la composición de ácidos grasos, trienos conjugados y estabilidad oxidativa.

Es escasa la bibliografía existente acerca de la influencia de la temperatura del proceso sobre la calidad de los aceites obtenidos por prensado. Esta carencia de conocimiento es una de las causas de la falta de definiciones precisas de terminología de uso corriente. Así por ejemplo, el término “prensado en frío” no está definido por el Código Alimentario Argentino y no resulta aplicable en muchos países. No obstante, algunas legislaciones, como la existente en el Reino Unido, establecen que el rótulo “prensado en frío” es aplicable a aceites cuya temperatura a la salida de la prensa, es inferior a 50 °C. A juzgar por los resultados obtenidos en el presente trabajo, los aceites de nuez obtenidos por prensado a 25, 50 y 70 °C no presentan mayores diferencias en su composición química por lo que, en principio, esta metodología resulta asequible para la extracción de aceites de buena calidad.

En la tabla 17 se presentan los rangos de intensidad del *warm up* (aceite de nuez de la variedad Franquette utilizado para el ensayo de almacenamiento) y de las referencias utilizadas en el análisis descriptivo del aceite de nuez obtenido a partir del tratamiento: humedad del material, 7.5 %; temperatura de prensado, 50 °C. El aceite se caracterizó por una marcada intensidad en los atributos frutado (4.6), picante (2.45), astringente (2.18) y oleoso (4.84). Los atributos negativos rancio y pintura resultaron con intensidades cercanas a cero (figura 14).



Tabla 17: Definición de los atributos sensoriales evaluados, rangos de intensidad del *warm up* y de las referencias utilizadas en el análisis descriptivo.

| Atributo         | Definición <sup>a</sup>  | Referencias [Intensidad de las referencias] <sup>b</sup>                          | Intensidad del <i>Warm-up</i> <sup>b,c</sup> |
|------------------|--|---|--|
| <b>Positivos</b> |  |   |  |
| Frutado          | Olor que recuerda a la nuez una vez que ésta es llevada a la boca.                                       | Nuez Franquette [4.7] - Nuez Criolla [5.3]  | 4.60   |
| Dulce            | Gusto percibido en la lengua cuando se prueba una solución de sacarosa.                                  | Solución de sacarosa (0.5 y 2 %) [0.5 – 1.5]                                      | 0.80   |
| Amargo           | Gusto percibido en la lengua cuando se prueba una solución de cafeína.                                   | Solución de cafeína (0.05 y 0.15 %) [1.5 – 7]                                     | 0.75   |
| Picante          |  | Aceite Franquette   | 2.45   |
| Astringente      | Sensación tacto bucal propia de aceites muy verdes (producida por polifenoles que precipitan la saliva). | Té verde [0.8] <sup>d</sup> - Aceite Franquette [2.5]                             | 2.18   |
| <b>Negativos</b> |  |   |  |
| Rancio           | Sabor y aroma desagradable asociado a una grasa o aceite rancio o viejo.                                 | Aceite de nuez enranciado <sup>e</sup> + girasol <sup>f</sup> (2 y 8 %) [2.5 – 7] | 0.30   |
| Oleoso           | Sensación aceitosa, que persiste en toda la boca una vez consumido el aceite.                            | Aceite de girasol <sup>f</sup> [3.45] - Aceite Franquette [5.30]                  | 4.84   |
| Pintura          | Olor que se asemeja a pintura o barniz.  | Aceite de lino <sup>g</sup> [1.6 - 5 - 10]  | 0.50   |

<sup>a</sup> Definiciones de los atributos formuladas por el panel y obtenidas de Anzaldúa-Morales (1994).

<sup>b</sup> Referencias definidas por el panel y rango de intensidades según una escala de 10 cm.

<sup>c</sup> El *warm up* es el mismo aceite de nuez de la variedad Franquette utilizado para el ensayo de almacenamiento.

<sup>d</sup> Preparación: 2 saquitos de té verde “La Virginia” en 1 l de agua hirviendo. Dejar en reposo 20 min.

<sup>e</sup> Aceite de nuez de la variedad Franquette sin aditar proveniente del ensayo Rancimat (flujo de aire 20 l/h, 110 °C, 7 h de exposición).

<sup>f</sup> Aceite de girasol “Natura”.

<sup>g</sup> Aceite de lino puro (punto 1.6) y enranciado (puntos 5 y 10) (estufa a 78 °C, tiempo 15 y 32 h, respectivamente).

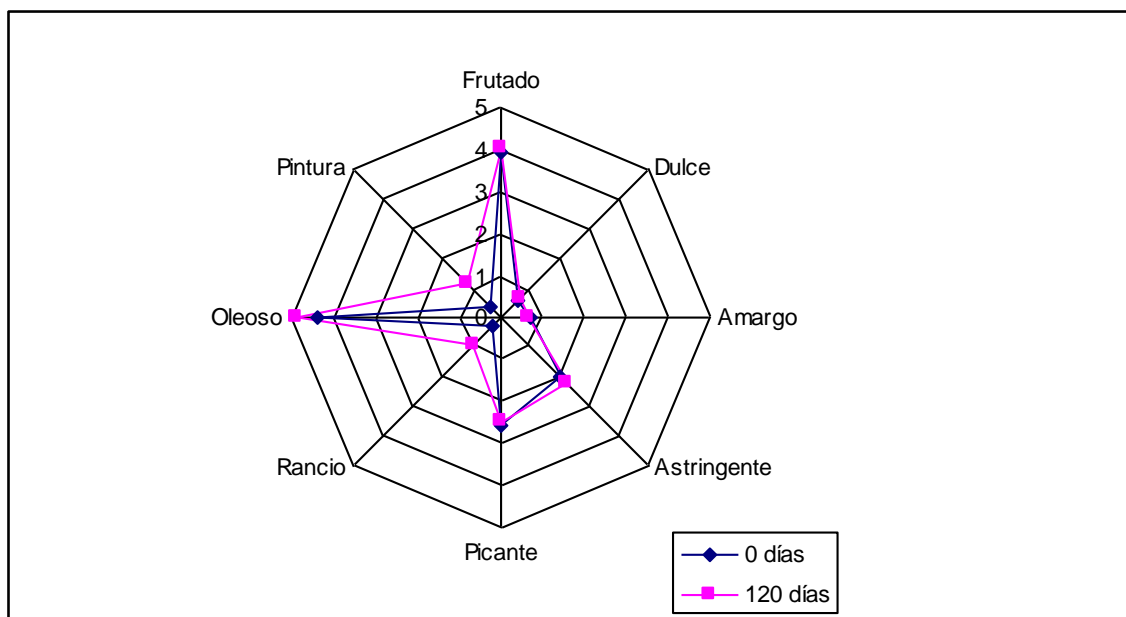
La mayor parte de los parámetros sensoriales analizados no presentaron cambios durante el almacenamiento (tabla 18, figura 14). Sin embargo, los atributos rancio y pintura se incrementaron significativamente respecto del tiempo cero (figuras 15 y 16) y se correlacionaron positivamente entre sí ( $r = 0.94$ ,  $p = 0.0002$ ).

Tabla 18: Parámetros sensoriales y químicos del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C).

| Parámetro  | Tiempo Cero (0 días)     | Tiempo Final (120 días)  |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <b>Sensorial</b>                                     |                          |                          |
| Frutado  | 3.92 <sup>a</sup> ± 0.47 | 4.06 <sup>a</sup> ± 0.82 |
| Dulce  | 0.57 <sup>a</sup> ± 0.15 | 0.66 <sup>a</sup> ± 0.24 |
| Amargo   | 0.70 <sup>a</sup> ± 0.16 | 0.68 <sup>a</sup> ± 0.08 |
| Astringente  | 2.01 <sup>a</sup> ± 0.31 | 2.24 <sup>a</sup> ± 0.05 |
| Picante  | 2.58 <sup>a</sup> ± 0.74 | 2.45 <sup>a</sup> ± 0.30 |
| Rancio   | 0.25 <sup>a</sup> ± 0.12 | 0.94 <sup>b</sup> ± 0.16 |
| Oleoso   | 4.39 <sup>a</sup> ± 0.91 | 4.89 <sup>a</sup> ± 0.21 |
| Pintura  | 0.33 <sup>a</sup> ± 0.16 | 1.16 <sup>b</sup> ± 0.47 |
| <b>Químico</b>                                       |                          |                          |
| Grado de acidez (% ácido oleico)                     | 0.06 <sup>a</sup> ± 0.00 | 0.08 <sup>b</sup> ± 0.00 |
| Índice de peróxidos (meq. O <sub>2</sub> /kg aceite) | 0.48 <sup>a</sup> ± 0.06 | 26.2 <sup>b</sup> ± 1.08 |
| K <sub>232</sub>                                     | 1.04 <sup>a</sup> ± 0.05 | 3.66 <sup>b</sup> ± 0.11 |
| K <sub>270</sub>                                     | 0.07 <sup>a</sup> ± 0.01 | 0.11 <sup>b</sup> ± 0.00 |
| Tocoferoles totales (µg/g aceite)                    | 284 <sup>a</sup> ± 9.71  | 221 <sup>b</sup> ± 3.34  |
| Estabilidad oxidativa (h)                            | 3.64 <sup>a</sup> ± 0.04 | 1.94 <sup>b</sup> ± 0.04 |

Parámetros sensoriales y químicos, valores medios ( $n = 10$  y  $n = 3$ , respectivamente) ± desvío estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tiempo inicial y final.

Figura 14: Perfil sensorial del aceite de nuez.



Se grafican los valores medios ( $n = 10$ ) de cada uno de los atributos.

A diferencia de los atributos sensoriales, todos los parámetros químicos analizados presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo cero y el final del período de almacenamiento (tabla 18, figuras 17 – 19). Los parámetros indicadores de oxidación primaria (índice de peróxidos y coeficientes de extinción específica,  $k_{232}$  y  $k_{270}$ ) se incrementaron linealmente ( $R^2 = 0.98, 0.96, 0.94$ , respectivamente), mientras que el contenido de tocoferoles totales mostró una reducción del 22 % al cabo de 120 días de almacenamiento. Como consecuencia de los cambios mencionados, la estabilidad oxidativa del aceite se redujo de 3.64 a 1.94 horas.

Figura 15: Evolución de la intensidad del atributo rancio del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C). La línea gris corresponde al valor de la intensidad del atributo "rancio" para un índice de peróxidos de 20 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite.

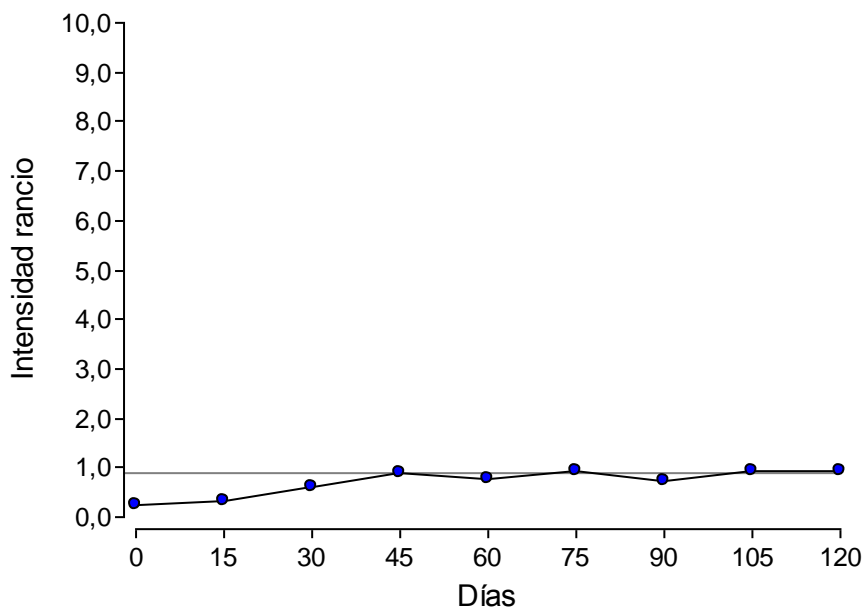


Figura 16: Evolución de la intensidad del atributo pintura del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C). La línea gris corresponde al valor de la intensidad del atributo "pintura" para un índice de peróxidos de 20 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite.

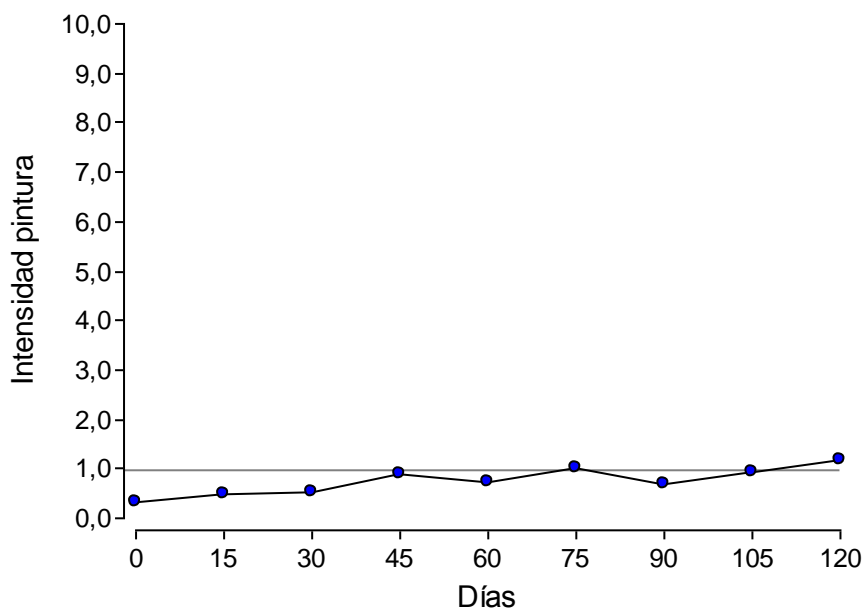


Figura 17: Evolución del índice de peróxidos del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C). La línea gris corresponde a un índice de peróxidos de 20 meq de O<sub>2</sub>/kg de aceite.

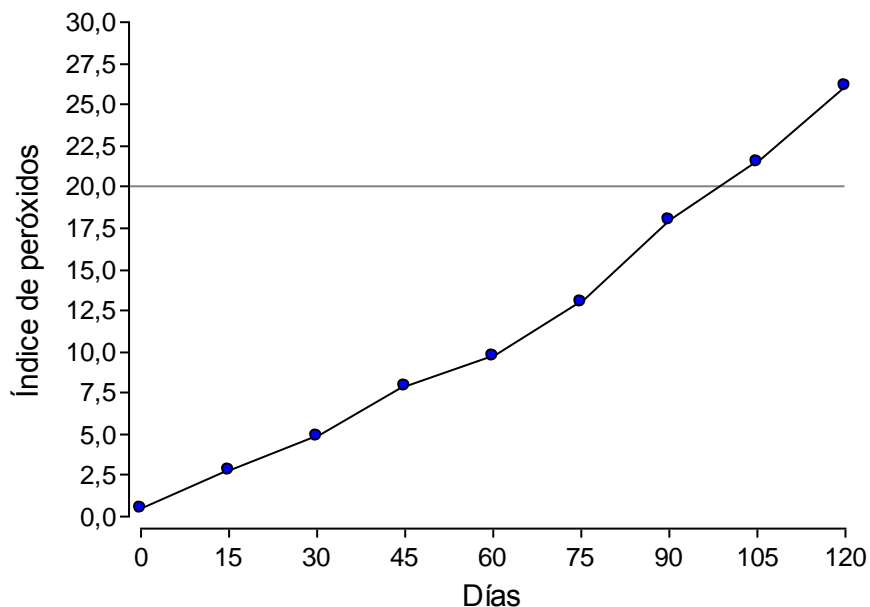


Figura 18: Evolución del coeficiente de extinción específica ( $k_{232}$ ) del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C).

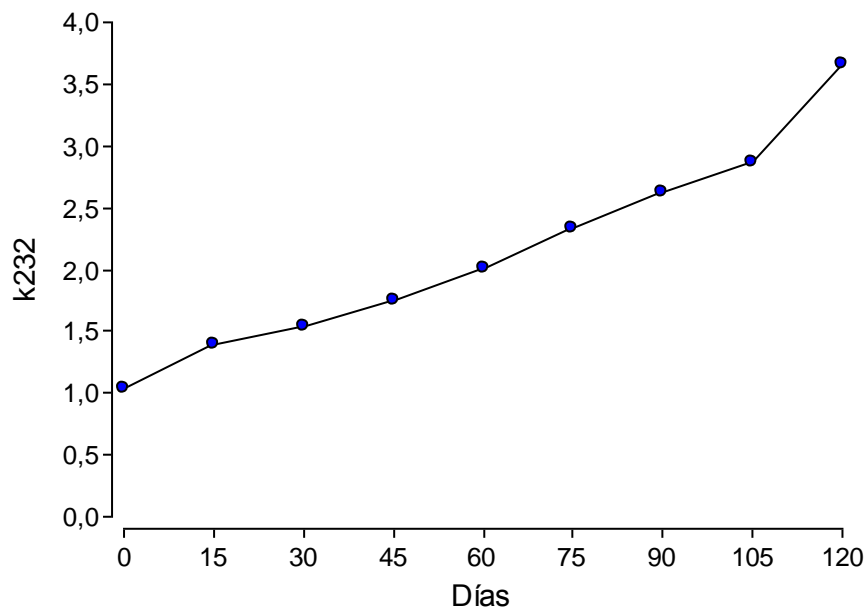
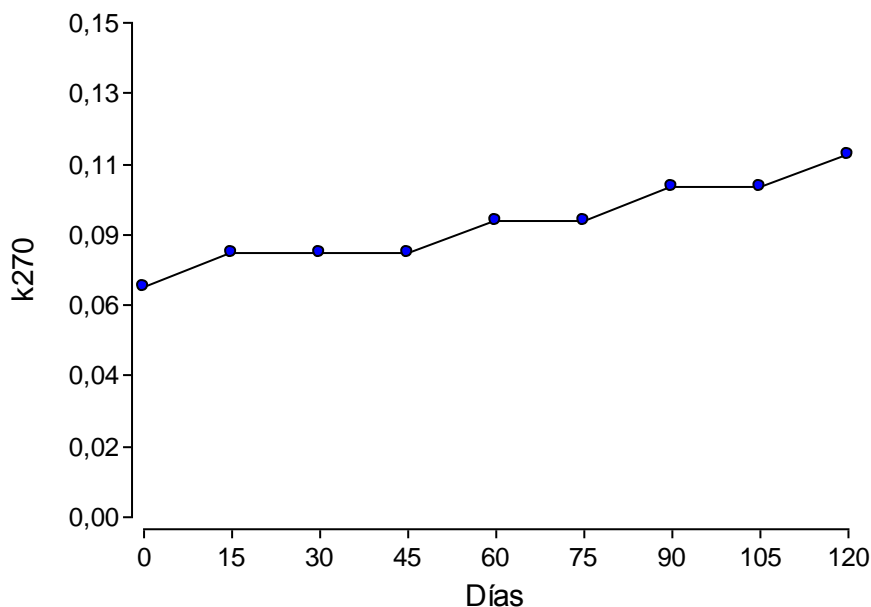


Figura 19: Evolución del coeficiente de extinción específica ( $k_{270}$ ) del aceite de nuez obtenido por prensado, almacenado durante 120 días en condiciones controladas de luz (1100 Lux) y temperatura (25 °C).



El período de vida útil del aceite de nuez almacenado bajo las condiciones indicadas, a partir de la ecuación mostrada en la tabla 19, y tomando como límite máximo permitido un índice de peróxidos de 20 meq  $O_2$ /kg de aceite, resultó de 99.7 días.

Tabla 19: Coeficientes de regresión lineal (\* significativos,  $p \leq 0.05$  y \*\* altamente significativos,  $p \leq 0.01$ ) de las variables sensoriales y químicas analizadas.

| Variable Dependiente      | $\beta_0$  | $\beta_1$ | $R^2$      |
|---------------------------|------------|-----------|------------|
| Dulce                     | 0.586222   | 0.000933  | 0.449618*  |
| Astringente               | 1.985333   | 0.001967  | 0.774703** |
| Picante                   | 2.656667   | -0.002833 | 0.639758** |
| Rancio                    | 0.384667   | 0.005367  | 0.702847** |
| Oleoso                    | 4.349333   | 0.004567  | 0.847997** |
| Pintura                   | 0.411333   | 0.005700  | 0.747724** |
| Grado de acidez           | 0.062889   | 0.000156  | 0.588000*  |
| Índice de peróxidos       | -1.087111  | 0.211544  | 0.977986** |
| $k_{232}$                 | 0.957111   | 0.019622  | 0.960618** |
| $k_{270}$                 | 0.070889   | 0.000300  | 0.942672** |
| Tocoferoles totales       | 285.309601 | -0.410344 | 0.624911*  |
| Estabilidad oxidativa (h) | 3.318889   | -0.011056 | 0.844174** |

$y = \beta_0 + \beta_1 x$ , donde  $y$  = variable dependiente,  $x$  = variable independiente (días de almacenamiento).

El índice de peróxidos se correlacionó positivamente con los atributos oleoso ( $r = 0.92$ ,  $p \leq 0.001$ ), rancio ( $r = 0.78$ ,  $p \leq 0.01$ ) y pintura ( $r = 0.83$ ,  $p \leq 0.005$ ). Dado que estos dos últimos fueron los únicos parámetros sensoriales que presentaron cambios significativos durante el almacenamiento, los valores de intensidad máximos permitidos (calculados a partir de la tabla 20) para un índice de peróxidos igual a 20 meq  $O_2$ /kg de aceite son, 0.90 y 0.97, para rancio y pintura, respectivamente.

Tabla 20: Coeficientes de regresión lineal (\* significativos,  $p \leq 0.05$  y \*\* altamente significativos,  $p \leq 0.01$ ) para las variables astringente, picante, rancio, oleoso y pintura respecto a índice de peróxidos.

| Variable Dependiente | Variable Independiente | $\beta_0$ | $\beta_1$ | $R^2$      |
|----------------------|------------------------|-----------|-----------|------------|
| Astringente          | Índice de peróxidos    | 1.994140  | 0.009409  | 0.811348** |
| Picante              | Índice de peróxidos    | 2.637583  | -0.013004 | 0.616639*  |
| Rancio               | Índice de peróxidos    | 0.437468  | 0.023196  | 0.600810*  |
| Oleoso               | Índice de peróxidos    | 4.376024  | 0.021310  | 0.844921** |
| Pintura              | Índice de peróxidos    | 0.455197  | 0.025689  | 0.694961** |

$y = \beta_0 + \beta_1 x$ , donde  $y$  = variable dependiente,  $x$  = variable independiente (índice de peróxidos).

### **Objetivo específico 3**

La tabla 21 resume los resultados obtenidos en la extracción del aceite del residuo proveniente del prensado, utilizando SC -  $CO_2$  y las siguientes combinaciones de presión y temperatura: 50 °C – 200 bar, 50 °C – 400 bar, 70 °C – 200 bar y 70 °C – 400 bar.

Tabla 21: Parámetros del proceso, rendimiento de extracción y composición química de los aceites obtenidos mediante el empleo de SC - CO<sub>2</sub>.

| Parámetro                                      | Tratamientos               |                           |                            |                            |
|--|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | 50 °C – 200 bar            | 70 °C – 200 bar           | 50 °C- 400 bar             | 70 °C – 400 bar            |
| Aceite extraído (%)                            | 79.1 <sup>b</sup> ± 0.84   | 44.3 <sup>a</sup> ± 9.13  | 92.6 <sup>b</sup> ± 2.55   | 91.2 <sup>b</sup> ± 4.95   |
| Aceite residual (%)                            | 20.9 <sup>a</sup> ± 0.91   | 55.7 <sup>b</sup> ± 9.13  | 7.34 <sup>a</sup> ± 2.48   | 8.77 <sup>a</sup> ± 4.96   |
| Humedad residual (%)                           | 26.2 <sup>ab</sup> ± 5.37  | 23.1 <sup>a</sup> ± 3.09  | 41.9 <sup>bc</sup> ± 10.07 | 46.5 <sup>c</sup> ± 2.69   |
| Rendimiento de extracción (g aceite/g residuo) | 0.16 <sup>b</sup> ± 0.01   | 0.07 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.19 <sup>b</sup> ± 0.01   | 0.18 <sup>b</sup> ± 0.01   |
| Tiempo de extracción (min)                     | 380 <sup>b</sup> ± 0.001   | 470 <sup>c</sup> ± 0.001  | 191.5 <sup>a</sup> ± 4.95  | 182.5 <sup>a</sup> ± 10.61 |
| Solubilidad (g aceite/kg CO <sub>2</sub> )     | 1.80 <sup>a</sup> ± 0.26   | 0.45 <sup>a</sup> ± 0.08  | 14.00 <sup>c</sup> ± 1.70  | 9.80 <sup>b</sup> ± 1.98   |
| Grado de acidez (% ácido oleico)               | 0.38 <sup>ab</sup> ± 0.005 | 0.54 <sup>c</sup> ± 0.03  | 0.34 <sup>a</sup> ± 0.006  | 0.41 <sup>b</sup> ± 0.01   |
| k <sub>232</sub>                               | 1.53 <sup>b</sup> ± 0.06   | 1.52 <sup>b</sup> ± 0.04  | 1.34 <sup>a</sup> ± 0.01   | 1.38 <sup>a</sup> ± 0.01   |
| k <sub>270</sub>                               | 0.19 <sup>a</sup> ± 0.04   | 0.22 <sup>a</sup> ± 0.02  | 0.18 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.19 <sup>a</sup> ± 0.04   |
| Color rojo                                     | 4.60 <sup>ab</sup> ± 0.01  | 4.35 <sup>a</sup> ± 0.01  | 5.05 <sup>bc</sup> ± 0.01  | 5.30 <sup>c</sup> ± 0.01   |
| Color amarillo                                 | 65 <sup>a</sup> ± 0.01     | 65 <sup>a</sup> ± 0.01    | 65 <sup>a</sup> ± 0.01     | 65 <sup>a</sup> ± 0.01     |
| Acidos grasos (%)                              |                            |                           |                            |                            |
| <i>Palmítico</i>                               | 8.19 <sup>a</sup> ± 0.24   | 8.72 <sup>a</sup> ± 0.11  | 8.50 <sup>a</sup> ± 0.11   | 8.20 <sup>a</sup> ± 0.38   |
| <i>Esteárico</i>                               | 2.87 <sup>a</sup> ± 0.04   | 3.04 <sup>a</sup> ± 0.30  | 3.02 <sup>a</sup> ± 0.19   | 2.75 <sup>a</sup> ± 0.05   |
| <i>Oleico</i>                                  | 23.4 <sup>a</sup> ± 0.37   | 24.0 <sup>b</sup> ± 0.31  | 23.5 <sup>ab</sup> ± 0.30  | 22.8 <sup>a</sup> ± 0.32   |
| <i>Linoleico</i>                               | 52.1 <sup>b</sup> ± 0.17   | 51.1 <sup>ab</sup> ± 0.65 | 50.6 <sup>a</sup> ± 0.47   | 50.9 <sup>a</sup> ± 0.48   |
| <i>Linolénico</i>                              | 13.5 <sup>a</sup> ± 0.40   | 13.1 <sup>a</sup> ± 0.15  | 13.7 <sup>ab</sup> ± 0.24  | 14.7 <sup>ab</sup> ± 0.65  |
| Tocoferoles totales (μg/g aceite)              | 559 <sup>a</sup> ± 65.0    | 820 <sup>b</sup> ± 52.3   | 529 <sup>a</sup> ± 18.9    | 588 <sup>a</sup> ± 29.7    |
| Carotenoides (μg/g aceite)                     | 9.90 <sup>b</sup> ± 0.72   | 7.14 <sup>a</sup> ± 1.07  | 9.62 <sup>b</sup> ± 0.07   | 9.59 <sup>b</sup> ± 0.07   |
| Estabilidad oxidativa (horas)                  | 0.30 <sup>a</sup> ± 0.001  | 0.30 <sup>a</sup> ± 0.001 | 0.79 <sup>b</sup> ± 0.01   | 0.78 <sup>b</sup> ± 0.21   |

Valores medios (n = 3) ± desvíos estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.05) entre los tratamientos.

A partir de los datos presentados (tabla 21, figuras 20 y 21) puede observarse que la presión de CO<sub>2</sub> ejerce un efecto significativo sobre la masa total de aceite extraído (AE); los rendimientos más elevados se obtuvieron a 400 bar. A esta presión, un incremento de la temperatura no genera un aumento significativo en la cantidad de AE. Asimismo, el incremento de la presión produjo una marcada reducción del tiempo de extracción; bajo condiciones isotérmicas, al duplicar la presión, el tiempo de extracción disminuyó alrededor del 50 % (a 50 °C) y 86 % (a 70 °C). Estos resultados coinciden, en términos generales, con los obtenidos por Sovova *et al.* (1994), Louli *et al.* (2004), Boutin *et al.* (2009), Han *et al.* (2009) y Salgin y Salgin (2006), quienes observaron que el rendimiento y la velocidad de extracción se incrementan al aumentar la presión del fluido supercrítico. Estos últimos investigadores determinaron, además, un máximo de rendimiento de aceite a presiones cercanas a 500 bar.



Figura 20: Relación entre la masa total extraída y la masa de solvente utilizada en función de la masa de material inerte.

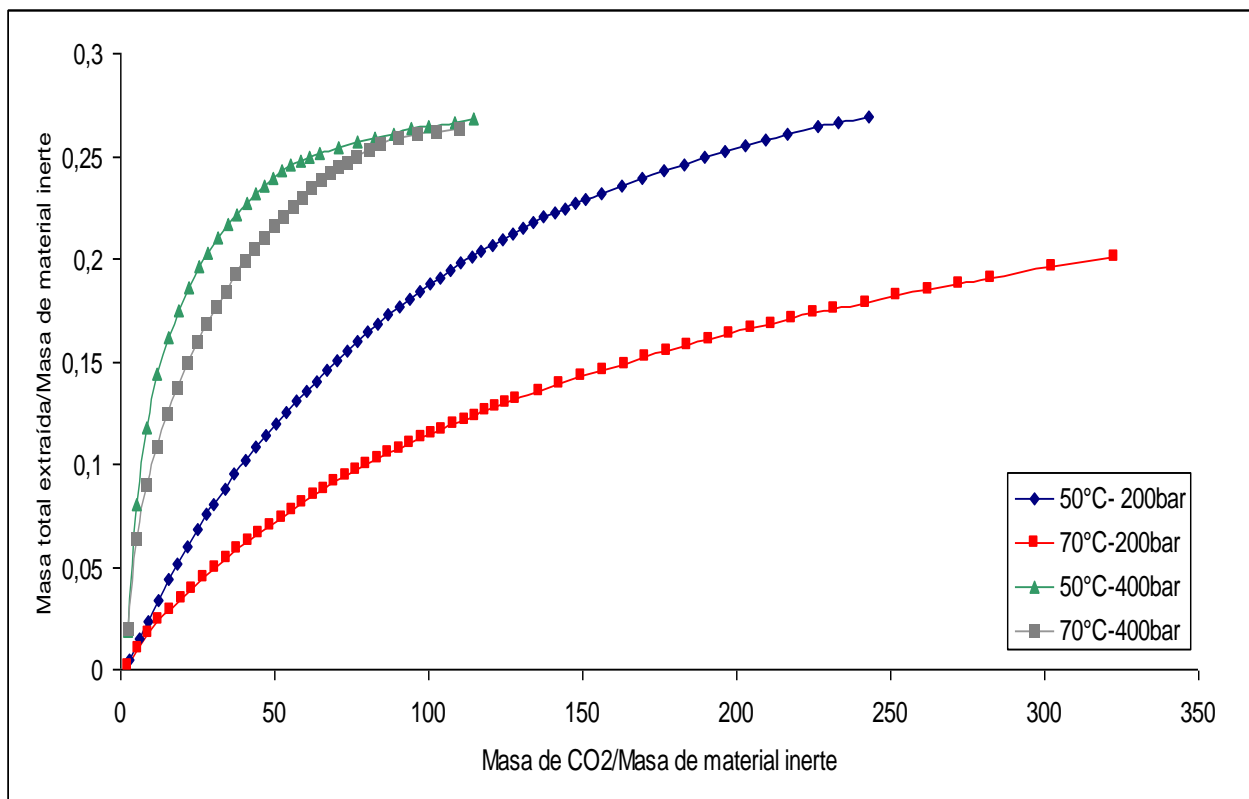
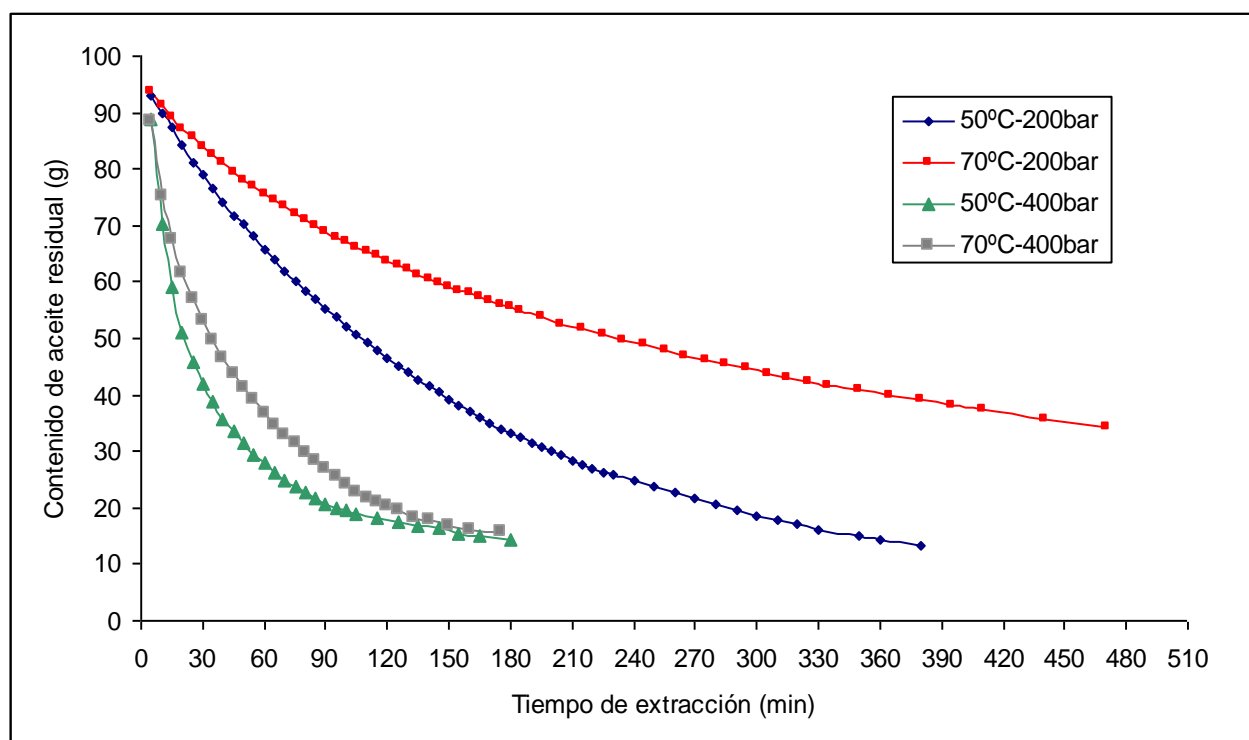


Figura 21: Contenido de aceite residual en función del tiempo de extracción.



Durante la primera etapa, la extracción del aceite estuvo determinada por la solubilidad del mismo en el SC - CO<sub>2</sub>, observándose una relación lineal entre la masa total extraída y la masa de CO<sub>2</sub> utilizada, donde la pendiente corresponde a la solubilidad del aceite en CO<sub>2</sub> bajo las condiciones de extracción. Este comportamiento fue observado a masas muy bajas de CO<sub>2</sub>. A 50 °C - 200 bar (durante los primeros 50 min de extracción) se obtuvo una relación lineal ( $R^2 = 0.997$ ) entre la masa de aceite extraído y la masa de CO<sub>2</sub> suministrada (este comportamiento se observó hasta alcanzar una masa de 9.05 kg de CO<sub>2</sub>). A 70 °C - 200 bar (durante los primeros 35 min de extracción) se obtuvo un coeficiente de regresión lineal  $R^2 = 0.986$  (hasta una masa de 6.94 kg de CO<sub>2</sub>). A 50 °C - 400 bar y a 70 °C - 400 bar (durante los primeros 15 min de extracción) se observó una relación lineal entre la masa de aceite extraída y la masa de CO<sub>2</sub> suministrada a cantidades inferiores de CO<sub>2</sub> (2.52 kg y 2.49 kg, respectivamente). Luego de esta etapa, la velocidad de extracción estuvo gobernada por la solubilidad y la difusión, disminuyendo continuamente con el tiempo. Lee *et al.* (1986) y Catchpole *et al.* (2009) explican la cinética de extracción de una manera similar.

Se observó un incremento en la solubilidad del aceite de nuez de 1.8 a 14 g de aceite/kg de CO<sub>2</sub> (a 50 °C) y de 0.45 a 9.8 g de aceite/kg de CO<sub>2</sub> (a 70 °C) cuando la presión de trabajo aumentó de 200 a 400 bar. La solubilidad del aceite de nuez tanto a 200 como a 400 bar disminuyó con el aumento de la temperatura de trabajo. Norulaini *et al.* (2009) observaron una disminución en el rendimiento de extracción con el aumento de la temperatura a presiones inferiores a 283 bar. Estos hechos pueden explicarse debido a que a presiones operativas bajas, la capacidad disolvente del SC - CO<sub>2</sub> se ve más afectada por los cambios en la densidad. A presiones operativas altas, los cambios de la densidad con la temperatura resultarían menos significativos comparados con los cambios de la presión de vapor del aceite de nuez (Han *et al.*, 2009).

En relación a la composición de los aceites extraídos, la mayor parte de los parámetros químicos analizados presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 21). El grado de acidez (GA) estuvo comprendido entre 0.34 y 0.54 %; el valor más alto se obtuvo a 70 °C y 200 bar. Este tratamiento extrajo la mayor cantidad de agua (figura 22), lo cual puede favorecer la hidrólisis de los triglicéridos, generando un aumento de la concentración de los ácidos grasos libres (AGL). El incremento en el GA también puede deberse a que bajo esas condiciones extractivas se produce una extracción diferencial de los AGL debido a que su solubilidad es

superior a la de los triglicéridos. Por otra parte, el contenido de AGL resultó más elevado que el encontrado en los aceites obtenidos por prensado.

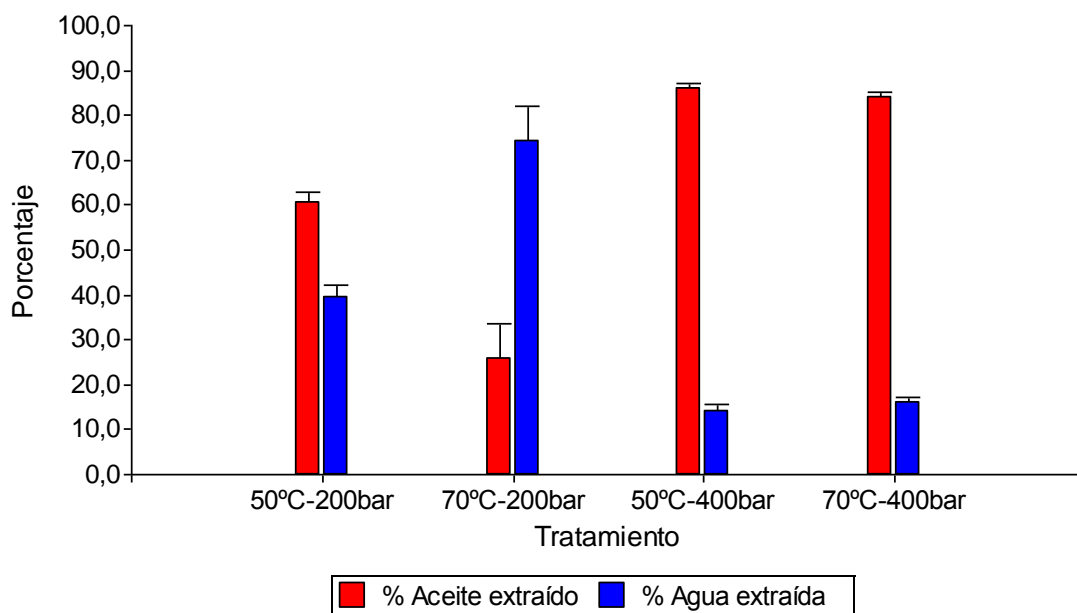
A 70 °C – 200 bar se obtuvo la máxima recuperación de tocoferoles (820 µg/g de aceite); los otros tratamientos no mostraron diferencias significativas. Estos resultados coinciden de manera parcial con los obtenidos por Mukhopadhyay (2000) quien observó un máximo de extracción de tocoferoles a 250 bar y 80 °C. Además, Molero Gomez y Martinez de la Ossa (2000), observaron que a 200 bar, un aumento en la temperatura de 50 a 60 °C incrementa el contenido de tocoferoles de 253 a 408 mg/g de aceite. La concentración de tocoferoles y de pigmentos carotenoides resultó, en promedio, superior a las observadas en los aceites obtenidos por prensado. Esto incidió en el color de los aceites; aquellos extraídos con SC - CO<sub>2</sub> mostraron una tonalidad más oscura en comparación con los de prensado.

La estabilidad oxidativa (EO) estuvo comprendida entre 0.3 y 0.79 horas; los aceites obtenidos a 200 bar presentaron los valores más bajos (tabla 21). La EO de los aceites obtenidos con SC - CO<sub>2</sub> resultó, en todos los casos, inferior a la de los aceites de prensado, a pesar del mayor contenido de tocoferoles observado en los primeros. Calvo *et al.* (1994), Oliveira *et al.* (2002) y Crowe y White (2003) han informado resultados similares en aceites de nuez extraídos con SC - CO<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones de presión y temperatura, concluyendo que la aplicación de esta tecnología origina un mayor deterioro oxidativo de los aceites. Una posible explicación para estos resultados se ha focalizado en el contenido de oxígeno del CO<sub>2</sub> usado para las extracciones. Por ejemplo, a 200 bar y 50 °C la solubilidad del aceite es de 1.8 g/kg de CO<sub>2</sub> (tabla 20), lo cual significa que son necesarios 0.55 kg de CO<sub>2</sub> para obtener 1 g de aceite. Si se tiene en cuenta que la concentración de oxígeno en el CO<sub>2</sub> es de 2 ppm, se puede estimar una relación de 1.1 mg de O<sub>2</sub> por gramo de aceite extraído. Si se asume que la masa molecular media de un triglicérido del aceite de nuez es igual a 875, resulta, de las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, una relación molar de 32.89 mol de aceite/mol de O<sub>2</sub>. Por lo tanto, una considerable cantidad de oxígeno está en contacto con la matriz y el aceite extraído, pudiendo ser esta la causa de la reducción observada en la EO.

Las condiciones de extracción no afectaron significativamente la composición acídica de los aceites (tabla 21). Estos resultados concuerdan con los reportados por Calvo *et al.* (1994) y Oliveira *et al.* (2002), quienes observaron que, bajo condiciones

de extracción similares a las analizadas en el presente trabajo, los aceites obtenidos no presentan diferencias significativas en la concentración de ácidos grasos.

Figura 22: Porcentajes de agua y aceite total extraídos durante la parte lineal de las curvas de extracción.



A 400 bar, la solubilidad del aceite en SC - CO<sub>2</sub> fue aproximadamente 5.7 veces superior a la solubilidad del agua, observándose diferencias menores entre las temperaturas. Estos resultados están en concordancia con los reportados por Eggers (1996) quien observó que la solubilidad de los triglicéridos en CO<sub>2</sub>, a presiones de extracción por encima de los 200 bar, es mucho mayor que la solubilidad del agua. A 200 bar, la solubilidad del aceite disminuyó abruptamente con el aumento de la temperatura. Los cambios observados en la solubilidad del aceite y del agua a baja presión (200 bar) y alta temperatura (70 °C) indican que estas condiciones son las menos convenientes para la extracción del aceite con SC - CO<sub>2</sub> a partir del residuo proveniente del prensado.

#### **Objetivo específico 4**

En la tabla 22 y figura 23 se muestran los datos de rendimiento obtenidos con los diferentes tratamientos. El porcentaje de aceite extraído (% AE) se incrementó al aumentar la temperatura del proceso. El porcentaje de finos en el aceite (% F) mostró

la tendencia opuesta. Las extracciones realizadas a 50 °C, con diámetros de boquilla 8 y 10 y un limitador de presión estándar arrojaron los % AE más altos y el menor % F.

Tabla 22: Efecto de distintos tratamientos [temperatura de prensado (°C) – diámetro de boquilla (mm) – tipo de ranura del limitador de presión (estándar, ST; estrellada, E)] sobre los rendimientos de prensado y parámetros químicos del aceite de nuez extraído mediante prensa de tornillo helicoidal, escala industrial.

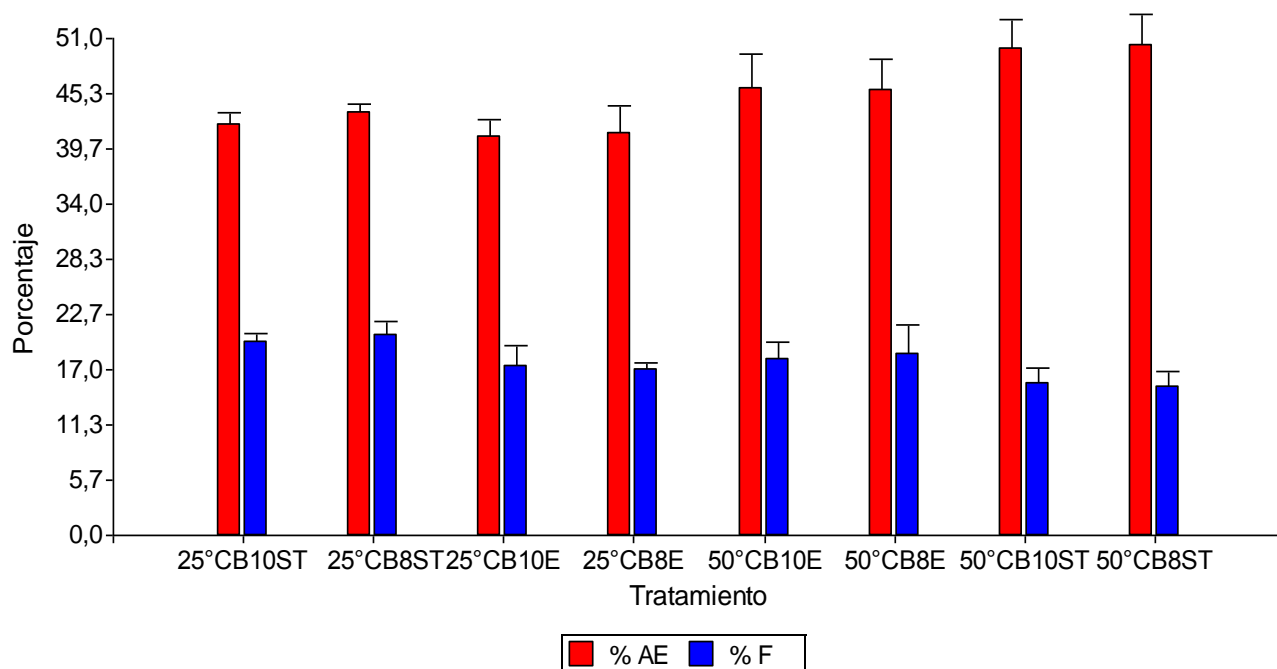
| Parámetro              | Tratamientos               |                           |                            |                            |                            |                            |                            |                            |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        | 25°C B10 ST                | 25°C B8 ST                | 25°C B10 E                 | 25°C B8 E                  | 50°C B10 E                 | 50°C B8 E                  | 50°C B10 ST                | 50°C B8 ST                 |
| <b>AE</b>              | 42.2 <sup>a</sup> ± 1.28   | 43.4 <sup>a</sup> ± 0.81  | 40.8 <sup>a</sup> ± 1.82   | 41.2 <sup>a</sup> ± 2.89   | 45.9 <sup>ab</sup> ± 3.44  | 45.7 <sup>ab</sup> ± 3.26  | 50.0 <sup>b</sup> ± 3.06   | 50.3 <sup>b</sup> ± 3.15   |
| <b>AR</b>              | 57.8 <sup>b</sup> ± 1.28   | 56.6 <sup>b</sup> ± 0.81  | 59.2 <sup>b</sup> ± 1.82   | 58.8 <sup>b</sup> ± 2.89   | 54.1 <sup>ab</sup> ± 3.44  | 54.3 <sup>ab</sup> ± 3.26  | 50.0 <sup>a</sup> ± 3.06   | 49.8 <sup>a</sup> ± 3.15   |
| <b>F</b>               | 19.8 <sup>bc</sup> ± 0.95  | 20.6 <sup>c</sup> ± 1.31  | 17.3 <sup>abc</sup> ± 2.09 | 17.0 <sup>abc</sup> ± 0.65 | 18.0 <sup>abc</sup> ± 1.89 | 18.7 <sup>abc</sup> ± 2.99 | 15.6 <sup>ab</sup> ± 1.64  | 15.2 <sup>a</sup> ± 1.62   |
| <b>GA</b>              | 0.33 <sup>abc</sup> ± 0.03 | 0.27 <sup>a</sup> ± 0.02  | 0.47 <sup>cd</sup> ± 0.13  | 0.48 <sup>d</sup> ± 0.01   | 0.44 <sup>bcd</sup> ± 0.03 | 0.31 <sup>ab</sup> ± 0.03  | 0.28 <sup>a</sup> ± 0.05   | 0.33 <sup>abc</sup> ± 0.10 |
| <b>IP</b>              | 0.50 <sup>ab</sup> ± 0.03  | 0.51 <sup>ab</sup> ± 0.02 | 0.46 <sup>a</sup> ± 0.02   | 0.50 <sup>ab</sup> ± 0.05  | 0.65 <sup>b</sup> ± 0.15   | 0.56 <sup>ab</sup> ± 0.01  | 0.60 <sup>ab</sup> ± 0.09  | 0.50 <sup>ab</sup> ± 0.11  |
| <b>k<sub>232</sub></b> | 1.35 <sup>a</sup> ± 0.04   | 1.35 <sup>a</sup> ± 0.01  | 1.40 <sup>abc</sup> ± 0.06 | 1.38 <sup>ab</sup> ± 0.03  | 1.42 <sup>abc</sup> ± 0.08 | 1.50 <sup>c</sup> ± 0.03   | 1.45 <sup>abc</sup> ± 0.04 | 1.46 <sup>bc</sup> ± 0.04  |
| <b>k<sub>270</sub></b> | 0.09 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.08 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.09 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.09 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.09 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.10 <sup>b</sup> ± 0.01   | 0.09 <sup>a</sup> ± 0.01   | 0.09 <sup>a</sup> ± 0.01   |
| <b>TT</b>              | 332 <sup>c</sup> ± 1.70    | 318 <sup>abc</sup> ± 2.71 | 318 <sup>abc</sup> ± 2.36  | 325 <sup>bc</sup> ± 3.53   | 315 <sup>ab</sup> ± 3.41   | 323 <sup>abc</sup> ± 12.0  | 309 <sup>a</sup> ± 6.15    | 313 <sup>ab</sup> ± 10.9   |
| <b>EO</b>              | 3.21 <sup>a</sup> ± 0.07   | 2.90 <sup>a</sup> ± 0.28  | 3.05 <sup>a</sup> ± 0.23   | 2.79 <sup>a</sup> ± 0.08   | 3.02 <sup>a</sup> ± 0.29   | 2.98 <sup>a</sup> ± 0.23   | 2.95 <sup>a</sup> ± 0.32   | 2.84 <sup>a</sup> ± 0.15   |

Abreviaturas y unidades: AE, aceite extraído (%); AR, aceite residual (%); F, finos en el aceite (%); GA, grado de acidez (% ácido oleico); IP, índice de peróxidos (meq O<sub>2</sub>/kg de aceite); TT, contenido de tocoferoles totales (µg/g de aceite); EO, estabilidad oxidativa (horas).  
Valores medios (n = 3) ± desvíos estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.01) entre los tratamientos.

Sobre la base de estos resultados, es evidente que el rendimiento de la extracción de aceite a nivel industrial resulta marcadamente inferior (un 39.8 %, en promedio) al rendimiento obtenido a escala piloto. Entre las causas de tal merma se pueden mencionar: el mayor tamaño de partícula, el contenido de humedad del material y el diámetro de la restricción empleada.

Por otra parte, y en contraposición a lo observado para el rendimiento de aceite, la cantidad de finos en el aceite extraído es sustancialmente más elevada (un 55.2 %, en promedio) en el proceso industrial. En este sentido, es oportuno mencionar la diferencia en el diámetro de los orificios de salida del aceite, 0.7 y 1 mm, para la prensa escala piloto e industrial, respectivamente. De acuerdo a estas consideraciones, se puede asumir que el mayor % F en el proceso industrial se produce como consecuencia del pasaje de finos al aceite a medida que este abandona el cilindro.

Figura 23: Porcentajes de aceite extraído (% AE) y finos en el aceite (% F) obtenidos mediante los tratamientos indicados en la tabla 11.



En cuanto a los parámetros químicos analizados en los aceites, no se observaron mayores diferencias entre los tratamientos. La temperatura de extracción (25 ó 50 °C) no afectó significativamente el índice de peróxidos (0.46 – 0.65 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite) ni el coeficiente de extinción  $k_{270}$  (0.09 – 0.10), mientras que los valores de  $k_{232}$  fueron algo más

elevados a 50 °C. Por otra parte, estos últimos y los valores de acidez resultaron mayores a los encontrados en los aceites obtenidos por prensado a escala piloto.

El contenido de tocoferoles totales y la estabilidad oxidativa de los aceites variaron entre 309 – 332 µg/g de aceite y entre 2.8 – 3.2 horas, respectivamente. En relación a estos últimos valores, resultan comparables a los determinados en el proceso a escala piloto (2.9 – 3.3 horas).

En el marco de las condiciones empleadas en este trabajo para la extracción mediante prensa de tornillo a escala industrial, puede afirmarse que las mismas son compatibles con la obtención de aceites de buena calidad, equiparable a la del aceite obtenido a menor escala, mediante prensado hidráulico – “en frío” – o por prensa de tornillo escala piloto.



## CONCLUSIONES

Sobre la base de las experiencias de extracción con hexano y teniendo en cuenta el alto contenido de aceite de la pulpa, es evidente que la extracción con solvente no resulta un proceso viable desde el punto de vista operativo y económico.

El tamaño de partícula constituye un factor determinante en este proceso y, tal como quedó demostrado, la extracción es más eficiente con tamaños reducidos (0.5 – 3 mm) que favorecen los fenómenos de difusión, los cuales son limitantes en las extracciones con solventes. Este hecho plantea una dificultad para el caso de la extracción del material estudiado puesto que debido a su elevada concentración de aceite, las pequeñas partículas exudan una considerable proporción del mismo lo cual dificulta los procesos de molienda y tamización previos a la extracción.

Los valores de las pendientes de las curvas de equilibrio de extracción a 25 y 50 °C están próximos a 1, indicando que el aceite es completamente soluble en hexano, por lo que la fuerza impulsora no es función de la concentración. La cantidad óptima de solvente necesaria para lograr la máxima recuperación de aceite resulta muy elevada, alcanzándose con relaciones sólido-solvente cercanas a 1:12. Esto agregaría una dificultad adicional a un posible proceso de extracción con solvente a escala industrial.

De las consideraciones que anteceden, se deduce que la extracción de materiales con tan elevado contenido de aceite debe plantearse mediante el empleo de herramientas y procesos tecnológicos que permitan reducir el mismo significativamente, como las prensas de tornillo helicoidal (“Expeller”) de uso frecuente en la industria aceitera.

Por sus cualidades físicas (tamaño, dureza) la pulpa de nuez constituye un material apropiado para la extracción del aceite por prensado, pero debe ser acondicionado previamente para lograr condiciones (tamaño de partícula, contenido de humedad, temperatura) adecuadas que permitan optimizar el proceso, en términos de rendimiento y calidad del producto.

Las experiencias de extracción por prensado a escala piloto permitieron determinar un rango de tamaño de partícula (2.4 – 4.8 mm) óptimo para la alimentación de la prensa. Los tratamientos (contenido de humedad x temperatura) aplicados a la extracción de este material, indicaron que el contenido de agua resulta un factor fundamental para lograr la máxima recuperación de aceite, lográndose rendimientos de casi el 90 % con materiales conteniendo 7.5 % de humedad, extraídos a 50 °C. La influencia de la temperatura es de menor significación. Sin embargo, con el contenido de humedad indicado anteriormente, un

aumento de la temperatura de 50 a 70 °C provoca una merma en el rendimiento como consecuencia de la aglutinación y compactación del material en el interior del dispositivo de prensado, lo que daría origen a una matriz menos porosa y a una menor fluidificación del aceite.

Asimismo, cabe destacar que la composición química de los aceites obtenidos mediante los diferentes tratamientos resulta comparable con la de aquéllos extraídos a temperatura ambiente, empleando una prensa hidráulica; no se detectan peróxidos y los coeficientes de extinción específica ( $k_{232}$  y  $k_{270}$ ) están comprendidos dentro de los rangos habituales encontrados en aceites vegetales comestibles. La acidez, empero, muestra una influencia significativa del contenido de humedad del material y sobretodo de la temperatura del proceso, incrementándose (desde 0.07 a 0.46) con el aumento de estos parámetros. Las condiciones empleadas en los distintos tratamientos no afectan prácticamente la composición de ácidos grasos ni la estabilidad oxidativa de los aceites.

El aceite obtenido mediante el tratamiento mencionado previamente (7.5 % humedad – 50 °C) fue sometido, además, a almacenamiento prolongado y evaluación de sus atributos sensoriales. Entre éstos se destacan, por sus intensidades, “frutado”, “picante” y “astringente”. En el aceite fresco se detectan bajas intensidades de los atributos “rancio” y “pintura”, pero las mismas se incrementan significativamente al cabo de 120 días de almacenamiento, correlacionándose positivamente con el índice de peróxidos.

El residuo proveniente del prensado con el tratamiento indicado, fue finalmente extraído empleando CO<sub>2</sub> en estado supercrítico (SC - CO<sub>2</sub>) en una planta a escala piloto. Se utilizaron diferentes condiciones de presión y temperatura, lográndose la máxima recuperación de aceite (92 % del total de aceite disponible) a 400 bar.

A masas muy bajas de CO<sub>2</sub> (< 5.25 kg, en promedio) la extracción está determinada por la solubilidad, observándose una relación lineal entre la masa de aceite extraída y la masa de CO<sub>2</sub> utilizada. A masas más elevadas de CO<sub>2</sub> la extracción se explica también por fenómenos de difusión, y la velocidad disminuye continuamente con el tiempo.

La presión del SC - CO<sub>2</sub> tiene un efecto determinante sobre la solubilidad del aceite en el fluido supercrítico observándose incrementos en el orden de 9 a 12 g de aceite/kg de CO<sub>2</sub> cuando la presión de trabajo aumenta de 200 a 400 bar. La presión también afecta significativamente el tiempo de extracción, habiéndose detectado reducciones de más del 50 % (a 70 °C) al duplicar la presión de SC - CO<sub>2</sub>.

La composición de los aceites extraídos con SC - CO<sub>2</sub> no presenta mayores diferencias entre los tratamientos y resulta similar, en términos generales, a la de los aceites de prensado, excepto los contenidos de tocoferoles y pigmentos carotenoides los cuales se encuentran en cantidades significativamente mayores en los primeros. A pesar de este hecho, la estabilidad oxidativa de los aceites obtenidos con SC - CO<sub>2</sub> es extremadamente baja (0.3 – 0.8 horas), confirmando que la aplicación de esta tecnología origina un mayor deterioro oxidativo de los mismos.

Por último, se llevaron a cabo algunas experiencias de extracción con una prensa de tornillo helicoidal de mayor tamaño con el propósito de realizar una aproximación al escalado a nivel industrial del proceso. Sobre la base de los resultados obtenidos, resulta necesario trabajar en la optimización de las condiciones de extracción que permitan incrementar el rendimiento de aceite. Entre los aspectos a considerar en este sentido, y tal como quedó demostrado en las operaciones a escala piloto, será de fundamental importancia ahondar en el estudio del acondicionamiento del material (tamaño y contenido de humedad de la partícula) y condiciones (temperatura, velocidad de prensado) apropiadas para el proceso a escala industrial.

# **CAPITULO III**

**Estabilidad y conservación del aceite de  
nuez**



### III Estabilidad y conservación del aceite de nuez

#### ANTECEDENTES

Las reacciones de oxidación de los lípidos constituyen una de las causas de mayor importancia comercial en la industria alimentaria por las pérdidas que producen en grasas, aceites y alimentos que contienen lípidos. Los sustratos de estas reacciones son fundamentalmente los ácidos grasos no saturados que, cuando están libres, se oxidan por lo general más rápidamente que cuando son parte de moléculas de triglicéridos o fosfolípidos. Pero es sobre todo el grado de insaturación el que influye en la velocidad de oxidación; por ej. a 100 °C las velocidades relativas de oxidación de los ácidos esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) son 1 : 100 : 1000/1500 : 2000/3500, respectivamente (Frankel, 2005). Los ácidos grasos saturados sólo se oxidan a temperaturas superiores a 60 °C, mientras que los poliinsaturados se oxidan incluso durante el almacenamiento de los alimentos, en estado congelado. También pueden sufrir reacciones de oxidación otros sustratos no saturados: algunos hidrocarburos presentes en los aceites (escualeno), las vitaminas A y E y los pigmentos carotenoides. Las reacciones de oxidación motivan una disminución de la calidad nutricional y sensorial de los alimentos, debido a pérdidas de ácidos grasos esenciales, actividad vitamínica y color. Además, algunos productos de oxidación son potencialmente tóxicos (Esterbauer, 1993; Colles *et al.*, 2001; Dobarganese y Márquez-Ruiz, 2003).

Los ácidos grasos poliinsaturados, como el linoleico y el linolénico, tienen en común la presencia de dobles enlaces separados entre sí por los dos enlaces simples de un grupo metileno (CH<sub>2</sub>) interruptor. Los átomos de hidrógeno de este grupo CH<sub>2</sub> están activados por la vecindad de los dobles enlaces y son más reactivos que otros hidrógenos de la molécula del ácido graso. La luz y el calor favorecen la oxidación. La remoción de un átomo de hidrógeno a partir del grupo CH<sub>2</sub> interruptor produce un radical alquilo inestable, el cual sufre inmediatamente una estabilización electrónica para formar híbridos de resonancia conjugados. En condiciones de presión normal de oxígeno, el radical alquilo reacciona rápidamente con el oxígeno para formar el radical peróxido. Éste sustrae un átomo de hidrógeno a otra molécula de ácido graso para formar un hidroperóxido y un nuevo radical alquilo libre. Esta secuencia de reacciones constituyen la auto-oxidación de lípidos propiamente dicha y se caracteriza por la acumulación de peróxidos lipídicos (hidroperóxidos). Finalmente, los hidroperóxidos se rompen en varias etapas dando lugar a una amplia variedad de productos de descomposición entre los que se encuentran

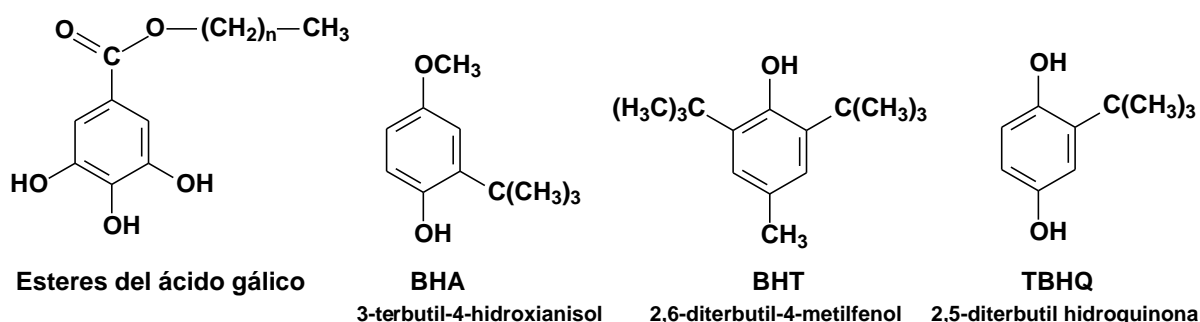
hidrocarburos, aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, furanoides, etc. Desde el punto de vista práctico, los aldehídos volátiles que se forman tienen gran importancia debido a que imparten sabores y olores rancios a las grasas, aceites o alimentos que los contienen. Algunos de ellos (hexanal, 2-decenal) se aprecian en concentraciones muy bajas.

Tal como quedó demostrado en el Capítulo I, el aceite de nuez posee un elevado contenido de ácidos poliinsaturados (> 68 %) por lo que constituye un sustrato particularmente susceptible al ataque por el oxígeno atmosférico. La adición de antioxidantes, en su mayor parte sintéticos, es un procedimiento tecnológico habitual en la industria alimentaria ya que mejora la estabilidad de los lípidos y prolonga la vida útil de los alimentos que los contienen. Los mecanismos por los cuales estas sustancias ejercen su actividad son diferentes y su eficacia se ve influenciada notablemente por las características del sustrato (Yanishlieva y Marinova, 2001; Decker *et al.*, 2005; Frankel, 2005).

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

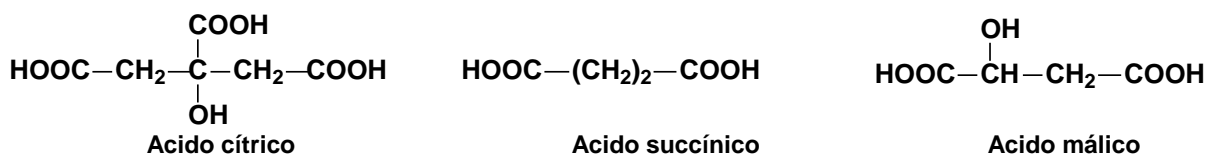
- Tipo I: Se trata de sustancias capaces de interrumpir la propagación en cadena de radicales libres actuando como donores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres. Los principales antioxidantes de Tipo I utilizados en los alimentos son los fenoles mono o polihidroxilados con varias sustituciones en el anillo (figura 24).

**Figura 24: Antioxidantes de Tipo I – Compuestos fenólicos sintéticos**



- Tipo II: Los antioxidantes de esta categoría son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres. Los más utilizados son los agentes que acomplejan los metales. Muchos de los agentes quelantes utilizados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como los ácidos policarboxílicos (cítrico, málico, succínico, etc., figura 25) y macromoléculas (porfirinas y proteínas).

**Figura 25: Antioxidantes de Tipo II – Quelantes o secuestrantes de metales**

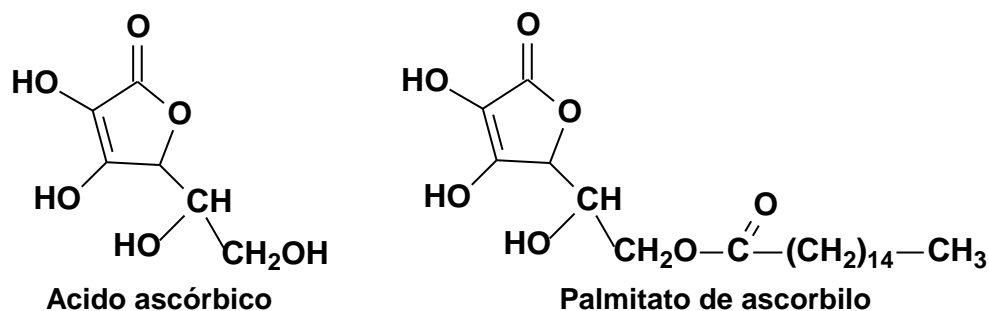


- Tipo III: Se clasifican en esta categoría los procedimientos de protección contra la oxidación, que consisten en establecer condiciones físicas o físico-químicas (contenido de oxígeno en el embalaje, humedad, temperatura, iluminación, pH, etc.) convenientemente escogidas.

Si bien la mayor parte de los antioxidantes de grado alimentario son sustancias fenólicas sintéticas – como las mostradas en la figura 24 - a la luz de las nuevas tendencias en alimentación, la presencia de estos aditivos sintéticos está siendo cuestionada cada vez en mayor grado. Muchas sustancias naturales, entre las que se encuentran fenoles simples, ácidos fenólicos, carotenoides, antocianinas y flavonoides, presentan propiedades antioxidantes (Maestri *et al.*, 2006).

El ácido ascórbico (figura 26) es una sustancia que posee propiedades fuertemente reductoras, debido a la presencia del grupo enodiol. En consecuencia, además de su actividad vitamínica, presenta propiedades antioxidantes y se lo utiliza como aditivo para esa finalidad, a menudo en combinación con un antioxidante fenólico. Si bien el mecanismo de acción no está completamente esclarecido, la mezcla de ambos antioxidantes tiene frecuentemente una acción sinérgica. Se cree que el ácido ascórbico puede regenerar el antioxidante fenólico proporcionando átomos de hidrógeno a los radicales fenoxi. Para conseguir la actividad deseada es necesario a veces incrementar el carácter lipófilo del ácido ascórbico lo que se consigue mediante la esterificación con ácidos grasos (habitualmente láurico o palmítico).

**Figura 26: Acido ascórbico y palmitato de ascorbilo**



Cort (1974) estudió el efecto antioxidante del TBHQ, ácido ascórbico, BHT, palmitato de ascorbilo y la combinación de estos dos últimos, sobre el aceite de soja almacenado a 45 °C y reportó el siguiente orden de efectividad: 200 ppm de TBHQ > 200 ppm de palmitato de ascorbilo > 100 ppm de palmitato de ascorbilo más 100 ppm de BHT > 100 ppm de palmitato de ascorbilo > 200 ppm de ácido ascórbico > 200 ppm de BHT. El palmitato de ascorbilo también resultó ser más efectivo que el BHT retardando reacciones de oxidación acelerada en aceites de girasol, maní, maíz y cártamo.

Por otra parte, McMullen *et al.* (1991) observó que el palmitato de ascorbilo (200 ppm) retarda el enranciamiento del aceite de canola almacenado a 65 °C, pero tiene un efecto limitado sobre el deterioro foto-oxidativo.

Más recientemente, Hras *et al.* (2000) compararon la actividad antioxidante de un extracto de romero (rico en ácido carnósico),  $\alpha$ -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico, solos y en combinación, sobre aceite de girasol almacenado a 60 °C. Estos autores observaron un efecto sinérgico del extracto de romero cuando se combina con palmitato de ascorbilo o con ácido cítrico, disminuyendo la formación de peróxidos y productos de oxidación secundarios.

Finalmente, Horn *et al.* (2009) evaluaron la estabilidad oxidativa de barras de cereal aditivadas con aceite de pescado, utilizando ácido cafeico, palmitato de ascorbilo o  $\gamma$ -tocoferol como antioxidantes. Para cada una de estas sustancias, observaron efectos pro y antioxidantes, dependientes de la concentración.

A partir de numerosas evidencias científicas, como las reseñadas anteriormente, parece evidente que la valoración del efecto antioxidante de las diversas sustancias ensayadas a tal fin, constituye un aspecto de la investigación sumamente empírico. Una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible hasta el momento, da cuenta de la carencia de estudios científicos en donde se evalúen alternativas para la conservación del aceite de nuez.

En este capítulo se propone analizar el efecto de algunas sustancias naturales y sintéticas sobre la estabilidad oxidativa y la conservación del aceite de nuez.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Extraer y purificar la fracción de compuestos fenólicos presentes en el residuo de extracción del aceite y evaluar sus propiedades antioxidantes.



- Analizar la eficacia del BHT, TBHQ, ácido ascórbico y palmitato de ascorbilo, solos o en diferentes combinaciones, sobre la estabilidad oxidativa y la conservación del aceite de nuez en condiciones de almacenamiento prolongado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Extracción y purificación de la fracción fenólica**

Se utilizó el residuo de extracción del aceite, proveniente de la prensa de tornillo helicoidal escala piloto, obtenido mediante el tratamiento: humedad del material 4.5 %, temperatura de prensado 50 °C.

La extracción de la fracción fenólica se llevó a cabo en forma pasiva. Se colocaron 400 g de material en 1000 ml de etanol: agua destilada (70:30, v/v), en oscuridad, a 4 °C, en atmósfera de nitrógeno, durante 72 h. Se realizó una filtración a través de papel Whatman Nº 1 y el filtrado se concentró en evaporador rotatorio a  $38 \pm 2$  °C, en oscuridad. Con la finalidad de extraer restos de material lipídico, el extracto resultante se particionó empleando porciones de 40 ml de hexano hasta que las mismas no presentaban color. Se recuperó la fracción soluble en etanol: agua, se evaporó a sequedad y se determinó el rendimiento de de extracto crudo por gravimetría. Finalmente, se diluyó en 50 ml del mismo disolvente utilizado para la extracción.

Se sembraron 2 ml del extracto crudo diluido en una columna cromatográfica (35 cm de longitud, 1 cm de diámetro interno), utilizando como adsorbente Diaion HP 20. La elusión de la columna se llevó a cabo empleando los volúmenes indicados de cada uno de los disolventes de la siguiente serie eluotrópica: agua destilada (140 ml), etanol (10 %, v/v, 295 ml), etanol (20 %, v/v, 830 ml), etanol (100 %, 135 ml). Cada una de las fracciones recogidas se evaporó a sequedad obteniéndose los siguientes rendimientos: 67.2, 4.21, 8.3 y 2.44 %, respectivamente.

### **Determinación del contenido de fenoles totales (CFT)**

EL CFT del extracto crudo deslipidizado y de cada una de las fracciones purificadas se determinó utilizando el reactivo de Folin–Ciocalteu (Siddhuraju y col., 2002). En un tubo de ensayo se colocó 0.1 ml de extracto, 0.2 ml de reactivo de Folin–Ciocalteu y 4 ml de solución de carbonato de sodio (30 %, p/v). Se llevó a un volumen final de 4 ml con agua destilada. Luego de 1 hora de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia de la solución a 765 nm. En forma paralela se construyó una curva de calibración usando ácido gálico como patrón. El CFT se expresó en miligramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto crudo deslipidizado (ECD) o de cada una de las fracciones purificadas (FP).

### **Determinación de la actividad antirradicalaria**

Se determinó la actividad secuestrante de radicales libres del ECD y de las FP utilizando el radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo a la metodología descrita por Braca *et al.* (2001). A 0.1 ml de extracto se le agregó 3 ml de solución metanólica de DPPH (0.004 %, p/v). Luego de 30 min de incubación se midió la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de inhibición frente al DPPH· se calculó con la siguiente ecuación:  $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , donde  $A_0$  es la absorbancia del blanco (solución metanólica de DPPH·) y  $A_1$  es la absorbancia de la solución del extracto.

Mediante la determinación de la absorbancia de disoluciones con diferentes concentraciones de ECD y de cada una de las FP, se calcularon los valores de  $EC_{50}$  (cantidad de antioxidante necesaria para disminuir al 50 % la concentración inicial de DPPH·). A los fines comparativos, se utilizaron BHT, TBHQ, ácido ascórbico y palmitato de ascorbilo.

### **Determinación de la capacidad antioxidante**

Se utilizaron dos concentraciones (600 y 1200 ppm) de ECD y de las FP (excepto la fracción acuosa debido a su bajo CFT y elevado  $EC_{50}$ ). Cada una de las mismas, se agregó de manera individual a 5 ml de aceite de nuez de la variedad Franquette cuyas características principales se resumen en la tabla 23. La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 110 °C) (Frankel, 2005). Se calculó un factor de protección (FProt) empleando la siguiente ecuación:

$$FProt = [\text{Tiempo de inducción del aceite con antioxidante (horas)} / \text{Tiempo de inducción del aceite sin antioxidante (horas)}].$$

Tabla 23: Características químicas del aceite de la variedad Franquette utilizado para determinar la capacidad antioxidante del extracto fenólico crudo deslipidizado y de las fracciones purificadas.

| Parámetro   | Valor medio (n = 3) ± DE |
|---|--------------------------|
| Grado de acidez (% Ac. oleico)                      | 0.07 ± 0.01              |
| Índice de peróxido (meq. O <sub>2</sub> /kg aceite) | 0.49 ± 0.01              |
| K <sub>232</sub>                                    | 1.09 ± 0.08              |
| K <sub>270</sub>                                    | 0.07 ± 0.01              |
| Ácidos grasos (%)                                   |                          |
| <i>Palmítico</i>                                    | 6.96 ± 0.40              |
| <i>Esteárico</i>                                    | 1.89 ± 0.20              |
| <i>Oleico</i>                                       | 24.6 ± 0.79              |
| <i>Linoleico</i>                                    | 53.5 ± 0.10              |
| <i>Linolénico</i>                                   | 13.1 ± 0.08              |
| Tocoferoles totales (µg/g aceite)                   | 297 ± 18.8               |
| Carotenoides (µg/g aceite)                          | 0.91 ± 0.24              |
| Clorofilas (µg/g aceite)                            | 0.54 ± 0.03              |
| Estabilidad oxidativa (Rancimat, horas)             | 3.60 ± 0.07              |

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

Con el propósito de evaluar la estabilidad del aceite frente a la foto-oxidación, se diseñó un ensayo de almacenamiento prolongado en una cámara con iluminación permanente (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) y temperatura controlada (25 °C). El aceite se obtuvo por prensado (prensa de tornillo escala piloto) bajo las siguientes condiciones: humedad del material, 7.5% y temperatura de extracción, 50°C.

Para la selección de los aditivos antioxidantes utilizados, se tuvieron en cuenta los factores de protección obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación y la solubilidad de las sustancias. De esta manera, se descartó el uso de BHT (por su menor factor de protección en relación al del TBHQ) y del ácido ascórbico (por sus características hidrofílicas que le confieren baja solubilidad en el aceite). Para TBHQ se utilizó la máxima cantidad permitida (200 ppm) – según el Código Alimentario Argentino (CAA) – para aditivos antioxidantes en aceites, la mitad de esta máxima concentración, y una mezcla de este antioxidante con palmitato de ascorbilo. Todos los aceites aditivados presentaron un aspecto translúcido. En la tabla 24 se resumen los tratamientos utilizados. Los aceites se colocaron en envases de vidrio transparente de 500 ml de capacidad. La condición de almacenamiento en oscuridad se logró recubriendo los envases con una lámina de aluminio. Los aceites se

almacenaron durante un periodo de 6 meses. Con una periodicidad quincenal se extrajeron muestras de cada uno de los tratamientos a fin de evaluar posibles cambios en la calidad química de los aceites. El volumen de muestra extraído de cada tratamiento fue de 18 cm<sup>3</sup>. Las muestras fueron almacenadas en recipientes cerrados, de vidrio color ambar de 30 cm<sup>3</sup> de capacidad (6 cm de alto y 3.5 cm de diámetro externo), en atmósfera de nitrógeno.

Se determinaron el índice de peróxidos, los coeficientes de extinción específica ( $k_{232}$  y  $k_{270}$ ), la actividad antirradicalaria y la estabilidad oxidativa (Rancimat) de los aceites según metodología descrita en el Capítulo I. En forma paralela se realizó la evaluación de los tratamientos indicados en la tabla 24, pero sin extracción de muestras, con el propósito de examinar la calidad de los aceites almacenados en los recipientes cerrados, durante un periodo de 6 meses. En este caso se determinaron, además de los parámetros químicos ya mencionados, el grado de acidez y la composición de ácidos grasos.

Tabla 24: Tratamientos utilizados para evaluar la estabilidad del aceite de nuez frente a la foto-oxidación (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) en un ensayo de almacenamiento prolongado.

| <b>Ensayo dinámico (con extracción de muestras)</b> |   |                           |
|---|---|---------------------------|
| <b>Código</b>                                       | <b>Tratamiento</b>                                | <b>Condición lumínica</b> |
| LA  | Control   | Luz                       |
| OB  |   | Oscuridad                 |
| LC  | TBHQ (200 ppm)                                    | Luz                       |
| OD  |   | Oscuridad                 |
| LE  | TBHQ (100 ppm)                                    | Luz                       |
| OF  |   | Oscuridad                 |
| LG  | TBHQ (100 ppm) + Palmitato de ascorbilo (100 ppm) | Luz                       |
| OH  |   | Oscuridad                 |
| <b>Ensayo estático (sin extracción de muestras)</b> |   |                           |
| <b>Código</b>                                       | <b>Tratamiento</b>                                | <b>Condición lumínica</b> |
| LK  | Control   | Luz                       |
| OM  |   | Oscuridad                 |
| LP  | TBHQ (200 ppm)                                    | Luz                       |
| OR  |   | Oscuridad                 |
| LS  | TBHQ (100 ppm)                                    | Luz                       |
| OT  |   | Oscuridad                 |
| LU  | TBHQ (100 ppm) + Palmitato de ascorbilo (100 ppm) | Luz                       |
| OX  |   | Oscuridad                 |

### **Análisis estadístico**

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las diferencias entre los tratamientos se estimaron mediante análisis de la varianza (ANAVA). En aquellos casos en

donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples (LSD).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El CFT presentó diferencias estadísticamente significativas entre los extractos analizados (tabla 25). La menor concentración se observó en el extracto acuoso, incrementándose notoriamente con el agregado de etanol, hasta alcanzar la concentración máxima en el extracto etanol: agua (20:80, v/v). Estas diferencias en el CFT reflejan variaciones en la solubilidad de los componentes presentes en los extractos, de acuerdo al disolvente utilizado. Los compuestos fenólicos encontrados en la semilla del nogal son en su mayor parte polifenoles (Fukuda *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Éstos comprenden principalmente al ácido gálico y sus ésteres y al ácido elágico, los cuales, cuando se encuentran como polímeros unidos a azúcares, se conocen como taninos hidrolizables (figura 27).

El porcentaje de inhibición frente al DPPH· (tabla 25), que refleja la actividad antirradicalaria de los extractos, fue más elevado en la fracción extraída con etanol (100 %). Esto puede atribuirse a una mayor extractabilidad del ácido gálico y sus derivados, más solubles en alcohol que en agua, y con mayor actividad antioxidante en relación a moléculas de alto peso molecular como los taninos condensados.

El valor de  $EC_{50}$  es un parámetro ampliamente utilizado para comparar la capacidad antirradicalaria (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Visioli *et al.*, 1998; Fukuda *et al.*, 2003; Arranz *et al.*, 2008 a; Zhang *et al.*, 2009). En correspondencia con los porcentajes de inhibición del DPPH·, los extractos etanólicos presentaron los valores de  $EC_{50}$  más bajos (tabla 25). Estos valores resultaron, por otra parte, similares al obtenido con la solución de ácido ascórbico e inferiores al de las soluciones de TBHQ, BHT y palmitato de ascorbilo.

El ensayo de actividad de los extractos frente a la termo-oxidación permitió calcular los factores de protección correspondientes (tabla 26). Aunque los valores registrados tuvieron un incremento significativo al duplicar la concentración de extracto (600 ppm vs 1200 ppm), resultaron muy bajos en comparación con los obtenidos utilizando los compuestos antioxidantes de referencia. Estos resultados indican, en principio, que los compuestos fenólicos presentes en el residuo de extracción del aceite, si bien muestran una elevada actividad inhibidora de radicales libres, tienen escasa eficacia para estabilizar el aceite en las condiciones utilizadas en el ensayo de termo-oxidación.

Tabla 25: Contenido de fenoles totales [CFT, mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto crudo deslipidizado (ECD) o de cada una de las fracciones purificadas (FP)], porcentaje de inhibición frente al DPPH· y valores de EC<sub>50</sub> (ug/ml).

| Muestra                | CFT                       | % Inhibición DPPH        | EC <sub>50</sub>          |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| ECD                    | 6.67 <sup>a</sup> ± 0.06  | 62.3 <sup>b</sup> ± 1.13 | 10.4 <sup>b</sup> ± 0.16  |
| FP1                    | 4.80 <sup>b</sup> ± 0.01  | 26.6 <sup>a</sup> ± 1.18 | 72.9 <sup>c</sup> ± 6.51  |
| FP2                    | 6.20 <sup>c</sup> ± 0.01  | 73.0 <sup>c</sup> ± 0.76 | 4.42 <sup>a</sup> ± 0.05  |
| FP3                    | 12.21 <sup>e</sup> ± 0.01 | 87.3 <sup>d</sup> ± 0.75 | 3.74 <sup>a</sup> ± 0.05  |
| FP4                    | 9.07 <sup>d</sup> ± 0.09  | 91.7 <sup>e</sup> ± 0.68 | 4.13 <sup>a</sup> ± 0.47  |
| BHT                    |                           |                          | 10.1 <sup>b</sup> ± 0.02  |
| TBHQ                   |                           |                          | 5.80 <sup>ab</sup> ± 0.01 |
| Acido ascórbico        |                           |                          | 4.14 <sup>a</sup> ± 0.01  |
| Palmitato de ascorbilo |                           |                          | 10.3 <sup>b</sup> ± 0.01  |

Abreviaturas: FP1, fracción extraída con agua destilada; FP2, fracción extraída con etanol (10 %, v/v); FP3, fracción extraída con etanol (20 %, v/v); FP4, fracción extraída con etanol (100 %). Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios en cada columna seguidos por letras diferentes difieren significativamente (p ≤ 0.05).

Figura 27: Compuestos polifenólicos presentes en la semilla del nogal.

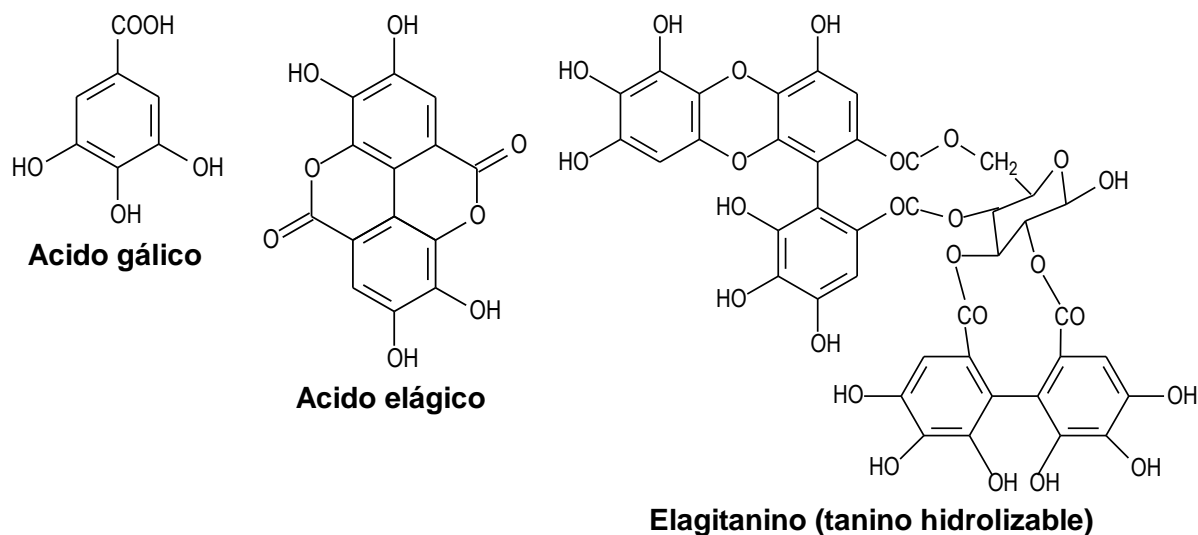


Tabla 26: Factores de protección de los extractos fenólicos, obtenidos a partir del ensayo de termo-oxidación mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 l/h, temperatura 110 °C).

| Muestra                | Concentración (ppm) | Factor de protección      |
|------------------------|---------------------|---------------------------|
| ECD                    | 600                 | 1.02 <sup>a</sup> ± 0.01  |
|                        | 1200                | 1.20 <sup>c</sup> ± 0.01  |
| FP2                    | 600                 | 1.13 <sup>b</sup> ± 0.01  |
|                        | 1200                | 1.16 <sup>bc</sup> ± 0.01 |
| FP3                    | 600                 | 1.01 <sup>a</sup> ± 0.01  |
|                        | 1200                | 1.16 <sup>bc</sup> ± 0.01 |
| FP4                    | 600                 | 1.13 <sup>b</sup> ± 0.01  |
|                        | 1200                | 1.16 <sup>bc</sup> ± 0.01 |
| BHT                    | 200                 | 1.76 <sup>d</sup> ± 0.06  |
| TBHQ                   | 200                 | 3.39 <sup>g</sup> ± 0.01  |
| Ácido ascórbico        | 100                 | 1.98 <sup>e</sup> ± 0.05  |
| Palmitato de ascorbilo | 100                 | 2.21 <sup>f</sup> ± 0.03  |

Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios seguidos por letras diferentes difieren significativamente (p ≤ 0.05).

En las figuras 28, 29 y 30 se muestra la evolución de parámetros oxidativos, a lo largo del periodo de almacenamiento, en los distintos tratamientos. De su análisis conjunto surge que la condición lumínica ejerce un efecto significativo sobre la generación de productos de oxidación primarios en el aceite de nuez. Los aceites adicionados con TBHQ y TBHQ más palmitato de ascorbilo, cuando fueron almacenados en presencia de luz, no se diferenciaron significativamente del tratamiento control (aceite sin aditivos), indicando que las sustancias ensayadas fueron poco eficaces para inhibir o retardar la producción de dienos y trienos conjugados y para prolongar el periodo de inducción (tiempo necesario para que la acumulación de peróxidos alcance el valor de 20 meq/kg, Economou *et al.*, 1991) de los aceites almacenados.

De acuerdo a Wong (1995) y Frankel (2005) la foto-oxidación representa una vía importante de generación de peróxidos a partir de ácidos grasos insaturados, cuando la misma sucede en presencia de un fotosensibilizador adecuado como las clorofilas, feofitinas o flavinas. Estas reacciones de oxidación fotosensibilizadas, al igual que las que ocurren durante la auto-oxidación, conducen a la formación de peróxidos pero, a diferencia de estas últimas, no presentan un periodo de inducción apreciable puesto que no son inhibidas ni retardadas por sustancias inhibitoras de la propagación en cadena de radicales libres, como los antioxidantes añadidos (TBHQ, palmitato de ascorbilo) o los que están presentes naturalmente en el aceite (tocoferoles).



Si bien el aceite de nuez utilizado como sustrato para evaluar la actividad antioxidante de las diversas sustancias ensayadas en este trabajo (tabla 23) contiene una baja concentración (0.54 ppm) de clorofilas, de acuerdo a Suzuki *et al.* (1984) esta cantidad del pigmento fotosensibilizador es suficiente para la producción fotoquímica de oxígeno singulete. Esta es una especie altamente reactiva del oxígeno y puede reaccionar más rápidamente (unas 1500 veces más rápido que el oxígeno en su forma más estable, el estado triplete) con zonas de densidad electrónica alta, como los dobles enlaces C – C de los ácidos grasos insaturados.

A diferencia de lo observado por Lee *et al.* (1997) durante la oxidación fotosensibilizada – mediada por clorofila – del aceite de soja, los resultados hallados en el presente trabajo sugieren que el palmitato de ascorbilo no resulta efectivo como inhibidor de reacciones de foto-oxidación ni potencia la actividad antioxidante del TBHQ en tales procesos.

En cuanto a la actividad antioxidante de los pigmentos carotenoides, Warner y Frankel (1987) han demostrado que el  $\beta$ -caroteno, en concentraciones comprendidas entre 5 y 20 ppm, posee un efecto protector contra el deterioro, inducido por la luz, del aceite de soja. A juzgar por estos resultados, y teniendo en cuenta las similitudes en la composición de ácidos grasos de los aceites de soja y nuez, se puede presumir que el contenido de carotenoides en el aceite de nuez utilizado como sustrato (0.91 ppm, tabla 23) es insuficiente para impartir alguna protección frente al deterioro foto-oxidativo del mismo.

En ausencia de luz, los aceites con agregado de antioxidantes, a diferencia del control sin aditivos, no mostraron incrementos en sus valores de peróxidos y coeficientes de extinción específicos a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. No se observaron variaciones significativas entre los tratamientos aditivados para estos parámetros. Estos resultados indican que: a) los tratamientos con TBHQ, solo o en combinación con palmitato de ascorbilo, resultan igualmente eficaces para inhibir la formación de productos de oxidación primarios en el aceite de nuez, b) la actividad del TBQH, para las dos concentraciones ensayadas (100 y 200 ppm) no es dependiente de las mismas, c) el efecto protector del TBHQ sobre la estabilidad oxidativa del aceite de nuez puede lograrse con una concentración muy inferior (100 ppm) a la máxima permitida (200 ppm) por el CAA para antioxidantes sintéticos en aceites vegetales.

Figura 28: Evolución del índice de peróxidos (meq  $O_2/kg$  aceite) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

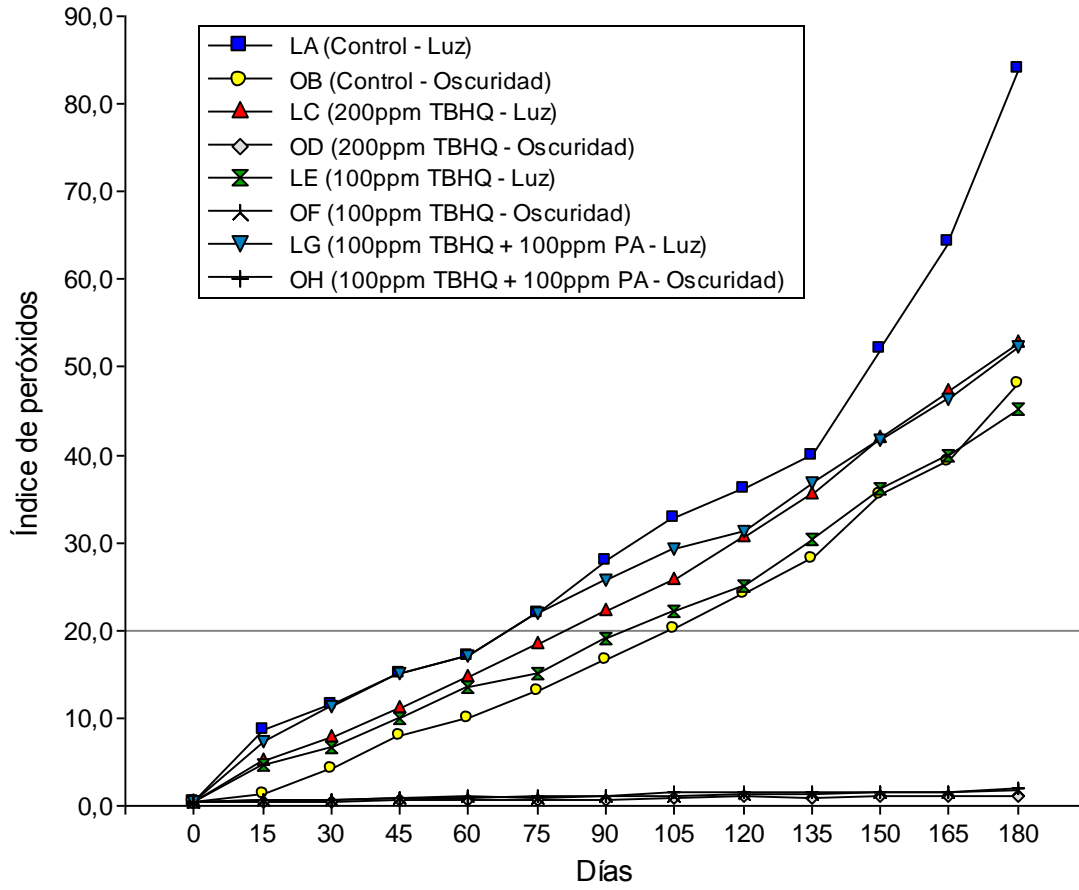


Figura 29: Evolución del coeficiente de extinción específica ( $k_{232}$ , dienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

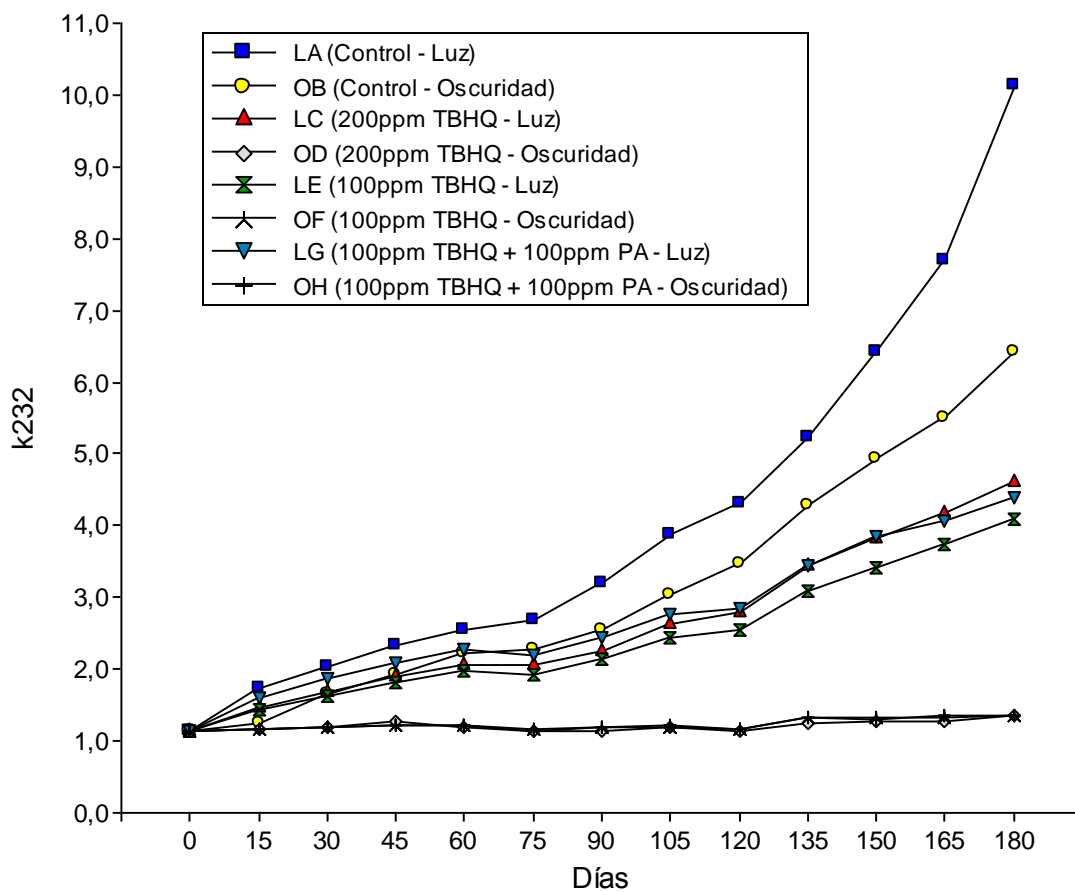
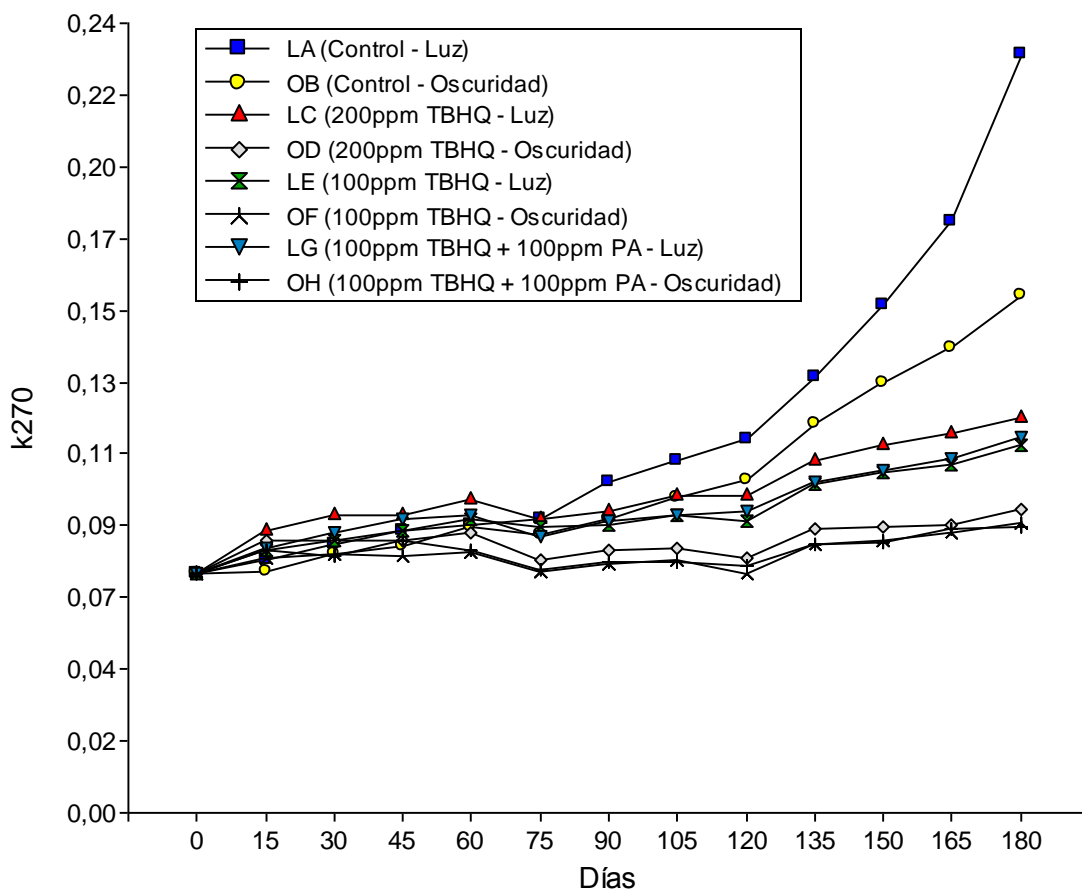


Figura 30: Evolución del coeficiente de extinción específica ( $k_{270}$ , trienos conjugados) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.



Con respecto a la actividad antirradicalaria de los distintos tratamientos, la valoración del DPPH remanente (DPPH<sub>r</sub>) a lo largo del ensayo de almacenamiento proporciona una medida de la capacidad de las sustancias antioxidantes para estabilizar radicales libres.

Los tratamientos se asociaron en tres grupos bien definidos (figura 31). Los aceites sin aditivos presentaron los valores más elevados de DPPH<sub>r</sub>, demostrando una reducida capacidad secuestrante de radicales libres, la cual puede ser atribuida a su contenido en tocoferoles. No obstante, los valores de DPPH<sub>r</sub> en estos aceites permanecieron prácticamente constantes a pesar de la disminución del contenido de tocoferoles totales observada durante el periodo de almacenamiento (figura 32).

Por otra parte, los tratamientos adicionados con 200 ppm de TBHQ (tanto en luz como en oscuridad) tuvieron valores de DPPH<sub>r</sub> significativamente más bajos que los restantes tratamientos aditivados (figura 31). Estos resultados indican que el TBHQ es un efectivo inhibidor de radicales libres manteniendo su actividad al menos durante un periodo de 6 meses. También demuestran que dicha actividad no resulta afectada por la luz, pero es dependiente de la concentración del antioxidante.

Los tratamientos adicionados con TBHQ (100 ppm) y TBHQ + palmitato de ascorbilo no se diferenciaron significativamente, confirmando que el palmitato de ascorbilo no ejerce un efecto aditivo sobre la actividad antirradicalaria del TBHQ.

La estabilidad oxidativa (tiempo de inducción, Rancimat) del aceite aditivado con 200 ppm de TBHQ, en presencia de luz (figura 33) fue significativamente más elevada que la del tratamiento con 100 ppm del mismo compuesto. El comportamiento de este último, por otra parte, resultó similar al tratamiento TBHQ + palmitato de ascorbilo. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos control almacenados en luz y oscuridad. La estabilidad oxidativa de los tratamientos aditivados, mantenidos en oscuridad, resultó superior a las 12 horas en todos los casos (estos datos no se muestran en la figura correspondiente debido a que las lecturas se realizaron hasta las 12 horas con un equipo semi-automático).

Figura 31: Evolución de la actividad antirradicalaria (DPPH remanente) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

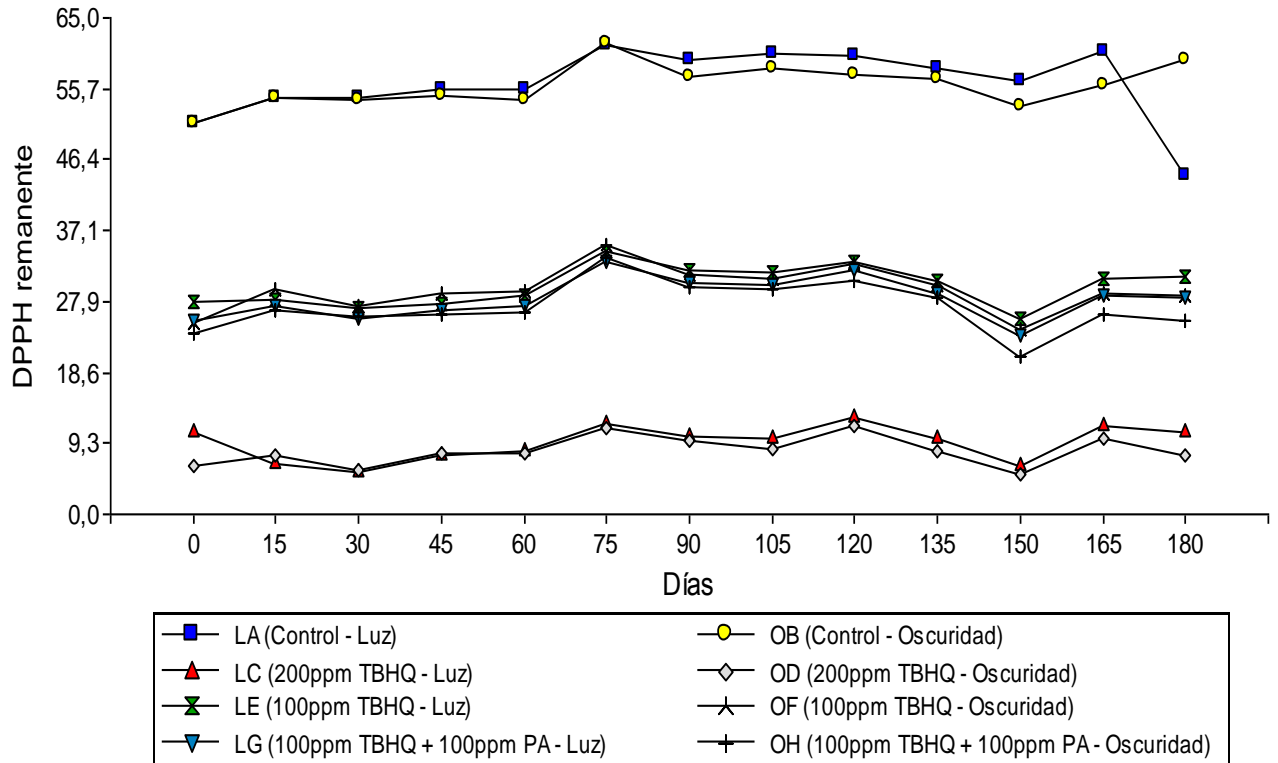


Figura 32: Evolución del contenido de tocoferoles totales (TT, µg/g aceite) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.

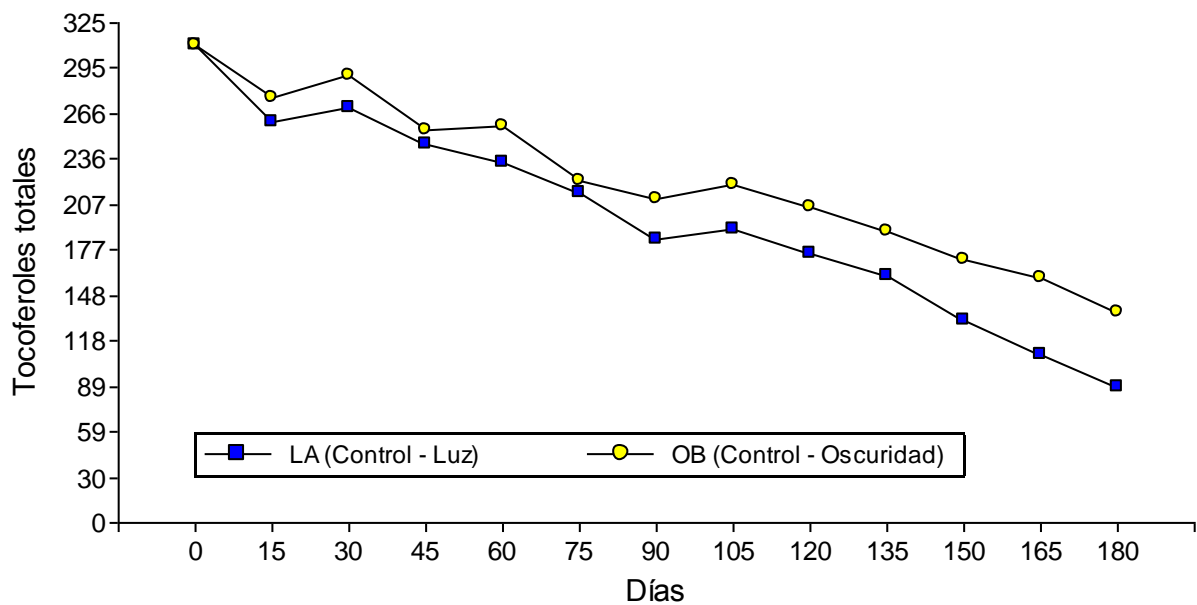
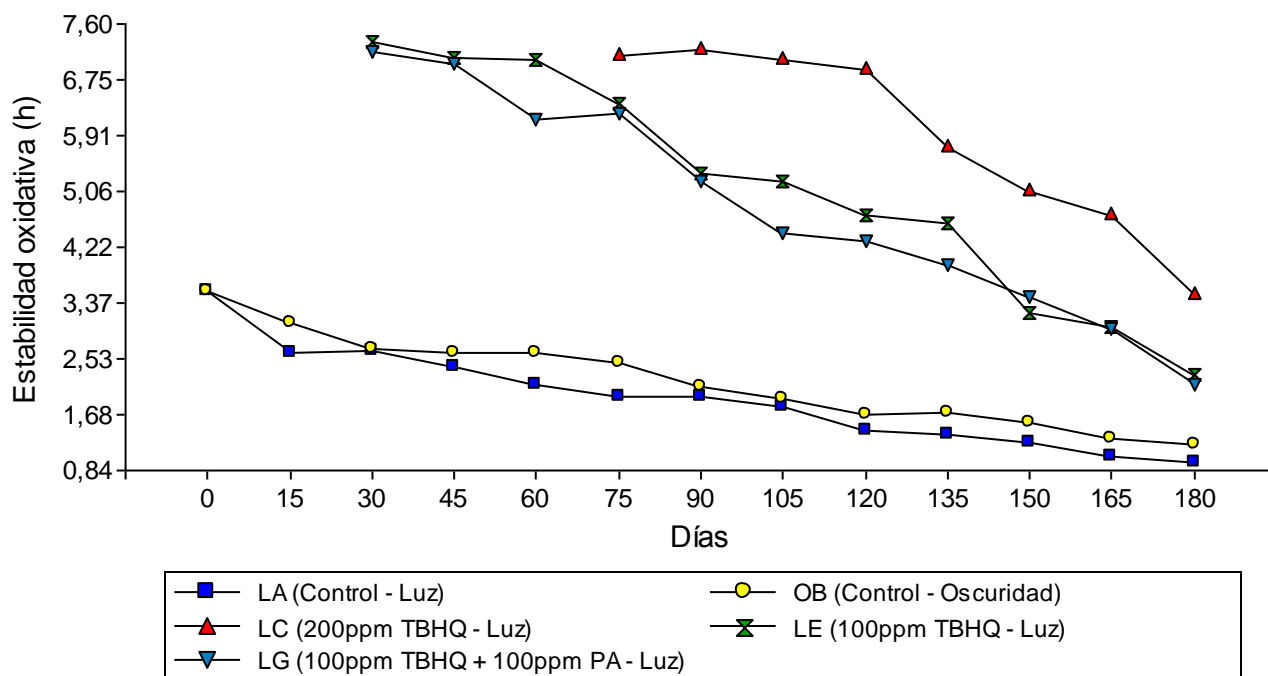
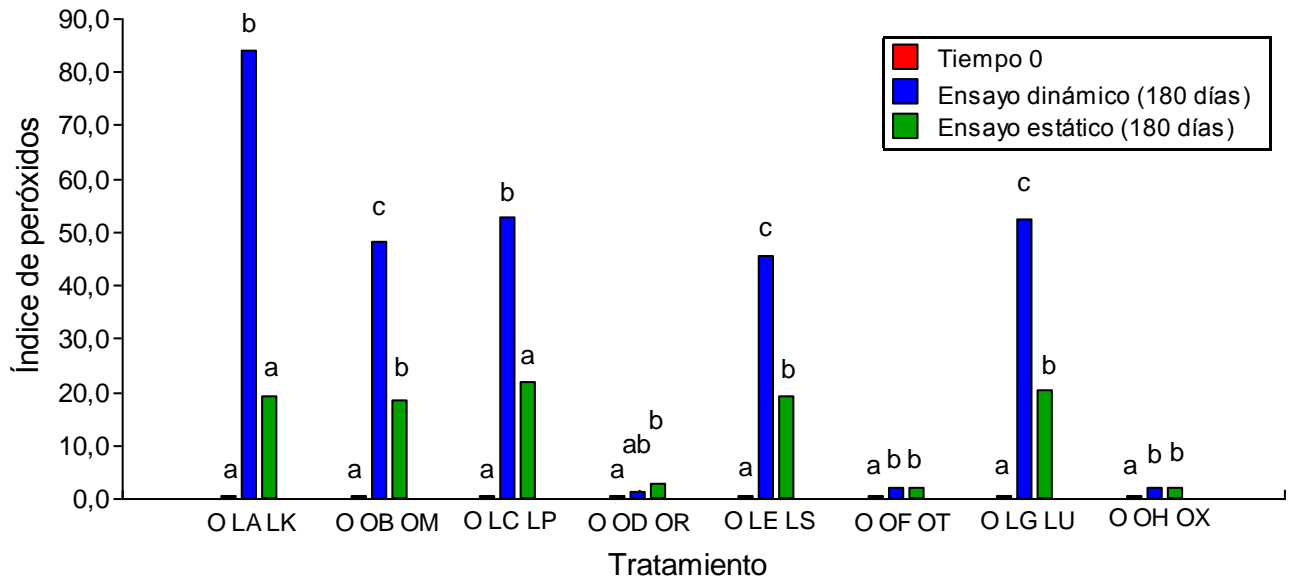


Figura 33: Evolución de la estabilidad oxidativa (tiempo de inducción, Rancimat) durante el almacenamiento del aceite de nuez en condiciones de iluminación (800 Lux) – oscuridad y temperatura (25 °C) controladas.



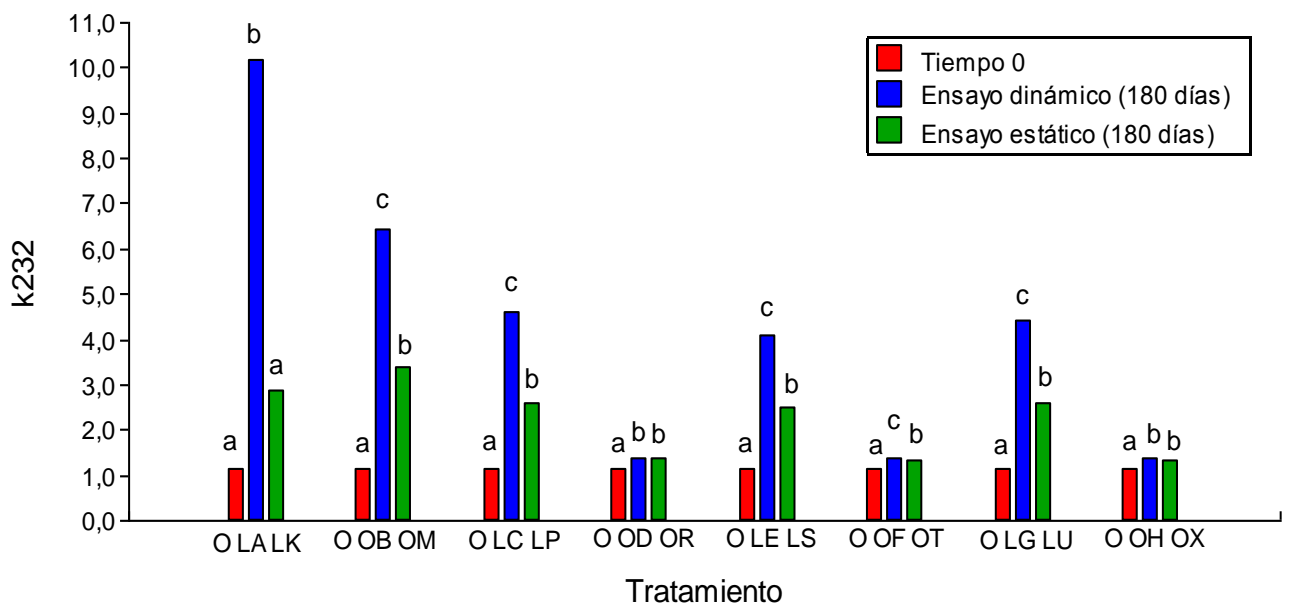
En relación al ensayo estático (sin extracción de muestras), los aceites sin aditivos, almacenados tanto en luz como en oscuridad, mostraron una reducción altamente significativa en sus valores de peróxidos, dienos y trienos conjugados, con respecto a los mismos aceites provenientes del ensayo dinámico (con extracción de muestras) analizados a los 180 días de almacenamiento (figuras 34, 35, 36). La misma tendencia se observó para los índices de peróxidos y  $k_{232}$  de los aceites aditivados, almacenados en presencia de luz. Los aceites aditivados, mantenidos en oscuridad, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos dinámico y estático.

Figura 34: Índices de peróxidos (meq O<sub>2</sub>/kg aceite) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tiempo 0, ensayo dinámico y ensayo estático para un mismo tratamiento.

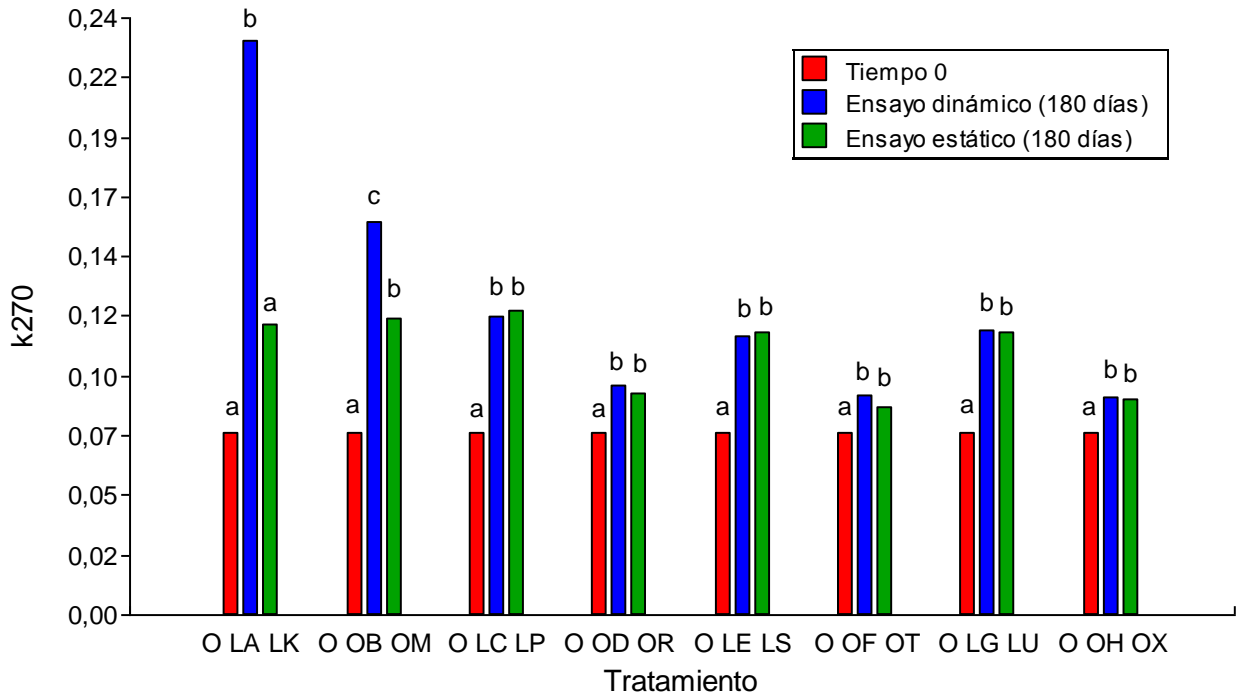
Figura 35: Valores de dienos conjugados ( $k_{232}$ ) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tiempo 0, ensayo dinámico y ensayo estático para un mismo tratamiento.



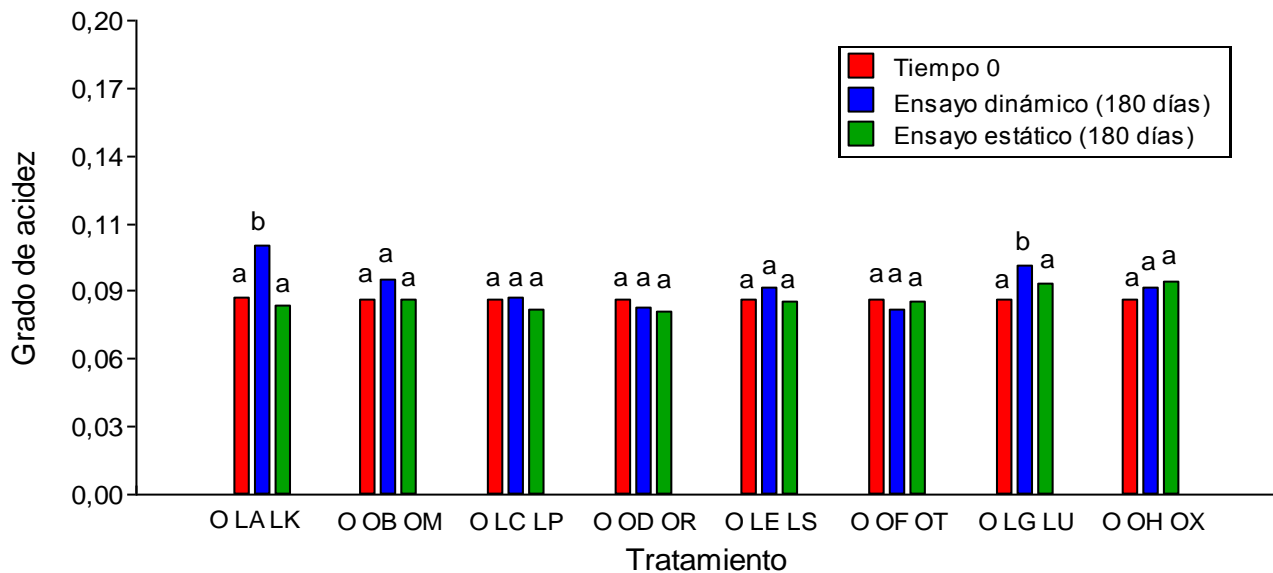
Figura 36: Valores de trienos conjugados ( $k_{270}$ ) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tiempo 0, ensayo dinámico y ensayo estático para un mismo tratamiento.

El grado de acidez presentó mínimas diferencias entre el valor inicial (tiempo 0) y los valores obtenidos a los 180 días de almacenamiento, tanto en el ensayo dinámico como en el estático (figura 37). Estos datos indican que el aceite de nuez es estable frente a la degradación hidrolítica de los glicéridos, aún en condiciones de exposición a la luz.

Figura 37: Grado de acidez (% ácido oleico) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo 0 (O) y a los 180 días de almacenamiento.



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tiempo 0, ensayo dinámico y ensayo estático para un mismo tratamiento.

La composición de ácidos grasos registró escasas diferencias entre los distintos tratamientos (tabla 27), demostrando que la misma permanece estable en las diferentes condiciones empleadas en el ensayo de almacenamiento.

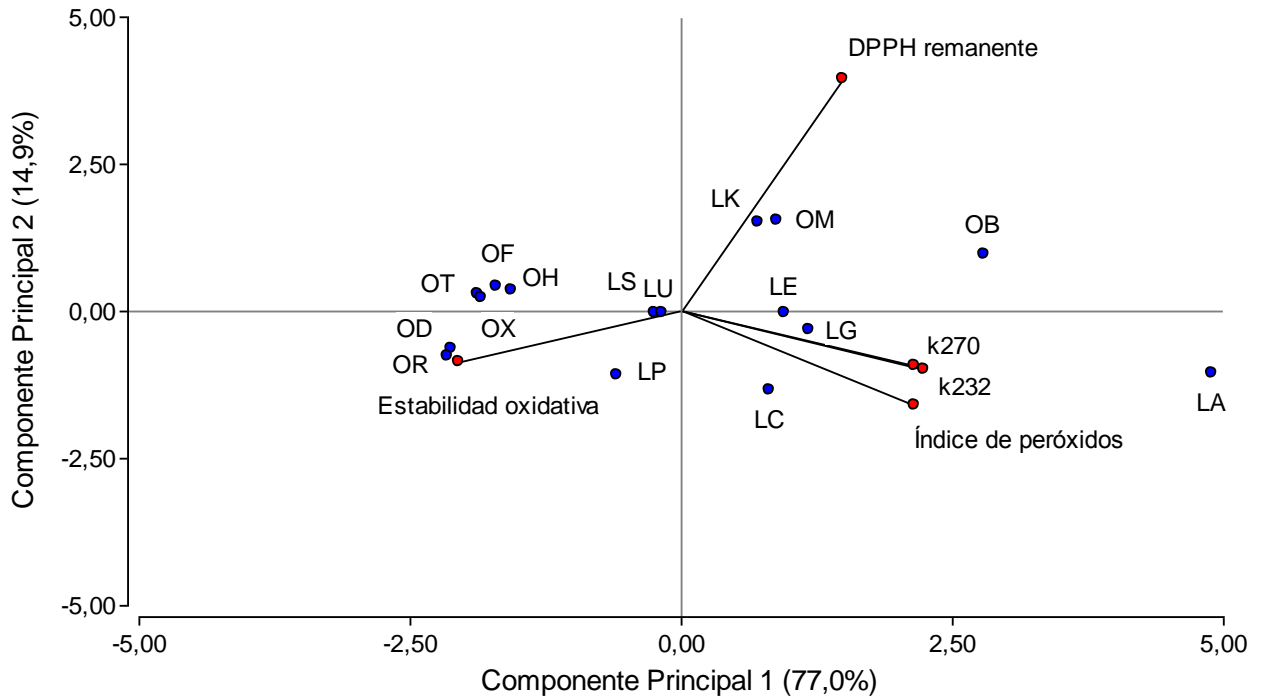
Tabla 27: Composición de ácidos grasos (% respecto del total) de los distintos tratamientos analizados, en el tiempo cero (0) y a los 180 días de almacenamiento (ensayo dinámico, tratamientos LA – OH; ensayo estático, tratamientos LK – OX).

| Tratamiento | Ácidos grasos              |                           |                            |                            |                           |
|-------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|             | Palmítico                  | Esteárico                 | Oleico                     | Linoleico                  | Linolénico                |
| 0           | 6.68 <sup>a</sup> ± 0.17   | 1.75 <sup>a</sup> ± 0.04  | 25.1 <sup>a</sup> ± 0.62   | 53.4 <sup>a</sup> ± 0.57   | 13.0 <sup>a</sup> ± 0.07  |
| LA          | 6.48 <sup>abc</sup> ± 0.03 | 1.80 <sup>ab</sup> ± 0.02 | 25.8 <sup>cd</sup> ± 0.03  | 53.1 <sup>bc</sup> ± 0.01  | 12.8 <sup>a</sup> ± 0.06  |
| OB          | 6.50 <sup>abc</sup> ± 0.16 | 1.80 <sup>ab</sup> ± 0.01 | 25.9 <sup>cd</sup> ± 0.02  | 53.0 <sup>bc</sup> ± 0.17  | 12.9 <sup>a</sup> ± 0.02  |
| LC          | 6.63 <sup>bc</sup> ± 0.41  | 1.88 <sup>ab</sup> ± 0.15 | 25.6 <sup>bc</sup> ± 0.28  | 52.9 <sup>abc</sup> ± 0.58 | 13.0 <sup>ab</sup> ± 0.25 |
| OD          | 6.59 <sup>abc</sup> ± 0.01 | 1.99 <sup>ab</sup> ± 0.08 | 25.5 <sup>abc</sup> ± 0.03 | 52.9 <sup>abc</sup> ± 0.11 | 13.0 <sup>ab</sup> ± 0.01 |
| LE          | 6.54 <sup>abc</sup> ± 0.02 | 2.02 <sup>ab</sup> ± 0.23 | 25.8 <sup>cd</sup> ± 0.42  | 52.8 <sup>abc</sup> ± 0.32 | 12.8 <sup>a</sup> ± 0.35  |
| OF          | 6.39 <sup>ab</sup> ± 0.04  | 1.70 <sup>a</sup> ± 0.02  | 25.1 <sup>a</sup> ± 0.34   | 53.3 <sup>bc</sup> ± 0.53  | 13.5 <sup>b</sup> ± 0.94  |
| LG          | 6.47 <sup>abc</sup> ± 0.20 | 1.65 <sup>a</sup> ± 0.01  | 25.6 <sup>abc</sup> ± 0.35 | 53.4 <sup>c</sup> ± 0.32   | 13.0 <sup>ab</sup> ± 0.17 |
| OH          | 6.84 <sup>c</sup> ± 0.45   | 1.81 <sup>ab</sup> ± 0.01 | 25.2 <sup>ab</sup> ± 0.13  | 53.0 <sup>bc</sup> ± 0.26  | 13.2 <sup>ab</sup> ± 0.05 |
| LK          | 6.54 <sup>abc</sup> ± 0.06 | 2.59 <sup>c</sup> ± 0.75  | 25.6 <sup>bc</sup> ± 0.21  | 52.4 <sup>a</sup> ± 0.45   | 12.9 <sup>a</sup> ± 0.05  |
| OM          | 6.57 <sup>abc</sup> ± 0.06 | 2.00 <sup>ab</sup> ± 0.02 | 25.7 <sup>bc</sup> ± 0.09  | 52.8 <sup>abc</sup> ± 0.01 | 13.0 <sup>ab</sup> ± 0.05 |
| LP          | 6.48 <sup>abc</sup> ± 0.04 | 1.87 <sup>ab</sup> ± 0.07 | 25.4 <sup>abc</sup> ± 0.23 | 53.1 <sup>bc</sup> ± 0.06  | 13.1 <sup>ab</sup> ± 0.14 |
| OR          | 6.49 <sup>abc</sup> ± 0.01 | 1.85 <sup>ab</sup> ± 0.01 | 25.6 <sup>abc</sup> ± 0.07 | 53.0 <sup>bc</sup> ± 0.06  | 13.1 <sup>ab</sup> ± 0.03 |
| LS          | 6.54 <sup>abc</sup> ± 0.06 | 1.80 <sup>ab</sup> ± 0.01 | 25.5 <sup>abc</sup> ± 0.08 | 53.1 <sup>bc</sup> ± 0.06  | 13.1 <sup>ab</sup> ± 0.09 |
| OT          | 6.35 <sup>ab</sup> ± 0.08  | 1.77 <sup>ab</sup> ± 0.08 | 25.4 <sup>abc</sup> ± 0.31 | 53.3 <sup>bc</sup> ± 0.25  | 13.2 <sup>ab</sup> ± 0.23 |
| LU          | 6.25 <sup>ab</sup> ± 0.19  | 1.83 <sup>ab</sup> ± 0.12 | 25.8 <sup>cd</sup> ± 0.16  | 53.1 <sup>bc</sup> ± 0.29  | 13.0 <sup>ab</sup> ± 0.18 |
| OX          | 6.20 <sup>a</sup> ± 0.25   | 2.26 <sup>bc</sup> ± 0.49 | 26.2 <sup>d</sup> ± 0.45   | 52.7 <sup>ab</sup> ± 0.23  | 12.6 <sup>a</sup> ± 0.45  |

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos para cada ácido graso.

El análisis de componentes principales (figura 38) reafirma y sintetiza los resultados descriptos precedentemente: el efecto de la condición lumínica resulta determinante para la estabilidad del aceite. Los tratamientos aditivados provenientes de ambos ensayos (con o sin extracción periódica de muestras), mantenidos en oscuridad y analizados a los 180 días de almacenamiento, constituyeron un grupo homogéneo estrechamente asociado a una mayor estabilidad oxidativa. Los tratamientos aditivados, mantenidos en presencia de luz, se asociaron, aunque con mayor grado de dispersión, a los controles sin aditivos, y todos ellos se relacionaron a parámetros indicadores de daño oxidativo.

Figura 38: Análisis de componentes principales (ACP) de los tratamientos utilizados para evaluar la estabilidad del aceite de nuez frente a la foto-oxidación en un ensayo de almacenamiento prolongado.



## CONCLUSIONES

El aceite de nuez constituye un sustrato altamente susceptible a reacciones oxidativas que deterioran su calidad química y organoléptica. Este hecho hace necesario que para su conservación deba ser protegido mediante el empleo de sustancias o condiciones de almacenamiento que puedan inhibir o retardar los procesos de oxidación mencionados.

El residuo de extracción del aceite es una fuente importante de compuestos fenólicos con probada actividad antioxidante. La evaluación de los extractos fenólicos obtenidos en este trabajo puso en evidencia que los mismos poseen una elevada capacidad inhibidora del radical libre 2,2-difenilpicrilhidracil (DPPH), comparable a la de los antioxidantes sintéticos utilizados como referencia. Sin embargo, cuando fueron adicionados al aceite, mostraron escasa influencia sobre la estabilidad termo-oxidativa del mismo, probablemente debido a su rápida degradación. Estos resultados, sumados a la dificultad que plantea su solubilización en el aceite, no permiten vislumbrar que los mismos, por el momento, puedan ser utilizados como aditivos antioxidantes.

El análisis de la estabilidad del aceite frente a la foto-oxidación, permitió determinar la eficacia antioxidante de algunas sustancias (TBHQ, palmitato de ascorbilo) bajo condiciones de almacenamiento que simulan las utilizadas en el comercio. La evaluación de los distintos tratamientos examinados revela que la condición lumínica juega un papel preponderante sobre la velocidad de oxidación del aceite. Las condiciones de iluminación empleadas (luz fluorescente, intensidad 800 Lux) promueven rápidamente la formación de productos de oxidación primarios, aún en los aceites aditivados. En consecuencia, los antioxidantes evaluados resultan poco eficaces como inhibidores de oxidación foto-sensibilizada en el aceite de nuez.

En ausencia de luz, todos los tratamientos con agregado de antioxidantes fueron igualmente eficaces para inhibir la formación de productos de oxidación primarios durante el periodo de almacenamiento. El efecto protector del TBHQ sobre la estabilidad oxidativa del aceite de nuez, almacenado en oscuridad, puede lograrse con la mitad de la concentración máxima permitida (200 ppm) por el Código Alimentario Argentino para antioxidantes sintéticos en aceites vegetales.

La valoración de la capacidad antirradicalaria de los aceites aditivados permitió determinar que: a) el TBHQ es un efectivo inhibidor de radicales libres en el aceite de nuez,

b) su actividad no resulta afectada por la luz, pero es dependiente de la concentración, c) el palmitato de ascorbilo no ejerce un efecto aditivo sobre la actividad del TBHQ.

Todos los tratamientos que no fueron sometidos a extracción periódica de muestras (ensayo estático), mantenidos tanto en luz como en oscuridad, no alcanzaron el periodo de inducción luego de 180 días de almacenamiento y presentaron valores de dienos conjugados significativamente más bajos que los respectivos tratamientos del ensayo con extracción periódica de muestras. Asimismo, el grado de acidez y la composición de ácidos grasos permanecieron prácticamente sin modificaciones al cabo del periodo de almacenamiento. Estos resultados son de utilidad a los fines de determinar criterios que permitan establecer el periodo de caducidad o lapso de aptitud del producto.

## CONCLUSIONES FINALES y PERSPECTIVAS FUTURAS

En Argentina, en los últimos años, el sector nogalero ha recibido el apoyo de políticas específicas para el control fitosanitario y la reconversión orientada al reemplazo de los nogales criollos o tradicionales - de bajo rendimiento - por variedades modernas de alta productividad.

En la actualidad, el principal destino de la producción nogalera de nuestro país es la industria alimentaria; prácticamente el total de la misma se destina al mercado interno y se consume en forma no procesada.

En nuestro país, la producción de aceites comestibles ha mostrado en los últimos años un crecimiento sostenido y en la actualidad es una actividad económica de gran relevancia. Dentro de este gran rubro de la economía, la elaboración de aceites no tradicionales, como los de nuez, almendra o avellana, ofrece una oportunidad que no ha sido prácticamente explotada. El principal obstáculo para este tipo de emprendimiento es la falta de instalaciones para el procesamiento de los frutos y la extracción de los aceites. Asimismo, la carencia de información relativa a las características físicas y químicas de las principales variedades de nuez cultivadas como los aspectos químicos y tecnológicos del proceso de obtención del aceite y de las propiedades y usos del mismo, han contribuido en forma negativa para el desarrollo de esta actividad.

La caracterización llevada a cabo permitió ampliar el conocimiento de las variedades de nuez más utilizadas comercialmente en nuestro país y, al mismo tiempo, sentar bases científicas para la tipificación de sus frutos y aceites. Como resultado de estos estudios, se seleccionó a la variedad Franquette, poco atractiva para uso como confitura por su pulpa de pequeño tamaño, pero con alto contenido de aceite y un perfil de ácidos grasos favorable en relación a la estabilidad, como materia prima para evaluar alternativas para la extracción y conservación del aceite.

Por sus cualidades físicas (tamaño, dureza) la pulpa de nuez constituye un material apropiado para la extracción del aceite mediante prensa de tornillo helicoidal, pero debe ser acondicionada previamente para lograr condiciones adecuadas que permitan optimizar el proceso, en términos de rendimiento y calidad del producto. Cabe destacar que esta tecnología resulta compatible con la obtención de aceites de nuez de buena calidad química, sin necesidad de una etapa posterior de refinado.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se realizó una aproximación al escalado industrial del proceso. Resulta necesario aún trabajar en la optimización de las condiciones de extracción que permitan incrementar el rendimiento de aceite. Entre los aspectos a considerar en este sentido, y tal como quedó demostrado en las operaciones a escala piloto, será de fundamental importancia ahondar en el estudio del acondicionamiento del material (tamaño y contenido de humedad de la partícula) y condiciones (temperatura, velocidad de prensado) apropiadas para el proceso a escala industrial.

El análisis de la estabilidad del aceite frente a la foto-oxidación, permitió determinar la eficacia antioxidante de algunas sustancias, como TBHQ y palmitato de ascorbilo, bajo condiciones de almacenamiento que simulan las utilizadas en el comercio. Los antioxidantes agregados fueron igualmente eficaces para inhibir la formación de productos de oxidación primarios durante el periodo de almacenamiento. El efecto protector del TBHQ sobre la estabilidad oxidativa del aceite de nuez puede lograrse con la mitad de la concentración máxima permitida por el Código Alimentario Argentino para antioxidantes sintéticos en aceites vegetales.

Los avances realizados en la caracterización pomológica de las principales variedades de nuez comercializadas en Argentina, en el conocimiento de la composición química de sus aceites y en el estudio de alternativas tecnológicas para su extracción y conservación representan un aporte significativo a los fines de establecer bases para la potencial elaboración de aceite de nuez a nivel industrial.



## BIBLIOGRAFÍA

Abraham, G., Hron, J., Koltun, S.P. (1988). Modeling the solvent extraction of oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (1): 129-135.

Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P. (2003). Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7698-7702.

Amaral, J.S., Cunha, S.C., Alves, M.R., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P. (2004). Triacylglycerol composition of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars: Characterization by HPLC-ELSD and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7964-7969.

Anzaldúa-Morales, A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

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

Arranz, S., Cert, R., Pérez-Jiménez, J., Cert, A., Saura-Calixto, F. (2008a). Comparison between radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*, 110: 985-990.

Arranz, S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2008b). Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): Contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology*, 227: 425-431.

Balta, M.F., Dogan, A., Kazankaya, A., Ozrenk, K., Celik, F. (2007). Pomological definition of native walnuts (*Juglans regia* L.) grown in Central Bitlis. *Journal of Biological Sciences*, 7 (2): 442-444.

Bockish, M. (1998). Extraction of vegetable oils. En: *Fats and oils handbook*. Ed. AOCS Press, Champaign, USA.

Boutin, O., Badens, E. (2009). Extraction from oleaginous seeds using supercritical CO<sub>2</sub>: Experimental design and products quality. *Journal of Food Engineering*, 92: 396-402.

Braca, A., Tommasi, N.D., Bari, L.D., Pizza, C., Polito, M., Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural Products*, 64: 892-895.

- Brunner, G. (1994). Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Ed. Springer, New York, USA.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67: 21-33.
- Caja, M.M., Ruiz del Castillo, M.L., Martínez Alvarez, R., Herraiz, M., Blanch, G.P. (2000). Analysis of volatile compounds in edible oils using simultaneous distillation–solvent extraction and direct coupling of liquid chromatography with gas chromatography. *European Food Research and Technology*, 211: 45–51.
- Calvo, L., Cocero, M.J., Diez, J.M. (1994). Oxidative stability of sunflower oil extracted with supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71: 1251–1254.
- Carelli, A.A., Ceci, L.N., Crapiste, G.H. (2002). Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*, 79 (12): 1177-1180.
- Catchpole, O.J., Tallon, S.J., Eltringham, W.E., Grey, J.B., Fenton, K.A., Vagi, E.M., Vyssotsky, M.V., MacKenzie, A.N., Ryan, J., Zhu, Y. (2009). The extraction and fractionation of specialty lipids using near critical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47: 591-597.
- Chapman, G.W. (1980). A conversion factor to determined phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*, 57: 299-302.
- Colles, S.M., Maxson, J.M., Carlson, S.G., Chisolm, G.M. (2001). Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles of oxysterols. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11: 131-138.
- Cort, W.M. (1974). Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*, 51: 321–325.
- Crews, C., Hough, P., Godward, P., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W. (2005). Study of the main constituents of some authentic walnut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4853-4860.
- Crowe, T.D., Crowe, T.W., Johnson, L.A., White, P.J. (2002). Impact of extraction method on yield of lipid oxidation products from oxidized and unoxidized walnuts. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*, 79: 453-456.
- Crowe, T.D., White, P.J. (2003). Oxidative stability of walnut oils extracted with supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*, 80: 575–578.

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

Del Valle, J.M., Jiménez, M., Napolitano, P., Zetzi, C., Brunner, G. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of pelletized Jalapeño peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 550-556.

Demir, C., Cetin, M. (1999). Determination of tocopherols, fatty acids and oxidative stability of pecan, walnut and sunflower oils. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 95 (7): 278-282.

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

Doreste, P. (2008). El nogal y sus perspectivas. Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias (Ministerio de Producción). [www.alimentosargentinos.gov.ar/.../Frutas\\_secas\\_Nuez\\_nogal.html](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/.../Frutas_secas_Nuez_nogal.html) (última consulta 6 de noviembre de 2009).

Ducci, F., Rogatis, A., Proietti, R. (1997). Protezione delle risorse genetiche di *Juglans regia* L. *Ann. Inst. Sper. Selv.*, 25/26: 35-55.

Dunford, N.T., Teel, J.A., King, J.W. (2003). A continuous counter current supercritical fluid deacidification process for phytosterol ester fortification in rice bran oil. *Food Research International*, 36: 175-181.

Ebrahimi, A., Zarei, A., Fatahi, R., Ghasemi Varnamkhasti, M. (2009). Study on some morphological and physical attributes of walnut used in mass models. *Scientia Horticulturae*, 121: 490-494.

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

Eggers, R. (1996). Supercritical fluid extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products. En: *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry* (King, J.W., List, G.R., Eds.), Champaign, USA, pp. 35-64.

Eggers, R., Ambroggi, A., Von Schnitzler, J. (2000). Special features of SCF solid extraction of natural products: Dealing with wheat gluten and extraction of rose hip oil, Brazilian. *Journal of Chemical Engineering*, 17: 329-333.

- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000). Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 648-656.
- Esquivel, M.M., Bernardo-Gil, M.G., King, M.B. (1999). Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 16: 43-58.
- Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 56: 7796-7865.
- Fan, H.P., Morris, J.C., Wakeham, H. (1948). Diffusion phenomena in solvent extraction of peanut oil: Effect of cellular structure. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40: 195-199.
- Fernández-López, J., Aleta, N., Alía, R. (2000). Forest genetic resources conservation of *Juglans regia* L. IPGRI, Rome, Italy.
- Fils, J.M. (2000). The production of oils. En: *Edible oil processing* (Hamm, W., Hamilton, R.J., Eds.), Sheffield Academic Press, Sheffield, England, pp. 47-78.
- Frankel, E.N. (2005). *Lipid oxidation*. Ed. Barnes & Associates, Bridgwater, England.
- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L). *Phytochemistry*, 63: 795-801.
- Gaydou, E.M., Bianchini, J.P., Ratovohery, J.V. (1983). Triterpene alcohols, methyl sterols, sterols, and fatty acids in five Malagasy legume seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 833-836.
- Goodrum, J.W., Kilgo, M.B. (1987). Peanut oil extraction with SC- CO<sub>2</sub>: Solubility and kinetic functions. *Journal of the American Society of Agricultural Engineering*, 30: 1865-1868.
- Grosso, N.R., Resurrección, 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.
- Gunstone, F.D. (2002). *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. Ed. Blackwell Publishing, CRC Press, Oxford, UK.
- Han, X., Cheng, L., Zhang, R., Bi, J. (2009). Extraction of safflower seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Food Engineering*, 92: 370-376.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006). Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98: 136-148.

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

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

Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1974). Sterols and methylsterols in some tropical and subtropical vegetable oils. *Oléagineux*, 29: 253–258.

Karnofsky, G. (1949). The theory of solvent extraction, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 26 (10): 564-569.

Karnofsky, G. (1986). Design of oil seed extractors I. Oil extraction. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 63 (6): 1011-1014.

Karnofsky, G. (1987). Design of oil seed extractors I. Oil extraction (Supplement). *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 64 (11): 1533-1536.

King, Ch.O., Katz, D.L., Brier, J.C. (1944). The solvent extraction of soybean flakes. American Institute of Chemical Engineers, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, pp. 533-556.

Labuckas, D.O., Maestri, D.M., Perelló, M., Martínez, M.L., Lamarque, A.L. (2008). Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*, 107: 607-612.

Lavedrine, F., Ravel, A., Poupard, A., Alary, J. (1997). Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chemistry*, 58: 135-140.

Lavedrine, F., Zmirou, D., Ravel, A., Balducci, F., Alary, J. (1999). Blood cholesterol and walnut consumption: a cross-sectional survey in France. *Preventive Medicine*, 28: 333-339.

Lavedrine, F., Ravel, A., Villet, A., Ducros, V., Alary, J. (2000). Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California. *Food Chemistry*, 68: 347-351.

Lee, A.K., Bulley, K., Fattori, N.R. (1986). Modeling of supercritical carbon dioxide extraction of canola oilseed in fixed beds. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 63: 921-925.

- Lee, K.H., Jung, M.Y., Kim, S.Y. (1997). Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of photosensitized oxidation of oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 74: 1053–1057.
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H., Young, J.C. (2006). Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8033-8040.
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Kramer, J.K.G., Hernández, M. (2007). Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1164-1169.
- Li, M., Bellmer, D.D., Brusewitz, G.H. (1999). Pecan kernel breakage and oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> as affected by moisture content. *Journal of Food Science*, 64: 1084–1088.
- Louli, V., Folas, G., Voutsas, E., Magoulas, K. (2004). Extraction of parsley seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*, 30: 163-174.
- Maestri, D.M., Labuckas, D.O., Meriles, J.M., Lamarque, A.L., Zygodlo, J.A., Guzman, C.A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 494-498.
- Maestri, D.M., Nepote, V., Lamarque, A.L., Zygodlo, J.A. (2006). Natural products as antioxidants. En: *Phytochemistry: Advances in research* (Imperato, F., Ed.), Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, pp. 105-135.
- Marrone, C., Poletto, M., Reverchon, E., Stasis, A. (1998). Almond oil extraction by supercritical CO<sub>2</sub>: Experiment and modeling. *Chemical Engineering Science*, 53: 3711-3718.
- Martinez, J.L., Vance, S.W. (2008). Supercritical extraction plants: Equipment, process and costs. En: *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds* (Martinez, J.L., Ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, USA, pp. 25-49.
- Mattea, M.A. (1999). Fundamentos sobre el prensado de semillas oleaginosas. *Aceites y Grasas*, 427-431.
- McGill, A.S., Moffat, C.F., Mackie, P.R., Cruickshank, P. (1993). The composition and concentration of n-alkanes in retail samples of edible oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61: 357–362.

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

Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T. (1991). *Sensory evaluation techniques*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 135-183.

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

Molero Gomez, A., Martinez de la Ossa, E. (2000). Quality of wheat germ oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 77: 969–974.

Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. CRC Press, New York, USA.

Myers, N.W. (1977). Solvent extraction in the soybean industry. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 54: 491-493.

Nielsen, S.S. (1998). *Food analysis*. En: *Crude fats analysis*. Purdue University, West Lafayette, Indiana, pp. 203-214.

Norulaini, N.A.N., Setianto, W.B., Zaidul, I.S.M., Nawi, A.H., Azizi, C.Y.M., Mohd Omar, A.K. (2009). Effects of supercritical carbon dioxide extraction parameters on virgin coconut oil yield and medium-chain triglyceride content. *Food Chemistry*, 116: 193-197.

Oliveira, R., Rodríguez, M.F., Bernardo-Gil, M.A. (2002). Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79: 225-230.

Osburn, J.O., Katz, D.L. (1944). Structure as a variable in the application of diffusion theory to extraction. *American Institute of Chemical Engineers*, 40: 511-531.

Oseni, K., Owolarafe, M., Faborode, O., Obafemi O. A. (2002). Comparative evaluation of the digester–screw press and a hand-operated hydraulic press for palm fruit processing. *Journal of Food Engineering*, 52 (3): 249-255.

Ozkal, S.G., Salgin, U., Yener, M.E. (2005). Supercritical carbon dioxide extraction of hazelnut oil. *Journal of Food Engineering*, 69: 217-223.

- Ozkan, G., Koyuncu, M.A. (2005). Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Turkey. *Grasas y Aceites*, 56 (2): 141-146.
- Padley, F.B., Gunstone, F.D., Harwood, J.L. (1986). Occurrence and characteristics of oils and fats. En: *The lipid handbook* (Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B., Eds.), Chapman & Hall, London, pp. 49–170.
- Palazoglu, T.K., Balaban, M.O. (1998). Supercritical CO<sub>2</sub> extractions of lipids from roasted pistachio nuts. *Journal of American Society of Agricultural Engineering*, 41: 679-684.
- Papaseit, T.J. (1986). The color of extra virgin olive oil. A characteristic of quality. *Grasas y Aceites*, 37: 204-206.
- Parra, P. (2006). Nuez de nogal: análisis de la cadena alimentaria. Dirección Nacional de Alimentos. SAGPyA. [www.alimentosargentinos.gov.ar](http://www.alimentosargentinos.gov.ar) (última consulta 6 de noviembre del 2009).
- Patricelli, A., Assogna, A., Emmi, E., Sodini, G. (1979). Fattori che influenzano l'extrazione del lipidi da semi decorticati di girasole. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 61: 136-142.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L. (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2103-2111.
- Pocklington, W.D., Dieffenbacher, A. (1988). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high-performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 60: 877–892.
- Prámparo, M., Mattea, M., Gregory, S. (2003). Influencia del tipo de contacto sólido líquido en la extracción de aceites vegetales. *Aceites y Grasas*, 53 (4): 592-597.
- Prasad, R.B.N. (2003). Walnuts and pecans. En: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Academic Press, London, UK, pp. 6071-6079.
- Ramadan, M.F., Moersel, J.T. (2006). Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 838-842.
- Resolución SEAG N° 1352 (1967).
- Salgin, S., Salgin, U. (2006). Supercritical fluid extraction of walnut kernel oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 577–582.



- Sánchez–Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 272-276.
- Şaşmaz, D.A. (1996). Evaluation of the diffusion coefficient of rapeseed oil during solvent extraction with hexane. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 73 (5): 669-671.
- Savage, G.P., Dutta, P.C., McNeil, D.L. (1999). Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76: 1059-1063.
- Sharma, O.C., Sharma, S.D. (2001). Genetic divergence in seedling trees of Persian walnut (*Juglans regia* L.) for various metric nut and kernel characters in Himachal Pradesh. *Scientia Horticulturae*, 88: 163–171.
- Siddhuraju, P., Mohan, P.S., Becker, K. (2002). Studies in the antioxidant activity of Indian laburnum (*Cassia .stula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79: 61–67.
- Singh, J., Bargale, P.C. (1990). Mechanical expression of oil from linseed. *Journal of Oilseeds Research*, 7: 106-110.
- Singh, J., Bargale, P.C. (2000). Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering*, 43 (2): 75-82.
- Singh, K.K., Wiesenborn, D.P., Tostenson, K., Kangas, N. (2002). Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79 (2): 165-170.
- Solar, A., Ivancic, A., Stampar, F., Hudina, M. (2002). Genetic resources for walnut (*Juglans regia* L.) improvement in Slovenia. Evaluation of the largest collection of local genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 491–501.
- Sovova, H., Kucera, J., Jez, J. (1994). Rate of the vegetable oil extraction with supercritical carbon dioxide – II extraction of grape oil. *Chemical Engineering Science*, 49: 415-420.
- Suzuki, T., Suzuki, Y., Endo, Y., Kaneda, T. (1984). Residual amounts of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 61: 785-788.
- Sze-Tao, K.W.C., Sathe, S.K. (2000). Walnut (*Juglans regia* L.): Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro deigestability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1393-1401.

- Torres, M.M., Martínez, M.L., Maestri, D.M. (2005). A multivariate study of the relationship between fatty acids and volatile flavor components in olive and walnut oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 82: 105–110.
- Tsamouris, G., Hatziantoniou, S., Demetzos, C. (2002). Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.). *Z. Naturforsch*, 57: 51–56.
- Vargas-Lopez, J.M., Wiesenborn, D., Tostenson, K., Cihacek, L. (1999). Processing of crambe for oil and isolation of erucic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76: 801-809.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247: 60-64.
- Ward, J.A. (1976). Processing high oil content seeds in continuous press. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 53: 261-264.
- Wardlaw, G.M. (1999). *Perspectives in nutrition*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Warner, K., Frankel, E.N. (1987). Effect of  $\beta$ -carotene on light stability of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 64: 213-218.
- Wiesenborn, D., Doddapaneni, R., Tostenson, K., Kangas, N. (2001). Cooking indices to predict screw-press performance for crambe seed. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 78 (5): 467-471.
- Williams, M.A. (1997). Preparing of oil bearing materials for extraction. En: *Technology and solvents for extraction oilseeds and nonpetroleum oils* (Wan, P.J., Wakelyn, P.J., Eds.), AOCS Press, Champaign, USA.
- Wingard, M.R., Phillips, R.C. (1949). The determination of the rate extraction of crude lipids from oilseeds with solvents. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 26: 422-426.
- Wong, D.W.S. (1995). Lípidos. En: *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 1-52.
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 752-767.
- Yarilgac, T., Koyuncu, F., Koyuncu, M.A., Kazankaya, A., Sen, S.M. (2001). Some promising walnut selections (*Juglans regia* L.). *Acta Horticulturae (ISHS)*, 544: 93–96.

Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.N.A., Omar, A.K.M., Smith Jr., R.L. (2006). Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction and fractionation of palm kernel oil from palm kernel as cocoa butter replacers blend. *Journal of Food Engineering*, 73 (3): 210-216.

Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.N.A., Omar, A.K.M., Smith Jr., R.L. (2007a). Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *Journal of Food Engineering*, 79: 1007-1014.

Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.N.A., Omar, A.K.M., Smith Jr., R.L. (2007b). Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extracted palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers. *Journal of Food Engineering*, 78: 1397-1409.

Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., Sato, Y., Smith Jr., R.L. (2007c). Separation of palm kernel oil from palm kernel with supercritical carbon dioxide using pressure swing technique. *Journal of Food Engineering*, 81 (2): 419-428.

Zeneli, G., Kola, H., Dida, M. (2005). Phenotypic variation in native walnut populations of northern Albania. *Horticultural Science*, 105: 91-100.

Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., Wang, Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, 113: 160-165.

Zheng, Y., Wiesenborn, D.P., Tostenson, K., Kangas, N. (2003). Screw pressing of whole and dehulled flaxseed for organic oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 80 (10): 1039-1045.

Zwarts, L., Savage, G.P., McNeil, D.L. (1999). Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50: 189-194.

## Divulgación de resultados y actividades de transferencia

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en reuniones científicas.

### **Trabajos publicados**

1. “A multivariate study of the relationship between fatty acids and volatile flavor components in olive and walnut oils”. (2005). M.M. Torres, **M.L. Martínez**, Damián M. Maestri. Journal of the American Oil Chemist’s Society. Editorial: AOCS Press. Vol 82: 105-110.
2. “Varietal and crop year effects on lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes”. (2006). **Marcela L. Martínez**, Miguel A. Mattea, Damián M. Maestri. Journal of the American Oil Chemist’s Society. Editorial: AOCS Press. Vol. 83: 791–796.
3. “Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil”. (2008). **Marcela L. Martínez**, Miguel A. Mattea, Damián M. Maestri. Journal of Food Engineering. Editorial: Elsevier. Vol. 88: 399–404.
4. “Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina”. (2008). **M.L. Martínez**, D.M. Maestri. European Journal of Lipid Science and Technology. Editorial: Wiley-VCH. Vol. 110: 1183-1189.

### **Presentaciones en reuniones científicas**

1. “Análisis de compuestos volátiles en aceites vegetales mediante microextracción en fase sólida”. **Martínez, Marcela L.**, Torres, Mariela M., Maestri Damián M. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Argentina, Córdoba. Noviembre de 2004.
2. “Obtención de aceite de nuez y caracterización del residuo de extracción”. **Martínez, Marcela L.**, Labuckas, Diana O., Maestri, Damián M. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Argentina, Córdoba. Noviembre de 2004.
3. “Obtención y caracterización de aceites de nuez (*Juglans regia* L.)”. **Marcela L. Martínez**, Marina Sosa, Diana O. Labuckas, Miguel Mattea, Damián Maestri. XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Argentina, Buenos Aires. Noviembre de 2005.
4. “Extracción de aceite de nuez mediante prensado “Expeller”: Estudio de algunas variables del proceso y su relación con el rendimiento y la calidad del mismo”. **Martínez,**

- M.**, Mattea, M., Maestri, D. I Simposio Internacional de Nogalicultura, Argentina, Catamarca, Belén. Septiembre de 2006.
5. Estudio comparativo de parámetros de calidad de variedades de nuez (*Juglans regia* L.) cultivadas en Argentina". **M.L Martínez**, M.A. Marin, S.M. Faillaci, D.M. Maestri. X Taller Internacional sobre Calidad Sanitaria, Evaluación y Conservación de Alimentos, Cuba, Varadero. Octubre de 2006.
  6. "Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of walnut oil from pre-pressed fruits". **M. Martínez**, D. Maestri, M. Mattea. I Iberoamerican Conference of Supercritical Fluids, Brasil, Foz do Iguaçu. Abril de 2007.
  7. "Extraction and purification of walnut (*Juglans regia* L.) phenolic fractions with antioxidant activity". Diana Ondina Labuckas, **Marcela Lilian Martínez**, Miguel Angel Mattea, Alicia Luz Lamarque, Damián Modesto Maestri. CIGR - International Conference of Agricultural Engineering XXXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Brasil, Foz do Iguaçu. Agosto - Septiembre de 2008.
  8. "Pomological and oil chemical variability in walnut (*Juglans regia* L.) genetic resources". **Marcela Lilian Martínez**, Maria Laura Albanese, Agustín Nasjleti, Diana Ondina Labuckas, Miguel Angel Mattea, Damián Modesto Maestri. CIGR - International Conference of Agricultural Engineering XXXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Brasil, Foz do Iguaçu. Agosto – Septiembre de 2008.
  9. "Obtención de subproductos de la nuez (*Juglans regia* L.)". **Marcela L. Martínez**, Miguel A. Mattea, Diana O. Labuckas, Alicia L. Lamarque, María Laura N. Albanese, Agustín Nasjleti, Damián M. Maestri. I Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos, Córdoba, Argentina. Octubre de 2008.
  10. "Caracterización químico-sensorial y estabilidad del aceite de nuez". **Martínez, M.**; Barrionuevo, G.; Albanese, L.; Nepote, V.; Maestri, D. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina. Abril 2009.

Además de la divulgación de los resultados enunciados precedentemente, las actividades desarrolladas en el marco de la tesis motivaron la firma de una Carta de Intención con la Empresa Aceites del Desierto SRL, tendientes a realizar tareas de experimentación destinadas a evaluar condiciones de extracción del aceite mediante prensa de tornillo helicoidal y conocer sus características químicas, con el objetivo final de poner a punto el proceso a escala industrial.