



UNIVERSIDAD DE CHILE
Doctorado en Nutrición y Alimentos

TÍTULO DE LA TESIS

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS DE HOJAS DE OLIVO O PALTO EN LA ESTABILIDAD TERMOOXIDATIVA DE ACEITES DE DIFERENTE INSATURACIÓN

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de

Doctor en Nutrición y Alimentos

Programa Conjunto

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos.

Por

Paula Andrea Jiménez Patiño

Director de Tesis Profesor:

Lilia Masson Salaue

Co-Director de Tesis Profesor Doctor:

Paz Robert Canales

Santiago, 2010

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS DE HOJAS DE OLIVO O PALTO EN LA ESTABILIDAD TERMOOXIDATIVA DE ACEITES DE DIFERENTE INSATURACIÓN

Por

PAULA ANDREA JIMÉNEZ PATIÑO

Tesis presentada y aprobada como parte de los requisitos para optar al Grado Académico de Doctor en Nutrición y Alimentos

COMITÉ DE TESIS

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Lilia Masson

Aprobado

Prof. Paz Robert

Aprobado

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Ana María Estévez

Aprobado

Prof. Alfonso Valenzuela

Aprobado

Prof. Mariane Lutz

Aprobado

Prof. Alvaro Peña

Aprobado

Prof. Sol Morales

Aprobado

DEDICATORIA

A Miguel Angel, Mamá, Familia y Amigos

RESUMEN BIOGRAFICO

Paula Andrea Jimenez Patiño, nace en Santiago, el 29 de enero de 1974. Realiza sus estudios secundarios en el Liceo Carmela Carvajal de Prat, egresando el año 1990.

En el año 1992 inició sus estudios en la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad de Chile, obteniendo en marzo de 1999 el Título de Médico Veterinario.

Contrae matrimonio en enero del año 2003; se desarrolla profesionalmente en el área de la veterinaria, hasta que en el año 2005 ingresa al Programa Conjunto de Doctorado en Nutrición y Alimentos de la Universidad de Chile, participando en el transcurso de este en congresos y proyectos de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración, participación y ayuda en el desarrollo de esta tesis a:

A Miguel Angel, Mamá y Familia

A mis profesores guías Sra. Lilia Masson y en forma especial a la Sra. Paz Robert.

A los miembros de la Comisión de Tesis, profesores Sra. Ana María Estévez, Sra. Mariane Lutz, Sr. Alvaro Peña y Sr. Alfonso Valenzuela.

A la Fac. Cs. Qcas y Farmacéuticas (U. de Chile) y Mecesus por la beca de doctorado.

A los profesores Nalda Romero, Jorge Chavez y Jaime Ortíz.

Al Dr. Andrés Barriga y Dra. María Antonieta Valenzuela, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y al Dr. Alvaro Peña, Fac. Cs. Agronómicas de la Universidad de Chile, por su aporte en la etapa de identificación de polifenoles.

A la Dra MC. Dobarganes y Dr. Joaquin Velasco, Instituto de la Grasa, Sevilla, España por su aporte en la etapa de análisis de los aceites de fritura.

Al predio Desarrollo Agrario y Millantú, por los aportes en hojas de palto y olivo, respectivamente.

Empresa Camilo Ferrón S.A. por su aporte de insumos (aceites y reactivos).

A mis amigos Paula García, Andrés Bustamante, Juan Vega, Juan Carlos Moreno, Guibeth Morello, Cristian Encina, Conrado Camilo y Graciela Cáceres.

Y a todos aquellos que de una u otra forma participaron en este trabajo

INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Proceso de Fritura	2
1.2.- Antioxidantes	6
1.2.1.- Antioxidantes Naturales	7
1.2.2.-Tocoles	7
1.2.3.- Actividad antioxidante de tocoles	8
1.2.4.- Polifenoles	9
1.2.5.- Procianidinas	11
1.2.6.- Flavonides	14
1.2.7.- Actividad antioxidante de los flavonoides sobre linoleato de metilo	15
1.2.8.- Actividad antioxidante de los polifenoles sobre grasas y aceites	15
1.2.9.- Interacción de tocoles y polifenoles	18
1.3.- Fuentes vegetales de antioxidantes	19
1.3.1- Actividad antioxidante de extractos de polifenoles en grasas y aceites	20
1.3.2.- Olivo (<i>Olea europaea</i>):	22
1.3.2.1.- Biosíntesis de compuestos fenólicos en familia de las oleáceas	22
1.3.2.2.- Compuestos fenólicos presentes en las hojas de olivo	24
1.3.2.3.- Métodos para la obtención de los extractos de hojas de olivo	25
1.3.2.4.- Efectos biológicos de los extractos de hojas de olivo	26
1.3.3.- Palto (<i>Persea americana Mill</i>)	26
1.3.3.1.- Compuestos fenólicos presentes en hojas de palto	27
1.3.3.2.- Métodos para la obtención de los extractos de hojas de palto	28
1.3.3.3.- Efectos biológicos de hojas de palto	28
1.4.- Matrices lipídicas propuestas en este estudio	28
1.5.- Hipótesis	30
1.6.- Objetivos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1.- Muestras	31
2.1.1.- Hojas de olivo	31
2.1.2.- Hojas de Palto	31
2.1.3.- Aceites	32
2.1.4.- Papas	32

2.2.- Preparación de los extractos	32
2.2.1- Asignación de grupos	32
2.2.2- Preparación del jugo (JO y JP)	32
2.2.3- Preparación del extracto hidroalcohólico (HAO y HAP)	33
2.2.4.- Preparación de extracto obtenido por extracción supercrítica-CO ₂ (EFSO y EFSP)	33
2.2.5.- Preparación de oleoresina en aceite de girasol alto oleico (OO y OP)	35
2.3.- Caracterización de los extractos de hojas de olivo y palto	35
2.3.1.- Determinación de polifenoles totales	35
2.3.2.- Determinación de la actividad antioxidante	36
2.3.3.- Identificación de polifenoles por LC-MS	36
2.3.4.- Determinación del contenido de tocoferoles	38
2.4.- Caracterización inicial de los aceites (AS, AC y AGAO)	39
2.4.1.- Determinación del contenido de tocoles	39
2.4.2.- Determinación de la composición de ácidos grasos por GLC	39
2.4.3.- Determinación de polifenoles totales	39
2.5.- Ensayos de estabilidad oxidativa de los aceites sin y con adición de los extractos de hojas de olivo o palto	40
2.5.1.- Sistemas estudiados	40
2.5.2.- Adición de los extractos a los aceites estudiados	40
2.5.3.-Determinación del Tiempo de Inducción	41
2.6.- Ensayos de fritura	41
2.6.1.- Sistemas estudiados	41
2.6.2.- Adición de los extractos a los aceites de fritura	41
2.6.3.- Fritura	42
2.7.- Determinaciones analíticas en las muestras	42
2.7.1.- Determinación de tocoferoles	42
2.7.2.- Determinación de compuestos polares	42
2.7.3.- Determinación de especies producidas por el deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico en la fracción de compuestos polares	43
2.8.- Análisis estadístico	43

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1.- Caracterización de los extractos	44
3.1.1.- Contenido de polifenoles totales	44
3.1.2.- Capacidad antioxidante de los extractos	47
3.1.3.- Perfil de los principales compuestos fenólicos en extractos de hojas de olivo	50
3.1.4.- Perfil de los principales compuestos fenólicos en extractos de hojas de palto	56
3.1.5.- Determinación del contenido de tocoferoles	64
3.2.- Estabilidad oxidativa (Rancimat) de los aceites sin y con la adición de extractos	65
3.2.1.- Selección de los extractos	65
3.2.2.- Características iniciales de los sistemas AGAO, AC y AS para los ensayos de estabilidad oxidativa	65
3.2.3.- Tiempos de inducción y factores de protección	66
3.3.- Ensayos de fritura en los aceites (AC y AGAO) sin y con la adición de extracto hidroalcohólico (HAO o HAP)	72
3.3.1.- Selección de los extractos aplicados a los aceites de fritura	72
3.3.2.- Características iniciales de los sistemas AC y AGAO para los ensayos de fritura con la adición de los extractos hidroalcohólicos	72
3.3.3.- Evolución de los tocoles en AC y AGAO sometidos a fritura de papas “french” como consecuencia de la adición de HAO o HAP	73
3.3.4.- Efecto de la adición de (HAO) o (HAP) sobre la formación de compuestos polares (CP) en aceites de canola y girasol alto oleico durante la fritura de papas “french”	77
3.3.5.- Composición de la fracción de compuestos polares	80
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	86
ANEXOS	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles considerando el número de carbonos de su estructura	10
Tabla 2. Efecto de la adición de polifenoles en la oxidación de diferentes materias grasas.....	17
Tabla 3. Efecto de la adición de extractos vegetales en la oxidación de materias grasas.....	21
Tabla 4. Composición de la gradiente del solvente de elución, según tiempo, para los extractos de hojas de olivo, considerando un flujo de 1 mL/min.....	37
Tabla 5. Composición de la gradiente del solvente de elución, según tiempo, para los extractos de hojas de palto, considerando un flujo de 1 mL/min.....	38
Tabla 6. Contenido de polifenoles totales en hojas de olivo, según tipo de extracto	44
Tabla 7. Contenido de polifenoles totales en hojas de palto, según tipo de extracto....	46
Tabla 8. EC ₅₀ de los extractos de hojas de olivo y palto	49
Tabla 9. Identificación en polaridad negativa de los compuestos fenólicos en los diferentes extractos de hojas de olivo por LC–MS	53
Tabla 10. Perfil de polifenoles de los extractos de hojas de olivo identificados por LC-MS, expresados en porcentaje.....	55
Tabla 11. Identificación de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de hojas palto (HAP) por LC–MS en polaridad positiva y negativa.....	59
Tabla 12. Identificación de los compuestos fenólicos en el extracto de hojas de palto obtenido por extracción supercrítica con CO ₂ (EFSP).....	62
Tabla 13. Identificación de los compuestos fenólicos en jugo por prensado de hojas de palto (JP) por LC-MS en polaridad positiva y negativa	63
Tabla 14. Principales compuestos fenólicos en hoja de palto, descritos en la literatura	64
Tabla 15. Características iniciales de los aceites utilizados en los ensayos de estabilidad oxidativa (Rancimat).....	66

Tabla 16. Tiempos de inducción y factores de protección de los aceites estudiados (AGAO, AC y AS), sin y con la adición de extractos de hojas de olivo en concentraciones de 250 y 630 mg EAC/Kg aceite	67
Tabla 17. Tiempos de inducción y factores de protección de los aceites estudiados (AGAO, AC y AS) sin y con la adición de extractos de hojas de palto en concentraciones de 250 y 630 mg EAC/Kg aceite	70
Tabla 18. Características iniciales de los sistemas utilizados para fritura.....	72
Tabla 19. Evolución del contenido de AT y GT (ppm) durante la fritura de papas “french” en los distintos sistemas de aceite de canola estudiados.....	73
Tabla 20. Evolución del contenido de AT (expresado en ppm), durante la fritura de papas french en los distintos sistemas de AGAO estudiados.....	74
Tabla 21. Constante de velocidad de degradación de primer orden para AT y GT en los aceites de canola y girasol alto oleico en fritura de papas french, sin y con la adición de extractos de hoja de olivo o palto	75
Tabla 22. Evolución del contenido de compuestos polares (%) en AC y AGAO sometidos a fritura de papas “french” sin y con la adición de HAO o HAP (600 mg EAC/kg).	77
Tabla 23. Composición inicial de la fracción polar en AC y AGAO (%).....	81
Tabla 24. Composición inicial y final de la fracción polar en los distintos sistemas estudiados (%)	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ecuaciones que describen el deterioro oxidativo de las materias grasas.....	4
Figura 2. Representación de la estructura química de los tocoles.....	8
Figura 3. Ecuaciones que describen el efecto antioxidante en las materias grasas de los tocoferoles	9
Figura 4. Ecuaciones que describen la acción antioxidante in vitro de los polifenoles.	10
Figura 5. Representación de la estructura química de las procianidinas A1, B1 y C...	12
Figura 6. Clasificación y estructura química de flavonoides.....	14
Figura 7. Ruta propuesta para la biosíntesis de oleuropeína en la familia de las Oleáceas	24
Figura 8. Esquema del relleno de la columna que se utilizó para la extracción supercrítica-CO ₂	34
Figura 9. Relación entre la concentración de polifenoles y la decoloración de DPPH (porcentaje) de los extractos de hojas de olivo (A) y palto (B), respectivamente.....	48
Figura 10. Cromatogramas HPLC con detección UV (280 nm) de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de hojas de olivo.....	52
Figura 11. Cromatogramas HPLC con detección UV (280 nm) de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de hojas de palto	58
Figura 12. Evolución de compuestos polares, expresados en porcentaje, en los sistemas de AC control y adicionados con HAO o HAP, según días de fritura.....	78
Figura 13. Evolución de compuestos polares, expresados en porcentaje, en los sistemas de AGAO control y adicionados con HAO o HAP, según días de fritura.	79
Figura 14. Contenido de la fracción polar en los sistemas AC, AC+HAO y AC+HAP, a las 56 h de fritura (día 7).	83
Figura 15. Contenido de la fracción polar en los sistemas AGAO, AGAO+HAO y AGAO+HAP, en el día 7 de fritura.....	83

ABREVIATURAS

EAC: equivalente ácido cafeico

HAO: extracto hidroalcohólico de hojas de olivo

JO: jugo obtenido por prensado de las hojas de olivo

EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂ de hojas de olivo

OO: oleorresina de hojas de olivo

HAP: extracto hidroalcohólico de hojas de palto

JP: jugo obtenido por prensado de las hojas de palto

EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂ de hojas de palto

OO: oleorresina de hojas de palto

TI: tiempo de inducción

AC: aceite de canola

AGAO: aceite girasol alto oleico

AS: aceite de soja

FP: factor de protección

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

LC-MS: cromatografía líquida acoplada a masa.

AT: alfa tocoferol

GT: gama tocoferol

CP: compuestos polares

PTG: polímeros de triglicéridos

DTG: dímeros de triglicéridos

TGOx: triglicéridos oxidados

DG: diglicéridos

AGL: ácidos grasos libres.

RESUMEN

Las materias grasas sometidas a proceso de fritura en profundidad (180 °C), sufren deterioro oxidativo, hidrolítico y térmico, produciendo una serie de nuevos compuestos volátiles y no volátiles. Estos últimos pueden alterar las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento, así como también pueden afectar la salud de los consumidores. Para retardar el deterioro oxidativo se ha recurrido a distintos mecanismos, siendo el uso de antioxidantes la herramienta más ampliamente utilizada por la industria de los alimentos. Una fuente importante de antioxidantes naturales son los extractos vegetales, que pueden obtenerse desde distintas partes de las plantas. De acuerdo a estos antecedentes, en este trabajo se caracterizaron ocho tipos de extractos obtenidos de hojas de olivo (*Olea europaea*) o palto (*Persea americana*) por cuatro métodos de extracción diferentes: hidroalcohólico (HAO o HAP), jugo (JO o JP), supercrítico-CO₂ (EFSO o EFSP) y oleorresina (OO o OP), mediante su contenido de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu, identificación de polifenoles por LC-MS y capacidad antioxidante por DPPH. Se estudió el efecto de la adición de los extractos de hojas de olivo y palto (hidroalcohólicos, jugos y supercrítico-CO₂) en dos concentraciones (250 y 630 mg EAC/Kg aceite) sobre la estabilidad oxidativa (tiempo de inducción) de aceites de distinto grado de insaturación (soja, canola y girasol alto oleico). Además, se estudió el efecto de la adición de extracto hidroalcohólico de hojas de olivo o palto (600 mg EAC/Kg aceite) a aceite de canola y girasol alto oleico sometidos a fritura de papas “french”, evaluando la formación de compuestos polares y la degradación de tocoles.

Los resultados mostraron que los diferentes extractos de hojas de olivo y palto presentaron distinta composición en polifenoles, lo que sugiere que el método de extracción y el pretratamiento de las hojas (escaldado, secado, molienda, entre otros) determinan el perfil de polifenoles. Siendo los extractos hidroalcohólicos de hojas de olivo y palto, los que presentaron los mayores contenidos de polifenoles totales y capacidad antioxidante. El estudio de la estabilidad oxidativa por Rancimat mostró que HAO, EFSO y EFSP (630 mg EAC/Kg aceite) poseen un efecto antioxidante, aumentando el tiempo de inducción de los tres aceites estudiados con respecto al control ($p < 0,05$), aunque el mayor efecto lo presentaron los aceites más monoinsaturados. Por otro lado, con JO se observó un comportamiento pro-oxidante en los tres aceites estudiados. El HAO adicionado a los aceites de girasol alto oleico o canola (600 mg EAC/Kg aceite) durante la fritura de papas "french" disminuyó la formación de compuestos polares con respecto al control ($p < 0,05$) y mostró un efecto antipolimerizante en ambos aceites. Por otro lado, se observó un aumento en la permanencia de los tocoferoles cuando se adicionó HAO o HAP a estos aceites con respecto al control, lo que sugiere que los tocoferoles son regenerados por los polifenoles u otros componentes menores presentes en los extractos. En consecuencia, los extractos hidroalcohólicos de hojas de olivo y palto (árboles de importancia productiva y comercial en nuestro país por sus respectivos frutos), se pueden considerar como nuevas fuentes de compuestos antioxidantes naturales, ricos en polifenoles, capaces de actuar sinérgicamente con los sistemas antioxidantes propios de los aceites de canola y girasol alto oleico. Este efecto es mayor con el extracto hidroalcohólico de olivo ($p < 0,05$), aumentando así la estabilidad y mejorando el perfil de ambos aceites, lo que representa ventajas desde un punto de vista nutricional, tecnológico y comercial.

SUMMARY

Fats and oils deteriorate through oxidative, hydrolytic and thermal reactions when submitted to deep frying processes (180 °C), producing new volatile and not volatile compounds. These compounds alter the organoleptic and nutritional properties of the food and may be deleterious to the consumer. To delay the oxidative deterioration of oils different mechanisms have been used in the food industry, mainly the incorporation of antioxidants. Plant extracts are important sources of natural antioxidants, which can be obtained from different parts of the plants. Although to identify the individual properties of each component in the extract is complex, the global behaviour may be determined without the need of isolating each particular component. Eight extracts from olive and avocado leaves were obtained by four different extraction methods: hydroalcoholic (HAO or HAP), juice (JO or JP), supercritical-CO₂ (EFSO or EFSP) and oleoresin (OO or OP), which were characterized by the total polyphenols content (Folin-Ciocalteu method), phenol chromatographic profiles (LC-MS) and antioxidant activity (DPPH). The effect of the addition of olive and avocado leaves extracts (hydroalcoholic, juice and supercritical-CO₂) on the oxidative stability of vegetables oils with different unsaturation (soybean oil, canola oil and high oleic sunflower oil) was studied at two concentrations (250 and 630 mg CAE/Kg oil). Besides, French potatoes were submitted to frying using canola and high oleic sunflower oils added to hydroalcoholic olive or avocado leaves extracts (600 mg EAC/Kg oil), studying the polar compounds formation and tocopherols degradation.

The results indicate that the olive and avocado hydroalcoholic extracts showed the highest total polyphenols content and antioxidant capacity. The phenolic composition differ among different extracts, showing the effect of the extraction method; solvent polarity and leaves pre-treatment (i.e. dried, scalded and grinded). The oxidative stability study (using Rancimat ®) showed that the addition of 630 mg CAE/Kg oil of HAO, EFSO and EFSP had an antioxidant effect on the oil systems studied, increasing significantly the induction time ($p < 0.05$). This effect was higher when the system was more monounsaturated. Contrary, a pro-oxidant behavior was observed in JO for oil systems studied. French potato fries in high oleic sunflower and canola oils added with HAO (600 mg EAC/Kg oil) reduced the formation of polar compounds with respect to control ($p < 0.05$) and showed an antipolymeric effect on both oils. On the other side, an increase in the retention of tocopherol was observed when HAO or HAP was added to these oils with respect to control, suggesting regeneration of tocopherol by the polyphenols of the extracts and the extent depends on polyphenols structural features. Therefore, the hydroalcoholic extracts of olive and avocado leaves (trees of both commercial and productive importance in Chile) can be considered as new sources of natural antioxidant compounds. These extracts showed a high polyphenol content and may act synergistically with the antioxidant systems of canola and high oleic sunflower oils. This effect is significantly higher in the hydroalcoholic extract of olive leaves, increasing the stability and improving the oil's profile in the nutritional, technological and commercial point of view.

INTRODUCCIÓN

La estabilidad de las materias grasas en general, como las utilizadas en fritura, depende del empleo de sistemas antioxidantes que sean capaces de retardar su deterioro oxidativo. Con este propósito, se ha recurrido al uso de antioxidantes naturales o sintéticos, aunque estos últimos se han cuestionado por sus posibles efectos carcinogénicos a concentraciones elevadas (Ito *et al.*, 1986). Entre los naturales liposolubles se encuentran a los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) e hidrosolubles a los polifenoles (principalmente flavonoides y ácidos fenólicos).

En este contexto, en la literatura se encuentra información sobre el efecto antioxidante de polifenoles cuando se adicionan a matrices lipídicas modelo como: metil linoleato (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibted, 2002), grasas y aceites purificados (libres de sus componentes menores) (Frankel *et al.*, 1996; Thiyam *et al.*, 2006) y grasas y aceites naturales (Wanasundara y Shahidi, 1996; Russin *et al.*, 2006; Navas *et al.*, 2006).

La estructura química de los polifenoles también adquiere importancia, ya que no todos tienen la misma actividad. En este sentido, en diversos estudios se ha evaluado el efecto de la adición de algunos extractos vegetales sobre la estabilidad oxidativa de aceites como es el caso de romero (Lalas y Dourtoglou, 2003), cilantro y espinaca (Shyamala *et al.*, 2005), hojas de té negro y verde (Gramza *et al.*, 2006), hojas de té, cebolla, ajo (Navas *et al.*, 2006; Iqbal y Bhanger, 2007). En esta perspectiva, las diferentes partes de la planta (hojas, frutos, flores, corteza) se presentan como nuevas fuentes para la obtención de extractos de antioxidantes naturales, las cuales podrían ser utilizadas en la protección de la materia grasa durante el proceso de fritura.

En este estudio, se eligieron distintos métodos de extracción de polifenoles en hojas de olivo y palto (hidroalcohólico, jugo y por extracción supercrítica), para evaluar como el método de preparación de éstos, influye en el perfil y capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en cada tipo de extracto.

Considerando los antecedentes anteriores, en este estudio se planteó como tema central evaluar la capacidad antioxidante de extractos de hojas de olivo o palto (ambos árboles con importancia productiva y comercial en nuestro país), como fuentes de antioxidantes naturales, entre los cuales se encuentran a los polifenoles, tomando como modelo la protección de aceites vegetales de diferente de insaturación y contenido de tocoles, como canola, girasol alto oleico y soja durante la fritura de papas “french” o bastón y determinar si estos podrían actuar sinérgicamente con los sistemas antioxidantes propios de cada aceite, aumentando así su estabilidad y mejorando su perfil desde un punto de vista nutricional, tecnológico y comercial.

1.1.- Proceso de Fritura

La fritura es un proceso combinado de transferencia de masa (evaporación), energía (calor) y de reacciones químicas entre el aceite y el aire, la humedad (del alimento), la temperatura (180 ± 10 °C) y componentes del alimento, como proteínas, carbohidratos, o aditivos químicos. La mayoría de las operaciones de fritura se realizan por breve tiempo a altas temperaturas (170-180 °C); como consecuencia, la humedad contenida en el alimento migra a la superficie y escapa como vapor de agua (Gupta, 2004).

En este proceso, sea continuo o discontinuo, la materia grasa sufre un deterioro irreversible de tipo físico y químico. Las alteraciones físicas involucran cambios en el color, aumento de la viscosidad, disminución del punto de humo y formación de espuma, los que pueden detectarse visualmente; por el contrario, el resultado de las reacciones que modifican químicamente la estructura de las materias grasas no son observables a simple vista, sino que se necesitan pruebas analíticas específicas para ello (Warner, 2004).

Entre las reacciones de degradación pueden mencionarse las de oxidación, hidrólisis, polimerización, isomerización y ciclización (Dobarganes *et al.*, 1988), que producen como consecuencia la modificación físico-química del aceite que, al alcanzar un contenido de compuestos polares por sobre lo establecido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA, 1996), hacen que sea necesario descartarlos (los límites establecidos en la reglamentación señalan que el contenido máximo de ácido α linolénico presente en materias grasas para fritura debe ser inferior a un 2%, máximo de 2,5% de acidez libre, 25% de compuestos polares y punto de humo inferior a 170 °C). Con esta reglamentación, se descarta el uso de aceite de soja, maíz y canola, entre otros.

Los factores que influyen en la estabilidad de los aceites de fritura son variados y entre ellos puede señalarse la humedad propia del alimento, ya que se libera al medio favoreciendo el deterioro hidrolítico (Warner, 2004), el oxígeno del aire que, al estar en contacto con la superficie de la materia grasa, entra al medio de fritura catalizando los procesos oxidativos y, por último, la alta temperatura, que favorece el deterioro de tipo térmico.

a) Deterioro hidrolítico: Se produce por la liberación de aire y vapor de agua desde el alimento que está en contacto con el aceite a temperatura de fritura, iniciándose así una cadena de reacciones interrelacionadas. El vapor causa la hidrólisis de los triglicéridos, que resulta en la formación principalmente de ácidos grasos libres y diglicéridos, produciendo un aumento de la acidez de la materia grasa (Fennema, 1993)

b) Deterioro oxidativo: Se produce por la oxidación de los ácidos grasos insaturados en presencia de oxígeno del aire. Este se conoce como autooxidación, e involucra un mecanismo mediado por radicales libres en tres etapas: inicio, propagación y término (Yanishlieva y Marinova, 2001), las que se describen en la Figura 1:

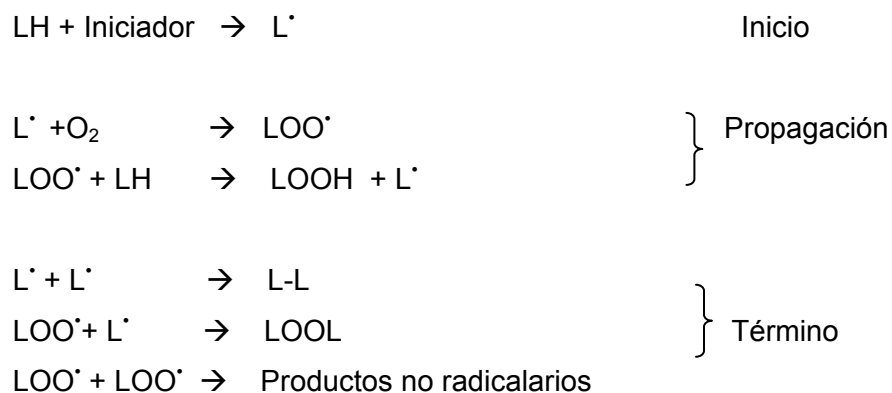


Figura 1. Ecuaciones que describen el deterioro oxidativo de las materias grasas.

Inicio: En esta etapa, se sustrae uno de los átomos de hidrógeno del carbono adyacente al doble enlace de un ácido graso insaturado (LH), formándose un radical alquil (L^{\bullet}). La luz y metales actúan como iniciadores (Belitz, 1997; Yanishlieva y Marinova, 2001).

Propagación: El radical alquil (L^{\bullet}) formado en el inicio reacciona con el oxígeno atmosférico originando un radical peroxil (LOO^{\bullet}); este último reacciona con otras moléculas de ácidos grasos insaturados, sustrayendo un átomo de hidrógeno en la posición alílica o bis alílica para formar el hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical alquil (L^{\bullet}), que propaga la reacción. Los hidroperóxidos constituyen los productos primarios de la oxidación (Belitz, 1997).

Término: Los radicales tienden a dimerizar para terminar la reacción en cadena. Los radicales libres provenientes de la descomposición de los hidroperóxidos se asocian para formar una serie de compuestos no radicalarios estables, como aldehídos, cetonas, alcanos, alcoholes, los cuales son responsables de aromas y sabores indeseables y de cambios en el color (Cheftel, 1992).

c) Deterioro térmico: Se origina cuando la materia grasa se somete a altas temperaturas por períodos prolongados. Se caracteriza porque se forman dímeros producto del cambio de la estructura 1,4-pentadieno del ácido graso, pasando a posiciones en las que se encuentran conjugados, los cuales mediante cicloadición 1,4 originan los aductos de Diels-Alder. Estos se pueden producir entre dos moléculas de diferentes triglicéridos, dentro de una molécula del triglicérido o por unión de dos ácidos grasos (Warner, 2004). El dímero puede derivar en polímeros (compuestos de alto peso molecular); también pueden formarse isómeros *trans*, posicionales y monómeros cíclicos.

Como consecuencia de la dimerización interna del ácido graso polimerizado se forman monómeros cíclicos. Cuando existen dienos conjugados en la molécula, estos monómeros se ciclan formando anillos de 5 y 6 carbonos, según su origen, a partir de ácido linoleico o linolénico (respectivamente). Los monómeros cíclicos constituyen la fracción más tóxica de todas las que se forman durante la termooxidación (Sébédio y Grandgirard, 1989; López-Varela *et al.*, 1995; Márquez-Ruiz y Dobarganes, 1996).

Los compuestos de degradación que se forman pueden ser volátiles y no volátiles. Los primeros, por su naturaleza, se eliminan en gran parte durante el proceso y su importancia está relacionada con las características organolépticas residuales que dejan sobre el producto frito, mientras que los componentes no volátiles son un grupo variado (monómeros oxidados, dímeros, polímeros oxidados, compuestos cíclicos), que se acumulan desde el inicio del proceso, permanecen en la materia grasa y se incorporan al alimento frito. Los compuestos polares son todos aquellos que presentan una polaridad mayor a la de los triglicéridos (Belitz, 1997).

Entre los métodos para medir el deterioro termooxidativo de una materia grasa se encuentra el propuesto por Dobarganes *et al.* (1988) para la determinación de compuestos polares, que se ha transformado en oficial (IUPAC, 2000). Este se basa en el fraccionamiento de una materia grasa a través de una columna de sílice activada, mediante elución con distintos solventes orgánicos, obteniendo dos fracciones de compuestos. La primera fracción corresponde a los triglicéridos no alterados y la segunda a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales.

Este método, que ha resultado ser uno de los más exactos, simples y reproducibles, proporciona una medida directa de la degradación, aplicable a cualquier materia grasa sometida a calentamiento.

En consecuencia, es importante considerar que el proceso oxidativo de los aceites vegetales depende del origen, la calidad inicial, la insaturación y el contenido de antioxidantes naturales y/o sintéticos de la materia grasa empleada (Martín-Polvillo *et al.*, 1996; Márquez-Ruiz *et al.*, 1999). El conocimiento de los factores que influyen en este proceso ha permitido a la industria de alimentos manejar y retardar la oxidación de las matrices lipídicas mediante diversas estrategias, siendo el uso de antioxidantes sintéticos la herramienta más ampliamente utilizada (Yanishlieva, 2004).

1.2.- Antioxidantes

Son moléculas orgánicas, de origen natural o sintético, que pueden definirse como cualquier sustancia que sea capaz de retardar el desarrollo de rancidez en el alimento o de otro deterioro en el sabor como consecuencia de la oxidación, mediante la prolongación del período de inducción (Yanishlieva y Marinova, 2001). Se ha descrito que los antioxidantes aumentan la vida útil de un alimento rico en grasas entre un 15 a un 200% (Maestro-Durán y Borja-Padilla, 1993).

Los sintéticos corresponden a compuestos fenólicos como el Hidroxibutilanisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terbutilhidroquinona (TBHQ) y el Galato de Propilo. Entre sus ventajas de uso se puede mencionar un bajo costo, pero en general son volátiles y se descomponen con facilidad a altas temperaturas, por lo que no son adecuados para ser adicionados a aceites de fritura. Existe algún cuestionamiento sobre su uso, por el posible efecto como promotores cancerígenos (Thompson y Moldeus, 1988).

Los antioxidantes naturales a pesar de tener un mayor costo en comparación a los sintéticos, han demostrado ser eficientes y seguros, lo que ha permitido utilizarlos como una alternativa a los sintéticos (Valenzuela y Nieto, 1996; Yanishlieva y Marinova, 2001)

Los antioxidantes pueden categorizarse en primarios o secundarios. Los primarios atrapan radicales libres retrasando la propagación, por ello se denominan quebradores de cadena, destruyéndose durante el período de inducción, e incluyen principalmente a la vitamina E (α -tocoferol) y polifenoles. Los secundarios actúan mediante unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicalarias, absorción de la radiación ultravioleta o desactivación del oxígeno singulete, entre otros (Yanishlieva, 2004).

1.2.1.- Antioxidantes Naturales

Se encuentran presentes en prácticamente todos los vegetales, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales, donde tienen múltiples efectos biológicos debido a su actividad antioxidante (Halliwell, 1995; Barclay y Vinqvist, 2003). La mayoría corresponde a compuestos fenólicos, entre los cuales los principales grupos son los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) y polifenoles (flavonoides y ácidos fenólicos).

1.2.2.-Tocoles

Los tocoles se encuentran principalmente en semillas oleaginosas, hojas y en otras partes verdes de los vegetales. Estos reaccionan con los radicales libres protegiendo de la peroxidación lipídica a las lipoproteínas y a los fosfolípidos que forman las membranas celulares.

Estructuralmente están formados por un anillo cromano y una cadena lateral fitilo unida en la posición C-2 del anillo. Los tocotrienoles difieren de los tocoferoles en la presencia de tres dobles enlaces aislados en la cadena fitilo. En ambos compuestos pueden identificarse homólogos (α , β , γ y δ), de acuerdo al número y posición de los grupos metilo en el anillo fenólico (Figura 2).

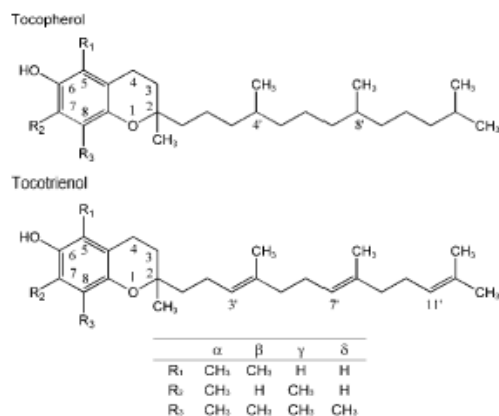


Figura 2. Representación de la estructura química de los tocoles

1.2.3.- Actividad antioxidante de tocoles

El efecto antioxidante de los tocoferoles (T) (Figura 3) se manifiesta mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo en la posición 6 del anillo cromano al radical peroxil, formando el hidroperóxido lipídico (LOOH) y el radical tocoferoxil (T•) (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996), el cual se estabiliza por resonancia. Los radicales tocoferoxil (T•) reaccionan con los peroxil (LOO•) en presencia de una alta concentración de estos últimos, formando un aducto tocoferol-peroxil lipídico (T-OOL) o reaccionando con otro radical (T•) (Liebler *et al.*, 1990). *In vivo*, la potencia donante de hidrógeno de los tocoferoles decrece en el siguiente orden $\alpha > \beta > \gamma > \delta$; sin embargo, existe una amplia controversia respecto de la potencia relativa *in vitro* en grasas, aceites y lipoproteínas, donde se ha visto que sigue un orden inverso ($\delta > \gamma \approx \beta > \alpha$).

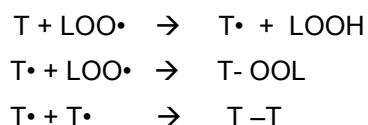


Figura 3. Ecuaciones que describen el efecto antioxidante en las materias grasas de los tocoferoles (T: tocoferol ; T•: radical tocoferoxil ; LOO• : radical peroxil).

Los T son efectivos al romper la cadena porque producen radicales antioxidantes estables y relativamente no reactivos, debido a la estabilización resonante de su estructura fenoxil; los radicales tocoferoxil α y β tiene tres formas resonantes, mientras que γ y δ tienen sólo dos. Los radicales T• ejercen su máxima eficacia a niveles relativamente bajos, siendo los γ T y δ -T los de mayor actividad antioxidante *in vitro* (Nawar, 1993; Martínez de la Cuesta *et al.*, 1995).

Sin embargo, se ha observado un efecto prooxidante en aceites vegetales, particularmente para el α -tocoferol, que se produce vía propagación de radicales libres cuando este está presente en altas concentraciones (sobre 250 ppm) (Cillard *et al.*, 1980; Yamamoto, 2001). Este efecto disminuye con el aumento de la temperatura, aún en presencia de concentraciones altas de radicales (Marinova y Yanishlieva, 1992).

1.2.4.- Polifenoles

Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Por sus propiedades antioxidantes se han relacionado con múltiples efectos biológicos, proporcionando protección frente a algunas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares (Pace-Asciak *et al.*, 1995; Jang *et al.*, 1997; Soobrattee *et al.*, 2005).

En general, poseen dos rutas de biosíntesis: desde el ácido siquímico y acetato. De acuerdo a su estructura, pueden dividirse en clases diferentes (Harborne, 1989, Tabla 1), encontrándose desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, siendo los flavonoides el grupo más importante.

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles considerando el número de carbonos de su estructura

Polifenoles	Nombre de la estructura
C ₆	Fenoles simples y benzoquinonas
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos y acetofenonas
C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos, derivados fenilpropanoides, cumarinas y cromonas
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados
(C ₆ -C ₁)	Taninos hidrolizables
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanos, neolignanos
(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas

La acción antioxidante *in vitro* de los polifenoles (PPH) se debe a la capacidad de atrapar tanto radicales libres (por donación de un átomo de hidrógeno) como iones metálicos (agente quelante) (Bravo, 1998). El radical intermediario fenoxil (PP•) que se forma es relativamente estable, inhibiendo la propagación al reaccionar con otros radicales libres. La representación de esta acción aparece en la Figura 4:

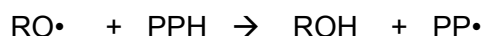
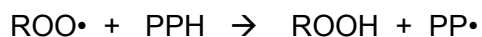


Figura 4. Ecuaciones que describen la acción antioxidante *in vitro* de los polifenoles.

Esta varía en función de su estructura química y de su solubilidad, de acuerdo con las siguientes características: presencia del grupo *O*-dihidroxi en el anillo B (situación que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones), doble enlace en las posiciones 2 y 3 conjugados con la función 4-oxo del anillo C y los grupos OH en las posiciones 3 y 5, en los anillos C y A, respectivamente (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

1.2.5.- Procianidinas

Las procianidinas son compuestos que tienen como precursores a catequinas y epicatequinas, encontrándose mayoritariamente las de tipo diméricas, que se caracterizan por presentar dos subtipos A y B, siendo las tipo A más rígidas en conformación que las de tipo B, debido a la presencia de enlaces C-C y C-O entre monómeros. Las de tipo B incluyen a procianidinas B1 ((-)-epicatequina-(4 β →8)-(+)-catequina), B2 ((-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina), B3 ((+) catequina-(4 α →8)-(-)-catequina), B4 ((+) catequina-(4 α →8)-(-)-epicatequina y B5 ((-)-epicatequina-(4 β →6)-(-)-epicatequina), también se identificaron a triméricas o tipo C (formadas por tres monómeros unidos entre sí por dos enlaces C4→C8) y tetraméricas (Aron y Kennedy, 2008) (Figura 5).

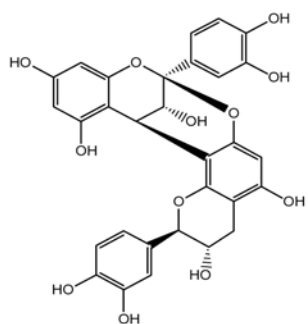
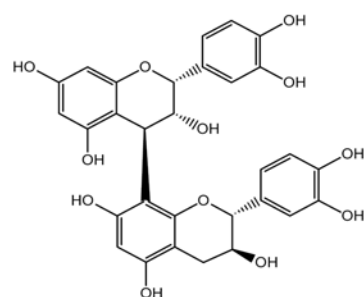
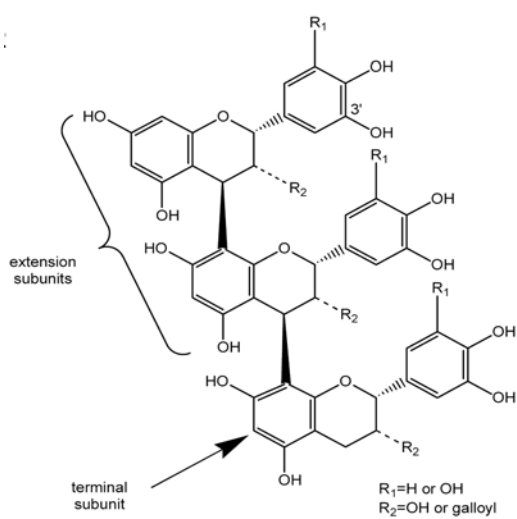
A-type Dimer (A1)**B-type Dimer (B-1)****C-type Proanthocyanidin**

Figura 5. Representación de la estructura química de las procianidinas A1, B1 y C

1.2.6.- Flavonoides

Los flavonoides, desde el punto de vista estructural, están formados por dos anillos aromáticos unidos a través de tres carbonos que usualmente forman un heterociclo oxigenado (difencilpropano) (Figura 6). El anillo A proviene de una molécula de resorcinol ó floriglucinol sintetizada en la ruta del acetato, mientras que el anillo B se origina en la ruta del shikimato (Harborne, 1989).

Estos compuestos pueden encontrarse como entidades libres (agliconas), o en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma tal que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres y, por lo tanto, presentan una menor actividad antioxidante que su aglicona (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

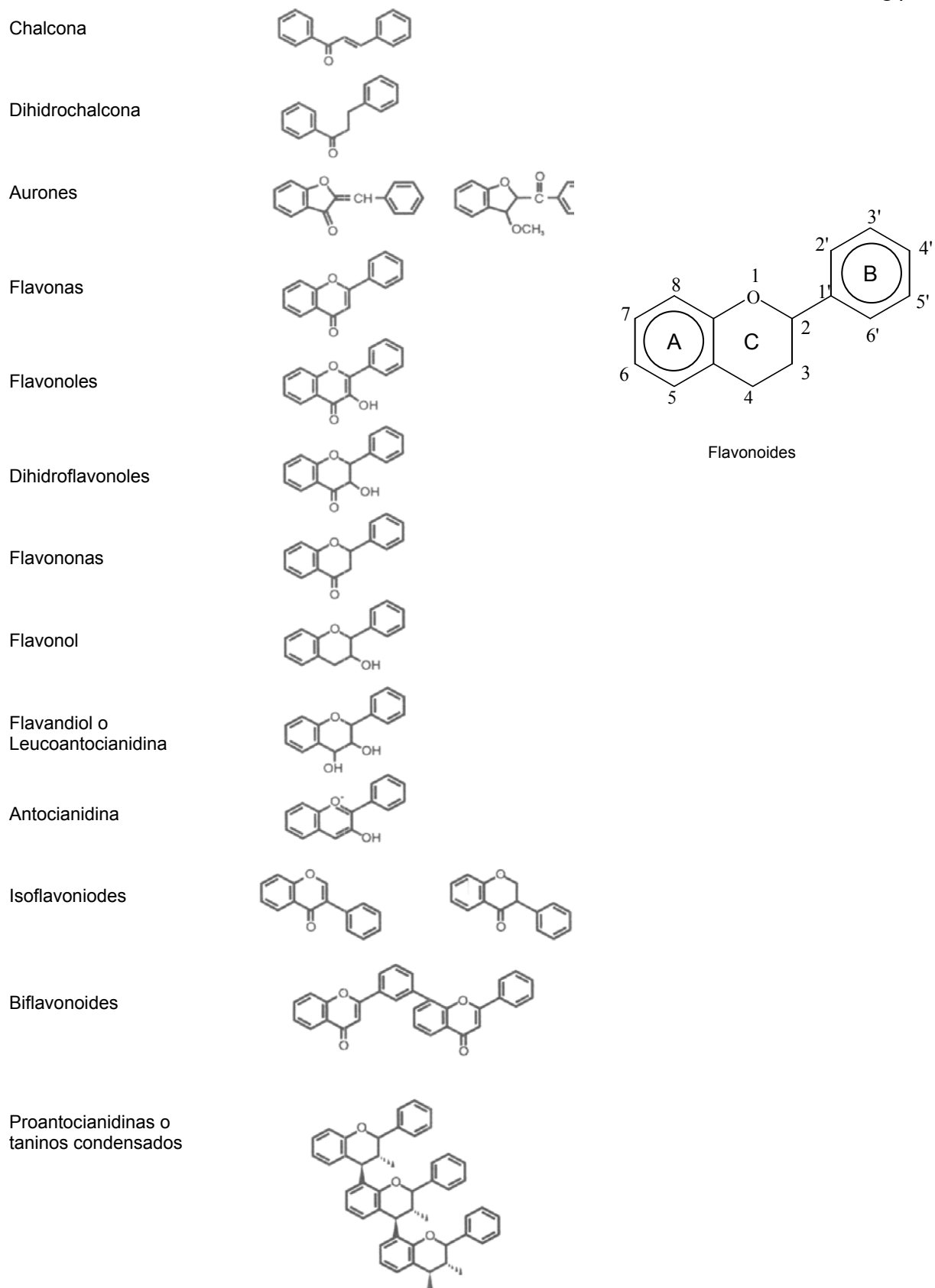


Figura 6. Clasificación y estructura química de flavonoides

1.2.7.- Actividad antioxidante de los flavonoides sobre linoleato de metilo

Al evaluar la oxidación de linoleato de metilo a temperaturas menores a 60 °C, se ha encontrado que la actividad antioxidante de los flavonoides depende del número de grupos hidroxilos en el anillo B, principalmente en posición orto y para; como también de la presencia de un doble enlace en posición 2, 3 y de la glicosilación de la molécula (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibsted, 2002). Se ha observado además que el uso de polifenoles impide o retarda la formación de hidroperóxidos en esta matriz, de acuerdo al siguiente orden: miricetina > quercetina > alfa-tocoferol > (+)-catequina > kaempferol = rutina (Pekkarinen *et al.*, 1999). En estudios similares se evaluó el efecto antioxidante de quercetina, (-)-epicatequina, y (+)-catequina, determinando que la primera fue más eficiente en inhibir la oxidación, seguido por las catequinas (Pedrielli y Skibsted, 2002).

1.2.8.- Actividad antioxidante de los polifenoles sobre grasas y aceites

En numerosos estudios se ha demostrado el efecto de la adición de polifenoles sobre diferentes materias grasas, como los aceites de palma (Pereira y Das, 1990), soja (Warner y Laszlo, 2005), linaza (Russin *et al.*, 2006), maíz (Fukuda *et al.*, 1986; Chen y Ho, 1997), canola (Wanasundara y Shahidi, 1994; Su *et al.*, 2004), girasol (Yanishlieva y Marinova, 1996), algodón (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007) y sobre materias grasas de origen animal, como manteca de cerdo (Chen y Ho, 1997; Antoshina *et al.*, 2005) y marino (Nieto *et al.*, 1993; Wanasundara y Shahidi, 1996; Ho *et al.*, 1997; Wanasundara y Shahidi, 1998a), entre otras. Sin embargo, este efecto puede ser tanto antioxidante (Fukuda *et al.*, 1986; Pereira y Das, 1990; Nieto *et al.*, 1993; Wanasundara y Shahidi, 1994; Wanasundara *et al.*, 1996; Yanishlieva y Marinova, 1996; Ho *et al.*, 1997; Su *et al.*, 2004; Antoshina *et al.*, 2005; Warner y Laszlo, 2005; Russin *et al.*, 2006; Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007), como pro-oxidante (Warner y Laszlo, 2005). Los estudios citados se resumen en la Tabla 2.

Las condiciones experimentales en las cuales se han llevado a cabo estos estudios son diversas, lo que contribuye a la variabilidad de los resultados encontrados, como por ejemplo la estructura y concentración del polifenol, origen e insaturación de la materia grasa, temperatura y método para la determinación de la oxidación de la materia grasa (formación de peróxidos, formación de compuestos polares, entre otros) todos los cuales influyen en la evaluación de los polifenoles sobre el sistema.

En relación al tipo de estructura de los polifenoles (flavonoides, fenoles simples e isoflavonas, entre otros), se ha demostrado que su capacidad antioxidante depende del número de grupos hidroxilos presentes en el compuesto fenólico. Por otro lado, la sustitución completa del anillo C en los flavonoides es primordial para aumentar la capacidad antioxidante frente a la oxidación térmica a 70 °C del aceite de algodón (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007). Las isoflavonas, como genisteína y daidzeína, (Antoshina *et al.*, 2005; Russin *et al.*, 2006), muestran un efecto limitado como antioxidantes en materias grasas.

En otro caso, los polifenoles extraídos del té negro y luego aislados y purificados se adicionaron sobre aceite de canola, encontrándose que las teaflavinas fueron menos eficientes que las catequinas (epímeros y metiladas) en la protección antioxidante. Dentro de las catequinas, la metilación en posición 3'-OH significó una pérdida de actividad antioxidante, sin que se apreciaran diferencias entre cada catequina y su par epímero (Su *et al.*, 2004).

Otro factor que afecta la actividad de los polifenoles como antioxidantes es la temperatura. Por ejemplo, se ha descrito que variaciones de 10 °C cambian el orden de actividad (miricetina > morina > kaempferol > quercetina a 170 °C y morina > kaempferol > miricetina > quercetina a 180 °C) (Pereira y Das, 1990). Por otro lado, el ácido ferúlico a 60 °C, no presentó efecto, sin embargo a 180 °C se comportó como antioxidante (Warner y Laszlo, 2005). La fraxetina, adicionada a aceite de girasol, mostró un aumento de su actividad antioxidante con el aumento de la temperatura (Yanishlieva y Marinova, 1996).

Tabla 2. Efecto de la adición de polifenoles en la oxidación de diferentes materias grasas

Tipo de matriz	Condiciones	Polifenoles	Efecto antioxidante	Referencia
Aceite de algodón	Peróxidos 70 °C	Quercetina, fisetina, (+)-catequina luteolina, taxifolina, eriodyctiol	Alto Moderado	Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007.
Aceite de linaza, prensado en frío, comercial.	Peróxidos 60 °C	Genisteína: 2µm/ g aceite 4µm/ g aceite	Moderado Moderado	Russin <i>et al.</i> , 2006.
Aceite de soja refinado sin aditivos	Compuestos polares 60 °C	Mono y diglicéridos del ácido ferúlico: 1,2 µm	Alto	Warner y Laszlo, 2005.
		Acido ferúlico: 0,6µm	Sin efecto	
	180 °C	Etil firulato: 1,3 µm	Pro-oxidante	
		Acido ferúlico: 0,6µm	Alto	
Materias grasas de origen animal (cerdo)	Peróxidos 72 °C	1x 10 ⁻⁴ a 5x10 ⁻³ M Baikaleína, Quercetina, Dihidroquercetina, Baikalina, Genistina, Daidzeína	Alto Moderado Bajo	Antoshina <i>et al.</i> , 2005.
Aceite de canola	Consumo de oxigeno 95 °C	0,5mM Catequinas, epicatequinas teaflavinas	Alto Moderado	Su <i>et al.</i> , 2004.
Aceites marinos	Peróxidos, TBA 65°C	Miricetina, quercetina y morina	Alto	Wanasundara y Shahidi, 1998 (a).
Manteca de cerdo y aceite de maíz (sin antioxidantes sintéticos)	Tiempo de inducción 110 °C	Ácido cafeico (CA), fenetil éster de ácido cafeico (CAPE), ácido ferúlico (FA), fenetil éster de ácido ferúlico (FAPE), ácido rosmarínico (RA) y ácido clorogénico (CHA)	M. de cerdo: Alto CA>CAPE~RA>CHA>>FA~ FAPE. Aceite de maíz: Moderado RA>CA~CAPE~CHA FA y FAPE: sin efecto	Chen y Ho, 1997.
Aceite marinos	Peróxidos 65 °C	Catequinas aisladas del té verde (200 ppm). Mejor efecto de Epicatequina galato	Alto	Ho <i>et al.</i> , 1997.
Aceites marinos	Peróxidos, TBA 65 °C	Epicatequina (EC), Epigalocatequina (EGC), Epicatequinagalato (ECG), Epigalocatequinagalato (EGCG) (200ppm)	Alto ECG>EGCG>EGC>EC	Wanasundara y Shahidi, 1996.
Aceite de girasol	Factor F 25°C 100 °C	0.01,0.02 y 0.05% Acido cafeico, Esculetina Fraxetina	Moderado Alto	Yanishlieva y Marinova, 1996.
Aceite de canola refinado y blanqueado.	Peróxidos, TBA 65 °C	Miricetina, (-) epicatequina, naringina, rutina, quercetina y morina	Alto	Wanasundara y Shahidi, 1994.
Aceite de sardina	Peróxidos, TBA 60°C	Catequina, morina, quercetina (0,7 g/kg aceite)	Alto	Nieto <i>et al.</i> , 1993.
Aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado	Tiempo de inducción	(30µm)		Pereira y Das, 1990.
	60 °C			
	170 °C	Miricetina>kaempferol>miricetina> quercetina.	Alto.	
	180 °C	Morina>kaempferol>miricetina> quercetina.	Alto	
Aceite de maíz	TBARs 60 y 180 °C	Sesamol 0,2%	Alto	Fukuda <i>et al.</i> , 1986.

Sin embargo, bajo ciertas condiciones (altas concentraciones, alto pH, presencia de hierro), los antioxidantes fenólicos pueden iniciar un proceso de autooxidación y comportarse como prooxidantes (Bravo, 1998). A nivel biológico se ha descrito que la actividad prooxidante sería directamente proporcional al número de grupos OH, principalmente en el anillo B, como en el caso de miricetina y baicaleína, que aumentaron significativamente la producción de peróxido de hidrógeno; la excepción a este comportamiento se observó en mono y dihidroxiflavonoides. Además, se ha descrito que el doble enlace en la posición 2, 3 y la función 4 oxo en flavonas pueden promover la formación de radicales libres inducida por cobre divalente en presencia de oxígeno. Estos antecedentes sugieren que los atributos estructurales que aumentan la actividad antioxidante en los flavonoides podrían en algunos casos exacerbar el estrés oxidativo, con el consecuente daño funcional y estructural a nivel molecular (Heim *et al.*, 2002).

1.2.9.- Interacción entre tocoles y polifenoles

Se ha sugerido un efecto sinérgico en la actividad antioxidante de polifenoles y tocoferoles, específicamente en combinaciones de algunos flavonoides con α -tocoferol a baja temperatura (< 60 °C). Se ha demostrado la regeneración de α -tocoferol a partir de uno ó más flavonoides, como es el caso de miricetina, quercetina y rutina en linoleato de metilo a 40 °C (Pekkarinen *et al.*, 1999); quercetina y catequina en linoleato de metilo a 50 °C (Pedrielli y Skibsted, 2002); quercetina en una emulsión aceite/agua y liposomas (Becker *et al.*, 2007); ácido 3,4-hidrobenzoico, gálico, epicatequina y epigallocatequina en hexano a temperatura ambiente (Pazos *et al.*, 2007) Este mismo efecto de regeneración de α -tocoferol se ha descrito con la adición de un extracto de hojas de té verde a ácido α -linolénico a 37 °C en solución (terbutilmetiléter y alcohol/agua) (Jia *et al.*, 1998) y en micelas (SDS) (Zhou *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005).

Contrariamente a los resultados de los estudios anteriores, a mayor temperatura (100 °C), Marinova *et al.* (2008), reportaron que en triglicéridos de aceite de girasol, el flavonoide miricetina fue regenerado a partir de α -tocoferol. Otros autores también han reportado un efecto sinérgico a 180 °C con la adición de un extracto de romero y salvia a aceite de palma (Che Man y Jaswir, 2000) y orégano a aceite de algodón (Houhoula, *et al.*, 2003); sin embargo, en estos casos no se estudiaron los procesos de regeneración.

El mecanismo de sinergia entre flavonoides y tocoferoles aún no es bien comprendido y es, por lo tanto, controversial. La regeneración de α -tocoferol a partir de flavonoides se ha explicado por un menor valor redox de este último, lo que permitiría la transferencia de un protón al radical tocoferoxil, reduciéndolo (Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Pazos *et al.*, 2007). El proceso de regeneración dependería del medio donde ocurre la reacción, del potencial redox y de la estructura química del flavonoide (Zhou *et al.*, 2000).

1.3.- Fuentes vegetales de antioxidantes

Existe un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales de antioxidantes y en el estudio de sus efectos. Una de ellas son los extractos que pueden obtenerse desde distintas partes de las plantas, aunque presentan como desventaja la dificultad de identificación de las propiedades individuales de cada constituyente. En relación con la actividad antioxidante de los extractos, se ha descrito que esta depende tanto de la estructura de los polifenoles como de la presencia de componentes menores, de manera que los polifenoles pueden presentar un comportamiento diferente al ser observado cuando están puros y formando parte de un extracto.

1.3.1- Actividad antioxidante de extractos de polifenoles en grasas y aceites

Se ha estudiado la actividad antioxidante de los polifenoles contenidos en extractos de cáscara de avena (Tian y White, 1994); té (negro y verde) (Wanasundara y Shahidi, 1998 b; Osman *et al.*, 2004; Gramza *et al.*, 2006; Navas *et al.*, 2006), ajo (Navas *et al.*, 2006; Iqbal y Bhangar, 2007), piel de cebolla (Navas *et al.*, 2006), orégano (Maestri *et al.*, 1996; Scheuermann y Cea, 2002; Houhoula *et al.*, 2003), romero (Maestri *et al.*, 1996; Frankel *et al.*, 1996; Gamel y Kiritsakis, 1999; Che Man y Jaswir, 2000; Lalas y Dourtoglou, 2003), eucalipto (Maestri *et al.*, 1996), salvia (Che Man y Jaswir, 2000), cáscara de papa (Rehman *et al.*, 2004), col, cilantro y espinaca (Shyamala *et al.*, 2005), hojas de cacao (Osman *et al.*, 2004) y torta de extracción de aceite de canola (Thiyam *et al.*, 2006), entre otros (Tabla 3). Los resultados son controversiales, ya que, aparte del efecto antioxidante, en algunos casos se observó una acción pro-oxidante que se atribuyó a la presencia de clorofila (como en el caso de hojas de té verde) (Wanasundara y Shahidi, 1998b). La explicación para estos resultados es diversa, ya que influyen factores como las diferencias en las condiciones experimentales, la forma de preparación de los extractos, el tipo de solvente utilizado, la concentración de polifenoles en el extracto y la presencia de componentes relacionados, entre otros.

Tabla 3. Efecto de la adición de extractos vegetales en la oxidación de materias grasas

Tipo de materia grasa	Condiciones	Tipo de extracto	Efecto	Referencia
Aceite de girasol	Peróxidos, dienos y trienos conjugados, TBARS 50 °C	Extracto metanólico de ajo 250, 500 ppm 1000ppm	Moderado Alto	Iqbal y Bhanger, 2007.
Aceite maíz refinado comercial	Peróxidos 55 °C 140 °C	Té, dientes de ajo, piel de cebolla (12,5 y 25% hoja seca) Té, ajo Té, ajo, cebolla.	Alto Sin efecto	Navas <i>et al.</i> , 2006.
Aceite de girasol refinado, comercial Manteca de cerdo, sin aditivos.	Tiempo de inducción 110 °C	Extracto acuoso y etanólico de hojas de té negro y verde (500 y 1000 ppm) Girasol: 1000 ppm M. de cerdo: 500 y 1000 ppm	Alto Alto	Gramza <i>et al.</i> , 2006.
Aceite de canola purificado, sin antioxidantes naturales.	Peróxidos Propanal 40 °C	Extracto metanólico (70%) de torta aceite de canola: 500 µmol/Kg aceite (equiv a ácido sinápico o sinapina). Acido sinápico y sinapina (éster de ácido sinápico): 500 µmol / Kg ácido sinápico	Alto Alto	Thiyam <i>et al.</i> , 2006
Aceite de girasol y maní, sin aditivos	Peróxidos 180 °C 10-20 °C	Extractos etanólicos (2% hoja seca) Cilantro y espinaca <i>Alternanthera sessilis</i> (hongone) Col	Alto Moderado Moderado	Shyamala <i>et al.</i> , 2005.
Aceite refinado de soja	Acidez libre, peróxidos 25 y 45 °C	Extracto de cáscara de papa (800, 1600 y 2400 ppm) > 1600 ppm	Alto	Rehman <i>et al.</i> , 2004.
Oleína de palma	Peróxidos 65 °C 25 °C	(50, 100, 200 ppm) Hojas de cocoa 8% humedad Inicio a 4ª hoja (200 ppm) 5ª a 8ª hoja (200 ppm) Ext hojas de té verde	Alto Moderado Alto	Osman <i>et al.</i> , 2004.
Aceite de algodón refinado	Dienos conjugados, valor de anisidina y compuestos polares 20 °C y 185 °C	2g l ⁻¹ : Orégano molido Extracto etanólico orégano	Moderado Alto	Houhoula <i>et al.</i> , 2003.
Aceite de soja comercial	Tiempo de inducción 185 °C	10% extracto de romero en etanol (Rosemax)® 400 mg/Kg aceite	Alto	Lalas y Dourtoglou, 2003.
Aceite de girasol refinado sin antioxidantes sintéticos.	Peróxidos 10-20 °C	Oleorresina de orégano (200-400-600 y 800 ppm)	Sin efectos claros	Scheuermann y Cea 2002.
Oleína de palma refinado	Peróxidos, anisina compuestos polares 180 °C	Olerresina romero (0,4%) Extracto salvia (0,4%)	Alto Alto	Che Man y Jaswir, 2000
Aceite de girasol	Factor F 63 y 120 °C	Extracto metanólico de romero (0,02%)	Alto	Gamel y Kiritsakis, 1999.
Aceite marinos	Peróxidos, TBARS 65 °C	100, 200, 500 y 1000 ppm Extracto de té verde Extracto té verde sin clorofila ≤200 ppm	Pro-oxidante Alto	Wanasundara y Shahidi, 1998 (b).
Aceite de maní	Peróxidos 60 °C	Aceites esenciales (0,02 y 0,1%) Orégano Romero y Eucaliptos	Alto Moderado	Maestri <i>et al.</i> , 1996.
Aceite de maíz purificado	Dienos conjugados hidroperóxidos, hexanal)	Extracto de romero (500ppm) Ácido carnósico (50ppm) Rosmarínico (50ppm) Carnosol (50ppm)	Alto Alto Alto Bajo	Frankel <i>et al.</i> , 1996.
Aceite de algodón y soja	Compuestos polares 180 °C	Extractos metanólicos de cascarilla de avena 0,005 y 0,007% (polifenoles totales).	Antipolimerizante	Tian y White, 1994.

Los vegetales estudiados son:

1.3.2.- Olivo (*Olea europaea*): Es un árbol perenne de la familia de las *Oleáceas*, cultivado en prácticamente todas las regiones del mundo de clima mediterráneo con gran exposición solar y libre de heladas (España, Grecia, Italia, Marruecos, Argentina, Australia, Chile, entre otros). En Chile su cultivo se desarrolla desde la I a IX regiones. Los usos del fruto son numerosos, parte se destina al consumo y principalmente a la fabricación de aceites (53% de la producción nacional) (ODEPA, 2007).

La producción de aceite de oliva ha aumentado año a año. En 2009, se estimó que la producción nacional creció 30% respecto a 2008, con una producción de 8.500 tons. En el período 2006/07 la superficie cultivada se estimó en 8.600 ha, más del doble de la existente en 1990. En este aspecto, el país tiene un potencial de 200 mil hectáreas con el clima mediterráneo exigido y el suelo apropiado, por lo que se espera que en el 2015 sean más de 33.000 ha plantadas y para el 2020 alrededor de 42.000 ha (Chile Oliva, 2010).

Como desechos de la elaboración del aceite y de la poda del olivo se obtiene una gran cantidad de hojas, las que corresponden a un 4% aproximadamente del total del árbol. Frecuentemente esta fracción se utiliza para la producción de compost sin valor comercial, de manera que se considera importante la búsqueda de otros usos industriales, por ejemplo, como fuente de compuestos antioxidantes lo que implicaría lograr un valor agregado para un producto de desecho de la agroindustria.

1.3.2.1.- Biosíntesis de compuestos fenólicos en la familia de las oleáceas

En las oleáceas los compuestos fenólicos corresponden principalmente a derivados de los secoiridoides, seguidos por alcoholes fenólicos y flavonoides (Soler-Rivas, et al., 2000). Los secoiridoides se relacionan químicamente con los iridoides (Ej: loganina), los cuales son producidos por el metabolismo secundario de monoterpenos y provienen de la ruta metabólica del acetato/mevalonato (Figura 7).

Los iridoideos están formados por un anillo heterocíclico con 6 posiciones unido a un ciclopentano (Ryan *et al.*, 2002). La apertura de este último en la posición 5 da origen a los secoiridoideos, que se caracterizan estructuralmente por un exociclo 8,9-olefínico (oleósido) y químicamente están formados por una combinación de ácido elenólico y un residuo glicosídico (Figura 7)

La oleuropeína es el principal secoiridoide presente en las hojas del olivo (Le Tour y Guedon, 1992; Soler-Rivas *et al.*, 2000; Savournin, *et al.*, 2001; Luque de Castro y Japón-Luján, 2006; Ranalli *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2007, Salta *et al.*, 2007; Altiok *et al.*, 2008; Japón-Luján y Luque de Castro, 2008), con un contenido de un 19% (p/p) aproximadamente (Le Tour y Guedon, 1992). Químicamente está compuesta por un éster de 2'-(3',4'-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol) unido a ácido elenólico.

Como parte del metabolismo de la planta, la oleuropeína se transforma por enzimas (β -glicosidasas) endógenas o exógenas a glucosa y aglicona. Esta última puede sufrir la apertura del ácido elenólico, permitiendo una serie de reordenamientos químicos (decarboxilación, metilación y oxidación), formando nuevas estructuras agliconas, las cuales pueden estar presentes en las hojas como tautómeros cetoenólicos inestables (formas mono y dialdehídicas) (Ranalli *et al.*, 2006).

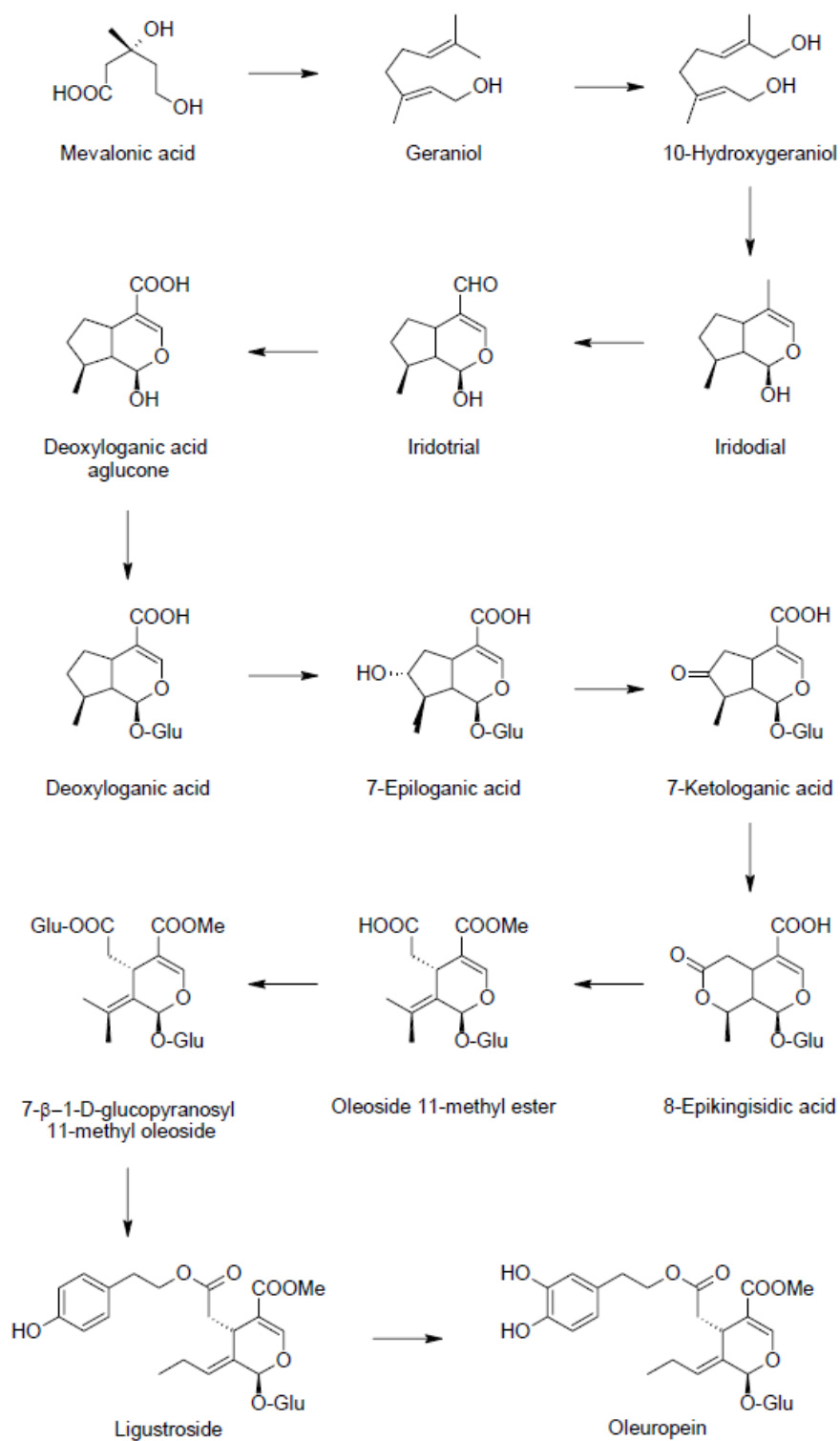


Figura 7. Ruta propuesta para la biosíntesis de oleuropeína en la familia de las Oleáceas (Damtoft *et al.*, 1993)

1.3.2.2.- Compuestos fenólicos presentes en las hojas de olivo

Aparte de la oleuropeína, existen otros compuestos identificados en hojas de olivo, como verbascósido (Luque de Castro y Japón-Luján , 2006, Altiok *et al.*, 2008, Japón-Luján y Luque de Castro, 2008; Savournin *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Kiritsakis *et al.*, 2010), oleurósido (Savournin *et al.*, 2001; Luque de Castro y Japón-Luján, 2006; kiritsakis *et al.*, 2010), ligustrósido (De Nino *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2006; Kiritsakis *et al.*, 2010), flavonoides glicosilados (en este grupo se encuentran principalmente la luteolina-7-glicósido, apigenina-7-glicósido, rutina (quercetina-3-rutinósido) (Savournin *et al.*, 2001; Luque de Castro y Japón-Luján, 2006; Altiok *et al.*, 2008; Japón-Luján y Luque de Castro, 2008), y en menor proporción apigenina-7-rutinósido, luteolina-7-rutinósido y luteolina-4-glicósido (Ryan *et al.*, 2002), flavonoides agliconas (como apigenina, quercetina, kaempferol, hesperitina (Soler-Rivas *et al.*, 2000), luteolina (Altiok *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2002) y ácidos ferúlico, cafeico, p-cumárico, clorogénico y vainillínico, entre otros (Ryan *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2007; Salta *et al.*, 2007 y Altiok *et al.*, 2008).

1.3.2.3.- Métodos para la obtención de los extractos de hojas de olivo

Se han descrito diferentes métodos para la obtención de extractos de polifenoles a partir de hojas de olivo, entre los que se encuentra el prensado de las hojas (Farag *et al.*, 2007), la extracción supercrítica-CO₂ (utilizando como cosolvente metanol al 10%) (Le Floch *et al.*, 1998), la extracción líquido-líquido (aceite-solvente) (Japón-Luján y Luque de Castro 2008), la extracción en secuencia con solventes orgánicos de distinta polaridad (Chiou *et al.*, 2007; Salta *et al.*, 2007), la extracción etanólica (Farag *et al.*, 2003; Paiva Martins *et al.*, 2007), la extracción etanólica con microondas (Altiok *et al.*, 2008); la extracción metanol-agua (Savournin *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Kiritsakis *et al.*, 2010) y la extracción metanólica (Le Tour y Guedon, 1992; Kiritsakis *et al.*, 2010). Sin embargo, no se puede concluir una tendencia en la composición fenólica porque no se tienen datos de perfil de polifenoles para todos los tipos de extractos descritos en la literatura. Sin embargo, en general, en los extractos obtenidos con solvente se ha identificado principalmente a la oleuropeína

1.3.2.4.- Efectos biológicos de los extractos de hojas de olivo

Se ha demostrado que los extractos de hojas de olivo presentan un efecto hipotensor, hipoglicémico, antimicrobiano, antioxidante y antiviral, entre otros (Partfitt *et al.*, 1994; Benavente *et al.*, 2000; Soler-Rivas *et al.*, 2000). Con respecto a su acción antimicrobiana, Markin *et al.* (2003) investigó el efecto de un extracto acuoso contra *E. coli* y *C. albicans*, mostrando en el primer caso una destrucción completa de las unidades formadoras de colonias, verificado por microscopía electrónica de barrido. Lee-Huang *et al.* (2003), describieron un efecto antiviral en cultivos celulares infectados con VIH.

Estudios realizados (in vitro y clínicos) con algunos compuestos aislados a partir de los extractos de hojas de olivo han demostrado que la oleuropeína presenta efectos beneficiosos para la salud humana, tales como antioxidante (Visioli *et al.*, 2002; Syed, 2010) antiaterogénicos (Manna *et al.*, 2004; Syed, 2010), hipocolesterolémicos (Luque de Castro y Japón-Luján, 2006; Syed, 2010), hipoglicemiantes (Romani *et al.*, 1999), antiinflamatorios (Visioli *et al.*, 1998; Benavente *et al.*, 2000; Syed, 2010), anticancerígenos (Menendez *et al.*, 2007; Syed, 2010), antivirales (Fredrickson, 2000) entre otros.

1.3.3.- Palto (*Persea americana Mill*): Este es un árbol de hoja persistente de zonas tropicales y subtropicales, también conocido como avocado y aguacate, en los países centroamericanos. En Chile, la condición climática mediterránea templada, la calidad y disponibilidad de agua y suelos, posibilidad de cultivo en altas pendientes y baja incidencia de plagas, entre otros, ha permitido su desarrollo creciente. Se cultiva desde la I a la VII regiones, principalmente en la Región de Valparaíso. La producción de Paltas en Chile representó el 1% de la producción mundial en 1969; sin embargo, la participación fue aumentando en forma paulatina, proceso que se aceleró entre 1997 y 2007, período en que pasó de 2,4% a 7,0% de la producción mundial. De los huertos comerciales, se estima que la superficie y producción de la variedad Hass, representaría en la actualidad sobre el 85% del total a nivel nacional.

Otras variedades corresponden a fuerte, edranol, bacon y negra de la cruz, entre otras, que en conjunto corresponden al 15% del área total (ODEPA, 2007). Para la temporada 2009/10 se espera una producción nacional total de 260.000 toneladas (ODEPA, 2010).

1.3.3.1.- Compuestos fenólicos presentes en hojas de palto

La información en la literatura respecto a la presencia de compuestos fenólicos en las hojas es escasa. Se han identificado principalmente derivados del ácido benzoico: ácido p-hidroxibenzoico, protocatéquico (3,4-dihidroxibenzoico) (Brune y van Lelyveld, 1982; Torres *et al.*, 1987), o-pirocatéquico, α -resorcílico, β -resorcílico, γ -resorcílico, gálico, isovaníllico, vaníllinico, siríngico (Torres *et al.*, 1987) y ácido clorogénico (De Almeida *et al.*, 1998). También se han encontrado derivados del ácido cinámico, tales como: ferúlico, cafeico, p-cumárico (Brune y van Lelyveld, 1982; Torres *et al.*, 1987), o-cumárico, m-cumárico, sinápico (Torres *et al.*, 1987), aesculetina (Brune y van Lelyveld, 1982), escopoletina (Ding *et al.*, 2007).

Otros compuestos identificados corresponden a flavonoides glicosilados, tales como kaempferol 3-O-a-L-ramnopiranosido (afzelina), quercetina 3-O-a-L-ramnopiranosido (quercetrina), quercetina-3-O-a-D-arabinopiranosido, quercetina-3- β -glicopiranosido (isoquercetrina) (De Almeida *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2007), kaempferol-3-O-a-D-arabinopiranosido (De Almeida *et al.*, 1998), kaempferol-3-O-glicósido (astragalina), luteolina-7-O-D-diglicósido (Ding *et al.*, 2007) y las agliconas: quercetina (De Almeida, *et al.*, 1998), luteolina, apigenina, catequina y epicatequina (Ding *et al.*, 2007). En el fruto se han identificado procianidinas derivadas de epicatequina (De Pascual *et al.*, 2000) y epicatequina y catequina en la cáscara del fruto (Teresawa *et al.*, 2006).

1.3.3.2.- Métodos para la obtención de los extractos de hojas de palto

En la literatura se han descrito diferentes métodos para la obtención de extractos de polifenoles a partir de hojas de palto. Entre éstos se puede mencionar principalmente la extracción acuosa (De Almeida *et al.*, 1998; Adeboye *et al.*, 1999; Adeyemi, 2002; Owolabi *et al.*, 2005; Ojewole y Amabeokn, 2006; Owolabi y Cocker, 2007), etanólica (Brune y Van Lelyveld, 1982) y metanólica (Torres *et al.*, 1987; Adeboye *et al.*, 1999, Etkor *et al.*, 2006). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios no se ha determinado el perfil de polifenoles de los extractos, lo que hace difícil concluir el tipo de polifenoles predominantes.

1.3.3.3.- Efectos biológicos de hojas de palto

La corteza, fruto y hojas de este árbol se han utilizado en la medicina popular en América del Sur y Central, Oeste de la India y África, para el tratamiento de varios desórdenes como amenorrea (Watt y Breyer-Brandwijk, 1962) y cuadros de bronquitis (Giron *et al.*, 1991) entre otros.

Se ha descrito que las hojas poseen un efecto antihipertensivo (Gupta *et al.*, 1979; Adeboye *et al.*, 1999), anticonvulsivante (Ojewole y Amabeokn, 2006), hipoglicemiante (Antia *et al.*, 2005), analgésico y antiinflamatorio (Adeyemi *et al.*, 2002), antiviral en cultivos celulares frente a infecciones por virus herpes tipo I (enfermedad de Aujeszky) y adenovirus tipo 3 (De Almeida *et al.*, 1998) y también capacidad para disminuir los efectos hepatotóxicos inducidos por paracetamol en ratas de laboratorio (Etkor *et al.*, 2006).

1.4.- Matrices lipídicas propuestas en este estudio

- Aceite de canola: es un aceite principalmente monoinsaturado (62%), posee aproximadamente un 21% de ácido linoleico (C18:2n-6), un 9% de ácido α -linolénico (C18:3n-3), un alto contenido de tocoferoles (690 ppm), principalmente γ -tocoferol (348 ppm), seguido por α -tocoferol (247 ppm), plastocromanol-8 (81 ppm) y δ -tocoferol (16 ppm) (Masson y Mella, 1985; ASAGA, 2000; González, 2004).

- Aceite de girasol alto oleico: es un aceite altamente monoinsaturado (83% de ácido oleico), con un 9% de ácido linoleico y trazas de ácido α -linolénico. Contiene α -tocoferol (445 ppm) y γ -tocoferol (20 ppm) (Lampi y Kalman-Eldin, 1998).

- Aceite de soja: es un aceite altamente poliinsaturado, con un contenido de 54% de ácido linoleico y 7% de ácido α -linolénico (Masson y Mella, 1985; Asaga, 2000). Sus tocoferoles principales son α -tocoferol (9 a 352 ppm), γ -tocoferol (89 a 2306 ppm), δ -tocoferol (54 a 939 ppm), aunque también se encuentran α y δ -tocotrienol en concentraciones de 69 y 103 ppm, respectivamente (Codex Standard 210, 1999).

Los aceites de girasol alto oleico y soja provienen de Argentina y canola de Chile, estos se escogieron porque en el caso de girasol alto oleico, este aceite es el que actualmente se utiliza principalmente para fritura en las cadenas de comida rápida, dado su perfil en ácidos grasos (ácido oleico, sobre 80%) característica que lo hace más estable a temperaturas de fritura.

Un comportamiento similar se observa en canola (ácido oleico sobre 50%), sin embargo, dado su contenido de ácido α -linolénico (mayor a 2%), está prohibido en Chile su uso en fritura, situación que se repite para soja.

A pesar de esta restricción para canola, las características de composición de ácidos grasos y tocoferoles y además, su producción a nivel nacional, permitiría su potencial uso como aceite de fritura.

1.5.- Hipótesis

La adición de un extracto de hojas de olivo o de palto, a los aceites de canola, girasol alto oleico o soja, mejorará significativamente su estabilidad oxidativa. Este mismo comportamiento se espera para el aceite de canola y girasol alto oleico al ser sometidos a procesos de fritura de papas “french” o bastón.

1.6.- Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la adición de un extracto de hoja de olivo o de palto, alto en polifenoles, en la estabilidad oxidativa de aceites de canola (*Brassica sp.*), girasol (*Helianthus annuus*) alto oleico y soja (*Glycine max*) y en la fritura de papas “french” o bastón en aceites de canola y girasol alto oleico.

Objetivos Específicos

Evaluar cuatro extractos obtenidos por distintos métodos desde hojas de olivo o palto (jugo por prensado, oleorresina, hidroalcohólico, supercrítico) y categorizarlos de acuerdo al contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), capacidad antioxidante (DPPH) y tiempo de inducción (Rancimat).

Identificar, por cromatografía líquida acoplada a detección de masas, los principales polifenoles presentes en los extractos.

Seleccionar el extracto a adicionar sobre las matrices lipídicas de acuerdo al contenido de polifenoles totales y a la ausencia de otros antioxidantes (tocoferoles)

Estudiar la estabilidad de los aceites de canola y girasol alto oleico como matrices lipídicas frente a la oxidación durante el proceso de frituras de papas “french”, con y sin la adición de los extractos de hoja de olivo o palto seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Muestras

2.1.1.- Hojas de olivo (*Olea europaea*). Las muestras de hojas (c.v Arbequina) fueron recolectadas en el Predio Millantú, durante los meses de noviembre y diciembre de 2007 en la comuna de Talagante (33° 37' y 33° 47' de latitud sur y 70° 48' y 71° 01' longitud oeste), Región Metropolitana. El sitio de recolección se caracteriza por un clima mediterráneo, templado cálido, con temperaturas medias de 25 °C, durante los meses de muestreo. El tipo de suelo es franco arcilloso-limoso y con buen arraigamiento, porosidad y de buen drenaje. El sistema de riego es por goteo. El muestreo de hojas sanas de ramillas de un año, se realizó en forma aleatoria en cada uno de los 120 árboles (de 3 años) seleccionados, recolectándose un total de 31 Kg de hojas. La humedad inicial de las hojas frescas correspondió a un 45%.

2.1.2.- Hojas de Palto (*Persea americana*) Las muestras de hojas (c.v Hass) fueron recolectadas en el Predio Desarrollo Agrario S.A., durante el mes de enero de 2008 en la comuna de Llay-Llay (32° 52' latitud sur y 70° 54' longitud oeste), Región de Valparaíso. El sitio de recolección se caracteriza por un clima templado cálido, con temperaturas entre 18 y 33°C, durante el mes de muestreo. El suelo es franco arcilloso-limoso y de buen drenaje. El sistema de riego es por goteo. El muestreo de hojas sanas, se realizó en forma aleatoria en cada uno de los 150 árboles (de 4 años) seleccionados, recolectándose un total de 44 Kg de hojas. La humedad inicial de las hojas frescas correspondió a un 65%. Previo a la preparación de los extractos se retiró la nervadura central de las hojas.

2.1.3.- Aceites: Los aceites de soja (AS, *Glycine max*), canola (AC, *Brassica sp*) y girasol alto oleico (AGAO, *Helianthus annuus*), sin la adición de antioxidantes sintéticos, fueron proporcionados por la empresa Camilo Ferrón S.A. (Santiago, Chile).

2.1.4.- Papas: papas french de la variedad PANDA (*Solanum tuberosum* L.), sin tratamiento previo, adquiridas en Pat Fer LTDA (Santiago, Chile).

2.2.- Preparación de los extractos

2.2.1- Asignación de grupos

El total de hojas de olivo y palto se dividió en 4 grupos, a partir de los cuales se hizo la siguiente distribución:

- a) 5 y 11 Kg se utilizaron para la preparación de la oleorresina de olivo (OO) y palto (OP), respectivamente.
- b) 9 y 11 Kg se destinaron a jugo por prensado de olivo (JO) y palto (JP), respectivamente
- c) 7 y 11 Kg se emplearon para obtener el extracto hidroalcohólico de olivo (HAO) y palto (HAP), respectivamente
- d) A partir de 10 y 11 Kg se obtuvo el extracto por extracción supercrítica-CO₂ de olivo (EFSO) y palto (EFSP), respectivamente.

2.2.2- Preparación del jugo (JO y JP)

Las hojas frescas recolectadas se molieron manualmente y se picaron en un procesador de alimentos (Moulinex, España). Las hojas picadas se prensaron en una prensa manual (Bertuzzi, Italia) con capacidad para 10 Kg. Se utilizaron 9 y 11 Kg de hojas de olivo y palto, respectivamente, en forma fraccionada. El jugo obtenido del prensado de las hojas de olivo (JO, 380 mL) o de palto (JP, 1200 mL), se concentró en un evaporador rotatorio (Büchi, Suiza) a 45 °C hasta un volumen final de 200 mL (olivo) y de 300 mL (palto). Estos jugos se almacenaron a -18 °C hasta el momento de su análisis.

2.2.3- Preparación del extracto hidroalcohólico (HAO y HAP)

Las hojas frescas (7 Kg de olivo y 11 Kg de palto) se escaldaron a 95 °C por 4,5 min por inmersión en un baño y se enfriaron rápidamente al chorro de agua fría. Luego se secaron en estufa de aire forzado a 45 °C por 18 h (se obtuvo un 8 y 10% de humedad residual para las hojas de olivo y palto, respectivamente). Las hojas desecadas se almacenaron en bolsas de polietileno a temperatura ambiente y en oscuridad hasta la preparación del extracto.

Las hojas desecadas (760,29 g de olivo ó 750,31 g de palto), se molieron en un procesador de alimentos (Moulinex, España) y se colocaron en un matraz con un volumen determinado de etanol/agua (50:50 v/v) (3 y 2,25 L para olivo y palto, respectivamente). Las hojas se dejaron macerar por 24 h y el sobrenadante se filtró al vacío en un embudo Büchner. Cada torta se re-extrajo dos veces más con igual volumen de etanol/agua (50:50 v/v). Los filtrados se reunieron y se concentraron en forma fraccionada en un evaporador rotatorio (Büchi, Suiza) hasta un volumen final de 1500 mL. Los extractos hidroalcohólicos resultantes (HAO y HAP), se almacenaron a -18 °C, hasta el momento de su análisis.

2.2.4.- Preparación de extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂ (EFSO y EFSP)

Las hojas frescas (10 y 11 Kg de olivo y palto, respectivamente) se secaron a temperatura ambiente hasta un contenido de humedad de 8 y 10% en las hojas de olivo y de palto, respectivamente. Luego se molieron en un molino de martillo (Biber Wien VII, 202 F, Austria) y el polvo se tamizó, recolectando la fracción de 30-50 mesh. El polvo se almacenó en bolsas de polietileno a -18° C hasta el momento de su análisis. La columna del extractor supercrítico se empacó de acuerdo al siguiente orden: lana de vidrio, Celite® (0,5 g), polvo a extraer (14,5 g), Celite® (0,5 g), lana de vidrio, perlas de vidrio y lana de vidrio, como se muestra en la Figura 8.

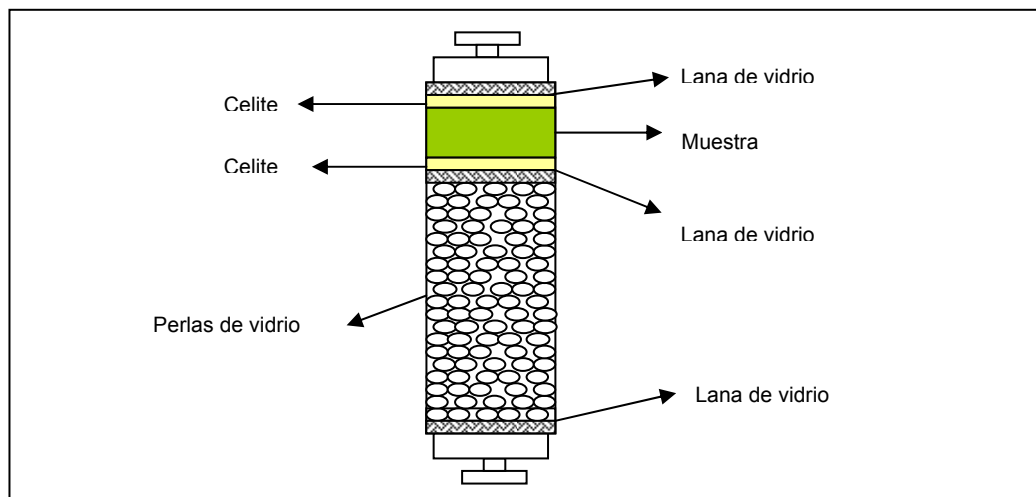


Figura 8. Esquema del relleno de la columna que se utilizó para la extracción supercrítica-CO₂.

Una vez que se introdujo la muestra en la columna de extracción se procedió a conectarla al interior del horno del equipo de extracción supercrítico Speed SFE (Allentown) (Anexo 2, Figura 16), para EFSO y EFSP se utilizó una muestra de 72,5 y 60, 2 g respectivamente.

Las condiciones experimentales empleadas en el estudio fueron las siguientes: temperatura del horno: 30 °C, presión de CO₂: 300 bar, etanol como cosolvente, tiempo estático de extracción: 30 min, flujo de CO₂ y etanol: 2,5 L/min y 0,3 mL/min, respectivamente. La variable de respuesta o dependiente correspondió al contenido de polifenoles (mg/g). Para establecer el tiempo de extracción de los polifenoles en hojas de olivo, se realizaron dos ensayos, uno por 2 y el otro por 5 h, muestreando cada 10 y 30 min, respectivamente (Anexo 2, Tabla 25, Figura 17A). En el caso de hojas de palto, el proceso de extracción se realizó por 2,2 y 8 h, muestreando cada 10 y 60 min, respectivamente (Anexo 2, Tabla 26, Figura 17B). En cada muestra se analizó el contenido de polifenoles inmediatamente.

Los volúmenes obtenidos para EFSO y EFSP se concentraron en un evaporador rotatorio (Büchi, Suiza) hasta un volumen final de 25 y 100 mL, respectivamente. Estos extractos, se almacenaron a -18 °C, hasta el momento de su análisis.

2.2.5.- Preparación de oleorresina en aceite de girasol alto oleico (OO y OP)

Las hojas frescas (5 y 11 Kg de hojas de olivo y palto, respectivamente), se secaron a temperatura ambiente en ausencia de luz (8% y 10% de humedad, respectivamente) y se almacenaron en bolsas de polietileno en oscuridad hasta la preparación de la oleorresina.

Las hojas desecadas (50,06 y 50,45 g de olivo y palto, respectivamente), se molieron por 1 min en un procesador de alimentos (Moulinex, España) y se mezclaron con aceite de girasol alto oleico (499,9 g). Luego, cada mezcla se colocó por 5 min a alta potencia en un horno microonda de 2450 MHz (Samsung, Corea) y luego se mantuvieron almacenadas por 24 h en oscuridad y se filtraron al vacío en un embudo Büchner. El filtrado se sometió al mismo procedimiento dos veces más con 49,90 y 49,56 g de hojas de olivo molidas o 49,47 g y con 50,13 g de hojas de palto molidas. Las oleorresinas se almacenaron a -18 °C, hasta el momento de su análisis.

2.3.- Caracterización de los extractos de hojas de olivo y palto

2.3.1.- Determinación de polifenoles totales

En el ensayo de Folin-Ciocalteu, los fenoles se oxidan con una mezcla de ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{10}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), conocida como reactivo de Folin-Ciocalteu; en presencia de fenoles estos se reducen a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) (Singleton y Rossi, 1965). La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Unicam UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK) a 725 nm (correspondiente al máximo de absorción del ácido cafeico). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido cafeico (EAC) (Anexo 3, Tabla 27, Figura 18).

2.3.2.- Determinación de la actividad antioxidante

Se realizó por el método de decoloración de DPPH, que se fundamenta en el cambio de color del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo hidratado (DPPH) que varía desde un color violeta intenso a amarillo pálido, dependiendo de la concentración del antioxidante. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Unicam UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK) a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995) (Anexo 4, Tablas 28 y 30, respectivamente).

Además, en este estudio se utilizó el EC_{50} , que indica la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% el porcentaje de decoloración del radical DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995) y puede expresarse en diferentes equivalencias de acuerdo al tipo de antioxidante que se esté utilizando.

El porcentaje de decoloración (capacidad atrapadora de radicales libres) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación: (Brand-Williams *et al.*, 1995) (Anexo 4, Tablas 29, 31 y 32, respectivamente):

$$\%Decoloración = 100 - \left(\frac{Absorbancia \quad muestra}{Absorbancia \quad control} \right) \times 100$$

2.3.3.- Identificación de polifenoles por LC-MS

La extracción de los polifenoles desde los extractos de hojas de olivo y palto se realizó de acuerdo al método descrito por Peña *et al.*, 2007 (Anexo 5).

Los compuestos fenólicos se identificaron utilizando un sistema LC-MS. El equipo consistió en un cromatógrafo HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc CA-USA), acoplado a un espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica (ESI-IT Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del sistema HPLC se utilizó el programa ChemStation para LC 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) y para el control del espectrómetro se utilizó el programa Esquire Control 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para la separación se utilizó una columna C18 Spherisorb ODS-2 (250 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm, Waters, USA). A la salida de la columna se conectó un split que dividió el flujo hacia el detector UV y al espectrómetro de masas. La detección se realizó a 280 nm. La composición de la gradiente del solvente de elución para los extractos de hojas de olivo y palto (Torres et al., 1987), considerando un flujo de 1mL/min, se muestra en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4. Composición de la gradiente del solvente de elución, según tiempo, para los extractos de hojas de olivo, considerando un flujo de 1 mL/min

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	96	4
8	96	4
48	50	50
53	40	60
68	0	100
78	4	96
80	96	4
90	96	4

Solvente A: agua /ácido fórmico (99,5:0,5 v/v), Solvente B: acetonitrilo/metanol (50:50 v/v).

Tabla 5. Composición de la gradiente del solvente de elución, según tiempo, para los extractos de hojas de palto, considerando un flujo de 1 mL/min

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	98	2
30	90	10
40	40	60
50	25	75
60	0	100
65	98	2

Solvente A: agua /ácido fórmico (99, 6:0,4 v/v), Solvente B: acetonitrilo

El proceso de ionización de la muestra mediante electro nebulización se realizó utilizando nitrógeno a una temperatura de 350 °C, presión de 27,5 psi y flujo de gas de 8 L/min. El análisis de los cromatogramas y de los espectros de masa se realizó por medio del programa Data Analysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). La identificación se realizó comparando las señales m/z y el perfil de la fragmentación de cada señal m/z con respecto a lo informado en la literatura.

2.3.4.- Determinación del contenido de tocoferoles

La determinación de tocoferoles en los extractos de hojas de olivo y palto se realizó por HPLC con detector de fluorescencia, de acuerdo al método de la AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993) (Anexo 6). El equipo estuvo compuesto de una bomba Merck-Hitachi L-6200 A (Merck, Darmstadt, Alemania), inyector Rheodyne 7725i, loop 20 µL, detector de fluorescencia Merck-Hitachi F-1050 acoplado a un computador con el software Clarity 2.4.1.43. La detección se realizó a 290 nm (longitud de onda de excitación) y 330 nm (longitud de onda de emisión). Se utilizó una columna LiChrocart Superspher Si60 (250 mm x 4 mm d.i., 5µm, Merck, Alemania).

La fase móvil correspondió a 2-propanol en hexano (0,5: 99,5 v/v) con un flujo de 1 mL/min. Para la identificación y cuantificación de los tocoles se utilizaron como estándares externos α , β , γ y δ tocoferol (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania).

2.4.- Caracterización inicial de los aceites (AS, AC y AGAO)

2.4.1.- Determinación del contenido de tocoles

Se realizó por HPLC con detector de fluorescencia, de acuerdo al método Ce 8-89 (AOCS, 1993) (Anexo 7).

2.4.2.- Determinación de la composición de ácidos grasos por GLC

La derivatización de los ácidos grasos se realizó por el método de metilación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico (Anexo 8), considerando las recomendaciones del Diario Oficial de las Comunidades Europeas Reglamento (CE) N° 796/2002. Para determinar la composición de los ácidos grasos de los aceites se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP) 5890 serie II con detector de ionización de llama (FID), integrador HP 3395, y columna SP-2560 (100 m x 0,25 μ m film x 0,20 d.i., Supelco, USA), utilizando como carrier hidrógeno. Se utilizó un split de 1:100, con un flujo de 1 mL/min. El volumen inyectado fue de 0,5 μ L. La temperatura inicial del horno fue de 160 °C, durante 3 min y luego se incrementó con una velocidad de 1 °C/min, hasta alcanzar 230 °C. La temperatura del inyector y la del detector se fijó en 240 °C.

2.4.3.- Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. Previamente se realizó una extracción de los compuestos fenólicos de acuerdo al método descrito por García-Mesa *et al.* (1993), con una modificación que consistió en reemplazar la solución metanol/agua (60:40 v/v) por etanol/agua (60:40 v/v) (Anexo 9).

2.5.- Ensayos de estabilidad oxidativa de los aceites sin y con adición de los extractos de hojas de olivo o palto

2.5.1.- Sistemas estudiados

- **Aceite de canola (AC) control**
- Aceite de canola adicionado con 250 ó 630 mg EAC/Kg aceite de extracto de hojas de olivo **(AC+HAO)**, **(AC+JO)** y **(AC+EFSO)**.
- Aceite de canola adicionado con 250 ó 630 mg EAC/Kg aceite de extracto de hojas de palto **(AC+HAP)**, **(AC+JP)** y **(AC+EFSP)**.

- **Aceite de girasol alto oleico (AGAO) control**
- Aceite de girasol alto oleico adicionado con 250 ó 630 mg EAC/Kg aceite de extracto de hojas de olivo **(AGAO+HAO)**, **(AGAO+JO)** y **(AGAO+EFSO)**.
- Aceite de girasol alto oleico adicionado con 250 ó 630 mg EAC/Kg aceite de extracto de hojas de palto **(AGAO+HAP)**, **(AGAO+JP)** y **(AGAO+EFSP)**.

- **Aceite de soja (AS) control.**
- Aceite de soja adicionado con 250 ó 630 mg EAC/Kg aceite de extracto de hojas de olivo **(AS+HAO)**, **(AS+JO)** y **(AS+EFSO)**.
- Aceite de soja adicionado con 250 ó 630 mg EAC/Kg aceite de extracto de hojas de palto **(AS+HAP)**, **(AS+JP)** y **(AS+EFSP)**.

Las oleorresinas de hojas de olivo y palto no se adicionaron a los aceites, debido a sus bajos contenidos de polifenoles totales.

2.5.2.- Adición de los extractos a los aceites estudiados

La adición de extractos a las matrices (AC, AGAO y AS) se realizó en diferentes concentraciones, de acuerdo al siguiente protocolo:

a) Para 250 mg EAC/Kg de aceite, a 3 g de aceite se agregaron alícuotas de 0,11; 0,14 y 0,33 mL de HAO, JO y EFSO, respectivamente y alícuotas de 0,14; 0,24 y 0,61 mL de HAP, JP y EFSP, respectivamente.

b) Para 630 mg EAC/Kg aceite, a 3 g de aceite se agregaron alícuotas de 0,26; 0,35 y 0,84 mL de HAO, JO y EFSO, respectivamente y de 0,35; 0,62 y 1,54 de HAP, JP y EFSP, respectivamente.

El solvente (etanol) presente en la mezcla (proveniente de los extractos), se eliminó con nitrógeno. Para mejorar la dispersabilidad en cada sistema, se agregaron 2 gotas del surfactante Tween-80® y se homogeneizó en un Ultraturrax (IKA, Alemania) a 9000 rpm por 2 min.

2.5.3.-Determinación del Tiempo de Inducción

El tiempo de inducción en los sistemas señalados en el punto anterior se determinó de acuerdo al método oficial AOCS Cd 12b-92, 1993 (AOCS, 1993, Anexo 10). Para estos ensayos se utilizó un equipo Rancimat 679 Metrohm AG. Herisau (Suiza), a 110 °C, con un flujo de aire constante de 20 mL/min.

2.6.- Ensayos de fritura

2.6.1.- Sistemas estudiados

- **Aceite de canola (AC) control**
- Aceite de canola adicionado con 600 mg EAC/Kg aceite de extracto hidroalcohólico de hojas de olivo **(AC+HAO)**
- Aceite de canola adicionado con 600 mg EAC/Kg aceite de extracto hidroalcohólico de hojas de palto **(AC+HAP)**

- **Aceite de girasol alto oleico (AGAO) control**
- Aceite de girasol alto oleico adicionado con 600 mg EAC/Kg aceite de extracto hidroalcohólico de hojas de olivo **(AGAO+HAO)**
- Aceite de girasol alto oleico adicionado con 600 mg EAC/Kg aceite de extracto hidroalcohólico de hojas de palto **(AGAO+HAP)**.

2.6.2.- Adición de los extractos a los aceites de fritura

Se adicionó 165 y 226 mL de HAO o HAP a los aceites AC y AGAO (2,0 Kg), respectivamente. El solvente (etanol) presente en la mezcla (proveniente de HAO o HAP), se eliminó con nitrógeno. Para mejorar la dispersabilidad en cada sistema, se agregó el surfactante Tween-80® y se homogeneizó en un Ultraturrax (IKA, Alemania) a 9000 rpm por 2 min.

2.6.3.- Fritura

Se utilizó una freidora doméstica (Moulinex, Francia) con una capacidad de 2,5 L. El aceite (AC o AGAO) se mantuvo a 180 °C por jornadas de 8 h diarias durante 7 días. Lotes de 100 g de papas french se frieron por 5 min cada 1 h, con un total de 8 frituras diarias. Después de cada día de fritura (jornada de 8 horas), se tomó una muestra de aceite (25 mL), las que se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis. La reposición de aceite adicionado de HAO o HAP se realizó después de la toma de muestra de cada día.

2.7.- Determinaciones analíticas

2.7.1.- Tocoferoles

Esta determinación se realizó por HPLC con detector de fluorescencia, de acuerdo al método AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993) (Anexo 7).

2.7.2.- Compuestos polares

Esta determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Dobarganes *et al.* (1988) y al método oficial IUPAC (2000) (Anexo 11). El método se basa en el fraccionamiento de una materia grasa a través de una columna de sílice activada, mediante elución con distintos solventes orgánicos, obteniendo dos fracciones de compuestos. La primera fracción corresponde a los triglicéridos no alterados y la segunda a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales.

2.7.3.- Especies producidas por el deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico en la fracción de compuestos polares

Se determinaron las especies de deterioro térmico (polímeros de triglicéridos y dímeros de triglicéridos), oxidativo (triglicéridos oxidados) e hidrolítico (diglicéridos y ácidos grasos), mediante cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño de partícula (HPSEC), de acuerdo a Dobarganes *et al.* (1988) y método oficial IUPAC (2000) (Anexo 12). El equipo estuvo compuesto de una bomba Merck Hitachi L-6200 (Merck, Darmstadt, Alemania), detector de índice de refracción Merck RI-71 y con un integrador Merck Hitachi 2500. Se utilizaron dos columnas PL-gel (Hewlett Packard) de 250 cm de largo x 4,6 mm diámetro interno x 100 y 500 Å de tamaño de poro, conectadas en serie, empacadas con un copolímero de estirenodivinilbenceno altamente entrecruzado (tamaño de partícula de 5 micras). La fase móvil correspondió a tetrahidrofurano (THF) grado HPLC, con un flujo de 1 mL/min.

2.8.- Análisis estadístico

Para las determinaciones de contenido de polifenoles, actividad antioxidante, tocoferoles y compuestos polares se realizaron tres análisis y los resultados se expresaron en promedio \pm desviación estándar para cada extracto de hojas de olivo o palto.

Para evaluar diferencias estadísticas entre los extractos de hojas de olivo o palto estudiados sobre el contenido de polifenoles, actividad antioxidante, y compuestos polares, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, mediante el software Statgraphics Plus versión 7.0, con un nivel de significancia de un 95%. Cuando los resultados mostraron diferencias significativas se aplicó el test de rangos múltiples de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Caracterización de los extractos

En esta tesis se utilizaron tres métodos de obtención de diferentes extractos de hojas de olivo y de palto, con el fin de determinar diferencias en el contenido y perfil de polifenoles en cada extracto

3.1.1.- Contenido de polifenoles totales

En la Tabla 6 se muestra el contenido de polifenoles totales de los extractos de hojas de olivo, expresados en distintas bases de comparación. Este varió entre 0,3 y 7,3 mg EAC/mL extracto.

Tabla 6. Contenido de polifenoles totales en hojas de olivo, según tipo de extracto

Tipo de extracto	mg EAC/mL extracto X ± DE	mg EAC/g hoja fresca X ± DE	mg EAC/g hoja seca* X ± DE
HAO	7,3 ± 0,04 ^a	8,1 ± 0,07	16,0 ± 0,13
JO	5,4 ± 0,15 ^b	0,1 ± 0,001	0,2 ± 0,01
EFSO	2,2 ± 0,18 ^c	0,5 ± 0,04	0,8 ± 0,07
OO	0,3 ± 0,003 ^d	0,5 ± 0,007	1,0 ± 0,01

* expresado como materia seca; X: promedio, DE: desviación estándar, EAC: equivalentes de ácido cafeico; HAO: extracto hidroalcohólico; JO: jugo; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂; OO: oleoresina. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) para el contenido de polifenoles, según tipo de extracto.

Los extractos presentaron diferencias significativas en su contenido de polifenoles. El extracto HAO presentó un contenido mayor con respecto a los obtenidos en JO, EFSO y OO ($p < 0,05$), lo que sugiere que el método de preparación fue el factor decisivo (Nack y Shahidi, 2006).

La comparación de estos valores con la literatura no es simple, ya que los solventes utilizados, la variedad arbórea y la expresión de los resultados son muy diversos. Giau *et al.* (2007), que expresaron los resultados como ácido gálico, encontraron contenidos de 0,274; 0,007 y 0,0053 mg EAG/mL en extractos acuosos con distintas metodologías de obtención: infusión de: hoja molida, hoja entera y hoja hervida (5 min), respectivamente. De la misma forma, Silva *et al.* (2006) expresaron sus resultados como ácido tánico, encontrando valores entre 11,6-17,4 mg EAT/g hoja fresca en extractos en medio metanol-agua. En otros estudios, Salta *et al.* (2007) y Chiou *et al.* (2007), utilizando una secuencia de solventes para la obtención de los extractos, lograron contenidos totales de 17,7 y 54 mg EAC/mL extracto, respectivamente. En este estudio se privilegió el etanol como solvente de extracción por la posibilidad de utilizarlo en alimentos (RSA, 1996).

El contenido de polifenoles del jugo fue menor con respecto al de HAO; sin embargo, esto era esperable puesto que, en rigor, el prensado no es un método de extracción, sobre todo si es que las hojas no han sido sometidas a un tratamiento coadyuvante que facilite la disponibilidad de la extracción de las moléculas bioactivas desde la microestructura de la hoja. El contenido de polifenoles en JO (0,1 mg EAC/g de hoja fresca) fue menor que el descrito por Farag *et al.* (2003) (0,2 mg EAC/g de hoja fresca), diferencia que podría explicarse por la variedad del árbol empleado: arbequina versus kronakii y por el volumen final del concentrado, que fue del 50% versus 30% del volumen inicial, respectivamente.

El contenido de polifenoles del extracto EFSO fue de 2,2 mg EAC/mL de extracto, 30% menos que el del HAO, diferencia difícil de explicar, especialmente si se considera que se usó etanol como modificador, aumentando la polaridad del sistema de extracción.

Como la extracción utilizada es dependiente de las condiciones experimentales en cuanto a presión y temperatura, la comparación con la literatura se hace compleja de interpretar. Le Floch *et al.* (1998) obtuvieron un contenido de polifenoles de 7,6 mg EAC/g de hoja, bastante superior en relación a este estudio. Sin embargo, no se aclara si las hojas correspondieron a secas o frescas ni tampoco a la variedad utilizada.

En la Tabla 7 se muestra el contenido de polifenoles totales de los extractos de hojas de palto. Este fue de 0,4; 1,2; 3,1 y 5,3 mg EAC/mL de extracto en OP, EFSP, JP y HAP, respectivamente, diferencias que fueron significativas entre sí para la variable tipo de extracto ($p < 0,05$).

Tabla 7. Contenido de polifenoles totales en hojas de palto, según tipo de extracto

Tipo de extracto	mg EAC/mL extracto X ± DE	mg EAC/g hoja fresca X ± DE	mg EAC/g hoja seca X ± DE
HAP	5,3 ± 0,079 ^a	3,7 ± 0,1	11,6 ± 0,2
JP	3,1 ± 0,093 ^b	0,08 ± 0,002	0,2 ± 0,01
EFSP	1,2 ± 0,071 ^c	0,8 ± 0,01	2,3 ± 0,02
OP	0,4 ± 0,02 ^d	0,5 ± 0,02	1,3 ± 0,06

* expresado como materia seca; X: promedio, DE: desviación estándar, EAC: equivalentes de ácido cafeico; HAP: extracto hidroalcohólico; JP: jugo; EFSP: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂; OP: oleorresina. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El contenido de polifenoles totales encontrado en este estudio es difícil de comparar por lo escaso en la literatura y por la diferencia en la expresión de los resultados (mg EAC/mL extracto), como es en los casos de Torres *et al.* (1987) y Giao *et al.* (2007), que obtuvieron valores expresados en ácido gálico en un rango de 17,5-19,3 y 0,024-0,5541 mg EAG/mL extracto, respectivamente.

La variedad, localización geográfica, periodo de recolección y etapa de madurez de las hojas son los principales factores de variabilidad respecto del contenido de polifenoles en los extractos de hojas de olivo y palto (Ranalli *et al.* 2006).

De la misma forma, aspectos tecnológicos como operaciones de secado, molido, escaldado y maceración, entre otros (pretratamiento de las hojas), también influyen en el contenido de activos; situación que se observó en las oleorresinas de ambas hojas, que fueron descartadas del estudio por sus bajos contenidos de polifenoles totales (0,3 y 0,4 mg/mL en OO y OP, respectivamente).

En este contexto, al comparar la cantidad de polifenoles en los extractos hidroalcohólicos obtenidos, se encontró que fue menor en palto (25% aproximadamente), con respecto a olivo. Esta diferencia es interesante, considerando que se utilizó el mismo pretratamiento y método de preparación del extracto en ambos casos, de manera que la explicación puede atribuirse a la ubicación de los compuestos fenólicos en el compartimiento anatómico de la hoja o a la presencia de estructuras que impedirían una adecuada molienda y disminuirían la fracción útil de la hoja. Por otro lado, se debe considerar que a pesar que el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado para estimar el contenido de polifenoles totales, tiene como desventaja la interferencia con compuestos reductores como azúcares, aminos aromáticos, ácido ascórbico y ácidos orgánicos, entre otros (Prior *et al.*, 2005).

3.1.2.- Capacidad antioxidante de los extractos

En la Figura 9 (A y B) se presentan los porcentajes de decoloración del radical DPPH a distintas concentraciones de polifenoles en los extractos de hojas de olivo y de palto, respectivamente. En todos los ensayos se observó que el aumento en la concentración de polifenoles fue directamente proporcional al porcentaje de decoloración del radical DPPH. Sin embargo, la magnitud de la concentración del activo en los extractos necesaria para lograr un porcentaje de decoloración similar fue drásticamente diferente, ya que en HAO y HAP se necesitó una pequeña concentración en comparación con JO, EFSO, JP y EFSP, lo que puede interpretarse como diferencias en su capacidad antioxidante.

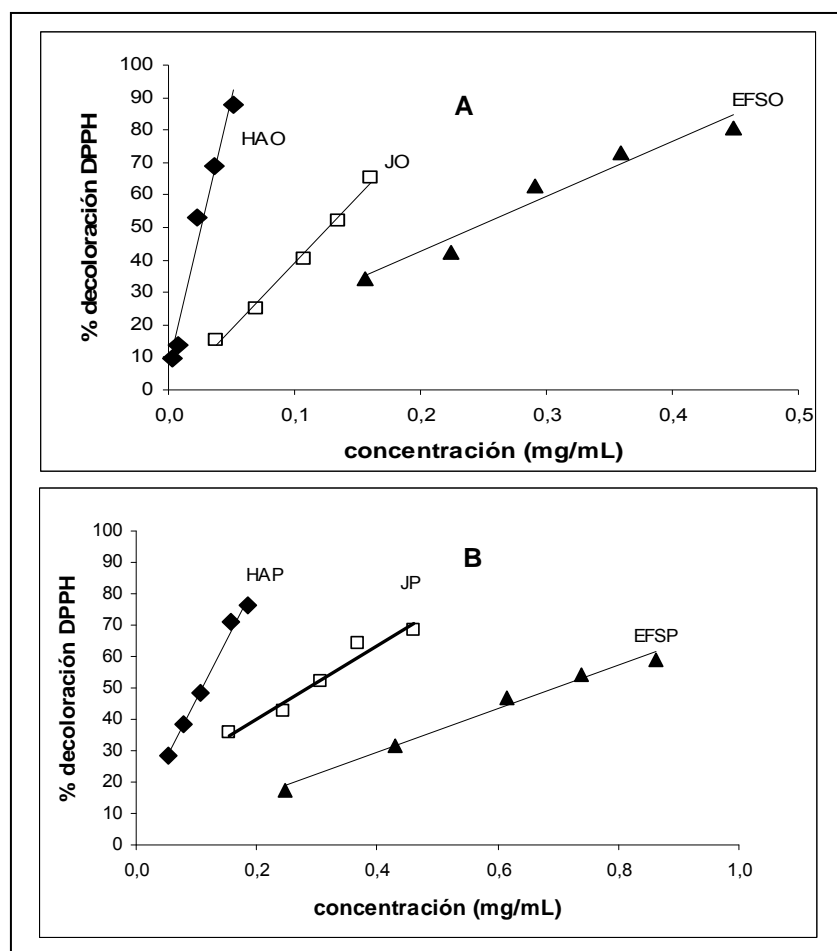


Figura 9. Relación entre la concentración de polifenoles y la decoloración de DPPH (porcentaje) de los extractos de hojas de olivo (A) y palto (B), respectivamente

En la Tabla 8 se presentan los valores de EC₅₀ de los extractos analizados en este estudio, en un rango de 0,026 a 0,68 mg EAC/mL de extracto. El valor más bajo fue de HAO, significativamente menor con respecto a JO y EFSO (p<0,05).

Un comportamiento similar se encontró en HAP con respecto a JP y EFSP. Estos valores fueron consistentes con el contenido de polifenoles totales señalados anteriormente, situación que no siempre es así, puesto que en algunos casos el EC₅₀ se ve alterado por el perfil de los polifenoles presentes y específicamente por sus características estructurales. Por ejemplo, los polifenoles glicosilados muestran valores menores de actividad antioxidante con respecto a sus agliconas (Martínez-Flórez et al., 2002).

Tabla 8. EC₅₀ de los extractos de hojas de olivo y palto

	EC ₅₀ (mg EAC/mL extracto) X ± DE
Hojas de olivo	
HAO	0,026 ± 0,007 ^a
JO	0,13 ± 0,003 ^b
EFSO	0,24 ± 0,006 ^c
Hojas de palto	
HAP	0,11 ± 0,006 ^a
JP	0,28 ± 0,006 ^b
EFSP	0,68 ± 0,017 ^c

X: promedio; DE: desviación estándar; HA: extracto hidroalcohólico de olivo o palto, respectivamente; J: jugo de hoja de olivo o palto, respectivamente; EFS: extracción supercrítica-CO₂ de olivo o palto, respectivamente. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) de EC 50, con respecto a la especie de hoja.

En este contexto, la fineza de la interpretación de la caracterización de los extractos sólo se logra con el análisis en conjunto, es decir, contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y el perfil de los compuestos fenólicos (LC-MS), sin embargo, este último pone en perspectiva la adecuada evaluación e interpretación de los resultados.

3.1.3.- Perfil de los principales compuestos fenólicos en extractos de hojas de olivo

En la Figura 10 se presentan los cromatogramas HPLC con detección UV (280 nm) de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de hojas de olivo (en polaridad negativa) y en las Tablas 9 y 10 se muestran los valores de las fragmentaciones y áreas de estas señales obtenidas por detección de masas, respectivamente.

Extracto hidroalcohólico (HAO)

Los principales polifenoles identificados en este extracto, considerando el área de las señales, correspondieron a oleuropeína y sus derivados (señal 23, 29%), oleurósido (señal 26, 13%) y ácido oleurósido-10-carboxílico (señal 24, 8%). Otros compuestos identificados fueron verbascósido, hesperidina, rutina, luteolina-7-glucósido y acetoxipinoresinol, entre otros, identificándose un 75% de las señales en los cromatogramas. Este perfil es concordante con lo descrito en la literatura para extractos etanólicos o de sus formas acuosas (10-90% v/v) (Japón-Luján y Luque de Castro, 2008; Altiok *et al.*, 2008).

En este contexto, la identificación de oleuropeína como el componente principal del extracto también ha sido descrito por otros autores (Le Tour y Guedon, 1992; Savournin, *et al.*, 2001; Ranalli *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2007; Salta *et al.*, 2007; Altiok *et al.*, 2008; Japón-Luján y Luque de Castro, 2008; Kiritsakis *et al.*, 2010).

Sin embargo, el perfil puede tener ciertas modificaciones que dependen del tratamiento a que han sido sometidas las hojas, como es el caso de la presencia de 3,4-DHPEA-EDA (forma dialdehídica de ácido elenólico unido a hidroxitirosol) y 3,4-DHPEA-EA (isómero de oleuropeína aglicona), cuando se han involucrado procesos de secado (Paiva-Martins *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente trabajo estos compuestos no se observaron.

Extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂ (EFSO)

Los resultados de la Figura 10 y Tablas 9 y 10 muestran que, respecto de la magnitud del área bajo la curva, los principales polifenoles identificados en este extracto fueron: ácido p-cumárico (señal 13, 11%), ácido ferúlico (señal 14, 6,7%), verbascósido (señal 15, 7,1%), oleuropeína (señal 23, 6,7%), hidroxitirosol (señal 1, 6,2%) y ácido vaníllinico (señal 2, 1,9%), entre otros; identificándose un 50 % del total de las señales en los cromatogramas. Este perfil resultó distinto del obtenido con el HAO, situación controversial, puesto que el uso de etanol en la extracción (para aumentar la polaridad del sistema) hacía suponer una similitud en la composición con el extracto hidroalcohólico. La explicación a estos resultados estaría dada por la ausencia de maceración de las hojas, lo que impidió en el caso de EFSO, una mayor extracción de compuestos de mayor peso molecular (como la oleuropeína).

Jugo (JO)

Los resultados de la Figura 10 y Tablas 9 y 10 indican que los principales polifenoles fueron: verbascósido (señal 15, 15,7%), hidroxitirosol (señal 1, 7,3%) y luteolina-7-glicósido (señal 19, 2,7%), y en menor proporción se encontraron oleósido, ácido elenólico, oleuropeína, apigenina-7-glucósido y ligustrósido (6% del total), identificándose un 32% del total de las señales. Respecto de la literatura, Silva *et al.* (2006) obtuvieron una proporción similar de verbascósido al encontrado en este estudio. Los polifenoles, al ser metabolitos secundarios, se encuentran principalmente en el líquido vacuolar de la célula vegetal (Hrazdina *et al.*, 1982; Ryan *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2005), así el prensado podría no ser capaz de atravesar o romper la membrana celular y vacuolar, explicando las diferencias en el tipo y la distribución de polifenoles en este extracto, con respecto a HAO y EFSO.

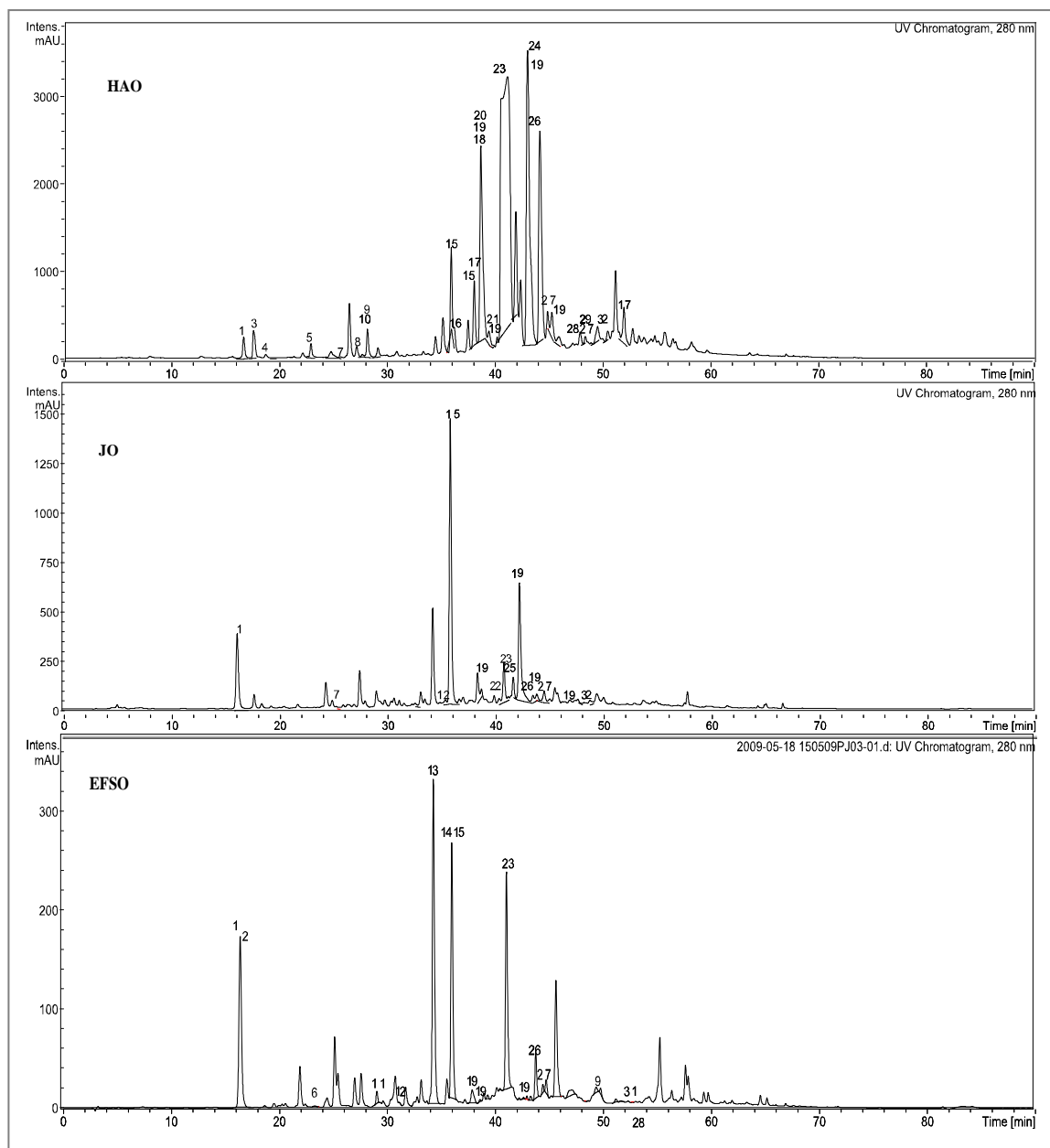


Figura 10. Cromatogramas HPLC con detección UV (280 nm) de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de hojas de olivo.

HAO: extracto hidroalcohólico de hojas de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica- CO_2 . Compuestos fenólicos: (1) hidroxitirosol, (2) ácido vanilínico, (3) hidroxitirosol glicosido, (4) ácido vanillico hexósido, (5) ácido cafeico hexósido, (6) vanilina, (7) oleósido, (8) ácido clorogénico, (9) oleuropeína aglicona, (10) pinoresinol, (11) ácido cafeico, (12) ácido elenólico, (13) ácido p-cumárico, (14) ácido ferúlico, (15) verbascósido, (16) ligustrósido aglicona decarboximetil, (17) luteolina-O-rutinósido, (18) acetoxipinoresinol, (19) luteolina-7-glicosido (20) hesperidina-rutina, (21) quercetina-3-O-galactósido+isoquercetina, (22) apigenina-7-rutinósido, (23) oleuropeína, (24) ácido oleurósido-10-carboxílico, (25) apigenina-7-glicosido, (26) oleurósido, (27) ligustrósido, (28) luteolina-3'-7-diglicosido, (29) oleuropeína diglicosido, (30) luteolina-7-rutinósido, (31) oleuropeína aglicona aldehído, (32) quercetina.

Tabla 9. Identificación en polaridad negativa de los compuestos fenólicos en los diferentes extractos de hojas de olivo por LC–MS

Peak	t _R	Compuesto	Precursor		Fragmentos MS ² iones MS/MS		
			m/z	HAO	JO	EFSO	
1	16,5	Hidroxitirosol	153	122.9 (100)		122.9 (100)	122.9 (100)
2	16.9	Ácido vanilínico.	167				122.9 (100)
3	17.4	Hidroxitirosol glicósido	315	152.9 (100) 135.0 (18) 123.0 (14) 101.0 (1)			
4	19.3	Ácido vanílico hexósido.	329	166.9 (100) 151.9 (5) 108.0 (3) 123.0 (3)			
5	22.7	Ácido cafeico hexósido.	341	178.9 (100) 161.0 (44) 135.1 (12) 202.9 (9)			
6	23.3	Vanillina.	151				122.9 (100)
7	25.4	Oleósido.	389	345.0 (100) 208.9 (80) 164.9 (41) 120.9 (41)	345.0 (100) 120.9 (98) 208.9 (70) 138.9 (42)		
8	27.5	Ácido clorogénico.	354	190.9 (100) 192.8 (6) 178.8 (2)			
9	28.0	Oleuropeína aglicona.	377	196.9 (100) 153.1 (19)			307.0 (100) 275.3 (91) 139.1 (12) 345.0 (7)
10	28.0	Pinosinol	356	193.0 (100) 216.9 (61) 175.1 (39) 134.1 (10)			
11	29.0	Ácido cafeico.	179				134.9 (100)
12	31.1	Ácido elenólico.	241		138.9 (100) 126.9 (100) 95.0 (90) 100.9 (43)		164.9 (100) 100.9 (95) 138.9 (19)
13	34.2	Ácido p-cumárico.	163				118.9 (100)
14	36.0	Ácido ferúlico.	193				134.0 (100) 149.0 (83) 177.9 (80)
15	36.0	Verbascósido.	623	461.1 (100) 315.1 (3) 477.1 (1) 443.2 (1)	461.2 (100) 477.0 (1) 315.2 (1) 579.2 (1)		461.1 (100)

HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂. (): fragmentaciones de muy baja intensidad

Tabla 9. Identificación en polaridad negativa de los compuestos fenólicos en los diferentes extractos de hojas de olivo por LC–MS

Peak	t _R (min)	Compuesto	Precursor (m/z)	Fragmentos MS ² iones MS/MS		
				HAO	JO	EFSO
16	36.0	Ligustrósido aglicona decarboximetil	303	284.9 (100) 125.2 (8) 177.4 (4)		
17	37.9	Luteolina-O-rutinósido.	593	284.9 (100) 175.0 (1) 217.1 (1) 197.2 (1)		
18	38.5	Acetoxipinoresinol.	415	150.9 (100) 204.9 (82) 136.0 (79) 295.0 (69)		
19	38.5	Luteolina-7-glicósido.	448	285.0 (100) 327.0 (1)	285.0 (100) 326.9 (1)	285.0 (100) 326.9 (2)
20	38.5	Hesperidina-rutina	609	461.3 (100) 300.9 (44) 342.9 (4) 271.0 (2)		
21	39.2	Quercetina-3-O-galactósido isoquercetina	463	300.9 (100) 179.2 (2) 151.0 (1) 342.9 (1)		
22	40.5	Apigenina-7-rutinósido.	577		268.9 (100) 531.3 (4) 195.3 (1)	
23	40.9	Oleuropeína.	539	307.0 (100) 275.1 (91) 377.0 (52) 345.0 (8)	275.1 (100) 307.0 (98) 377.0 (57) 327.0 (9)	307.0 (100) 275.1 (95) 377.0 (56) 345.0 (9)
24	42.8	Ácido oleurósido -10-carboxílico	539	275.1 (100) 307.0 (89) 377.0 (50) 327.0 (13)		
25	43.5	Apigenina-7-glicósido.	431		268.9 (100) 311.0 (2)	
26	43.9	Oleurósido.	539	307.0 (100) 275.0 (89) 377.0 (18) 327.0 (8)	275.1 (100) 307.0 (95) 377.0 (16) 437.1 (16)	307.0 (100) 275.1 (95) 377.0 (18) 371.0 (9)
27	44.6	Ligustrósido.	523	291.1 (100) 361.0 (81) 259.2 (49) 223.2 (2)	291.0 (100) 361.0 (74) 259.1 (68) 223.1 (6)	291.1 (100) 361.0 (79) 259.1 (43) 223.2 (4)
28	47.7	Luteolina-3'-7-diglicósido.	609	285.0 (100) 323.0 (3) 446.9 (3) 199.1 (1)		
29	48.1	Oleuropeína diglicósido.	701	539.1 (100) 307.1 (50) 377.1 (45) 275.1 (37)		
30	51.1	Luteolina-7-rutinósido.	593			284.9 (100) 447.1 (3) 201.0 (2)
31	51.6	Oleuropeína aglicona aldehído.	377			275.1 (100) 307.0 (100) 345.0 (9) 149.0 (7)
32	52.1	Quercetina.	301	178.9 (100) 150.9 (53) 272.9 (12) 107.0 (8)	178.9 (100) 150.9 (78) 107.0 (14) 256.9 (10)	

HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂. (): indica fragmentaciones de muy baja intensidad.

Tabla 10. Perfil de polifenoles de los extractos de hojas de olivo identificados por LC-MS, expresados en porcentaje

Peak	t _R (min)	Compuesto	Precursor (m/z)	Áreas (%)		
				HAO	JO	EFSO
1	16,5	Hidroxitirosol	153	0,4	7,3	6,2
2	16.9	Ácido vanilínico	167			1,9
3	17.4	Hidroxitirosol glicósido	315	0,8		
4	19.3	Ácido vanílico hexósido	329	0,3		
5	22.7	Ácido cafeico hexósido	341	0,4		
6	23.3	Vanillina.	151			0,3
7	25.4	Oleósido.	389	1,5	0,9	0,1
8	27.5	Ácido clorogénico.	354	0,3		
9	28.0	Oleuropeína aglicona	377	1,3		0,8
10	28.0	Pinoresinol	356	0,8		
11	29.0	Ácido cafeico	179			0,3
12	31.1	Ácido elenólico	241		0,5	0,1
13	34.2	Ácido p-cumárico	163			11,2
14	36.0	Ácido ferúlico	193			8,7
15	36.0	Verbascósido	623	3,0	15,7	7,1
16	36.0	Ligustrósido aglicona decarboximetil	303	0,6		
17	37.9	Luteolina-O-rutinósido	593	2,2		
18	38.5	Acetoxipinoresinol.	415	1,8		
19	38.5	Luteolina-7-glicósido.	448	2,2	2,7	1,2
20	38.5	Hesperidina-rutina	609	2,2		
21	39.2	Quercetina-3-O-galactósido e isoquercetina	463	1,1		
22	40.5	Apigenina-7-rutinósido.	577		0,8	
23	40.9	Oleuropeína.	539	29,1	0,8	6,7
24	42.8	Ácido oleurósido-10-carboxílico	539	8,2		
25	43.5	Apigenina-7-glicósido.	431		1,1	
26	43.9	Oleurósido.	539	13,2	0,8	2,3
27	44.6	Ligustrósido.	523	1,5	0,5	1,8
28	47.7	Luteolina-3'-7-diglicósido.	609	1,6		
29	48.1	Oleuropeína diglicósido.	701	0,9		
30	51.1	Luteolina-7-rutinósido.	593			1,2
31	51.6	Oleuropeína aglicona aldehído.	377			0,5
32	52.1	Quercetina.	301	1,1	0,8	

HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂

3.1.4.- Perfil de los principales compuestos fenólicos en extractos de hojas de palto

En la Figura 11 se presentan los cromatogramas HPLC con detección UV (280 nm) de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de hojas de palto, y en la Tablas 11, 12 y 13, los valores para las fragmentaciones y áreas de las señales (espresadas en %) en polaridad positiva y negativa para los extractos HAP, EFSP y JP, respectivamente.

En la Tabla 14 se presenta un resumen de la literatura para los diferentes compuestos fenólicos que se han identificado en hojas de palto.

Extracto hidroalcohólico (HAP)

En el análisis de los cromatogramas HPLC con detección UV se observó que las señales se encontraban superpuestas en iguales tiempos de retención, debido a la similitud de sus estructuras, pero lograron ser identificadas por LC-MS.

Los principales polifenoles identificados (Figura 11, Tabla 11) correspondieron a procianidinas (tetraméricas, triméricas y diméricas) y epicatequina (señal 10, 10,7%); epicatequina y procianidinas diméricas (señal 11, 13%) y procianidinas diméricas (B1-B4), quercetina-3-O-arabinoglicósido ó 6-hidroxluteolina-7-O-hexósido ó delphinidina-3-glicósido ó delphinidina-3-galactósido ó quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-O-galactósido ó quercetina-7-O-hexósido), quercetina, quercetina-7-O-glucurónido, quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido (señal 15, 19,8%)

Los resultados mostraron que fue posible identificar un 88 % del total de las señales que dan cuenta del perfil cromatográfico.

Además, por una parte el análisis de los resultados del cromatograma obtenido a 280 nm y el con detección de masas, mostró que una misma señal (igual tiempo de retención), presentó más de un precursor (m/z), cada uno con un perfil diferente de fragmentaciones, debido a una co-elución de polifenoles con polaridades muy similares entre sí, como es el caso por ejemplo de la señal 9 (T_R : 36 min, tabla 11), con 5 precursores.

Otra situación similar ocurre cuando un precursor presenta el mismo perfil de fragmentaciones, pero corresponde a compuestos diferentes (ejemplo señal 15, T_R 38,1 min y m/z 597,4), en este caso se presenta en polifenoles que están glicosilados en distintas posiciones de la molécula, de manera que la utilización de estándares sería necesaria para una identificación conclusiva de los compuestos.

Extracto obtenido por extracción supercrítica- CO_2 (EFSP)

En la Figura 11 aparecen los cromatogramas UV (280 nm) y en la Tabla 12 la identificación por LC-MS. Los principales polifenoles identificados en este extracto fueron procianidina dimérica y escopoletina (señal 12, 4,1%), procianidina dimérica (B1-B4) (señal 1, 3,7%), kaempferol y un compuesto flavonoide (posiblemente quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido ó 6-hidroxluteolina-7-O-ramnósido ó kaempferol-3-glicósido ó kaempferol-7-glicósido ó escutalareína-7-O-hexósido ó luteolina-7-glicósido ó quercetina 3-O-ramnosa) (señal 5, 3,1%), identificándose un 25 % de las señales en el cromatograma. Los resultados mostraron que el perfil de compuestos de este extracto fue similar a HAP en cuanto al tipo de polifenoles; sin embargo, en relación con el contenido y capacidad antioxidante, el comportamiento de EFSP fue distinto a HAP.

En comparación con la literatura, las procianidinas identificadas en HAP y EFSP no se han descrito previamente en extractos de hojas de palto (Tabla 14), pero sí en el fruto (De Pascual-Teresa *et al.*, 2000). Otros polifenoles, identificados como quercetina, canferol y luteolina, se han observado también en hojas por Ding *et al.* (2007) y De Almeida *et al.* (1998).

Jugo (JP)

Los principales compuestos fenólicos que se identificaron en polaridad positiva (Figura 11, Tabla 13) fueron principalmente los flavonoides kaempferol y kaempferol cumaril glicósido ó kaempferol-O-rutinósido ó cianidina-O-glicósido ó kaempferol-O-glicósido ó luteolina-O-glicósido (señal 18, 20,8%). En polaridad negativa el principal compuesto identificado correspondió a ácido clorogénico (señal 12, 17,5%), quercetina-O-rutinósido (señal 17, 14,5%), quercetina-O-ramnósido (señal 19, 12%) y kaempferol-O-ramnósido ó luteolina-O-ramnósido (señal 20, 6,9%). En hojas de palto se ha reportado previamente la presencia de ácido clorogénico, kaempferol y quercetina glicosilados (referencias en Tabla 14).

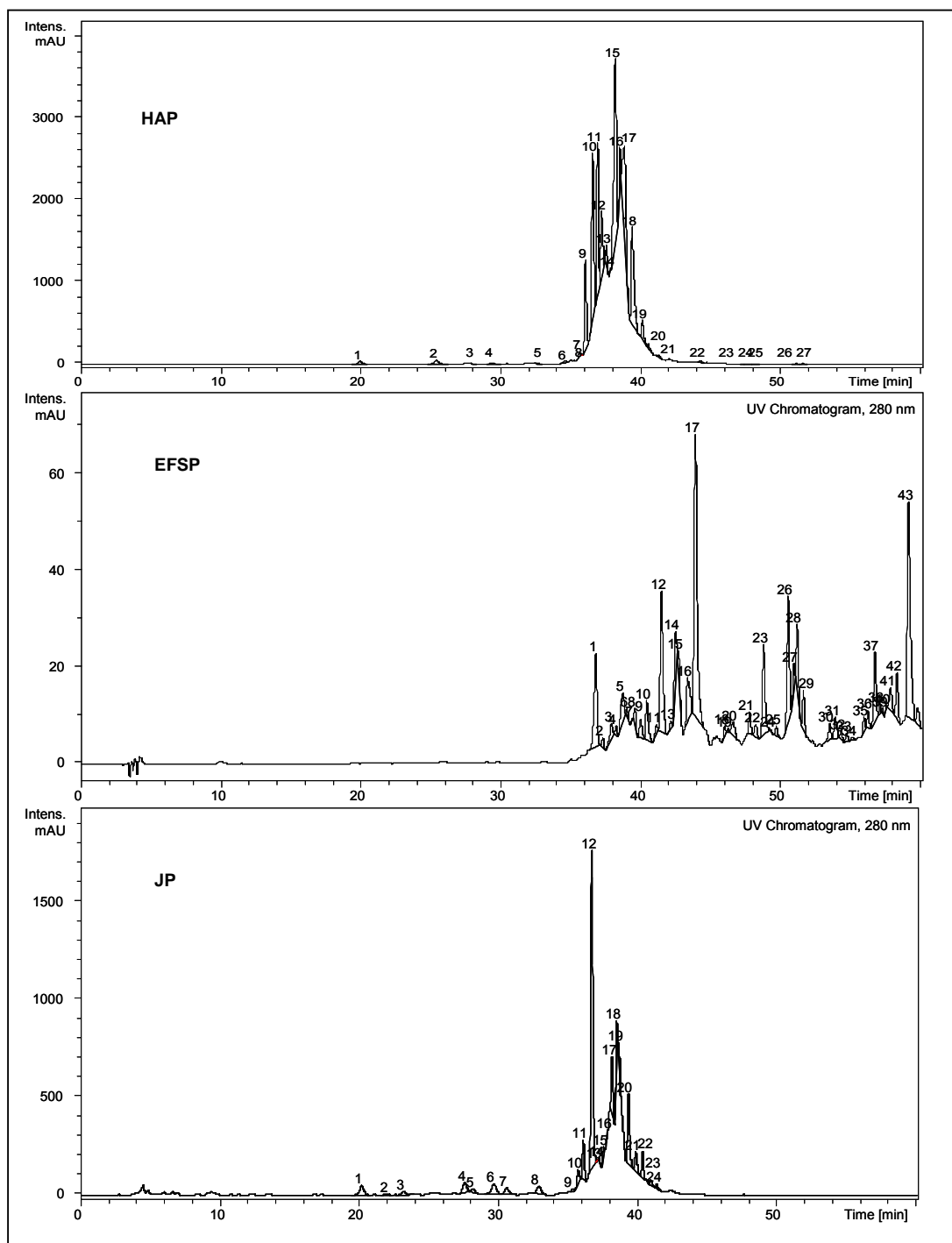


Figura 11. Cromatogramas HPLC con detección UV (280 nm) de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de hojas de palto

HAP: extracto hidroalcohólico de hojas de palto; JP: jugo de hoja de palto obtenido por prensado; EFSP: extracto de hoja de palto obtenido por extracción supercrítica- CO_2 .

Tabla 11. Identificación de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de hojas palto (HAP) por LC-MS en polaridad positiva y negativa

Peak	t _R (min)	Compuesto	Área (%)	Polaridad Positiva			Polaridad Negativa		
				Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)		Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)	
1	19.9	Galocatequina, catequina	0,3	595	425.1	577.1	437.0		
		Ácido pirocatéquico						153.2	109.0
2	25.3	Ácido cafeoilquínico-clorogénico	0,4					353.8	190.9 179.0 135.0
3	28.0	Ácido cafeoilquínico	0,5	355.4	163.0	145.0			
5	32.6	Procianidina dimérica (B1-B4)	0,1	579.7	427.0	409.0	289.1		
		Procianidina dimérica (B1-B3)						578.3	406.9 425.1
6	34.5	Procianidina trimérica	0,3	867.4	579.1	715.2	697.1		
		procianidina dimérica (B1-B4)		579.6	427.0	409.1	291.1		
		Procianidina dimérica (B1-B5)						577.9	425.1 407.1 451.0
7	35.5	p-cumaroil glicósido ó p-cumaroil hexosa	0,5					325.7	162.9 144.9 205.0
8	35.7	Procianidina trimérica	0,3	867.0	579.2	741.1	713.1		
9	36.0	Procianidina tetramérica	5,0	1155.9	577.1	865.2	697.2		
		Procianidina trimérica		867.0	579.1	697.2	715.1	865.3	695.1 577.1 407.1
		Procianidina dimérica (B1-B4)		579.5	427.1	289.1	409.1		
		Procianidina dimérica (B1-B5)						578.1	425.1 407.4 451.1
		Ácido cafeoilquínico-clorogénico						353.8	190.9 179.3
10	36.5	Procianidina tetramérica	10,7	1155.8	577.2	867.2	409.2	1156.0	577.2 1135.3 865.3
		Procianidina trimérica		867.5	577.2	713.1	695.1	865.8	695.1 407.1 449.0
		Procianidina dimérica (B1-B4)		579.5	427.0	291.1	409.1		
		Epicatequina		290.2	127.0	123.1	139.0		
11	36.8	Epicatequina	13,0	291.3	127.0	123.1	139.0	289.3	245.0 205.2 179.3
		Procianidina dimérica (B1-B5)						579.3	289.1 425.1 407.2
12	37.1	Procianidina tetramérica	6,5	1155.7	577.3	867.3	409.2	1153.8	865.3 983.3 577.3
		Procianidina trimérica		866.1	577.1	713.1	533.1	864.2	711.2 407.0 411.1
		6-hidroiluteolina-7-O-laminaribiosido ó delphinidina-3,5-diglicósido ó quercetina-3,4'-O-di β-glucopiranosido		627.5	303.1	465.0	447.1		
		Procianidina dimérica (B1-B4)		579.0	409.2	427.1	453.1		

Tabla 11. Identificación de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de hojas palto (HAP) por LC–MS en polaridad positiva y negativa

Peak	t _R (min)	Compuesto	Área (%)	Polaridad Positiva			Polaridad Negativa				
				Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)		Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)			
13	37.5	Quercetina-3-O-arabinoglicósido	3,3	597.4	303.1	465.0	447.1				
		6-Hidroxiluteolina- 7-O-hexósido ó delphinidina-3-glicósido ó delphinidina-3-galactósido ó quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido ó quercetina-7-O-hexósido.		465.3	303.0						
		Quercetina		303.3	229.0	257.0	165.1				
		Luteolina-O-diglicósido ó cianidina -O-diglicósido						609.8	285.0	429.0	300.1
		Quercetina-O-pento-hexósido						595.8	300.0	271.1	445.0
		Procianidina dimérica (B1-B5)					578.0	407.1	425.1	289.0	
14	37.7	Quercetina diglicósido ó quercetina-3-O-rutinósido ó Hesperidina-3-rutinósido.	0,2					609.5	300.9	342.9	271.9
15	38.1	Procianidina dimérica (B1-B4).	19,8	579.1	409.2	427.1	289.2	578.6	425.0	407.3	451.1
		Quercetina-3-O-arabinoglicósido ó 6-Hidroxiluteolina-7-O-hexósido ó delphinidina-3-glicósido ó delphinidina-3-galactósido ó quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido ó quercetina-7-O-hexósido.		597.4	303.1	465.0	447.1				
		Quercetina		303.2	229.0	257.0	165.0				
		Quercetina-7-O-glucurónido						477.3	300.9	430.9	457.1
		Quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido					463.5	300.9	151.2	179.3	
16	38.4	kaempferol	6,3	287.3	165.0	213.0	241.0				
		Kaempferol-O-hexósido ó kaempferol-O-galactósido ó cianidina-O-glicósido ó cianidina-O-galactósido ó luteolina-O-glicósido		449.5	287.1	353.1					
		kaempferol cumaroil-glicósido ó kaempferol O-rutinósido						593.6	284.1	413.0	255.1
		Ácido dicafeoilquínico					515.4	353.2	173.9		
17	38.8	Cianidina ramnosa-pentosa	9,5	565.5	433.1	287.0	397.1				
		Quercetina-3-O-ramnósido o cianidina-O-glicósido o luteolina-7-glicósido		449.4	303.0	287.1	413.0				
		Ácido dicafeoilquínico						515.9	353.0	173.0	
		Quercetina-O-ramnósido					447.8	300.8	151.3	179.4	

Tabla 11. Identificación de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de hojas palto (HAP) por LC–MS en polaridad positiva y negativa

Peak	t _R (min)		Área (%)	Polaridad Positiva			Polaridad Negativa			
				Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)		Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)		
18	39.3	Quercetina Kaempferol-O-ramnósido ó luteolina-O-ramnósido	8,4	301.5	191.0	165.1	137.0	432.1	284.8	326.9
19	40.0	Ácido-1,3-dicafeoilquínico glicósido ó ácido-3,4-dicafeoilquínico glicósido Kaempferol-3-cumaroil glicósido ó luteolina- 7-O-rutinósido Quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido	2,5					677.4	594.0	285.0 447.0
22	44.2	Quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido	0,3					464.1	300.9	150.9
23	47.1	Ácido dicafeoilquínico Quercetina-3-O-glicósido ó quercetina-3-O-galactósido kaempferol hexósido ó kaempferol-3-glicósido ó kaempferol- 7-glicósido ó escutalareína-7-O-hexósido ó cianidina-3-glicósido ó luteolina-7-O glicósido ó luteolina-7-O-galactósido ó quercetina-O-hexósido ó quercetina-O-pentósido ó quercetina-3-ramnósido	0,2					464.2	300.9	150.9
								516.1	353.0	178.9
								464.2	300.9	342.9
								447.6	300.9	284.0 323.0
24	47.6	Ácido dicafeoilquínico Quercetina-3-O-glucósido ó quercetina-3-O-galactósido	0,1					516.0	353.0	173.0
								464.4	300.9	
26	51.0	Quercetina-3-O-glucósido ó quercetina-3-O-galactósido	0,1					464.4	300.9	
27	51.5	kaempferol hexósido ó kaempferol-3-glicósido ó kaempferol-7-glicósido ó escutalareína-7-O-hexósido ó cianidina-3-glicósido ó luteolina-7-O- glicósido ó luteolina-7-O-galactósido ó quercetina-O-hexósido ó quercetina-O-pentósido ó quercetina-3-ramnósido	0,1					447.7	300.9	284.0 257

Tabla 12. Identificación de los compuestos fenólicos en el extracto de hojas de palto obtenido por extracción supercrítica con CO₂ (EFSP)

Peak	t _R (min)		Área (%)	Polaridad Positiva			Polaridad Negativa		
				Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)		Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)	
1	36.5	Procianidina dimérica (B1-B4)	3,7	579.5	427.0	290.9			
		Procianidina dimérica (B1-B5)					577.3	406.9	450.9 288.9
3	37.7	Kaempferol- O-hexósido ó kaempferol-O-galactósido ó cianidina-O-glicósido ó cianidina-O-galactósido ó luteolina-O-glicósido	1,2	449.5	287.1				
		Quercetina		303.2	285.1	119.1 131.1			
		Kaempferol-3-diglicósido ó kaempferol-7-diglicósido ó cianidina-3,5-di-O-glicósido ó luteolina-3',7-diglicósido					610.0	284.9	429.1
		Quercetina-3-O-arabinoglicósido					596.5	299.9	463.0
5	38.7	Kaempferol	3,1	287.3	213.1	165.0 269.1			
		Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido ó 6-Hidroxiluteolina-7-O-ramnósido ó Kaempferol-3-glicósido ó kaempferol-7-glicósido ó escutalareína-7-O-hexósido ó luteolina-7-glicósido ó quercetina-3-O-ramnosa					447.7	284.8	300.9
6	38.9	Quercetina	1,2	301.5	285.1	177.0 173.1			
		Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosido ó 6-Hidroxiluteolina 7-O-ramnósido ó kaempferol-3-glicósido ó kaempferol-7-glicósido ó escutalareína-7-O-hexósido ó luteolina-7-glicósido ó quercetina- 3-O-ramnosa					447.7	284.8	300.9
8	39.5	Kaempferol-3-O- α -L-ramnósido ó canferol-7-O- α -L-ramnósido ó cianidina-3-O-ramnósido ó luteolina-7-O-ramnósido	1,6				431.9	284.9	
12	41.4	Procianidina dimérica (fragmento)	4,1	443.0	425.3	233.1 291.2			
		Escopoletina			193.5	175.0 133.1 83.2			
14	42.4	Epicatequina (derivado)	2,7	500.8	483.3	291.2 233.2			
		Epicatequina (derivado)			483.5	233.1 465.3 291.2			
16	43.3	Epicatequina (derivado)	2,3	558.8	541.3	233.2 291.2			
34	55.0	Miricetina	1,1	319.4	245.2	113.1 283.2			
36	56.2	Epicatequina (derivado)	1,1	428.8	351.3	411.2 291.7			
44	59.7	Kaempferol	1,8	287.7	121.1	161.1 175.1			

Tabla 13. Identificación de los compuestos fenólicos en jugo por prensado de hojas de palto (JP) por LC-MS en polaridad positiva y negativa

Peak	t _R (min)	Área (%)	Polaridad Positiva				Polaridad Negativa		
			Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)			Precursor (m/z)	Fragmentaciones MS2 (m/z)	
1	20.0	Ácido pirocatequico	1,2				153.2	108.9	
2	21.8	Ácido (iso)vainílico	0,2				167.3	122.9	107.9 151.8
7	30.5	Ácido p-cumárico	0,9				163.4	119.0	
12	36.0	Ácido clorogénico	17,5				354.7	191.0	193.0 175.0
13	37.0	3-acetilvitisina B	1,4	558.6	331.2	523.1	361.1		
15	37.5	Luteolina-O-diglicósido ó cianidina-O-diglicósido	2,8	611.4	287.1	449.1	592.3	609.8	285.0 429.0
16	37.7	Kaempferol-O-hexósido ó kaempferol-O-galactósido ó cianidina-O-glicósido	5,2	449.5	287.1	303.1			
		Cianidina-O-galactósido ó luteolina-O-glicósido							
		Quercetina		303.2	229.1	285.0	257.0		
		Kaempferol-O-neohesperidósido ó kaempferol-O-galactósido-ramnósido					594.3	284.4	429.1 447.1
17	38.1	Quercetina-O-rutinósido	14,5				609.9	300.1	
18	38.4	Kaempferol	20,8	287.3	165.0	213.1	241.0		
		Kaempferol-cumaril-glicósido ó kaempferol-O-rutinósido					593.6	285.0	413.0 431.0
		Cianidina-O-glicósido ó kaempferol-O-glicósido ó luteolina-O-glicósido					448.0	284.2	255.5 327.0
19	38.6	Quercetina-O-ramnósido	12,0				448.7	300.9	285.1
20	39.3	Kaempferol-O-ramnósido ó luteolina-O-ramnósido	6,9				431.7	284.9	255.3
21	39.8	Ácido 1,3-dicafeoilquínico glicósido ó ácido 3,4-dicafeoilquínico glicósido.	3,9				677.4	515.2	629.6 353.3

Tabla 14. Principales compuestos fenólicos en hoja de palto, descritos en la literatura

Compuesto	Masa (g/mol)	Referencias
Ácido cafeico	180	Bune y van Lelyveld, 1982; Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido clorogénico	354	De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Ácido cumárico	164	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido ferúlico	194	Bune y van Lelyveld, 1982; Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido gálico	170	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido hidroxibenzoico	138	Bune y van Lelyveld, 1982; Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido pirocatéquico	154	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido protocatéquico	154	Bune y van Lelyveld, 1982; Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido resorcílico	154	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido sinápico	224	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido siríngico	198	Torres <i>et al.</i> , 1987
Ácido vainillínico	168	Torres <i>et al.</i> , 1987
Apigenina	270	Ding <i>et al.</i> , 2007; Owolabi <i>et al.</i> , 2005
Catequina	290	Ding <i>et al.</i> , 2007
Kaempferol 3-O-arabinósido	418	De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Kaempferol 3-O-glucósido (astragalina)	448	Ding <i>et al.</i> , 2007; Owolabi <i>et al.</i> , 2005
Kaempferol 3-O-ramnósido (afzelina)	432	De Almeida <i>et al.</i> , 1998; Ding <i>et al.</i> , 2007
(Epi)catequina	290	Ding <i>et al.</i> , 2007
Escopoletina	192	Ding <i>et al.</i> , 2007
Luteolina	286	Ding <i>et al.</i> , 2007; Owolabi <i>et al.</i> , 2005
Luteolina 7-glucósido (cinarósido)	448	Ding <i>et al.</i> , 2007
Quercetina	302	De Almeida <i>et al.</i> , 1998; Owolabi <i>et al.</i> , 2005.
Quercetina 3-O-arabinósido (guayaverina/avicularina)	434	De Almeida <i>et al.</i> , 1998; Ding <i>et al.</i> , 2007
Quercetina 3-O-diglucoído (meratina)	626	Ding <i>et al.</i> , 2007
Quercetina 3-O-galactósido (hiperósido)	464	De Almeida <i>et al.</i> , 1998
Quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrina)	464	De Almeida <i>et al.</i> , 1998; Ding <i>et al.</i> , 2007
Quercetina 3-O-ramnósido (quercetrina)	448	De Almeida <i>et al.</i> , 1998; Ding <i>et al.</i> , 2007
Quercetina 3-O-rutinósido (rutina)	610	Owolabi <i>et al.</i> , 2005

3.1.5.- Determinación del contenido de tocoferoles

No se identificó la presencia de tocoles en HAO y HAP, así como tampoco en JO y JP. A diferencia de lo anterior, en EFSO y EFSP se determinó un contenido de α -tocoferol de 671 y 113 mg/Kg de extracto, respectivamente. El contenido de este compuesto en EFSO fue mayor que el descrito por Guinda et al (2002) en un extracto hexanólico de hojas de olivo (cv. Arbequina, 125 μ g/g). Sin embargo, fue similar al rango descrito por Tabera et al (2004), entre 62 y 1044 μ g/g, en extractos de hojas de olivo macerados previamente en hexano y luego sometidos a extracción supercrítica-CO₂ (con presiones que fluctuaron entre 75 y 200 bar y temperaturas entre 35 y 50°C. Estos resultados indican que las condiciones utilizadas (presión) para la obtención de estos extractos permitieron la coextracción de α -tocoferol debido a que el CO₂, presenta una baja polaridad, permitiendo extraer compuestos con estructuras químicas similares a los extraídos con solventes orgánicos como pentano y hexano. Además, se ha descrito que al aumentar la presión del CO₂, este es capaz de separar compuestos menos volátiles, de mayor peso molecular o con mayor polaridad como ocurre con los polifenoles (Del Valle y Aguilera, 2002).

3.2.- Estabilidad oxidativa (Rancimat) de los aceites sin y con la adición de extractos de hojas de olivo y palto

3.2.1.- Selección de los extractos

Los extractos OO y OP se descartaron por su bajo contenido de polifenoles totales, seleccionando para el estudio de estabilidad oxidativa HAO, HAP, JO, JP, EFSO y EFSP.

3.2.2.- Características iniciales de los sistemas AGAO, AC y AS para los ensayos de estabilidad oxidativa

En la Tabla 15 se muestran las características iniciales de los aceites AGAO, AC y AS.

Tabla 15. Características iniciales de los aceites utilizados en los ensayos de estabilidad oxidativa (Rancimat)

	Sistemas Lipídicos		
	AGAO	AC	AS
	X ± DE	(% ésteres metílicos) X ± DE	X ± DE
C16:0	3,9 ± 0,1	5,3 ± 0,3	10,4 ± 0,7
C18:0	3,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	4,6 ± 0,2
C18:1n-9	81,8 ± 2,2	56,3 ± 1,8	20,3 ± 0,9
C18:2n-6	7,3 ± 0,5	21,6 ± 1,1	51,6 ± 2,7
C18:3n-3	0,2 ± 0,01	8,5 ± 0,4	7,2 ± 0,4
		(mg/Kg aceite)	
α-tocoferol	590 ± 7,7	277 ± 4,3	6 ± 1,8
β-tocoferol	23 ± 1,7	nd	24 ± 1,0
γ-tocoferol	6 ± 0,5	130 ± 3,3	238 ± 7,8
δ-tocoferol	nd	19 ± 0,8	256 ± 5,4
Total	619	426	524
		(µg EAC/g aceite)	
Polifenoles	2,7 ± 0,42	3,2 ± 0,23	1,3 ± 0,08

X: promedio; DE: desviación estándar; AGAO: aceite de girasol alto oleico; AC: aceite de canola; AS: aceite de soja; nd: no detectado.

3.2.3.- Tiempos de inducción y factores de protección

En la Tabla 16 se presentan los tiempos de inducción (TI) y factores de protección (FP) de los aceites de soja (AS), canola (AC) y girasol alto oleico (AGAO), sin y con la adición de los extractos HAO, JO y EFSO, con concentraciones de polifenoles de 250 y 630 mg EAC/Kg aceite.

Tabla 16. Tiempos de inducción y factores de protección de los aceites estudiados (AGAO, AC y AS), sin y con la adición de extractos de hojas de olivo en concentraciones de 250 y 630 mg EAC/Kg aceite

	Tiempo de Inducción (h) X ± DE			Factor de Protección (FP)		
	AGAO	AC	AS	AGAO	AC	AS
Control	16,9 ± 0,35 ^a	9,5 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,41 ^a	--	--	--
250 mg EAC/Kg						
HAO	21,1 ± 0,07 ^b	9,5 ± 0,23 ^a	6,7 ± 0,06 ^a	1,3	1	1,1
EFSO	26,3 ± 0,86 ^d	12,6 ± 0,36 ^c	6,9 ± 0,39 ^a	1,6	1,3	1,2
JO	2,7 ± 0,21 ^c	1,8 ± 0,04 ^b	1,7 ± 0,05 ^b	0,2	0,2	0,3
630 mg EAC/Kg						
HAO	30,7 ± 0,78 ^b	11 ± 0,85 ^b	7,6 ± 0,13 ^b	1,8	1,2	1,3
EFSO	35,1 ± 0,28 ^d	13,4 ± 0,42 ^d	8,4 ± 0,05 ^b	2,1	1,4	1,4
JO	3,0 ± 0,18 ^c	2,0 ± 0,04 ^c	1,4 ± 0,61 ^c	0,2	0,2	0,2

X: promedio; DE: desviación estándar; EAC: equivalente a ácido cafeico; AGAO: aceite girasol alto oleico; AC: aceite de canola; AS: aceite de soja; HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂. A los aceites adicionados con extractos se les agregó Tween-80®. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05), con respecto al tipo de aceite y concentración.

Los tiempos de inducción (TI) obtenidos en AC y AGAO controles (sin la adición de los distintos extractos) fueron similares a los encontrados por Merrill *et al.* (2008), de 8,4 y 16,5 h, respectivamente, y levemente menor para el AS de 7,6 h. De acuerdo a estos resultados, se puede corroborar que la estabilidad oxidativa de una matriz lipídica está relacionada en gran parte con la composición de sus ácidos grasos. En este caso el AGAO presentó TI mayores con respecto a AS y AC, lo cual se explica por su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados (83,6%) y bajo contenido en poliinsaturados (7,7%), estos últimos más susceptibles de sufrir procesos oxidativos.

El análisis estadístico del efecto de la adición de los diferentes extractos (HAO, JO y EFSO), en una concentración de polifenoles de 250 y 630 mg EAC/Kg a AS, AC y AGAO, mostró que el tipo de aceite y el tipo de extracto afectan el tiempo de inducción (p<0,05).

La adición de los extractos, en una concentración de polifenoles de 250 mg EAC/Kg, aumentó el TI (efecto antioxidante) con respecto al control ($p < 0,05$), en el caso del extracto HAO adicionado a AGAO y EFSO adicionado a AC y AGAO, sin embargo, este efecto fue mayor en el aceite más monoinsaturado (AGAO). Este mismo comportamiento se encontró cuando se calcularon los factores de protección (tiempo de inducción del aceite adicionado/tiempo de inducción del aceite control), observándose mayores FP para los sistemas EFSO-AGAO; EFSO-AC y HAO-AGAO, con valores de 1,6, 1,3 y 1,3, respectivamente. Por otro lado, la adición de los extractos HAO y EFSO (630 mg EAC/Kg aceite), aumentaron los TI de los tres aceites (AS, AC y AGAO) estudiados con respecto al control ($p < 0,05$). Aunque el extracto EFSO presentó TI mayores con respecto al extracto HAO, en los aceites más monoinsaturados (AC y AGAO), situación que se mantuvo cuando se calcularon los FP.

El efecto antioxidante observado, en general, en HAO y EFSO, es concordante con lo encontrado por Salta *et al.* (2008), que adicionaron 200 ppm de polifenoles de un extracto metanólico de hoja de olivo (cv. Kalamón) a aceites de girasol, oliva, palma y a un shortening vegetal a 100°C y Farag *et al.* (2003) que adicionaron 400 ppm de polifenoles libres, ésteres solubles y ácidos fenólicos esterificados desde extractos de hojas de la variedad Picual y Kronakii a aceite de girasol, siendo este efecto significativamente mayor cuando los polifenoles fueron adicionados en forma libre con respecto a los ésteres solubles y ácidos fenólicos esterificados.

En forma opuesta a lo anterior, la adición de JO en ambas cantidades (250 y 630 mgEAC/Kg aceite) disminuyó el TI de los tres aceites (AS, AC y AGAO), en relación a sus respectivos controles ($p < 0,05$), ejerciendo así un efecto prooxidante, con valores de FP en los tres aceites y en ambas concentraciones menores a 1.

Estos resultados se contraponen a lo descrito por Farag *et al*, (2007), que mostraron un efecto antioxidante del jugo en concentraciones equivalentes a 400 y 2400 ppm en aceite de girasol a 180°C. Las diferencias con el presente estudio son difíciles de explicar, pero se podrían atribuir a la composición de polifenoles y al pretratamiento de las hojas.

El efecto prooxidante del jugo sobre los tres tipos de aceites estudiados cuando se sometieron a una temperatura de 110°C sugiere que en el jugo están presentes enzimas como la difenil oxidasa (POO, código de identificación EC 1.10.3.2, descrita en el fruto) (Soler- Rivas *et al.*, 2000), que facilitarían la oxidación y degradación de los compuestos fenólicos a otros con menor o sin capacidad antioxidante. En este contexto, el escaldado permitiría suministrar un pulso de energía (90 °C por 4,5 min) para inactivar las enzimas deletéreas evitando la oxidación de polifenoles.

Estos resultados sugieren que el efecto pro-oxidante y/o antioxidante de los extractos de hojas de olivo es dependiente del sistema lipídico, el pretratamiento de las hojas, el tipo de polifenoles y la temperatura aplicada.

En la Tabla 17 se presentan los tiempos de inducción y factores de protección de los aceites AS, AC y AGAO sin y con la adición de polifenoles en concentraciones de 250 y 630 mg EAC/Kg de aceite.

Tabla 17. Tiempos de inducción y factores de protección de los aceites estudiados (AGAO, AC y AS) sin y con la adición de extractos de hojas de palto en concentraciones de 250 y 630 mg EAC/Kg aceite

	Tiempo de Inducción (h) X ± DE			Factor de Protección (FP)		
	AGAO	AC	AS	AGAO	AC	AS
Control	16,9 ± 0,35 ^a	9,5 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,41 ^a	--	--	--
250 mg EAC/Kg						
HAP	17 ± 0,14 ^a	9,5 ± 0,54 ^a	5,3 ± 0,96 ^a	1,0	1,0	0,9
EFSP	18,5 ± 0,36 ^b	9,2 ± 0,04 ^a	6,3 ± 0,19 ^a	1,0	1,0	1,1
JP	16,9 ± 0,21 ^a	9,1 ± 0,04 ^a	6,3 ± 0,37 ^a	1,1	0,9	1,1
630 mg EAC/Kg						
HAP	18,8 ± 0,14 ^b	9,8 ± 0,66 ^a	6,4 ± 0,16 ^{ab}	1,1	1,0	1,0
EFSP	33,4 ± 0,5 ^c	11,6 ± 0,07 ^b	6,9 ± 0,01 ^b	1,9	1,3	1,2
JP	16,4 ± 0,57 ^a	11,5 ± 0,21 ^b	7,1 ± 0,3 ^b	1,0	1,2	1,2

X: promedio; DE: desviación estándar; EAC: equivalentes ácido cafeico; AGAO: aceite girasol alto oleico; AC: aceite de canola; AS: aceite de soja; HAP: extracto hidroalcohólico de palto; JP: jugo de hoja de palto obtenido por prensado; EFSP: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂. A los aceites adicionados con extractos se les agregó Tween-80®. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) según tipo de aceite y concentración.

El análisis estadístico para la adición de HAP, JP y EFSP a AS, AC y AGAO en concentraciones de 250 y 630 EAC/Kg mostró un comportamiento similar al de las hojas de olivo, donde el tipo de aceite, el tipo de extracto y la concentración del extracto afectaron el tiempo de inducción (p<0,05).

La adición de los extractos de hojas de palto en una concentración de polifenoles de 250 mg EAC/Kg aumentó el TI con respecto al control sólo en el extracto EFSP adicionado a AGAO (aceite más monoinsaturado) (p<0,05). Los extractos HAP, JP y EFSP no afectaron los TI de AS y AC, así como tampoco los extractos HAP y JP en AGAO.

Cuando los extractos de hojas de palto se adicionaron a los tres aceites estudiados en una concentración mayor de polifenoles (630 mg EAC/Kg), se observó que la adición de HAP aumentó sólo el TI de AGAO ($p < 0,05$). El JP aumentó el TI de los aceites más poliinsaturados AS y AC ($p < 0,05$) y el extracto EFSP aumentó el TI de los tres aceites (AS, AC y AGAO), siendo este efecto mayor para AGAO ($p < 0,05$), obteniéndose el FP más alto, de 1,9. No se encontraron estudios acerca de la estabilidad de aceites adicionados con polifenoles provenientes de extractos de hojas de palto.

Los resultados de estabilidad oxidativa a 110°C (TI y FP), en los extractos de hoja de olivo y palto, mostraron que la adición de EFSO y EFSP a los aceites ejerció mayor efecto antioxidante en comparación a los otros extractos. Sin embargo, este mejor comportamiento antioxidante podría atribuirse a la presencia de otros componentes menores, como es la presencia adicional de α -tocoferol (671 y 113 ppm en EFSO y EFSP, respectivamente). En la literatura, algunos autores (Pekkarinen *et al.*, 1999; Pedrielli y Skibsted, 2002; Becker *et al.*, 2007; Marinova *et al.*, 2008) han sugerido un sinergismo entre flavonoides y específicamente α -tocoferol, lo que podría explicar en parte el mejor efecto antioxidante de los extractos obtenidos por extracción supercrítica y especialmente de EFSO sobre los aceites estudiados.

El comportamiento diferente que presentó el jugo de palto con respecto al de olivo (efecto antioxidante y pro-oxidante, respectivamente), sugiere que el tipo de polifenoles y/o la interacción de éstos con otros componentes presentes en los extractos influirían sobre el TI.

3.3.- Ensayos de fritura en los aceites (AC y AGAO) sin y con la adición de extracto hidroalcohólico (HAO o HAP)

3.3.1.- Selección de los extractos aplicados a los aceites de fritura

Los extractos OO, OP, JO, JP, EFSO y EFSP se descartaron por sus bajos contenidos de polifenoles totales y además por la presencia de α -tocoferol (extractos EFSO y EFSP). Por lo tanto, para los ensayos de fritura se seleccionaron solo los extractos hidroalcohólicos de hojas de olivo y palto (HAO y HAP).

3.3.2.- Características iniciales de los sistemas AC y AGAO para los ensayos de fritura con la adición de los extractos hidroalcohólicos

En la Tabla 18 se muestran las características iniciales de los sistemas

Tabla 18. Características iniciales de los sistemas utilizados para fritura.

	Sistemas Lipídicos X \pm DE			
	AGAO	(AGAO+HAO) ó (AGAO+HAP)	AC	(AC+HAO) ó (AC+HAP)
	(% ésteres metílicos)			
C16:0	4,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	6,2 \pm 0,5	6,2 \pm 0,5
C18:0	3,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1
C18:1n-9	82,5 \pm 2,2	82,5 \pm 2,2	53,4 \pm 0,8	53,4 \pm 0,8
C18:2n-6	6,4 \pm 0,4	6,4 \pm 0,4	20,4 \pm 0,7	20,4 \pm 0,7
C18:3n-3	0,3 \pm 0,01	0,3 \pm 0,01	7,9 \pm 0,4	7,9 \pm 0,4
	(mg/Kg aceite)			
α -tocoferol	572,9 \pm 19,4	572,9 \pm 19,4	212,3 \pm 17,8	212,3 \pm 17,8
γ -tocoferol	nd	nd	385 \pm 2,3	385 \pm 2,3
Total	572,9	572,9	597,3	597,3
	(mg EAC/Kg aceite)			
Polifenoles	2,7 \pm 0,43	602,7 \pm 0,80	3,5 \pm 0,23	603,1 \pm 0,98

nd: no detectado; AGAO: aceite girasol alto oleico; AC: aceite de canola.

3.3.3.- Evolución de los tocoles en AC y AGAO sometidos a fritura de papas “french” como consecuencia de la adición de HAO o HAP

En la Tabla 19 se presenta la evolución del contenido de α -tocoferol (AT) y γ -tocoferol (GT) durante la oxidación térmica de los distintos sistemas de aceite de canola estudiados.

Tabla 19. Evolución del contenido de AT y GT (ppm) durante la fritura de papas “french” en los distintos sistemas de aceite de canola estudiados.

Tiempo (h)	α -tocoferol (AT)			γ -tocoferol (GT)		
	AC control	AC+HAO	AC+HAP	AC control	AC+HAO	AC+HAP
0	212 \pm 18	212 \pm 18	212 \pm 18	386 \pm 22	386 \pm 22	386 \pm 22
8	123 \pm 2	196 \pm 4	178 \pm 5	265 \pm 10	368 \pm 21	349 \pm 1
16	72 \pm 2	187 \pm 5	125 \pm 4	153 \pm 10	294 \pm 21	228 \pm 5
24	42 \pm 2	164 \pm 15	100 \pm 2	78 \pm 4	282 \pm 13	160 \pm 11
32	nd	149 \pm 2	75 \pm 1	43 \pm 3	228 \pm 7	102 \pm 2
40	nd	117 \pm 8	nd	nd	183 \pm 3	81 \pm 1
48	nd	88 \pm 4	nd	nd	130 \pm 10	60 \pm 3
56	nd	61 \pm 3	nd	nd	95 \pm 2	nd

AC: aceite de canola; AC+HAO: aceite de canola adicionado con 600 ppm de extracto hidroalcohólico de hojas de olivo; AC+HAP: aceite de canola adicionado con 600 ppm de extracto hidroalcohólico de hojas de palto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a cada tipo de tocoferol.

En AC se estudió el comportamiento de AT y GT en el tiempo, por ser los tocoles más importantes, con contenidos de 212 y 386 mg/Kg de aceite, respectivamente, similares a los valores reportados por González (2004). En el aceite control se observó una mayor pérdida de AT y GT al término del primer día de fritura, con respecto a los sistemas con adición de los extractos.

La adición de los extractos HAO y HAP al aceite de canola produjo una mayor permanencia de AT y GT, con respecto al control ($p < 0,05$), mostrando el HAO un mayor efecto protector de los tocoferoles.

En la Tabla 20 se presenta la evolución de AT durante la fritura (oxidación térmica) en AGAO, AGAO+HAO y AGAO+HAP. En el aceite control, el contenido disminuyó drásticamente después del primer día, resultados similares a los descritos por Barrera-Arellano *et al.* (2002).

La explicación a este comportamiento radicaría en la composición de los ácidos grasos (menor insaturación) y no en la acción antioxidante de los tocoferoles. Un comportamiento similar al de canola se observó cuando se adicionó HAO o HAP a AGAO, aumentando la permanencia de AT, siendo este efecto mayor con la adición de HAO ($p < 0,05$).

Tabla 20. Evolución del contenido de AT (expresado en ppm), durante la fritura de papas french en los distintos sistemas de AGAO estudiados.

Tiempo(h)	α -tocoferol (AT) (ppm)		
	AGAO control	AGAO+HAO	AGAO+HAP
0	573 \pm 19	573 \pm 19	573 \pm 19
8	49 \pm 3	513 \pm 16	152 \pm 5
16	nd	356 \pm 3	45 \pm 1
24	nd	253 \pm 1	nd
32	nd	200 \pm 3	nd
40	nd	177 \pm 1	nd
48	nd	154 \pm 1	nd
56	nd	152 \pm 9	nd

X: promedio; DE: desviación estándar; AGAO: aceite girasol alto oleico; AGAO+HAO: aceite girasol alto oleico adicionado con 600 ppm de extracto hidroalcohólico de hojas de olivo; AGAO+HAP: aceite girasol alto oleico adicionado con 600 ppm de extracto hidroalcohólico de hojas de palto.

En la Tabla 21 se presentan las constantes de velocidad de degradación de primer orden de los tocoferoles en AC y AGAO, sin y con la adición de HAO o HAP, calculadas como la pendiente de un gráfico del logaritmo natural de la concentración versus el tiempo.

Tabla 21. Constante de velocidad de degradación de primer orden para AT y GT en los aceites de canola y girasol alto oleico en fritura de papas french, sin y con la adición de extractos de hoja de olivo o palto

	$k_{obs} (h^{-1})$ $X \pm DE$	
	α -tocoferol	γ -tocoferol
AC	0,061 \pm 0,003 ^a	0,063 \pm 0,001 ^a
AC+HAO	0,019 \pm 0,001 ^b	0,021 \pm 0,001 ^b
AC+HAP	0,027 \pm 0,001 ^c	0,037 \pm 0,001 ^c
AGAO	-	-
AGAO + HAO	0,029 \pm 0,001 ^c	-
AGAO+ HAP	0,080 \pm 0,003 ^d	-

X: promedio; DE: desviación estándar; AC: aceite de canola; AGAO: aceite girasol alto oleico; HAO: extracto hidroalcohólico de hojas de olivo; HAP: extracto hidroalcohólico de hojas de palto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), con respecto al tipo de aceite y tocoferol.

En los sistemas AC, la adición de HAO y HAP aumentó la permanencia de AT y GT, lo que queda demostrado por las menores constantes de velocidad con respecto al control, mostrando HAO un mayor efecto protector de los tocoferoles con respecto a HAP. Un comportamiento similar sobre la permanencia de AT se observó en los sistemas AGAO+HAO y AGAO+HAP. Contrariamente, en AGAO control, la degradación de AT fue muy rápida (antes de las 8 h) lo que no permitió determinar su constante de velocidad, asumiendo un valor mayor a 0,08.

Además, se observó una menor constante de degradación para AT en el sistema más insaturado (AC sin y con la adición de HAO y HAP) con respecto a AGAO, lo que coincide con lo descrito en la literatura donde la degradación de AT disminuyó con el grado de insaturación de la matriz lipídica (Barrera-Arellano *et al.*, 2002).

En los aceites monoinsaturados, los tocoles son sustratos oxidables, aumentando su velocidad de degradación, mientras que en los aceites más insaturados los ácidos grasos pasan a ser sustratos oxidables y la velocidad de degradación de los tocoles disminuye (Barrera-Arellano *et al.*, 2002)

Con respecto a la literatura, Romero *et al.* (2006) indican que el AC adicionado con un extracto de cáscara de rosa mosqueta sometido a calentamiento a 180°C por 18 h, presentó constantes de velocidad de degradación de AT mayores a las de este estudio ($0,10 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). Estas diferencias podrían explicarse por las condiciones de cada estudio y el tipo de extracto adicionado.

La mayor permanencia de los tocoferoles en los aceites cuando se adicionó HAO o HAP, con respecto al control, sugiere que los tocoferoles son regenerados por los polifenoles u otros componentes menores presentes en los extractos, como describieron Pekarinen *et al.* (1999) y Marinova *et al.* (2008) en sistemas modelos.

La interacción entre polifenoles y tocoferol, se ha descrito en quercetina en una emulsión aceite/agua (Becker *et al.*, 2007), miricetina, quercetina y rutina en linoleato de metilo a 40° C (Pekkarinen *et al.*, 1999), quercetina y catequina en linoleato de metilo a 50° C (Pedrielli y Skibsted, 2002) y miricetina en triglicéridos de aceite de girasol a 100°C (Marinova *et al.*, 2008). Un efecto sinérgico también se ha descrito con la adición de extracto de romero y salvia en aceite de palma (Che Man y Jaswir, 2000) y de orégano en aceite de algodón (Houhoula *et al.*, 2003), ambos a 180°C.

El mecanismo que describe la interacción entre flavonoides y tocoferoles no está aún bien comprendido. Se ha sugerido la regeneración del tocoferol desde su radical por un flavonoide ó que los flavonoides sean regenerados por los tocoferoles.

En el presente estudio se observó que los polifenoles presentes en el extracto de hoja de olivo y palto regeneran los tocoferoles. Marinova *et al.*, (2008) reportaron un comportamiento diferente, en que el AT regenera a miricetina durante la autoxidación de triglicéridos de aceite de girasol a 100°C. Las diferencias en el mecanismo de interacción entre polifenoles y tocoferoles podría estar relacionada con las propiedades termodinámicas sensibles al solvente y a la temperatura (Altunkaya *et al.*, 2009).

3.3.4.- Efecto de la adición de (HAO) o (HAP) sobre la formación de compuestos polares (CP) en aceites durante la fritura de papas “french”

En la Tabla 22 se muestra la evolución en el contenido de los compuestos polares en AC y AGAO sometidos a fritura de papas “french”, sin y con la adición de HAO o HAP (600 mg EAC/Kg aceite).

Tabla 22. Evolución del contenido de compuestos polares (%) en AC y AGAO sometidos a fritura de papas “french” sin y con la adición de HAO o HAP (600 mg EAC/Kg).

Sistema/ Tiempo (h)	CP (%)				
	0	16	32	48	56
AC	4,4 ± 1,01	16,2 ± 0,65	24,5 ± 0,76	32,7 ± 1,21	35,2 ± 1,10 ^a
AC+HAO	4,4 ± 1,01	12,6 ± 1,52	16,4 ± 0,14	20,7 ± 1,97	25,1 ± 0,45 ^b
AC +HAP	4,4 ± 1,01	11,5 ± 1,77	22,6 ± 2,44	31,6 ± 2,35	35,2 ± 1,01 ^a
AGAO	5,7 ± 0,64	16,4 ± 0,23	23,1 ± 0,69	25,6 ± 1,34	29,8 ± 4,31 ^a
AGAO+HAO	5,7 ± 0,64	15,5 ± 0,25	19,0 ± 0,90	23,4 ± 0,43	25,2 ± 0,56 ^b
AGAO+HAP	5,7 ± 0,64	20,6 ± 0,01	26,5 ± 0,12	31,8 ± 1,13	34,2 ± 0,69 ^c

X: promedio; DE: desviación estándar; AC: aceite de canola; AGAO: aceite girasol alto oleico, HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; HAP: extracto hidroalcohólico de palto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), en el contenido de CP a los 56 h de fritura, con respecto al tipo de aceite.

Los resultados mostraron un aumento en la formación de CP con el tiempo de fritura en todos los sistemas estudiados. A las 56 h de fritura (día 7), el contenido superó el 25%,

valor máximo permitido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (RSA, 1996).

El AGAO (83% monoinsaturación) presentó una menor formación de CP con respecto al AC (53%), de forma que la composición en ácidos grasos juega un rol importante en la estabilidad termooxidativa. Se ha sugerido que en la estabilidad de aceites de fritura sometidos a altas temperaturas, la composición en ácidos grasos es más importante que la presencia de componentes menores, a diferencia de lo que ocurre a bajas temperaturas, donde el contenido de antioxidantes es más importante que la composición en ácidos grasos (Lampi y Kalman-Eldin, 1998).

En la Figura 12 se muestra la evolución del contenido de CP en los sistemas AC, AC+HAO y AC+HAP sometidos a fritura de papas “french”.

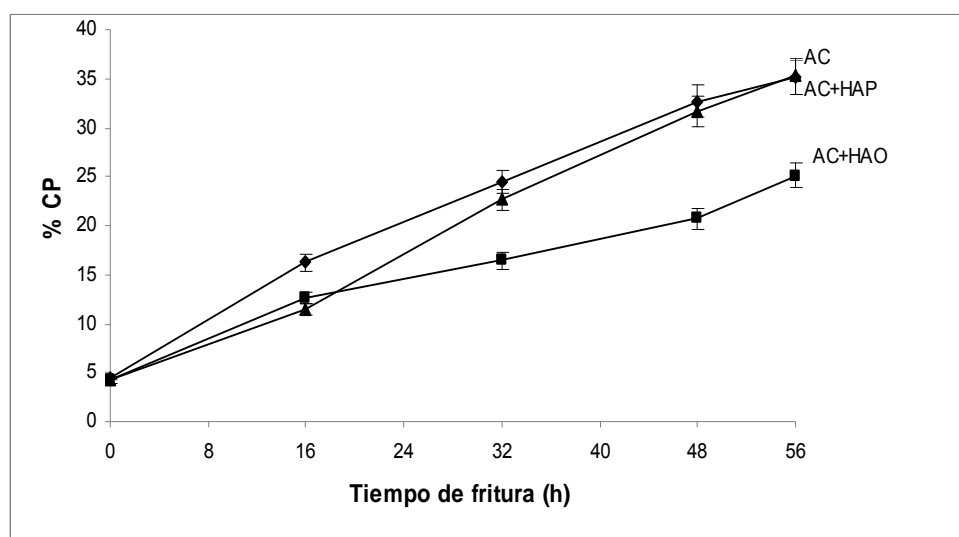


Figura 12. Evolución de compuestos polares, expresados en porcentaje, en los sistemas de AC control y adicionados con HAO o HAP, según tiempo de fritura (h)

La adición de extracto HAP al AC no mostró un efecto significativo en retardar la formación de CP, similar al comportamiento encontrado en el AC control. Sin embargo,

la adición del HAO al AC disminuyó la formación de estos compuestos en comparación con AC y AC+HAP ($p < 0,05$).

Este resultado es coincidente con la mayor permanencia y la menor constante de velocidad de degradación de los tocoferoles en el sistema con HAO, mostrando la protección que los antioxidantes ejercen para evitar la formación de compuestos polares (Barrera-Arellano *et al.*, 2002).

En la Figura 13 se muestra la evolución del contenido de los CP en los sistemas AGAO, AGAO+HAO y AGAO+HAP. En forma similar a los sistemas con AC, la adición de HAO disminuyó la formación de compuestos polares en comparación con los sistemas AGAO y AGAO+HAP ($p < 0,05$). Contrariamente, la adición de HAP mostró un aumento en la formación de CP con respecto a los sistemas AGAO y AGAO+HAO ($p < 0,05$). Sin embargo, a pesar que el contenido de HAP favoreció la permanencia de AT, la formación de CP se produjo más tempranamente que en el control.

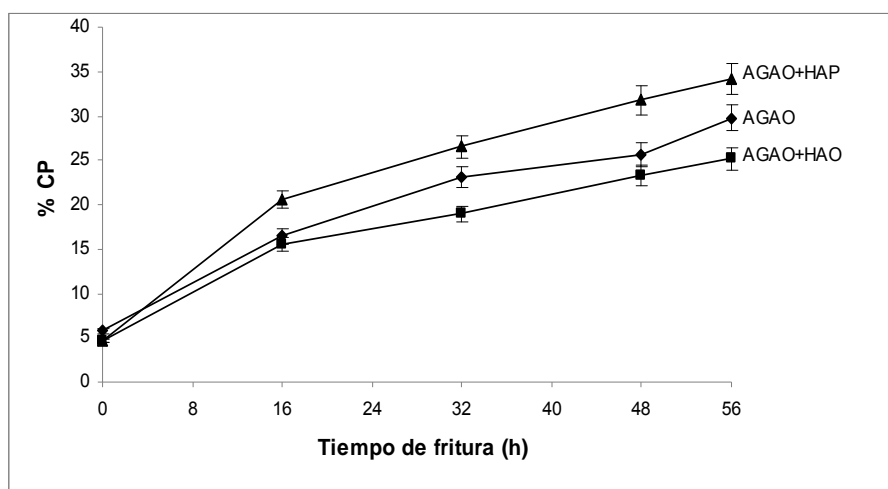


Figura 13. Evolución de compuestos polares, expresados en porcentaje, en los sistemas de AGAO control y adicionados con HAO o HAP, según tiempo de fritura (h).

En este contexto, el mecanismo de acción de los polifenoles está relacionado con la capacidad para actuar como donantes de átomos de hidrógeno a los radicales libres primarios (peroxil) formados durante la fritura, previniendo de esta manera las

reacciones de polimerización que se producen como consecuencia de las elevadas temperaturas que alcanza este proceso (Houhoula *et al.*, 2003), siempre y cuando sean estables a esas temperaturas. Se ha descrito que algunos productos de descomposición de los polifenoles son capaces de donar un hidrógeno nuevamente, aumentando su potencia antioxidante (Murakami *et al.*, 2004).

En la literatura existe una numerosa evidencia que muestra la capacidad protectora de los polifenoles sobre el aceite de fritura. Por ejemplo, en un trabajo realizado en aceite de girasol calentado a 180°C (5 h/día durante 5 días) al que se adicionó jugo de hojas de olivo en cantidades equivalentes a 1600 y 2400 mg EAC/Kg, se observó un efecto antioxidante, medido por la formación de CP (Farag *et al.*, 2007).

Efectos similares a los observados en este trabajo pueden encontrarse en estudios realizados sobre distintos aceites sometidos a fritura de papas, como es el caso de la adición a aceite de palma de un extracto de romero (comercial) y salvia en una concentración de 0,4% (Che Man y Jaswir, 2000), aceite de algodón más un extracto etanólico de hojas de orégano (Houhoula *et al.*, 2003) y aceite de palma más un extracto etanólico de hojas de *Curcuma longa* en una concentración de 0,2% (Mohd Nor *et al.*, 2009).

3.3.5.- Composición de la fracción de compuestos polares

En la Tabla 23 se muestra la composición de la fracción polar en los aceites previo a la fritura. Se observa una buena calidad inicial, con valores de CP inferiores al 6%, resultados similares a los reportados por Masson *et al.* (1997).

Tabla 23. **Composición inicial de la fracción polar en AC y AGAO (%).**

	PTG	DTG	TGOx	DG	AGL
AC	0,1 ± 0,04	0,6 ± 0,23	1,4 ± 0,20	1,6 ± 0,40	0,4 ± 0,04
AGAO	0,1 ± 0,03	0,5 ± 0,22	1,8 ± 0,43	2,8 ± 0,16	0,9 ± 0,22

AC: aceite de canola; AGAO; aceite girasol alto oleico; PTG: polímeros de triglicéridos; DTG: dímeros de triglicéridos; TGOx: triglicéridos oxidados; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres.

En la Tabla 24 se presenta el contenido de la fracción polar a tiempo inicial y final, agrupadas por el tipo de deterioro en AC y AGAO, sin y con la adición de HAO o HAP. Los resultados mostraron un aumento de la fracción polar en todos los casos a las 56 h de fritura (día 7), con respecto a los valores iniciales. Se encontró que el deterioro térmico y oxidativo fue más importante que el hidrolítico.

Tabla 24. Composición inicial y final de la fracción polar en los distintos sistemas estudiados (%)

Sistema/Tpo (h)	Deterioro térmico (PTG+DTG)		Deterioro oxidativo (TGOx)		Deterioro hidrolítico (DG+AGL)	
	0	56	0	56	0	56
	AC control	0,7	20,6	1,4	9,8	2,0
AC+HAO	0,7	13,2	1,4	7,7	2,0	4,6
AC+HAP	0,7	21,7	1,4	11,0	2,0	3,3
AGAO control	0,7	17,0	2,1	8,9	3,6	4,5
AGAO+ HAO	0,7	12,8	2,1	7,5	3,6	5,3
AGAO+ HAP	0,7	19,0	2,1	11,0	3,6	3,7

PTG: polímeros de triglicéridos; DTG: dímeros de triglicéridos; TGOx: triglicéridos oxidados; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres, AC: aceite de canola; AC+HAO: aceite de canola adicionado con extracto hidroalcohólico de hojas de olivo; AC+HAP: aceite de canola adicionado con extracto hidroalcohólico de hojas de palto; AGAO: aceite girasol alto oleico; AGAO+HAO: aceite girasol alto oleico adicionado con extracto hidroalcohólico de hojas de olivo; AGAO+HAP: aceite girasol alto oleico adicionado con extracto hidroalcohólico de hojas de palto.

Estudios previos de fritura en materias grasas de distinto grado de insaturación realizados en condiciones bien controladas, similares a las utilizadas en este estudio, demostraron que la alteración hidrolítica fue la de menor importancia cuantitativa, a pesar del elevado grado de humedad de la papa (Sébédio *et al.*, 1990; Pérez-Camino *et al.*, 1991; Arroyo *et al.*, 1992; Dobarganes *et al.*, 1993 y; Arroyo, 1995; Masson *et al.*, 1997). Con respecto al predominio de las especies de degradación térmica encontradas en este estudio, éste coincide con la evolución que se esperaría conforme la degradación progresa en cualquier proceso de polimerización, formación de dímeros y polímeros de peso molecular más elevado. Otros autores también han reportado esta tendencia en aceites empleados como medio de fritura (Arroyo *et al.*, 1992; Masson *et al.*, 1997).

En las Figuras 14 y 15 se muestra el contenido de la fracción polar a las 56 h de fritura (día 7), en los aceites de canola y girasol alto oleico, respectivamente, sin y con la adición de HAO o HAP.

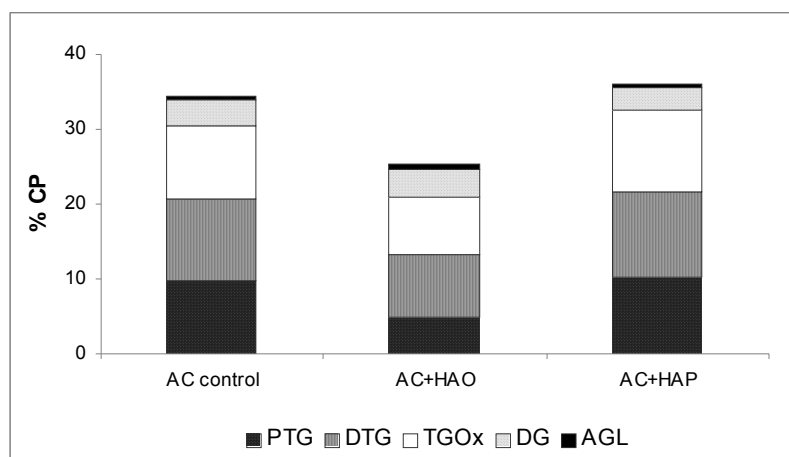


Figura 14. Contenido de la fracción polar en los sistemas AC, AC+HAO y AC+HAP, a las 56 h de fritura (día 7)

PTG: polímeros de triglicéridos; DTG: dímeros de triglicéridos; TGOx: triglicéridos oxidados; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres.

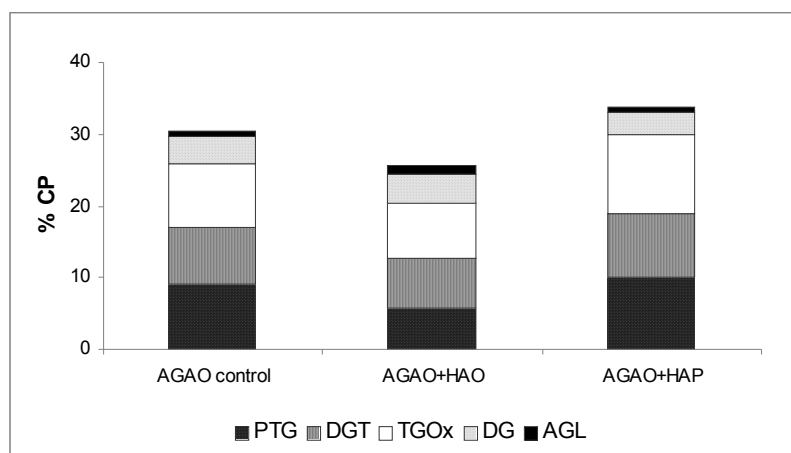


Figura 15. Contenido de la fracción polar en los sistemas AGAO, AGAO+HAO y AGAO+HAP, en el día 7 de fritura

PTG: polímeros de triglicéridos; DGT: dímeros de triglicéridos; TGOx: triglicéridos oxidados; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres

La adición de HAO en una concentración de 600 mg EAC/Kg a AC y AGAO mostró un efecto antipolimerizante, retardando la formación de polímeros con respecto a la adición de HAP y a los controles. Este comportamiento puede ser atribuido a la presencia de polifenoles, ya sea por un efecto directo o por regeneración de los tocoferoles presentes en el aceite (Houhoula *et al.*, 2003). No se observó un efecto similar con la adición del extracto de hojas de palto, aún cuando este también contiene polifenoles, sugiriendo que la estructura del polifenol es la que tiene importancia en la protección de la degradación de un aceite. Un efecto antipolimerizante también se observó en estudios realizados en aceites calentados a altas temperaturas adicionados con tocoferoles y extractos de rosa mosqueta (Robert *et al.*, 2006).

Proyecciones

- Los estudios futuros deberían estar relacionados principalmente con estudios de estructura de polifenoles-reactividad en matrices lipídicas in “bulk”.
- La estandarización de metodologías en cuanto a método de extracción que haga comparable diferentes estudios para una misma materia prima.
- El estudio de nuevas fuentes de antioxidantes naturales con aplicabilidad en matrices lipídicas.

CONCLUSIONES

1-. Los extractos hidroalcohólicos de hojas de olivo o palto, especialmente el primero, mostraron un contenido de polifenoles totales y una actividad antioxidante mayor con respecto al jugo obtenido por prensado, extracción supercrítica y oleorresinas de ambas hojas estudiadas ($p < 0,05$). El perfil de polifenoles observado en cada extracto fue diferente, atribuyéndose a variables del proceso de elaboración de los extractos así como a la especie de hoja, su pre-tratamiento y el método de extracción utilizado.

2-. La acción antioxidante/pro-oxidante de los extractos HAO, HAP, EFSO, EFSP, JO y JP en la estabilidad termoxidativa de los aceites estudiados, evaluada por el tiempo de inducción depende de:

- Insaturación del aceite: los extractos en los aceites más monoinsaturados muestran un mayor efecto antioxidante
- Método de elaboración del extracto (pre-tratamiento de las hojas y método de extracción), que afectan principalmente el perfil de polifenoles y la co-extracción de otros componentes presentes en el extracto.
- Concentración de polifenoles en el extracto.
- Interacción tocoferoles –polifenoles.

3-. Los aceites AC y AGAO sometidos a fritura de papas french, sin y con la adición de HAO y HAP (600 mg EAC/Kg), mostraron que el HAO disminuyó la formación de compuestos polares y presentó un efecto antipolimerizante con respecto al control ($p < 0,05$). Por otro lado, tanto el HAO como el HAP aumentaron la permanencia de tocoferoles, siendo mayor el efecto en HAO. Este comportamiento sugiere una regeneración de los tocoferoles por los polifenoles de los extractos, dependiente de las características estructurales de los polifenoles de cada extracto.

BIBLIOGRAFIA

Adeboye, J.O., Fajonyomi, M.O., Makinde, J.M., Taiwo, O.B. 1999. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea Americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. *Fitoterapia* **70**, 15-20.

Adeyemi, O., Okpo, S.O., Ogunti, O.O. 2002. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia* **73**, 375-380.

Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., Ülkü, S. 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology* **62**, 342-348.

Altunkaya, A., Becker, L., Gökmen, V., Skibsted, L. 2009. Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chemistry* **115**, 163-168.

Antia, B.S., Okokon, J.E., Okon, P.A. 2005. Hypoglycaemic activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* Mill. *Indian Journal of Pharmacology* **37**, 325-326.

Antoshina, S., Selishcheva, A., Sorokoumova, G.M., Utkina, E.A., Degtyarev, N.S., Shvets, V.I. 2005. Effects of flavonoides of various structures on peroxidation of neutral lipids of animal origin. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**, 18-23.

American Oil Chemists Society. 1993. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society, 3 th ed, AOCS, Champaign, Illinois

Aron, P., Kennedy, J. 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**, 79-104.

Arroyo, R., Cuesta, C.J., Garrido-Polonio, S., López-Varela, S., Sanchez- Muniz, F. 1992. High performance size exclusion chromatographic studies on polar components formed in sunflower oil used for frying. *Journal of the American Oil Chemists` Society* **69**, 557-663.

Arroyo, R., Cuesta, C.J., Sanchez-Montero, M., Sanchez- Muniz, F. 1995. High performance size exclusion chromatography of palm olein used for frying. *European Journal of Lipid Science and Technology* **97**, 292-296.

ASAGA, A&G .2000. Libro 10º aniversario, Recopilación de Artículos Técnicos 1990/2000, Amalevi, Rosario-Sta Fé, Argentina.

Barclay, L., Vinqvist, M.R. 2003. Phenols as antioxidants. In Z. Rappoport (edit), The chemistry of phenols. pp: 839-908. Nva York, USA.

Barrera-Arellano, D., Ruiz, Mendez, V., Velasco, J., Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, C. 2002. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperature in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 1696-1702.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C 1995. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* **28**, 25-30.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.

Becker, E., Ntouma, G., Skibsted, L. 2007. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid system of increasing structural organization. *Food Chemistry* **103**, 1288-1296.

Belitz, H.D. 1997. Lípidos. In H.D. Belitz, W. Grosh (eds), Química de Alimentos. pp: 175-267. Acribia, Zaragoza, España.

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Río, J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* **68**, 457-462.

Brune, W., Van Lelyveld, L.J. 1982. Biochemical Comparison of Leaves of Five Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivars and its Possible Association with Susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* Rootrot. *Phytopathology* **104**, 243-254.

Cillard, I, Cillard, P., Cormier, M. (1980) Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of α -tocopherol. *Journal of the American Oil Chemists` Society* **57**, 255-261.

Codex Standard 210. 1999. Codex Standard for named vegetable oils, pp:16.

Cheftel, J.C. 1992. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. pp 265-269. Acribia, Zaragoza, España.

Chen, J., Ho, Ch. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 2374-2378.

Che Man, Y., Jaswir, I. 2000. Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying, *Food Chemistry* **69**, 301-307.

Chile Oliva 2010. Disponible en http://www.chileoliva.cl/estadisticas_noticias.php. Leído el 25 junio 2010.

Chiou, A., Salta, E., Kalogeropoulos, A., Mylona, A., Ntalia, A., I., Andrikopoulos, N. 2007. Retention and distribution of polyphenols after pan-frying of French fries in oils enriched with olive leaf extract. *Journal of Food Science* **72**, S574-S584.

Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S. 1993. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry* **34**, 1291-1299.

De Almeida, A.P., Miranda, M., Simoni, I.C., Wigg, M., Lagrota, M. 1998. Flavonol Monoglycosides Isolated from the Antiviral Fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) Leaf Infusion. *Phytotherapy Research* **12**, 562-567.

De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Procopio, A., Raffaelli, A., Sindona, G. 1997. Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 533-541.

De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5331-5337.

Del Valle, J.M., Aguilera, J.M. 2002. Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de los alimentos. *Food Science and Technology International* **8**, 1-24.

Ding, H., Chin, Y.W., Kinghorn, A.D., D'Ambrosio, S. M. 2007. Seminars in Cancer Biology **17**, 386-394.

Dobarganes, M.C., Perez-Camino, M.C., Marquez-Ruiz, G (1988) High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. *Fat Science Technology*, **90**, 308-311.

Dobarganes, M.C., Márquez-Ruiz, G.M., Pérez-Camino, C. 1993. Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 678-81.

Etkor, M., Adepoju, G., Epoyun, A. 2006. Protective effect of the methanolic leaf extract of *Persea americana* (avocado) against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmacology* **2**, 416-420.

Farag, R., Baroty, G., Basuny, A. 2003. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology* **38**, 81-87.

Farag, R., Mahmoud, E., Basuny, A. 2007. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology* **42**, 107-115.

Fennema, O. 1993. Química de Alimentos. pp 29-79 y 157-273. Acribia, Zaragoza, España.

Frankel, E., Huang, S.W., Aeschbach, R., Prior, E. 1996. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 131-135.

Fredrickson, W.R., F and S Group, Inc., 2000, Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves, U.S. Patent 6,117,884. En *Olive Oils (Minor Constituents and Health)* 2009, editado por Dimitrios Boskou, CRC Press, Taylor & Francis Group, pp 35.

Fukuda, T., Nagata, M., Osawa, T., Namiki, M. 1986. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame oil, and the effect of using the oil for frying. *Agricultural Biological Chemistry*, **50**, 857-862.

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

Garcia-Mesa, J., Luque de Castro, M., Valchrrel, M. 1993 Coupled Robot-Flow injection analysis system for fully automated determination of total polyphenols in olive oil. *Analytical Chemistry* **65**, 3540-3542.

Giao, M., González-Sanjosé, M., Rivero-Pérez, M., Pereira, C., Pintado, M., Malcata, X. 2007. Infusions of portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 2638-2647.

Giron, L.M., Freire, V., Alonzo, A., Caceres, A. 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Ethnopharmacology* **34**, 173-187.

González, K. 2004. Estudio del efecto de tocoles: tocoferoles, tocotrienoles y plastocromanol-8 en la estabilidad térmica del aceite de canola. Tesis de Magíster en Ciencias de los Alimentos, Fac. de Cs. Qcas y Farmacéuticas. Universidad de Chile, Santiago.

Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M., Korczak, J. 2006. Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technolgy* **108**, 351-362.

Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R.L. 2003. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7513-7521.

Guinda, A., Lanzón, A., Ríos, J., Albi, T. 2002. Aislamiento y cuantificación de los componentes de la hoja de olivo: extracto de hexano. *Grasas y Aceites* **53**, 419-422.

Gupta, M.P., Arias, T.D., Correa, M., Lamba, S. 1979. Ethnopharmacognostic observations on Panama medicinal plants. *Journal Crude Drug Research* **17**, 115-130.

Gupta, M. 2004. The Effect of oil Processing on Frying oil Stability. In M. Gupta, K. Warner y P. White (eds), *Frying Technology and Practices*. pp 76-90. AOCS Press Champaign, Illinois, USA.

Halliwell, B. 1995. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* **49**, 1341-1348.

Harborne J.B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In J.B. Harborne (edit). *Methods in plant biochemistry*, vol I, Academic Press, London.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.

Ho, C.T., Chen, C.W., Wanasundara, F., Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants from tea. In F. Shahidi (edit), *Natural Antioxidants: Chemistry, Health effects, and Applications*. pp 213-223. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

Houhoula, D., Oreupoulou, V., Tzia, C.J. 2003. Antioxidant efficiency of oregano during frying and storage of potato chips. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1499-1503.

Hrazdina, G., Marx, G., Hoch, H. 1982. Distribution of secondary plant metabolites and their biosynthetic enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiology* **70**, 745-748

Ito, N., Hiroze, M., Fukushima, G. Tauda, H., Shira, T., Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants; their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chemistry Toxicology* **24**, 1071-1081.

Iqbal S., Bhangar, M. 2007. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry* **100**, 246-254.

IUPAC. 2000. The determination of polar compounds, polymerised and oxidised triglycerols and diacylglycerols in oils and fats. *Pure and Applied Chemistry* **72**, 1563-1575.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 218-221.

Japón-Luján, R., Luque de Castro, M. 2008. Liquid-Liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2505-2511.

Jia, Z., Zhou, B., Yang, L., Wu, L., Liu, Z. 1998. Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2*, 911-915.

- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., Kiritsakis, A. 2010. Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **87**, 369-376.
- Lalas, S., Dourtoglou, V. 2003. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **80**, 579-583.
- Lampi, A., Kalman-Eldin, A. 1998. Effect α and γ tocopherol in thermal polymerization of purified High-oleic sunflower triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **75**, 1699-1703.
- Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A., Valcárcel, M. 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta* **46**, 1123-1130.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P., Chang, Y., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical research Communications* **307**, 1029-1037.
- Le Tour, B., Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* **31**, 1173-1178.
- Liebler, D.C., Baker, P.F., Kaysen, K.L. 1990. Oxidation of vitamin E: evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reaction of the tocopheroxyl radical. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **11**, 6995-2000.
- López-Varela, S., Sánchez-Muniz, F.J., Cuesta, C. 1995. Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying. *Food and Chemical Toxicology* **33**, 181-189.
- Luque de Castro, M., Japón-Luján, R. 2006. State of the art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 501-509.
- Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognmiglio, A., Galetti, P., Chiariello, M., Zappia V. 2004. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury by ischemia and reperfusion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **15**, 461-468.
- Maestri, D.M., Zygadlo, J.A., Lamarque, A.L., Labuckas, D.O., Guzman, C.A. 1996. Effect of some essential oils on oxidative stability of peanut oil. *Grasas y Aceites*, **47**, 397-400.
- Maestro-Durán, R., Borja-Padilla, R. 1993. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites* **44**, 101-106.

Marinova E., Yanishlieva, E. 1992. Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **60**, 313-318.

Marinova, E., Toneva, A., Yanishlieva, N. 2008. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry* **106**, 628–633.

Markin, D., Duek, C., Berdicevsky, I. 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses* **46**, 132-136.

Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C. 1996. Nutritional and Physiological Effects of used Frying Fats, in Deep Frying. In E.G. Perkins y M.C Erickson (eds), Nutritional and Practical Applications. pp 160-182. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

Márquez-Ruiz, G., Martín-Polvillo, M., Jorge, N., Ruiz-Mendez, M.V., Dobarganes, M.C. 1999. Influence of used frying oil quality and natural tocopherol content on oxidative stability of fried potatoes. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **76**, 421-425.

Martín-Polvillo, M.V., Márquez-Ruiz, G., Jorge, N., Ruiz-Mendez, M.V., Dobarganes, M.C. 1996 Evolution of oxidation during storage of crisps and french fries prepared with sunflower oil and high oleic sunflower. *Grasas y Aceites* **47**, 48-53.

Martínez de la Cuesta, P.J., Ruz-Martínez, E., Galdeano, Ch. 1995. Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales en presencia de alfa-tocoferol. *Grasas y Aceites* **46**, 349-353.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* **6**, 271-278.

Masson, L., Robert, P., Romero, N., Izaurieta, M., Valenzuela, S., Ortíz, J., Dobarganes, M.C. 1997. Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos, *Grasas y aceites* **48**, 273-281.

Masson, L; Mella, M. 1985. Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile. Composición en ácidos grasos. Fac. de Cs. Qcas y Farmacéuticas, Univ. de Chile, Santiago.

Menendez, J., Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., Garcia-Villalba, R., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A. 2007. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*. **7**, 80.

Merril, L., Pike, O., Ogden, L., Dunn, M. 2008. Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **85**: 771-776.

- Mohd Nor, F., Mohamed, S., Idris, N., Ismail, R. 2009. Antioxidative properties of *Curcuma longa* leaf extract in accelerated oxidation and deep frying studies. *Journal of the American Oil Chemists` Society* **86**, 141-147.
- Moore, J.P., Westall, K., Ravenscroft, N., Farrant, J., Lindsey G., Brandt, W. 2005. The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3, 4, 5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochemical Journal* **385**, 301–308.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. 2004. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Food Science* **69**, 7-10.
- Naczki, M., Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetable: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 1523-1542.
- Navas, P., Carrasquero-Durán, A., Flores, I. 2006. Effect of black tea, garlic and onion on corn oil stability and fatty acid composition under accelerated oxidation. *International Journal of Food Science and Technology* **41**, 243-247.
- Nawar, W.W. 1993. Lípidos. In O. Fenemma (edit), *Química de los Alimentos*. pp. 230-239. Acribia, Zaragoza, España.
- Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela, A. (1993) Flavonoids as stabilizers in fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists` Society*, **70**, 773-778.
- ODEPA 2007. Mercado del aceite de oliva 16/02/2007. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr?idcla=2&idcat=4&idn=1909>. Leído el 31 de octubre 2007.
- ODEPA 2010. <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2206.pdf>. Leído el 1 de junio 2010.
- Ojewole, J., Amabeokn, G. 2006. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (avocado) Leaf aqueous extract in mice. *Phytotherapy Research* **20**, 696-700.
- Osman, H., Nasarudin, R., Lee S.L. 2004. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry*, **86**, 41-46
- Owolabi, M.A., Jaja, S.I., Coker, H. 2005. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea Americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia* **76**, 567-573.
- Owolabi, M.A., Cocker, H. 2007. Flavonoid metabolites in urine after oral administration of aqueous extract of *Persea Americana* to rats. *Journal of Nutritional Medicine* **61**, 200-204.

Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis E.P., Soleas, G., Goldberg, D.M. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* **235**, 207-219.

Parfitt, J., Rubba, P., Bolton, C., Marotta, G., Hartog, M., Mancini, M. 1994. A comparison of antioxidant status and free radical peroxidation of plasma lipoproteins in healthy young persons from Naples and Bristol. *European Heart Journal*, **15**, 871-876.

Paiva-Martins, F., Correia, R., Felix, S., Ferreira, P., Gordon, M. 2007. Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4139–4143.

Pazos, M., Andersen, M., Medina, I., Skibsted, L. 2007. Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocopheroxyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3661-3666.

Pedrielli, P., Skibsted, L. 2002. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50**, 7138-7144.

Pekkarinen, S., Heinonen, M., Hopia, A. 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 499-506.

Peña-Neira, A., Cáceres, A., Pastenes, C. 2007. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo valley (Chile): Effect of Clusters thinning and vineyard yield. *Food Science Technology International* **13**, 153-158.

Pérez-Camino, M. C., Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez M.V., Dobarganes M.C. 1991. Lipid changes during the frying of frozen prefried foods. *Journal of Food Science* **56**, 1644–1647.

Pereira, T.A., Das, N.P. 1990. The effects of flavonoids on the thermal autoxidation of palm oil and other vegetable oils determined by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, **165**, 129-137.

Prior, R., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1367-1380.

Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V. 2006. Factors affecting the contents of iridoid Oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 434-440.

Reglamento Sanitario de los Alimentos. 1996. Decreto Supremo N° 977/996, Ministerio de Salud.

Rehman, Z., Habib, F., Shah, W. 2004. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. *Food Chemistry* **85**, 215-220.

Robert, P., Romero, N., Ortíz, J., Massson, L., Barrera-Arellano, D. 2006. Effect of Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) extract on the performance of chilean hazelnut oil (*Gevuina avellana* Mol.) at high temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**, 1-5.

Romani, A., Milinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F., Cimato, A. 1999. Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 964-967.

Romero, N., Robert, P., Masson, L., Ortiz, J., González, K., Tapia, K., Dobarganes, C. 2006. Effect of α -tocopherol, α -tocotrienol and Rosa mosqueta shell extract on the performance of antioxidant-stripped canola oil (*Brassica sp.*) at high temperature. *Food Chemistry* **104**, 383-389.

Russin, T.A., Boye, J.I., Pham, H.M., Arcand, Y. 2006. Antioxidant properties of genistein in a model edible oil system. *Journal of Food Science* **71**, C395-399.

Ryan, D., Antolovic, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* **92**, 147-176.

Salta, N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N. 2007. Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extracts. *Food Science Technology International* **13**, 413-421.

Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., Balansard, G. 2001. Rapid High-performance liquid chromatography análisis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 618-621.

Scheuermann, E., Cea, M. 2002. Estudio de la estabilidad de aceite comestible de girasol coloreado con pigmentos clorofílicos y con adición de oleoresina de orégano (*Origanum vulgare* L.) durante el almacenamiento en oscuridad. *Grasas y aceites* **53**, 289-297.

Sébédio, J.L., Grandgirard, A. 1989. Cyclic Fatty Acids: Natural sources, formation during heat treatment, synthesis and biological properties. *Progress Lipid Research* **28**, 303-336.

Sébédio, J.L., Bonpunt, A., Grandgirard, A., Prevost, J. 1990. Deep fat frying of frozen prefried foods: Influence of the amount of linolenic acid in the frying medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1862-1867.

Shyamala B.N, Gupta S., Lakshmi J., Prakash, J. 2005. Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. *Innovative Foods Science and Emerging Technologies* **6**, 239-245.

- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A., Boas, V. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science Technology International* **12**, 385-396.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture* **16**, 144-158.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H. 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 10134-1023.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* **579**, 200-213.
- Su, Y.-L., Xu, J.-Z., Ng, Ch.H., Leung, L., Huang, Y., Chen, Z.-Y. 2004. Antioxidant activity of tea theaflavins and methylated catechins in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **81**, 269-274.
- Syed Haris, O. 2010. Oleuropein in Olive and its pharmacological effects *Scientia Pharmaceutica*. 78, 133–154
- Tabera, J., Guinda, A., Ruiz-Rodriguez, F., Señorans, E., Ibañez, T., Albi, G., Reglero, J. 2004. Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4774–4779.
- Terasawa, N., Sakakibara, M., Murata, M. 2006. Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. *Food Science and Technology Research* **12**, 55-58.
- Thiyam, U., Stöckmann, H., Scchwarz, K. 2006 Antioxidant activity of rapeseed phenolics and their interactions with tocopherols during lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **83**, 523-528.
- Thompson, D., Moldeus, P. 1988 Citotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochemistry Pharmacology* **37**, 2201-2207.
- Tian, L.L., White, P.J. 1994. Antipolymerization activity of oat extract in soybean and cottonseed oils under frying conditions. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **71**, 1047-1078-
- Torres, A., Mau-Lastovicks, T., Rezaaiyan, R. 1987. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**, 921–925.
- Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. 2007 Defining the role of flavonoid structure on cottonseed oil stabilization: study of A-and C-ring substitution. *Journal of the American Oil Chemists`Society*, **84**, 129-136.

- Valenzuela, A., Nieto, S. 1996. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites* **47**, 186-196.
- Visioli, F., Poli, A., Galli, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*. **22**, 65–75.
- Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C. 1998. Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Science*. **62**, 541–546.
- Wanasundara, U., Shahidi, F. 1994. Stabilization of canola oil with flavonoides. *Food Chemistry* **50**, 393-396.
- Wanasundara, U., Shahidi, F. 1996. Stabilization of seal blubber and menhaden oils with green tea catechins. *Journal of the American Oil Chemists`Society* **73**, 1183-1190.
- Wanasundara U.N., Shahidi F. 1998 (a). Stabilization of marine oils with flavonoids. *Journal of Lipids*, **5**, 183-186.
- Wanasundara U.N., Shahidi F. 1998 (b). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, **63**, 335-342.
- Warner, K. 2004. Chemical and Physical Reactions in Oil During Frying. In M. Gupta, K. Warner y P. White (eds), *Frying Technology and Practices*. pp 16-28. AOCS Press Champaign, Illinois, USA.
- Warner, K., Laszlo, J.A. 2005. Addition of ferulic acid, ethyl ferulate, and feruloylated monoacyl and diacylglycerols to salad oils and frying oils. *Journal of the American Oil Chemists`Society*, **82**, 647-652.
- Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. *The medicinal plants and poisonous plants of Southern and Eastern Africa*, pp 1457. E. and S. Livingstone, Ltda, Edinburgh-London, England.
- Yamamoto, Y. 2001. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatology Science* **27**, 1, 1-4.
- Yanishlieva, N., Marinova E. 2001. Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* **103**, 752-767.
- Yanishlieva, N. 2004. Inhibición de la oxidación. In N. Yanishlieva, J. Pokorny y M. Gordon (eds), *Antioxidantes de los Alimentos, Aplicaciones prácticas*. pp 33-38. Acribia, Zaragoza, España.
- Yanishlieva, N., Marinova, E.M. 1996. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, **203**, 220-223.
- Zhou, B., Jia, Z., Chen, Z., Yang, L., Wu, L., Liu, Z. 2000. Synergistic antioxidant effect of green tea polyphenols with α -tocopherol on free radical initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Journal Chemical Society, Perkin Transaction 2*, 785-791.

Zhou, B., Wu, L., Yang, L., Liu, Z. 2005. Evidence for α -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radical Biology and Medicine*, **38**, 78-84.

ANEXOS

Anexo 1.

Participación a Congresos:

- Estabilidad oxidativa de aceites de distinta insaturación adicionados de extractos de hojas de olivo (*Olea europaea*) obtenidos por distintos métodos. Trabajo aceptado en CIBIA VII; Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Bogotá, Colombia, Abril, 2009.
- Efecto de extractos de hojas de palto (*Persea americana*) en la estabilidad oxidativa de aceites de distinta insaturación. Trabajo aceptado en XII Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Arg, Nov, 2009.
- Efecto de la adición de un extracto hidroalcohólico de hojas de olivo (*Olea europaea*, cv. arbequina) o palto (*Persea americana*, cv. Hass), en la oxidación térmica de aceite de canola a alta temperatura. Trabajo aceptado en V Simpósio Internacional de Aceites y Grasas: Tendencias e Innovaciones en Tecnología, Campinas, Sao Paulo, Brasil, Sept, 2010.

Publicaciones

Jiménez P, Masson L., Barriga A., Chávez J., Robert P. (2010) Oxidative stability of different unsaturation oils enriched with olive leaves extracts obtained by pressing, supercritical-CO₂, and solvent extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology* (Artículo aceptado)

Anexo 2. Especificaciones equipo extractor supercrítico Applied Separations y Evolución de extracción de polifenoles de hojas de olivo o palto, respectivamente.

El extractor supercrítico utilizado (Speed SFE unit, modelo 7071, Applied Separations, Allentown PA) consiste en un enfriador (Julabo F200 con refrigerante R134a. Seelbach, Alemania), una bomba de alta presión para CO₂, una bomba para ingresar el etanol (de desplazamiento positivo HPLC-Pumpe K-501), una cámara de calentamiento, un vaso de extracción, un regulador de presión, recipientes para recibir el extracto y un medidor de flujo de salida de CO₂.

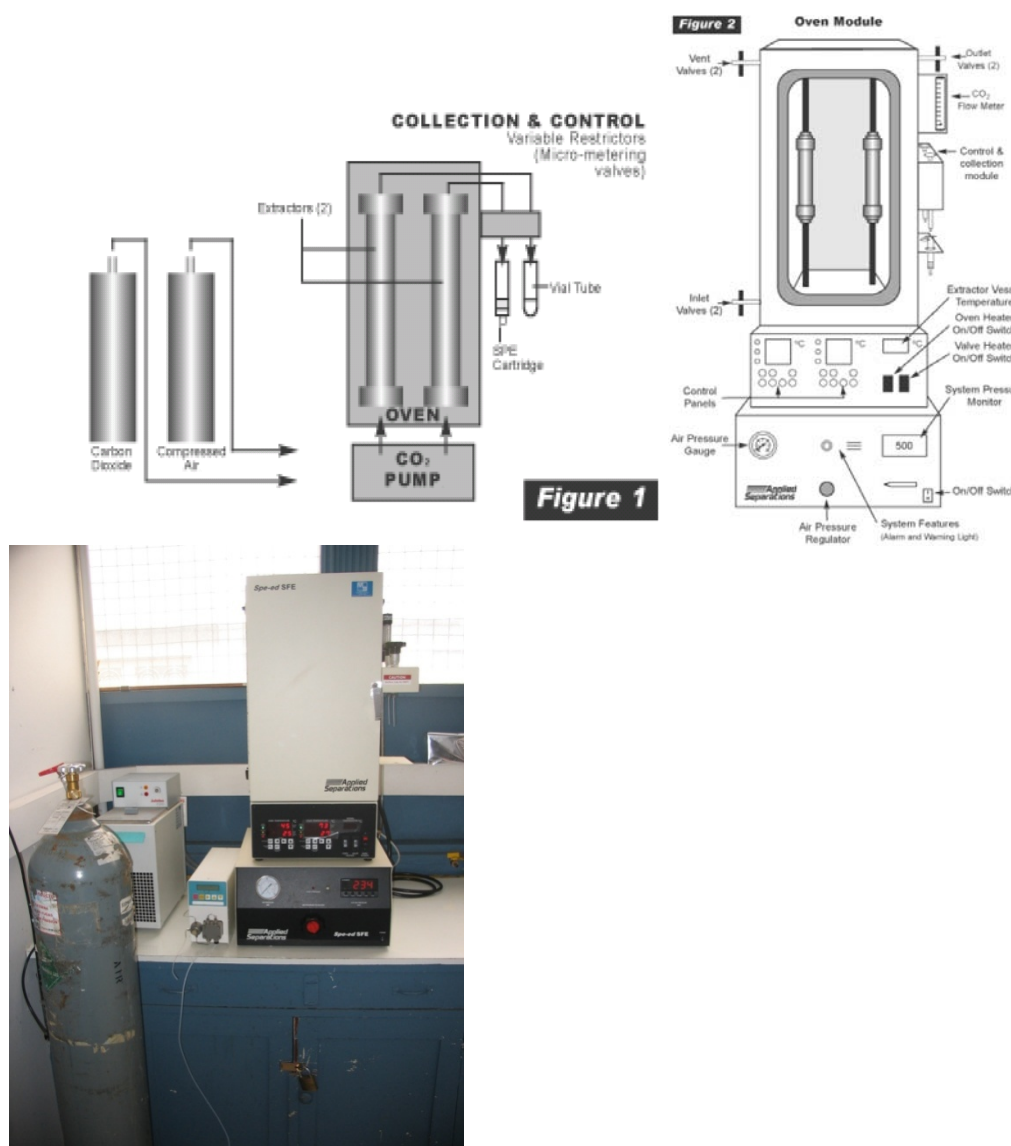


Figura 16. a) Esquema extractor supercrítico Applied Separations, b) Fotografía

Tabla 25. Evolución de extracción de polifenoles de hojas de olivo (cv. Arbequina)

Tiempo (hrs)	Peso fracción(g)	Absorbancia	Polifenoles $\mu\text{g/mL}$ EAC	Factor dilucion	Concentración μg EAC /mL	mg/mL	mg/g	Σ mg/g
0,5	0,2021	0,587	419,3	2	981,13	0,98	48,55	48,55
1,0	0,1438	0,767	547,9	1	547,86	0,55	38,10	86,65
1,5	0,0494	0,279	199,3	1	199,29	0,20	40,34	126,99
2,0	0,0355	0,243	173,6	1	173,57	0,17	48,89	175,88
2,5	0,0405	0,208	148,6	1	148,57	0,15	36,68	212,56
3,0	0,0326	0,208	148,6	1	148,57	0,15	45,57	258,14
3,5	0,0664	0,252	180,0	1	180,00	0,18	27,11	285,25
4,0	0,0424	0,237	169,3	1	169,29	0,17	39,93	325,17
4,5	0,0438	0,227	162,1	1	162,14	0,16	37,02	362,19
5,0	0,0878	0,206	147,1	1	147,14	0,15	16,76	378,95
			2295,7				378,95	

EAC: equivalentes ácido cafeico. Condiciones del ensayo: solvente: CO₂; cosolvente: etanol 5% (flujo 0,3mL/min); temperatura: 30°C; presión: 300bar; tiempo estático: 30 min y dinámico: 5 h.

Tabla 26. Evolución de extracción de polifenoles de hojas de palto (cv. Hass)

Tiempo (min)	Peso fracción(g)	Absorbancia	Polifenoles $\mu\text{g/mL}$ EAC	Factor dilución	Concentración μg EAC/mL	mg/mL	mg/g	Σ mg/g
1,0	0,5051	0,567	405,0	4	1502,55	1,50	29,75	29,75
2,0	0,1187	0,620	442,9	1	442,86	0,44	37,31	67,06
3,0	0,0568	0,387	276,4	1	276,43	0,28	48,67	115,72
4,0	0,0390	0,297	212,1	1	212,14	0,21	54,40	170,12
5,0	0,0254	0,198	141,4	1	141,43	0,14	55,68	225,80
8,0	0,0871	0,347	247,9	1	247,86	0,25	28,46	254,26
			1725,7				254,26	

EAC: equivalentes ácido cafeico. Condiciones del ensayo: solvente: CO₂; cosolvente: etanol 5%, (flujo 0,3mL/min); temperatura: 30°C; presión: 300bar; tiempo estático: 30 min y dinámico: 5 h

En las Figuras 17 (A y B), se presenta la influencia del tiempo de extracción de polifenoles de hojas de olivo y palto, respectivamente, por extracción supercrítica con CO₂.

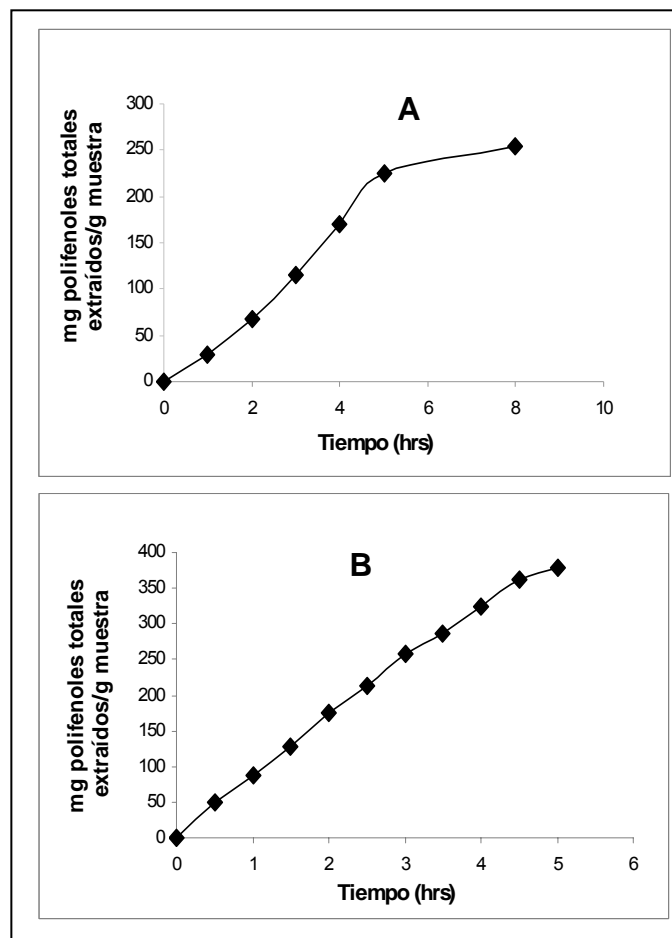


Figura 17. Influencia en el tiempo de extracción supercrítica de polifenoles (30°C, 300 bar y etanol 5% como cosolvente) de hojas de olivo (A) y palto (B).

Anexo 3. Determinación del contenido de polifenoles totales

Reactivos

1. Solución patrón de ácido cafeico (Sigma-Aldrich, USA).
2. Metanol p.a.
3. Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania).
4. Carbonato de sodio al 20%: Se pesó 200 g de carbonato de sodio anhidro y se disolvió en 800 mL de agua destilada hirviendo, se enfrió a temperatura ambiente. Luego se sembraron cristales de carbonato de sodio y después de 48 h se filtró sobre papel (Whatman N°1) y se aforó a 1000 mL con agua destilada.

Procedimiento.

En un matraz se agregó 0,1mL de extracto y 4,9 mL de agua destilada. Luego se agregó 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperó 3 min, se adicionó 1,7 mL de carbonato de sodio al 20% y se aforó en un matraz de 10 mL con agua destilada. Se agitó y se dejó reposar por 30 min. Luego se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (Unicam UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK) en una cubeta paso óptico de 1 cm.

El blanco estuvo compuesto por 5 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, 1,7 mL de carbonato de sodio al 20%, se aforó en un matraz de 10 mL con agua destilada.

Curva de calibración de estándar de ácido cafeico para cuantificación de polifenoles de los extractos de hoja de olivo y palto por método Folin-Ciocalteu

Tabla 27. Preparación de estándar de calibración desde solución madre de ácido cafeico

Vol (mL) sol ác. cafeico (5,25 mg/mL)	Concentración en 10 mL (µg/mL)	Absorbancia (nm)	Concentración polifenoles (µg/mL)
0,38	200	0,260-0,267	207,7 - 214,6
0,57	300	0,370-0,378	317,6 - 325,7
0,76	400	0,462-0,456	403,7 - 409,6
0,95	500	0,566-0,574	513,6 - 521,7
1,14	600	0,693-0,685	632,7 - 640,6

Se realizó una curva de calibración de ácido cafeico en duplicado (N=10). La absorbancia para cada concentración se obtuvo de la aplicación del método de Folin-Ciocalteu. A los datos de esta la tabla, se determinó una regresión lineal, obteniéndose la ecuación (figura 20):

$$Y = 0,001 X + 0,0523; \text{ con un } R^2 = 0,9965$$

Donde, Y= absorbancia medida a 725 nm y X= concentración de polifenoles totales expresada como µg equivalentes de ácido cafeico por mL de extracto (µg EAC/mL).

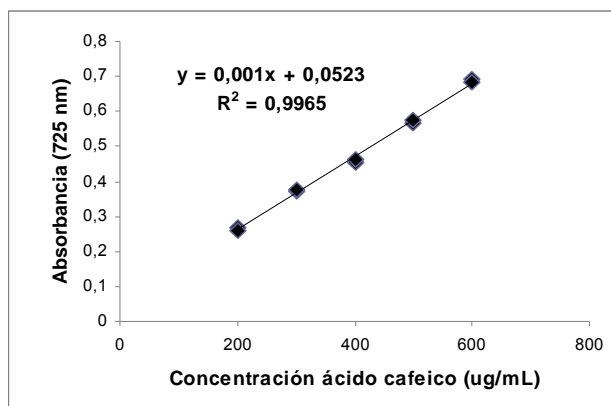


Figura 18. Curva de calibración de ácido cafeico

Para obtener los datos de la concentración de polifenoles en la muestra se reemplazaron los valores de la absorbancia en la ecuación de la recta dada por la curva estándar de ácido cafeico, de tal forma que el contenido de polifenoles totales se expresó como equivalentes de ácido cafeico (EAC).

Anexo 4. Determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH

Reactivos

1. Solución metanólica de radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH).
2. Metanol

Procedimiento:

Para determinar la capacidad antioxidante de los distintos extractos se preparó una solución metanólica de radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) de 20 mg/L. Se pesó 0,005 g de DPPH y se aforó en un matraz de 250 mL con metanol. Luego se esperó 30 min y se midió la absorbancia a 517 nm en cubetas de 1 cm, en un espectrofotómetro (UV/Vis ATI UNICAM, Cambridge, UK). La absorbancia del DPPH fue de 0,559.

Se prepararon además soluciones metanólicas del compuesto a ensayar a distintas concentraciones. Se mezcló y se esperó 30 min, transcurrido este tiempo se leyó en espectrofotómetro a 517 nm en cubetas de 1 cm.

En las tablas 28 y 30, se muestran los procedimientos experimentales para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de olivo y palto, y sus respectivos blancos. En las tablas 29 y 31, se muestran los porcentajes de decoloración del DPPH de los extractos de hojas de olivo y palto, respectivamente.

Tabla 28. Determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH para distintos extractos de hojas de olivo

Extracto hojas de olivo		Alícuota (μ l)			
HAO	5	10	30	50	70
JO	70	130	200	250	300
EFSO	700	1000	1300	1600	2000
Alícuotas se aforaron con metanol a un volumen de 10 mL					
Control					
Metanol	0,1				
DPPH	3,9				
Muestra					
Alícuota (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DPPH (mL)	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Blanco					
Alícuota (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Metanol (mL)	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Absorbancia (HAO)	0,480	0,452	0,249	0,164	0,069
Conc. polifenoles (mg/mL)	0,003	0,006	0,017	0,029	0,040
Absorbancia (JO)	0,455	0,381	0,321	0,241	0,179
Conc. polifenoles (mg/mL)	0,030	0,056	0,086	0,107	0,129
Absorbancia (EFSO)	0,343	0,296	0,191	0,137	0,099
Conc. polifenoles (mg/mL)	0,118	0,168	0,218	0,269	0,336

HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂.

Tabla 29. Porcentaje de decoloración de DPPH a distintas concentraciones de polifenoles, según tipo de extracto de hojas de olivo (cv. Arbequina)

HAO		JO		EFSO	
(mg/mL)	DPPH (%) decoloración X \pm DE	(mg/mL)	DPPH (%) decoloración X \pm DE	(mg/mL)	DPPH (%) decoloración X \pm DE
0,0029	8,8 \pm 0,95	0,030	15,6 \pm 0,40	0,118	33,9 \pm 0,68
0,0057	14,1 \pm 0,62	0,056	25,6 \pm 0,55	0,168	42,3 \pm 0,55
0,0171	53,6 \pm 0,79	0,086	40,5 \pm 0,13	0,218	63,1 \pm 0,55
0,0285	69,5 \pm 0,92	0,107	52,7 \pm 0,69	0,269	73,4 \pm 0,55
0,0399	87,1 \pm 0,79	0,129	64,9 \pm 0,42	0,336	80,9 \pm 0,28

X: promedio; DE: desviación estándar; HAO: extracto hidroalcohólico de olivo; JO: jugo de hoja de olivo obtenido por prensado; EFSO: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂.

Tabla 30. Determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH para distintos extractos de hojas de palto

Extracto hojas de palto	Alícuota (μ l)				
	100	150	200	300	350
HAP	100	150	200	300	350
JP	500	800	1000	1200	1500
SFEP	2000	3500	5000	6000	7000

Alícuotas se aforaron con metanol hasta un volumen de 10 ml

Control					
Metanol	0,1				
DPPH	3,9				
Muestra					
Alícuota (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DPPH (mL)	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Blanco					
Alícuota (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Metanol (mL)	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Absorbancia (HAP)	0,370	0,316	0,263	0,146	0,123
Conc. polifenoles (mg/mL)	0,0239	0,0359	0,0478	0,072	0,0837
Absorbancia (JP)	0,345	0,313	0,257	0,195	0,173
Conc. polifenoles (mg/mL)	0,122	0,195	0,244	0,293	0,366
Absorbancia (EFSP)	0,440	0,363	0,287	0,245	0,218
Conc. polifenoles (mg/mL)	0,196	0,343	0,490	0,588	0,686

HAP: extracto hidroalcohólico de palto; JP: jugo de hoja de palto obtenido por prensado; EFSP: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂

Tabla 31. Porcentaje de decoloración de DPPH a distintas concentraciones de polifenoles, según tipo de extracto de hojas de palto

HAP		JP		EFSP	
(mg/mL)	DPPH (%) decoloración X±DE	(mg/mL)	DPPH (%) decoloración X±DE	(mg/mL)	DPPH (%) decoloración X±DE
0,024	28,25 ± 0,41	0,122	36,34 ± 0,65	0,196	17,76 ± 0,53
0,036	38,74 ± 0,41	0,195	42,25 ± 0,52	0,343	32,24 ± 0,66
0,048	49,03 ± 0,68	0,244	52,68 ± 0,65	0,490	46,45 ± 0,40
0,072	71,65 ± 0,82	0,293	64,02 ± 0,52	0,588	54,30 ± 0,13
0,084	76,12 ± 0,27	0,366	68,17 ± 0,65	0,686	58,97 ± 0,13

X: promedio; DE: desviación estándar; HAP: extracto hidroalcohólico de palto; JP: jugo de hoja de palto obtenido por prensado; EFSP: extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂.

Tabla 32. Ecuaciones de la recta para la actividad antioxidante de extractos de hojas de olivo y palto

Tipo de extracto	Ecuación de la recta	R ²
HAO	y= 1683x + 5,8663	0,9674
JO	y= 405,44x -1,6652	0,9937
EFSO	y= 170,03x + 8,3729	0,9563
HAP	y= 374,49x + 8,9998	0,9934
JP	y= 116,16x + 17,108	0,9553
EFSP	y= 69,605x + 1,5929	0,9874

HA: extracto hidroalcohólico de olivo o palto, respectivamente; J: jugo de hoja de olivo o palto, respectivamente; EFS: extracto por extracción supercrítica-CO₂ de olivo o palto, respectivamente. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05), con respecto a la especie de hoja.

Anexo 5. Extracción de polifenoles de los extractos de hojas de olivo o palto.Reactivos

1. Eter etílico p.a.
2. Acetato de etilo p.a.
3. Sulfato de sodio
4. Metanol HPLC

Procedimiento

A 25 mL de muestra (jugo y extracto hidroalcohólico de hoja de olivo o palto), se le realizaron 3 extracciones sucesivas con 10 mL de éter y posteriormente con 10 mL de acetato, también por tres veces. Posterior a cada extracción, se agitó y se esperó la separación de las fases. Se recolectó en una fracción todas las fases provenientes del éter y acetato y se agregó 20 g de sulfato de sodio, luego se agitó y se dejó reposar por 30 min. Posteriormente se filtró y se llevó a sequedad por un evaporador rotatorio a 30°C. El residuo se suspendió en 2 mL de solución metanol-agua (1:1 v/v); finalmente se filtró a través de un filtro Millipore (Brasil) de 0,22 µm, para HPLC.

En el extracto obtenido por extracción supercrítica-CO₂ de olivo o palto (EFSO o EFSP), se tomó 3 mL y se aforó en un matraz de 10 mL con agua destilada. Luego se filtró y se extrajo con 2,5 mL de eter y acetato, respectivamente, por 3 veces. Posteriormente se siguió el procedimiento anteriormente señalado.

Anexo 6. Determinación de tocoles en extractos de hojas de olivo o palto.Reactivos

- 1-. Hexano HPLC
- 2-. Estándares de tocoles (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania).

Procedimiento

Se tomaron alícuotas de 1mL de los extractos: HAO, HAP, JO y JP; y 3 mL de EFSO y EFSP. Las alícuotas se extrajeron con 2 mL por 3 veces con hexano. Luego las fases orgánicas se recolectaron y aforaron en un matraz ámbar de 10 mL con hexano HPLC. La identificación y cuantificación se realizó por comparación con los estándares de tocoles de concentración conocida, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ppm Tocol} = (a \times C \times V \times d) / (A \times P)$$

Donde:

a= Área del peak del tocol en la muestra

C= Concentración del tocol en el estándar ($\mu\text{g/mL}$)

V= Volumen del matraz aforado (mL)

D= Factor de dilución

A= Área del peak del tocol en el estándar

P= Peso de la muestra (g)

Anexo 7. Determinación de tocoles en los aceites iniciales y sometidos a frituras sin y con la adición de los extractos de hojas de olivo o palto.

Reactivos

- 1-. Hexano HPLC
- 2-. Estándares de tocoles (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania).

Procedimiento:

Se pesaron 100 mg de aceite filtrado y anhidro en un matraz ámbar (10 mL), aforando con hexano HPLC. Se inyectó al equipo 20 µL de la solución anterior y se esperó aproximadamente 25 min hasta la salida del último peak, correspondiente a delta tocoferol.

La identificación y cuantificación se realizó por comparación con los estándares de tocoles de concentración conocida, mediante la siguiente fórmula:

ppm Tocol= $(a \times C \times V \times d) / (A \times P)$; donde:

a= Área del peak del tocol en la muestra

C= Concentración de tocol en el estándar (µg/mL)

V= Volumen del matraz aforado (mL)

D= Factor de dilución

A= Área del peak del tocol en el estándar

P= Peso de la muestra (g)

Anexo 8. Determinación de la composición de ácidos grasos por GLC.

Derivatización de ácidos grasos: Metilación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico.

Reactivos

- 1-.KOH en metanol.
- 2-. Hexano p.a.
- 3-. Estándares (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania)

Procedimiento

Se pesaron 100 mg de aceite, se agregó 500 μ L de KOH en metanol y 3 mL de hexano. Se agitó por 30 s y se dejó reposar por 30 min. Luego se inyectó 0,5 μ L de la fase superior (hexano) al cromatógrafo de gases. La temperatura inicial del horno fue de 160 $^{\circ}$ C, durante 3 min y luego se programó con un incremento de 1 $^{\circ}$ C/min, hasta alcanzar 230 $^{\circ}$ C. La temperatura del inyector y la del detector correspondió a 240 $^{\circ}$ C. El gas portador correspondió a hidrógeno.

Para identificar a los ácidos grasos y determinar el porcentaje de éstos en la muestra, se compararon los tiempos de retención relativos de la muestra con los tiempos de retención de un estándar (Merck) inyectado previamente.

Anexo 9. Medición del contenido de polifenoles totales del aceite por espectrofotometría

Reactivos

1. Hexano p.a
2. Etanol p.a

Procedimiento

En un tubo se pesó 1 g de aceite y se agregó 5 mL de hexano. Luego se realizó una extracción con 3 mL de una solución etanol-agua (60:40 v/v), se agitó por dos minutos. Se transfirió la capa etanol-agua a un balón esmerilado de 25 mL, se reextrajo con 3 mL de la mezcla anterior por dos veces más, agitando por 3 min cada vez. Luego se juntaron las extracciones y se llevaron a un evaporador rotatorio a 40°C, hasta sequedad. El residuo se redisolvió en dos porciones de 0,1 mL de etanol, se traspasó cuantitativamente con pipeta pasteur a un matraz aforado de 10 mL, para proceder con el método de Folin-Ciocalteu.

Anexo 10. Método Rancimat

Este método se basa en la medición del tiempo de resistencia a la termooxidación de una materia grasa sometida a calentamiento a 110° en presencia de un flujo de constante de aire (20 mL/min). Este análisis permite realizar comparaciones de estabilidad y eficacia de antioxidantes naturales o sintéticos adicionados a materias grasas, ya que permite estandarizar las condiciones de oxidación de las materias grasas estudiadas.

Procedimiento

Se pesaron aproximadamente 3 g de cada aceite (AC, AGAO y AS) control y adicionado en forma independiente con 250 y 630 mg EAC/Kg aceite de los extractos de hojas de olivo o palto, se programó la temperatura en 110 °C, se agregaron 60 mL de agua destilada a cada una de las celdas de medición. Se colocaron los electrodos en estas celdas y los tubos en la placa calefactora del equipo. Se conectó el flujo de aire, verificándose que la conductividad inicial de los electrodos no sobrepasara los 2 uS/cm

Anexo 11. Determinación del porcentaje de compuestos polares por cromatografía en columna abierta (IUPAC 2000, Método 2.507).

Reactivos

- 1-. Eter de petróleo: eter etílico (90:10 v/v)
- 2-. Eter etílico p.a.
- 3-. Silica gel 60 (tamaño de partícula: 0,063-0,2 mm), Merck ajustada a un contenido de humedad de 5%.
- 4-. Arena de mar p.a.
- 5-. Algodón
- 6-. Nitrógeno (99-99.8%)

Materiales

Mini columna de vidrio (10 mm diámetro interno, 150 mm longitud, con llave de paso), vaso precipitado (5 y 200 mL), embudo de decantación (250 mL), embudo analítico, pipetas pasteur, probeta (100 mL), bagueta, matraces de boca esmerilada (100 mL).

Procedimiento:

Preparación de la muestra: Se pesaron 0,5 g de muestra, en balanza analítica, registrando el peso exacto.

Preparación del material: Se activó la sílica gel a 160 °C por 4 h, luego se ajustó la humedad a un 5% (m/m), con agua destilada. Se colocaron matraces de 100 mL en una estufa durante 30 min y se dejaron enfriar en el desecador, luego se registró el peso de los matraces.

Preparación de la columna: Se colocó algodón en la base de la columna, en una probeta se midieron 70 mL de la mezcla eter de petróleo/eter etílico (90:10 v/v), de los cuales, 60 mL se colocaron en un embudo de decantación y 10 mL se utilizaron para disolver en un vaso precipitado 5 g de sílica (con 5 % humedad, ajustada previamente) las que se traspasaron a la columna. Se enjuagó el vaso con la mezcla, asegurándose de traspasar toda la sílica y evitar la formación de burbujas, golpeando suavemente las paredes de la columna, mientras se agregaron pequeños volúmenes de la mezcla para

eluir, para evitar que la columna se secase. Luego se agregó 1 g de arena de mar como filtro de la muestra.

Cromatografía en columna: La muestra se sembró con pipeta pasteur, enjuagando el dedal varias veces con la mezcla 90:10 (v/v) para cerciorarse del traspaso total de la muestra. Luego la columna se eluyó con 60 mL de la mezcla, medidos anteriormente en el embudo de decantación y se dejó gotear hacia la columna con un flujo de 1 mL por min. En un matraz esmerilado se recolectó toda la fase I (compuestos no polares). Luego al embudo de decantación se agregó 50 mL de eter etílico y se dejó gotear hacia la columna con un flujo de 1 mL por min, cambiando el matraz, para recolectar la fase II (compuestos polares). Ambos matraces se llevaron a evaporador rotatorio hasta remover todo el solvente, se colocaron en estufa por 10 min y luego en un desecador. Para eliminar el oxígeno, se agregó nitrógeno y se pesaron hasta alcanzar peso constante.

Se debe tener en cuenta que para obtener resultados satisfactorios, el porcentaje de recuperación de la muestra debe superior a un 96%.

La primera fracción (Fracción I) corresponde a los triglicéridos no alterados y la segunda (Fracción II) a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales.

$$\% \text{ Fracción: } \frac{\text{Peso obtenido fracción (g)} * 100}{\text{Peso muestra (g)}}$$

El porcentaje de compuestos polares puede calcularse directamente a partir del % obtenido en la fracción II o a través de la diferencia entre 100% y el % de fracción I. En este caso se calcularon de la última forma ya que en muestras de alteración elevada, los compuestos de alta polaridad, que deberían eluir en la fracción II quedan retenidos en la columna, por lo que existiría un error por defecto.

Anexo 12. Cromatografía HPLC de exclusión para la determinación de especies de deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico en la fracción de compuestos polares.

A partir de la fracción de compuestos polares (Fracción II), se pueden separar mediante cromatografía líquida de exclusión, 5 grupos de compuestos de peso molecular diferenciado, que en general, se distribuyen en 3 grupos diferentes.

El grupo de deterioro térmico que corresponde a los polímeros de triglicéridos (PTG) y dímeros de triglicéridos (DTG) característicos de la alteración térmica. El grupo de los triglicéridos oxidados (TGOx) originados exclusivamente por el oxígeno del aire y que constituyen el deterioro oxidativo y el grupo de los compuestos de hidrólisis atribuidos a la acción de la humedad que corresponden a diglicéridos (DG) y ácidos grasos libres (AGL).

Reactivos

1-. Tetrahidrofurano (THF) HPLC

Equipos

Bomba: Merck Hitachi L-6200

Detector: Índice de refracción Merck RI-71

Integrador: Merck Hitachi 2500

Columnas: dos columnas PL-gel, Hewlett Packard (250 cm de largo x 4,6 mm diámetro interno x 100 y 500 Å de tamaño de poro), conectadas en serie, empacadas con un copolímero de estirenodivinilbenceno altamente entrecruzado (tamaño de partícula de 5 micras).

Condiciones de trabajo:

Fase móvil: tetrahidrofurano (THF) grado HPLC

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Tiempo de corrida: 15 min por muestra.

Preparación de las muestras y análisis.

Las muestras de los aceites de fritura, se disolvieron en THF, obteniendo una concentración entre 7 a 12 mg/mL. La identificación de las especies de deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico, se realizó por comparación de los tiempos de retención de los peaks obtenidos en las muestras con patrones de especies de deterioro térmico, oxidativo e hidrolítico.

El contenido de las diferentes especies de deterioro, se calcularon de la siguiente forma:

$$\%PTG = (A_{PTG} / \sum A) / w_p$$

$$\%DTG = (A_{DTG} / \sum A) / w_p$$

$$\%TGOx = (A_{TGOx} / \sum A) / w_p$$

$$\%DG = (A_{DG} / \sum A) / w_p$$

$$\%AGL = (A_{AGL} / \sum A) / w_p$$

Donde,

% PTG= porcentaje de polímeros de triglicéridos en el aceite

% DTG= porcentaje de dímeros de triglicéridos en el aceite

% TGOx= porcentaje de polímeros de triglicéridos oxidados en el aceite

% DG= porcentaje de polímeros de diglicéridos en el aceite

% AGL= porcentaje de polímeros de ácidos grasos libres.

A= área del peak correspondiente.

$\sum A$ = Suma de todas las áreas de los peaks.

w_p = porcentaje de compuestos polares en el aceite.