



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

Título de la tesis

**“Efecto de la adición de extractos de cáscara y  
hojas de palto sobre la estabilidad oxidativa de  
aceite de girasol”**

**Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título de**

**Ingeniero en alimentos**

**Por**

Camila Fernanda Fritz Avendaño

**Director de Tesis Profesor:**

Dra. Paula Andrea Jiménez Patiño

**Co-Director de Tesis Profesor:**

Dra. Paz Robert Canales

Santiago de Chile, 2016

## DEDICATORIA

*A mi familia...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por el apoyo incondicional que me han transmitido durante este proceso, gracias a ellos soy la mujer y futura profesional íntegra que siempre he esperado ser.

A mi novio, que siempre me ha brindado su apoyo incondicional, por darme ánimo y fuerzas para seguir adelante aun en los momentos más complejos.

A mis amigos, que siempre han estado junto a mí en los momentos que más los he necesitado.

A mi directora de tesis Dra. Paula Andrea Jiménez Patiño y a mi Co-Directora Dra. Paz Robert Canales que siempre estuvieron cuando más necesité de su ayuda.

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

## INDICE DE MATERIAS

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	1
1.1- Oxidación lipídica.	2
1.2- Antioxidantes alimentarios.	4
1.3- Secado por atomización.	6
1.4- Palto: fuente de antioxidantes naturales.	6
1.5- Métodos de evaluación de la estabilidad oxidativa.	8
1.6- Hipótesis.	9
1.7-Objetivos del proyecto.	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	10
2.1-Materiales.	10
2.2- Obtención de extractos de palto (acuosos e hidroalcohólico) de las hojas y la cáscara.	10
2.3- Caracterización de los extractos de palto (acuoso e hidroalcohólico) de las hojas y la cáscara en polvo	11
2.3.1- Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT)	11
2.3.2- Determinación de la actividad antioxidante (AA)	11
2.3.3- Determinación de tocoles (T)	12
2.4- Caracterización de aceite de girasol (AG).	12
2.5- Estabilidad termo-oxidativa de aceite de girasol sin y con extractos cáscara y hoja de palto en polvo.	12
2.5.1- Adición de los extracto de cáscara y hojas de palto, en polvo, al aceite de girasol.	13
2.5.2-Determinación de compuestos polares en los sistemas lipídicos (AG; AG+EAHP; AG+EACP; AG+EHHP; AG+EHCP; AG+BHA).	13
2.5.3-Determinacion de tocoles en los sistemas lipídicos (AG; AG+EAHP; AG+EACP; AG+EHHP; AG+EHCP; AG+BHA).	14

2.6- Análisis estadístico.	14
<b>RESUTADOSY DISCUSIÓN</b>	<b>15</b>
3.1- Caracterización de los extractos de hojas y cáscara de palto.	15
3.1.1- Contenido de polifenoles totales (CPT).	15
3.1.2- Actividad antioxidante (AA).	18
3.2- Caracterización química del aceite de girasol (AG).	20
3.3- Estabilidad oxidativa del aceite de girasol (AG) sin y con la adición de extractos de cáscara y hojas de palto, secados por atomización (en polvo).	22
3.3.1- Evolución de la formación de CP en la matriz lipídica (AG) con y sin la adición de extractos de hojas y cáscara de palto (en polvo).	22
3.3.2- Evolución de $\alpha$ -tocoferol para los sistemas lipídicos con y sin la adición de extractos (AG + EHCP, AG + EACP, AG + EHHP, AG + EAHP, AG+ BHA y AG control), sometidos a calentamiento de 80°C.	25
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>31</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1:** Contenido de polifenoles totales (CPT) de extractos de cáscara y hojas de palto (Var. Hass), antes y después del secado por atomización.

**Tabla 2:** Actividad antioxidante (FRAP y DPPH) de extractos de hojas y cáscara de Palto (Var. Hass), antes y después del secado por atomización.

**Tabla 3:** Características iniciales del aceite de girasol (Natura ®) sin antioxidantes sintéticos adicionados, utilizado para los ensayos de estabilidad oxidativa.

**Tabla 4:** Porcentajes de retención y cinéticas de degradación de alfa-tocoferol ( $\alpha$ -T) de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 80°C.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Evolución de CP (%) para los sistemas AG control, AG+EHCP, AG+EACP, AG+EHHP, AG+EAHP y AG + BHA sometidos a calentamiento (80°C).

## RESUMEN

Las materias grasas especialmente aquellas poliinsaturadas, sufren deterioro oxidativo cuando son sometidas a altas temperaturas produciendo una serie de nuevos compuestos volátiles y no volátiles, que pueden alterar las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento. En este contexto, la adición de antioxidantes sintéticos ha sido la herramienta más utilizada por la industria, para retardar la oxidación de los lípidos en los alimentos. Sin embargo, éstos están siendo cuestionados por los consumidores, lo que abre las puertas a la búsqueda e identificación de nuevas fuentes naturales de antioxidantes.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de la adición de extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscara y hojas de palto (Var. Hass) en polvo, sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol sometido a 80°C.

Los extractos de hojas y cáscara de palto (Var. Hass) se prepararon utilizando agua como solvente de extracción (EAHP y EACP, respectivamente) y etanol:agua (50:50 v/v) (EHHP y EHCP, respectivamente). Los extractos acuosos e hidroalcohólicos con Capsul como carrier se sometieron a secado por atomización a 140°C.

Los extractos (EHCP, EACP, EHHP y EAHP) antes y después del secado por atomización, se caracterizaron según su contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu), tocoferoles (HPLC-detector de fluorescencia) y actividad antioxidante (FRAP y DPPH). Los resultados obtenidos mostraron que los cuatro extractos después del secado por atomización, presentaron un aumento en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, siendo mayor para EHCP.

La estabilidad termo-oxidativa del aceite de girasol (AG) con la adición de 400 ppm de los extractos de hoja y cáscara en polvo (EHCP, EACP, EHHP y EAHP), se sometieron a calentamiento a 80°C hasta 216 h. Los resultados mostraron que solamente el BHA y EHCP disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la formación de compuestos polares y la constante de velocidad de degradación de tocoferoles, respecto al AG (control), presentando un mayor efecto el BHA.

## SUMMARY

Oils and fats, especially those polyunsaturated suffer oxidative deterioration when they are submitted at thermal conditions, producing new compounds volatile and non-volatile. In this context, the addition of synthetic antioxidants has been the most used tool by the industry to delay the lipid oxidation in food. However, they are questioned by consumers. Therefore, there is a growing interest in using antioxidants from natural sources.

The aim of this work was to study the effect of the addition of powder extracts from avocado skins and leaves (hydro-alcoholic and aqueous) on the oxidative stability of sunflower oil storage at 80°C.

The extracts of avocado peels and leaves (Var. Hass) were elaborated using water (ALAE y APAE, respectively) or ethanol:water (50:50 v/v) (APHE y ALHE, respectively) as extracting solvents. The aqueous and hydroalcoholic extracts were dried by spray-drying at 140°C using Capsul as carrier.

The extracts (ALAE, APAE, APHE y ALHE) before and after spray-drying were characterized according to their total content of polyphenols (Folin-Ciocalteu), tocopherols (HPLC-Fluorescence detector) and antioxidant activity (FRAP and DPPH). The results showed an increase of total polyphenols content and antioxidant activity after spray-drying, being higher for APHE.

The thermal oxidative stability of sunflower oil (SO) with the addition of 400 ppm of powder avocado peels and leaves extracts (ALAE, APAE, APHE y ALHE) were storage at 80°C until 216 h. The results showed that only BHA and APHE diminished significantly the polar compounds formation and degradation rate constants of tocopherols respect to SO (control), being the BHA the most effective.

## ABREVIATURAS

EAC: Equivalente ácido cafeico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

AG: Aceite girasol

CP: Compuestos polares

EHCP: Extracto hidroalcohólico de cáscara de palto

EHHP: Extracto hidroalcohólico de hoja de palto

EAHP: Extracto acuoso de hoja de palto

EACP: Extracto acuoso de cáscara de palto

CPT: Cantidad de polifenoles totales

AA: Actividad antioxidante

BHA: Butilhidroxianisol

IP: Índice de peróxidos

AGL: Acidez libre

$\alpha$ -T: Alfa tocoferol

TBHQ: Terbutilhidroquinona

T: Tocolos

ASPA: Antes del secado por atomización

PSPA: posterior al secado por atomización

## INTRODUCCION

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro de grasas y aceites produciendo compuestos de degradación volátiles o no volátiles que pueden alterar las propiedades nutricionales y organolépticas (Choe y Min, 2007). En este contexto, el uso de antioxidantes sintéticos constituye la herramienta más ampliamente utilizada por la industria de los alimentos para disminuir la oxidación, aunque están siendo cuestionado por sus posibles efectos adversos a concentraciones elevadas (Shahidi y Zhong, 2010). Así, los antioxidantes de origen natural son una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos, entre los que podemos distinguir dos grupos: liposolubles donde se encuentran los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) e hidrosolubles donde se encuentran los polifenoles (principalmente flavonoides y ácidos fenólicos).

Una fuente importante de antioxidantes naturales son los extractos vegetales. En este proyecto se utilizará como fuente de antioxidantes naturales la cáscara y las hojas de palto, Var. Hass (subproductos de la elaboración industrial), debido a que estudios han demostrado que los extractos de estos contienen una cantidad importante de polifenoles, con mayor contenido de procianidinas, y alta actividad antioxidante (Brune y van Lelyveld, 1982; Torres *et al.*, 1987; De Almeida *et al.*, 1998; Terasawa *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011 a, b; Chávez *et al.*, 2011) y por tanto, podrían ser utilizados para retrasar la oxidación de materias grasas que se han expuesto a un proceso térmico.

Finalmente, a través de esta investigación se pretende incrementar la estabilidad oxidativa del aceite de girasol, sometido a una temperatura moderada de 80°C, mediante la adición de extractos hidroalcohólicos y acuosos de cáscaras y hojas de palto (en polvo), y así alargar la vida útil de éste. En este estudio el etanol se seleccionó como solvente de extracción de polifenoles, debido a que este solvente está permitido en alimentos (RSA, 1996). La estabilidad del aceite de girasol sin y

con los extractos de cascara y hoja de palto, se seguirá a través de la formación de compuestos polares y la cinética de degradación de tocoferoles.

Por último, con esta investigación se pretende generar nuevos conocimientos para la utilización de antioxidantes naturales, extraídos de subproductos del palto, para ser aplicados en la industria alimentaria.

### **1.1.- Oxidación lipídica**

Los lípidos son un componente importante en los alimentos por su contribución en la palatabilidad, saciedad y nutrición, además son importantes constituyentes estructurales y funcionales de las células en los sistemas biológicos. Sin embargo, este diverso grupo de sustancias puede sufrir una serie de reacciones oxidativas que llevan a la pérdida de su calidad química y nutricional (Márquez-Ruiz *et al.*, 2010).

La oxidación lipídica es una reacción natural favorecida por muchos factores tales como la temperatura, composición en ácidos grasos, la presencia de oxígeno y luz, ausencia de compuestos antioxidantes, presencia de ácidos grasos libres, metales, pigmentos, enzimas y compuestos oxidados térmicamente (Choe y Min, 2007; Yanishlieva y Marinova, 2001). La oxidación de lípidos puede ocurrir por tres mecanismos: autooxidación, foto-oxidación y oxidación enzimática, sin embargo, la autooxidación es la que ocurre con más frecuencia e involucra un mecanismo mediado por radicales libres en tres etapas: inicio, propagación y término (Yanishlieva y Marinova, 2001).

En la iniciación, un radical libre o iniciador (luz o metales) sustrae uno de los átomos de hidrógeno del carbono adyacente al doble enlace de un ácido graso insaturado (LH), formándose un radical alquil ( $L^{\cdot}$ ) (Belitz, 1997; Yanishlieva y Marinova, 2001).

En la propagación, el radical alquil ( $L^{\cdot}$ ), formado en el inicio, reacciona con el oxígeno atmosférico originando un radical peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ) el cual 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<sup>•</sup>), que propaga la reacción. Los hidroperóxidos constituyen los productos primarios de la oxidación (Belitz, 1997).

Al 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).

Cuando una materia grasa se somete a temperatura de fritura en presencia de un alimento, además del deterioro oxidativo se produce un deterioro hidrolítico y térmico (Dobarganes *et al.*, 1988), este último ocurre básicamente por el mismo mecanismo que el de autooxidación, pero en forma mucho más acelerada (Marmesat *et al.*, 2010). El deterioro térmico se caracteriza por la formación de 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 tanto entre dos moléculas de diferentes triglicéridos como también dentro de una misma o por unión de dos ácidos grasos (Warner *et al.*, 2004). El dímero puede derivar en polímeros (compuestos de alto peso molecular), también pueden formarse isómeros *trans*, posicionales y monómeros cíclicos.

## **1.2.- Antioxidantes alimentarios.**

Los antioxidantes alimentarios son moléculas orgánicas, de origen natural o sintético, que pueden definirse como cualquier sustancia que, a muy bajas concentraciones, comparado con la especie oxidable, sea capaz de prevenir o retardar la oxidación (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 antioxidantes sintéticos son los más utilizados por la industria alimentaria, corresponden a compuestos fenólicos como el Hidroxibutilanisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terbutilhidroquinona (TBHQ) y el Galato de Propilo. Entre sus ventajas de uso se pueden mencionar su alta eficiencia, estabilidad y bajo costo, sin embargo, a altas temperaturas son volátiles y se descomponen con facilidad. Por otra parte, existe algún cuestionamiento sobre su uso por el posible efecto como promotores cancerígenos (Ito *et al.*, 1986; Thompson y Moldeus, 1988; Gharavi *et al.*, 2007). Estos antecedentes sugieren que es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con efectos antioxidantes.

Los antioxidantes naturales, se encuentran presentes en prácticamente todos los vegetales, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales (Barclay y Vinqvist, 2003), donde tienen múltiples efectos biológicos. La mayoría corresponden a compuestos fenólicos, entre los cuales, los principales grupos son los tocoles (tocoferoles y tocotrienoles) y polifenoles (Shahidi y Zhong, 2010).

Los polifenoles son compuestos secundarios del metabolismo de vegetales, siendo ampliamente distribuidos en estas especies. Estos contribuyen al color, sabor (amargor y astringencia) y estabilidad oxidativa en los alimentos (Pandey y Rizvi, 2009). En general, poseen dos rutas de biosíntesis, la del ácido siquímico y la del acetato. Así, de acuerdo a su estructura, pueden dividirse en diferentes clases, encontrándose desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos condensados. Estos

polifenoles existen en los vegetales en diferentes cantidades, siendo los flavonoides el grupo mayoritario (Muñoz *et al.*, 2007).

La acción antioxidante *in vitro* de los polifenoles se debe a la capacidad de atrapar, tanto radicales libres (por donación de un átomo de hidrógeno), como iones metálicos (agente quelante) (Muñoz *et al.*, 2007). El radical intermediario fenoxil, que se forma, es relativamente estable, inhibiendo la fase de propagación al reaccionar con otros radicales libres. La actividad antioxidante de polifenoles varía en función de su estructura química y de su solubilidad (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Por otro lado, una sub-clase de flavonoides que ha producido interés por sus potenciales efectos beneficiosos en la salud, corresponde a las procianidinas (PC). Éstas se encuentran en la mayoría de los alimentos, tales como: uvas, cocoa, té, palta (semilla y cáscara), entre otros. Las PC son compuestos que tienen como precursores a monómeros de catequinas y epicatequina unidas por enlaces C4–C8 y/o C4–C6. La condensación de unidades monoméricas pueden formar oligómeros (condensación de 2 a 5 unidades) y polímeros (más de 5 unidades) (Serra *et al.*, 2010). A las PC se les han descrito efectos biológicos antioxidantes (Puiggròs *et al.*, 2009), anti-inflamatorios (Serra *et al.*, 2010) y antidiabéticos (Hsi *et al.*, 2009). Sin embargo, el efecto de PC como antioxidantes en alimentos ha sido escasamente estudiado.

De acuerdo a estos antecedentes, existe un gran interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales de antioxidantes, como es el caso de los extractos vegetales. Estos se pueden obtener desde distintas partes de las plantas (hojas, semillas, frutos, flores, entre otros) y están formados generalmente por una mezcla de compuestos bioactivos, los cuales son afines a la polaridad del disolvente utilizado y que se relaciona con la estructura química del o los compuestos de interés (Naczki and Shahidi, 2006; Jiménez *et al.*, 2011). Si bien, en los extractos vegetales no se pueden identificar e interpretar las propiedades antioxidantes de

cada compuesto en particular, sí pueden presentar una actividad antioxidante superior en comparación a la de cada compuesto en forma individual (Benavente-García *et al.*, 2000). Disolventes como metanol, acetona, etil acetato, agua y sus mezclas, se han utilizado para la extracción de polifenoles presentes en cáscara de palta y hojas de palto (Ojewole y Amabeokun, 2006).

### **1.3.- Secado por atomización**

El secado por atomización es el método más utilizado en la industria de los alimentos para transformar un producto líquido en un polvo, de forma económica, simple y continua. Consiste en la atomización de un fluido en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente para obtener un material sólido (Martín *et al.*, 2009).

Las ventajas de un extracto seco en comparación a uno líquido, se traducen en menor contaminación microbiológica y costos de almacenamiento, mayor concentración y estabilidad de los activos o compuestos de interés, entre otras (Oliveira *et al.*, 2006). Por esto, en este estudio se utilizaron extractos de palto secados por atomización, usando como carrier Capsul<sup>®</sup>, el cual es un almidón químicamente modificado que incorpora en su estructura un componente lipofílico, permitiendo una mayor estabilidad en emulsiones aceite en agua (Shahidi y Han, 1993), lo que podría mejorar la dispersabilidad de los extractos en un aceite.

### **1.4.- Palto: Fuente de antioxidantes naturales.**

El Palto (*Persea Americana Mill*) es un árbol de hoja perenne de zonas tropicales y subtropicales, también conocido como avocado y aguacate en los países centroamericanos. En Chile se cultiva desde la I a la VII región, principalmente en la Región de Valparaíso. Las principales variedades de palto cultivadas en el país, corresponden a la Negra de La Cruz, Bacon y Hass, siendo esta última la de mayor importancia de cultivo, con el 67% del total nacional (ODEPA, 2009).

A partir de la producción industrial de palta, se obtienen distintos subproductos, entre los cuales se encuentran las hojas y cáscaras del fruto. Además, se han

reportado distintos efectos beneficiosos a infusiones de hojas, como antihipertensivo (Gupta *et al.*, 1979; Adeboye *et al.*, 1999; Owolabi *et al.*, 2005), anticonvulsante (Ojewole y Amabeokn, 2006), hipoglicémico (Antia *et al.*, 2005), analgésico, anti-inflamatorio (Adeyemi *et al.*, 2002), antiviral (De Almeida *et al.*, 1998) y hepatoprotector (Etkor *et al.*, 2006), los cuales se han atribuido a los polifenoles (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011 a,b; Brune y van Lelyveld, 1982; Torres *et al.*, 1987; De Almeida *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2007; Terasawa *et al.*, 2006).

Los principales polifenoles identificados en hojas de palto son los ácidos: cafeico, clorogénico, cumárico, ferúlico, gálico, hidroxibenzoico, protocatéuico, pirocatéuico, resorcílico, sinápico, siríngico y vanílico (Brune y van Lelyveld, 1982; Torres *et al.*, 1987; De Almeida *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2007), flavonoides como apigenina, isoramnetina, kaempferol 3-O-arabinopiranosido, kaempferol 3-O- $\beta$ -glucopiranosido, kaempferol 3-O-ramnopiranosido, luteolina, luteolina 7-O-glucosido, rutina, quercetina, quercetrina, quercetina 3-O-arapiranosido, quercetina 3-O- $\beta$ -glucopiranosido, quercetina 3-O- $\beta$ -D glucosido y epicatequina (De Almeida *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2007; Owolabi *et al.*, 2005). Se ha descrito un contenido de polifenoles totales para hojas de palto de la Var. Hass desde 1750 a 1930 EAG mg/100g MS (Torres *et al.*, 1987)

En cáscara de la palta se han identificado: procianidinas (Wang *et al.*, 2010, Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b; Chávez *et al.*, 2011; Kosinska *et al.*, 2012), antocianidinas (Prahba *et al.*, 1980; Ashton *et al.*, 2006), ácido cinámico (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b), ácido clorogénico (Prahba *et al.*, 1980), quercetina 3,4'-diglucosido, quercetina 3-O-rutinosido, quercetina 3-O-arabinosil-glucósido, quercetina 3-O-galactósido (Kosinska *et al.*, 2012) y epicatequina (Prahba *et al.*, 1980; Terasawa *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Hirasawa *et al.*, 2008; Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b; Chávez *et al.*, 2011; Kosinska *et al.*, 2012). En cuanto al contenido total de polifenoles, en la cáscara de palta se han reportado valores de 457 mg EAG/100g (Terasawa *et al.*, 2006), en la Var. Hass de 1260 mg

EAG/100g (Wang *et al.*, 2010) y 3293 a 8997 mg EAG/100g en materia seca (MS) (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011(a,b); Chávez *et al.*, 2011).

De acuerdo a estos antecedentes, las hojas del palto y cáscaras del fruto son subproductos de bajo costo y alto contenido de polifenoles, siendo atractivas fuentes naturales de antioxidantes. Sin embargo, hay pocos estudios que han evaluado el efecto de estos extractos sobre la estabilidad oxidativa en materias grasas (Terasawa *et al.*, 2006; Rodríguez-Carpena, *et al.*, 2011a, b).

### **1.5.- Métodos de evaluación de la estabilidad oxidativa.**

La estabilidad termooxidativa de lípidos generalmente se sigue por la determinación de compuestos secundarios de oxidación como valor de anisidina y compuestos polares (CP) (IUPAC, 2000) entre otros. La formación de compuestos polares y su distribución en especies de alteración, representa el método más adecuado para la evaluación de la oxidación lipídica sometidas a condiciones aceleradas de almacenamiento (Dobarganes *et al.*, 1988). Los compuestos polares se determinan por extracción en fase sólida, en columna abierta, donde la primera fracción corresponde a los triglicéridos no alterados y la segunda a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales (IUPAC, 2000).

En este contexto, el mecanismo de acción de los polifenoles sobre la estabilidad oxidativa de los aceites sometidos a altas temperaturas, se relacionaría con la capacidad de los polifenoles para actuar como donantes de átomos de hidrógeno a los radicales libres primarios (peroxil) formados durante el calentamiento del aceite, previniendo de esta manera las reacciones de polimerización (Houhoula *et al.*, 2003). Este mecanismo considera que los polifenoles sean estables a esas temperaturas. Se ha descrito que algunos productos de la descomposición de los polifenoles son capaces de donar un hidrógeno nuevamente, aumentando su potencia antioxidante (Murakami *et al.*, 2004).

Además, se ha evaluado la actividad antioxidante de extractos en aceites, como: extractos de hojas de Inca muña (Chirinos *et al.*, 2011), sésamo (Mohdaly *et al.*, 2011), hojas de olivo (Jiménez *et al.*, 2011), té verde y negro (Zhu *et al.*, 2009), cáscara de granada (Iqbal *et al.*, 2008), entre otros. Sin embargo, los resultados de estos estudios son controversiales, encontrándose efectos antioxidantes altos, bajos ó moderados.

### **1.5.- Hipótesis**

La adición de extractos (hidroalcohólico y acuoso), de cáscara y hojas de palto (Var. Hass) en polvo, al aceite de girasol (AG) sometido a 80°C, mejorará su estabilidad oxidativa en comparación al control (aceite de girasol, sometido a la misma temperatura, sin extractos).

### **1.6.- Objetivos del proyecto**

#### Objetivo General:

Estudiar el efecto de la adición de extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscara y hojas de palto (Var. Hass) en polvo, sobre la estabilidad oxidativa del aceite de girasol sometido a 80°C.

#### Objetivos Específicos:

- 1.- Elaborar y caracterizar los extractos de cáscara y hojas de palto (Var. Hass) en polvo por secados por atomización.
- 2.- Caracterizar químicamente el aceite de girasol.
- 3.- Estudiar la oxidación de aceite de girasol sometido a 80°C, con y sin la adición de extractos (hidroalcohólico y acuoso) de cáscara y hojas (Var. Hass), en polvo, evaluando la formación de compuestos polares y la degradación de tocoles.

## MATERIALES Y METODOS

### 2.1.- Materiales.

- Las hojas de palto y cáscaras del fruto, ambos de la Var. Hass, serán obtenidas desde árboles de más de 10 años de edad en la Región de Valparaíso (localidades de Casablanca y Quillota, respectivamente).
- Capsul® (almidón de maíz ceroso modificado hidrofóbicamente), se obtuvo de National Starch, SA, Chile.
- Modelo lipídico: aceite de girasol (AG) (*Helianthus annuus*) sin antioxidantes sintéticos, marca Natura®, se adquirió en un supermercado local.
- Antioxidante sintético: BHA (hidroxibutilanisol), se utilizó con fines comparativos, de acuerdo a límite legal permitido de 0,02%.

### 2.2.- Obtención de extractos de palto (acuoso e hidroalcohólicos) de las cáscara y hojas.

Hojas y cáscaras, en forma independiente, fueron escaldadas en agua a 90°C por 3 min y secadas en estufa a temperatura de 45°C, en oscuridad. Las hojas y cáscaras (400 g secas y molidas) fueron maceradas en 2 L de etanol/agua (50:50 v/v) (extracto hidroalcohólico) o agua (extracto acuoso), durante 72 horas (las primeras 6 h con agitación) a temperatura ambiente y oscuridad. Luego los extractos fueron filtrados y congelados a -20°C. Así los extractos de palto estudiados fueron: extractos de hojas de palto acuoso (EAHP) e hidroalcohólico (EHHP) y extractos de cáscara de palta acuoso (EACP) e hidroalcohólico (EHCP).

Cada uno de los extractos se sometió a secado por atomización, usando un secador Spray-Dryer Büchi B-290, a 140°C, utilizando Capsul como carrier en una proporción de 5%.

### **2.3.- Caracterización de los extractos de palto (acuoso e hidroalcohólico), de las hojas y la cáscara en polvo**

Los análisis de la caracterización de los extractos de cáscara y hojas de palto acuoso e hidroalcohólico incluirán contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante (métodos FRAP y DPPH) y contenido de tocoferoles.

#### **2.3.1.- Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT)**

Se realizó mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a Singleton y Rossi. (1965). En este ensayo, 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 ácidos 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 (UV/Vis Lambda 25, Perkin Elmer, Singapore) a 725 nm (correspondiente al máximo de absorción del ácido cafeico). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido cafeico (EAC).

#### **2.3.2.- Determinación de la actividad antioxidante (AA):**

La actividad antioxidante de los extractos de palto se determinaron por los métodos espectrofotométricos: DPPH y FRAP, de acuerdo a Brand-Williams *et al.* (1995) y Benzi y Strain *et al.* (1996), respectivamente.

El método de decoloración de DPPH, 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 (UV/Vis Lambda 25, Perkin Elmer, Singapore) a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos para DPPH se expresaron como  $EC_{50}$ , 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 método de FRAP, determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ . El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (UV/Vis Lambda 25, Perkin Elmer, Singapore) a 593 nm.

### **2.3.3.- Determinación de tocoles (T):**

La determinación de tocoferoles en los extractos de cáscaras y hojas de palto se realizó por HPLC con detector de fluorescencia, de acuerdo al método de la AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993). El equipo estuvo compuesto de una bomba Merck-Hitachi L-6200 A (Merck, Darmstadt, Alemania), inyector Rheodyne 7725i, loop 20  $\mu\text{L}$ , 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 Si-60 (5 $\mu\text{m}$ , 4 mm d.i. x 250 mm, Merck, Alemania).

### **2.4.- Caracterización de aceite de girasol (AG)**

El AG se caracterizó por su perfil en ácidos grasos por GC (AOAC, 2003), índice de peróxido (AENOR, 1991), acidez (AOCS, 1993) y contenido de tocoles por HPLC (AOCS, 1993).

### **2.5.- Estabilidad termo-oxidativa de aceite de girasol sin y con extractos de cáscara y hoja de palto en polvo.**

#### **Sistemas lipídicos estudiados:**

- AG control (sin adición de extractos de palto)
- AG adicionado con extracto acuoso de hojas de palto (AG+EAHP)
- AG adicionado con extracto acuoso de cáscaras de palto (AG+EACP)
- AG adicionado con extracto hidroalcohólico de hojas de palto(AG+EHHP)

- AG adicionado con extracto hidroalcohólico de cáscaras de palto (AG+EHCP)
- AG adicionado con 200 ppm de antioxidante sintético (AG+BHA)

### **2.5.1.- Adición de los extractos de cáscara y hojas de palto, en polvo, al aceite de girasol.**

La adición de los extractos de cáscara (EACP y EHCP) y hojas de palto (EAHP y EHHP) en polvo al AG, se realizó en una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles/kg aceite. La elección de esta concentración se fundamentó en ensayos previos de estabilidad oxidativa (determinados por Rancimat), donde se estudiaron concentraciones de 400 y 700 ppm y no se observaron diferencias significativas en los tiempos de inducción entre ellas.

Los sistemas de AG (5 g) con y sin la adición de extractos de cáscara y hojas de palto (acuoso e hidroalcohólico) o BHA, se colocaron en tubos de vidrio que se calentaron en una placa calefactora a 80°C, con agitación a 175 rpm. Los tubos se retiraron a intervalos específicos de tiempo para la determinación de la formación de compuestos polares (CP) y degradación de tocoferoles en el aceite. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **2.5.2.- Determinación de compuestos polares en los sistemas lipídicos (AG; AG+EAHP, AG+EACP, AG+EHHP; AG+EHCP; AG+BHA).**

Los CP se determinaron por cromatografía de adsorción en columna abierta, de acuerdo a Dobarganes et al. (1988). 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 correspondiente a los triglicéridos no alterados y la segunda a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales.

### **2.5.3.- Determinación de tocoles en los sistemas lipídicos (AG; AG+EAHP, AG+EACP, AG+EHHP; AG+EHCP; AG+BHA)**

La determinación de tocoferoles se realizó por HPLC con detector de fluorescencia, de acuerdo al método de la AOCS Ce 8-89 (AOCS, 1993), que se describió en 2.3.3.

### **2.6.- Análisis estadístico**

Para las determinaciones de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos, se realizaron triplicados de las muestras y los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $X \pm DE$ ). De esta misma forma se expresaron también los resultados para la determinación de compuestos polares y tocoferoles en los sistemas lipídicos.

Para evaluar diferencias estadísticas entre los parámetros analizados para los extractos (polifenoles totales, DPPH, FRAP) y para los sistemas de AG (compuestos polares y constante de velocidad de degradación de tocoferoles) 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%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1.- Caracterización de los extractos de hojas y cáscara de palto

#### 3.1.1.- Contenido de polifenoles totales (CPT)

En la Tabla 1 se muestra el contenido de polifenoles totales (CPT), de los extractos (hidroalcohólicos y acuosos) de cáscara y hojas de palto, Var. Hass, (EHCP, EACP, EHHP y EAHP) antes y después del secado por atomización, expresados en mg EAC/ g de materia seca de hoja o cáscara.

**Tabla 1:** Contenido de polifenoles totales (CPT) de extractos de cáscara y hojas de palto (Var. Hass), antes y después del secado por atomización.

Contenido de Polifenoles Totales (mg EAC/ g de MS de hoja o cáscara)		
Extracto	ASPA*	PSPA*
EHCP	77,6 ± 5,1 <sup>b</sup>	166,2 ± 4,6 <sup>d</sup>
EACP	53,7 ± 4,1 <sup>a</sup>	89,2 ± 0,7 <sup>b</sup>
EHHP	51,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	134,0 ± 1,1 <sup>c</sup>
EAHP	47,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	67,8 ± 2,5 <sup>a</sup>

ASPA: Antes del secado por atomización; PSPA: Posterior al secado por atomización; EAC: equivalente a ácido cafeico; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara; EACP: extracto acuoso de cáscara; EHHP: extracto hidroalcohólico de hojas; EAHP: extracto acuoso de hojas. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). \*Valores fueron expresados en base a materia seca (MS), humedad final para cáscara y hojas de 8% y para polvos obtenidos por secado por atomización de 4%.

Los resultados de la tabla 1 muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en CPT, de acuerdo al tipo de subproducto de palto (hojas o cáscara) y disolvente utilizado. El CPT varió en un rango entre 47,6 a 77,6 mg EAC/ g MS de hoja o cáscara, para los extractos antes del secado por atomización y entre 67,8 a 166,2 mg EAC/ g MS de hoja o cáscara, para los extractos después del secado por atomización. Los mayores valores de CPT los poseen los extractos en polvo, esto se debería a que durante el proceso de secado por atomización, los polifenoles condensados y/o polifenoles conjugados se hidrolizan aumentando el número de grupos hidroxilos que reaccionen con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Kim *et al.*, 2006).

Tanto en los extractos líquidos como en aquellos en polvo, se encontró que el mayor CPT fue para el EHCP. En los sistemas en polvo, la extracción de polifenoles con etanol/agua (50/50 v/v) fue más eficiente que sólo con agua, estos resultados podrían atribuirse a la polaridad del disolvente (constante dieléctrica) utilizado (Naczk y Shahidi, 2006) y a la afinidad de los compuestos fenólicos presentes en los extractos. Hamid *et al.* (2010) y Dorta *et al.* (2013) reportaron que mezclas de disolventes, tales como: etanol/agua; metanol/agua y acetona/agua, en la extracción de polifenoles de extractos vegetales de guayaba y mango, respectivamente, fueron más eficientes en la extracción de compuestos fenólicos que los disolventes puros (Naczk y Shahidi, 2006; Hamid *et al.*, 2010).

Por otro lado, es muy complejo optimizar un procedimiento de extracción adecuado para la recuperación de todos los compuestos fenólicos presentes en los extractos de origen vegetal, debido a que éstos contienen una mezcla de clases de compuestos fenólicos. La extracción de los polifenoles dependerá entonces de la afinidad y solubilidad de éstos en el disolvente de extracción utilizado, considerando que en los extractos vegetales, se pueden encontrar compuestos de bajo peso molecular, así como también sustancias altamente polimerizadas (Naczk y Shahidi, 2006)

Resultados de CPT en cáscara de palto (*Persea Americana Mill*), Var. Hass, se han reportado por varios autores. Rodríguez-carpina *et al.* (2011b), estudiaron los CPT de extractos obtenidos con acetato de etilo; acetona/agua (70:30 v/v) y metanol/agua (70:30 v/v), con valores de CPT de 32,93; 89,97 y 78,41 mg EAG (equivalentes a ácido gálico)/g de materia seca (MS), respectivamente, siendo este último valor similar al obtenido por Chávez *et al.* (2011) (77,13 mg EAG/g de cáscara) en extractos acuosos liofilizados y en el presente estudio en EHCP (77,6 mg EAC/ g de cáscara) previo al secado. Otros autores han reportado un CTP de 19,7 mg EAG/g de cáscara en extractos acuosos liofilizados (Calderón-Oliver *et al.*, 2016); 25,32 mg EC (equivalente de catequina)/g de cáscara MS en extractos

metanol/agua (80:20 v/v) liofilizados (Kosinska *et al.*, 2012) y 30,01 mg EAG/g de cáscara en extractos líquidos utilizando como disolvente HCL/metanol (1:1 v/v) (Oboh *et al.*, 2013). Estos resultados muestran el efecto del tipo del solvente de extracción sobre el CPT.

Por otra parte, la comparación de los resultados de CPT para extractos de hoja de palto de la Var. Hass (*Persea Americana Mill*) es aún más compleja, debido a la falta de estudios disponibles en la literatura. Oboh *et al.* (2013) utilizaron como disolvente de extracción, mezclas de HCl/metanol (1:1 v/v), reportando un CPT de 43,82 mg EAG/g de hoja. Este valor fue similar a los encontrados para EHHP y EAHP sin secar (51,6 y 47,6 mg EAC/ g de hoja, respectivamente), a pesar de las diferentes condiciones utilizadas en cada estudio.

La comparación de CPT de este estudio con aquellos de la literatura, es limitada, debido a las diferencias en: métodos de extracción (pretratamiento del material vegetal, disolventes de extracción, entre otros), forma de expresión de los CPT en cada estudio (equivalente a ácido cafeico, gálico ó catequina) y aspectos tecnológicos como operaciones de secado por atomización o liofilizado (Ranalli *et al.*, 2006.; Ahmad *et al.*, 2014). Además, se debería considerar la ubicación geográfica, etapa de madurez de los vegetales, el tamaño de la partícula de la materia vegetal (Ranalli *et al.*, 2006), presencia de sustancias interferentes (Ej. terpenos y clorofilas), condiciones de almacenamiento que influyen en la solubilidad de los compuestos fenólicos en el disolvente, la cinética de transferencia de masa del producto y las fuerzas de las interacciones matriz-soluto (Hamid *et al.*, 2010), entre otros.

Por otro lado, se debe considerar que el método de Folin-Ciocalteu, a pesar de ser ampliamente utilizado para estimar el contenido de polifenoles totales, tiene la desventaja de no ser un reactivo específico para los compuestos fenólicos ya que puede reducir otros compuestos, tales como, aminas aromáticas, ácido ascórbico,

ácidos orgánicos y compuestos reductores como azúcares, entre otros (Tabart *et al.*, 2009 y Prior *et al.*, 2005).

### 3.1.2.- Actividad antioxidante (AA)

La Tabla 2 muestra la actividad antioxidante (AA), de los extractos de cáscara y hoja de palto Var. Hass (EHCP, EACP, EHHP y EAHP), de acuerdo a los métodos FRAP y DPPH (expresado como EC<sub>50</sub>).

**Tabla 2:** Actividad antioxidante (FRAP y DPPH) de extractos de hojas y cáscara de Palto (Var. Hass), antes y después del secado por atomización.

Extracto	FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /g)		EC <sub>50</sub> (mg/ml)	
	ASPA	PSPA	ASPA	PSPA
EHCP	0,57± 0,005 <sup>d</sup>	1,33±0,022 <sup>c</sup>	0,048±0,0002 <sup>a</sup>	0,043±0,0005 <sup>a</sup>
EACP	0,17±0,005 <sup>a</sup>	0,81±0,013 <sup>b</sup>	0,061±0,0004 <sup>c</sup>	0,052±0,0056 <sup>b</sup>
EHHP	0,22±0,004 <sup>b</sup>	0,83±0,096 <sup>b</sup>	0,055±0,0004 <sup>b</sup>	0,063±0,0004 <sup>c</sup>
EAHP	0,25±0,002 <sup>c</sup>	0,45±0,003 <sup>a</sup>	0,106±0,0007 <sup>d</sup>	0,075±0,0002 <sup>d</sup>

ASPA: Antes del secado por atomización; PSPA: posterior al secado por atomización; EHC: extracto hidroalcohólico de cáscaras; EAC: extracto acuoso de cáscaras; EHH: extracto hidroalcohólico de hojas; EAH: extracto acuoso de hojas. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Los resultados de la tabla 2 muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en AA, de acuerdo al tipo de subproducto de palto (hojas o cáscara) y al método utilizado (FRAP y DPPH).

La AA varió en un rango entre 0,17 a 0,57 (mmol Fe<sup>2+</sup>/g) para FRAP y entre 0,048 y 0,106 (mg/ml) para EC<sub>50</sub> en los extractos líquidos y entre 0,45 a 1,33 (mmol Fe<sup>2+</sup>/g) para FRAP y entre 0,043 a 0,075 (mg/ml) para EC<sub>50</sub> en los extractos en polvo. La AA (medida por FRAP) para los extractos en polvo fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) respecto a los extractos líquidos. Sin embargo, para EC<sub>50</sub> (DPPH), este comportamiento se observó solamente en EACP y EAHP. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Vega-Gálvez *et al.* (2009), quienes

estudiaron el efecto del secado por aire sobre la capacidad antioxidante del pimiento rojo a diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 y 90 °C) y tiempo (a mayor temperatura, menor tiempo de secado), encontrando que a mayores temperaturas de secado (80 y 90°C), las muestras revelaron una capacidad antioxidante más alta que las muestras sometidas a temperaturas inferiores.

Tanto en los extractos líquidos como en polvo, se observa que la mayor AA, entregada por FRAP y DPPH (EC<sub>50</sub>), fue para EHCP, lo cual, podría explicarse por su mayor CPT y/o perfil de polifenoles y/o otros compuestos menores presentes en el extracto. Así, estudios como el de Chávez *et al.* (2011) y Terasawa *et al.* (2006), reportaron que extractos de cáscara de palta poseen un alto contenido de catequina y epicatequina, formando específicamente, por procianidinas, compuestos que podrían aumentar la AA de estos extractos.

Por lo tanto, la AA encontrada en cada extracto de palto es atribuible a distintos factores, entre los cuales se encuentran el perfil de polifenoles (Rice-Evans *et al.*, 1996) y la presencia de otros compuestos menores con propiedades antioxidantes. Sin embargo, en este estudio se descarta la presencia de tocoles, ya que se corroboró por un análisis químico previo, que éstos no están presentes en los extractos.

Si se comparan los resultados de AA determinados por FRAP y DPPH, de los otros extractos (líquido y en polvo), sin considerar el de EHCP, no se observan claros efectos del tipo de subproducto (cáscara u hoja) y disolvente. Este resultado podría atribuirse a los distintos mecanismos antioxidantes de cada método, mientras FRAP determina la AA mediante la capacidad reductora por transferencia de electrones, el DPPH lo hace por la capacidad para neutralizar radicales libres (Karadag *et al.*, 2009). Estas diferencias en los mecanismos, hacen necesario la utilización de más de un método para medir la AA de extractos vegetales.

La comparación de los resultados de FRAP para extractos de cáscara y hojas de palto (*Persea Americana Mill*) Var. Hass, obtenidos en el presente estudio, con la literatura, es escasa. Oboh *et al.* (2013), determinaron valores de 29,52 y 34,64 mg EAA (equivalentes a ácido ascórbico)/g (hoja o cáscara), respectivamente, utilizando HCl/metanol (1:1 v/v) como disolvente de extracción.

Por otro lado, en cuanto a DPPH, existen estudios previos en extractos de cáscara de palta (Var. Hass) con acetato de etilo, acetona/agua (70:30 v/v) y metanol/agua (70:30 v/v), obteniendo valores de DPPH de 17,85, 88,94 y 71,92 mmol ET (equivalente a Trolox) /g de materia fresca, respectivamente (Rodríguez-Carpena *et al.* 2011b). Wang *et al.* (2010) reportó un valor de 0,189 mmol ET/g MS y Kosinska *et al.* (2012) en extractos metanólicos un EC<sub>50</sub> de 0,358 mg (MS).

Por último, la comparación con la literatura de los resultados de FRAP y DPPH para los extractos hidroalcohólicos de hojas y cáscara de palto (Var. Hass), no fue posible porque no se encontraron estudios similares por otros autores.

### **3.2.- Caracterización química del aceite de girasol (AG)**

En la tabla 3 se presenta la caracterización química del aceite de girasol utilizado, para realizar los ensayos de estabilidad oxidativa.

Los valores de ésteres metílicos del aceite de girasol (AG) obtenidos mediante CG, mostraron en general, un alto grado de poliinsaturación representado mayoritariamente por el ácido linoleico C18:2n6 en un porcentaje de 52%. Estos resultados son concordantes con los encontrados por otros autores (Tuberoso *et al.*, 2006). De acuerdo a los valores obtenidos mediante índice de peróxido (IP) y acidez libre (AGL) (1,18 meqO<sub>2</sub>/ Kg de aceite y 0,07% expresado como ácido oleico, respectivamente), indican que este aceite cumple con los requisitos establecidos en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA, 1996) para su consumo y son concordantes con lo descrito por otros autores en IP, con valores de 2,0 y 1,21 meqO<sub>2</sub>/ Kg de aceite y 0,06% y 0,13% para AGL (Urbancic *et al.*, 2014 y Robert *et al.*, 2001). En cuanto al contenido de tocoferoles (antioxidante natural), se determinó un valor total de 601 mg/Kg, siendo el α-tocoferol, el

mayoritario con 589 mg/kg aceite. Estos resultados son similares a los descritos por Robert *et al.* (2001); Carelli *et al.* (2005) y Urbancic *et al.* (2014).

**Tabla 3:** Características iniciales del aceite de girasol (Natura ®) sin antioxidantes sintéticos adicionados, utilizado para los ensayos de estabilidad oxidativa.

Sistema Lipídico (AG)	
	% ésteres metílicos
C14:0	0,1
C16:0	5,7
C18:0	3,3
C20:0	0,3
C22:0	0,7
C24:0	0,3
C16:1	0,1
C18:1	37,3
C20:1n9	0,19
C18:2n6	52,0
C18:3n3	0,08
	mg/kg Aceite
α-Tocoferol	589 ± 5,9
β-Tocoferol	Trazas
δ-Tocoferol	Trazas
γ-Tocoferol	Trazas
Total	601 ± 8,3
CP (%)	4,5 ± 0,11
IP (meqO <sub>2</sub> / Kg de Aceite)	1,18 ± 0,001
AGL (% expresado como ác. Oleico)	0,07 ± 0,243

X ± DE: promedio ± desviación estándar; AG: aceite de girasol, CP: compuestos polares; IP: índice de peróxidos; AGL: acidez libre

Por otra parte, se observó un porcentaje inicial de compuestos polares de 4,5 %, los que son acordes a los descritos en AG por Urbancic *et al.* (2014) y Crapiste *et al.* (1999) con valores de 4,01 % y 4,20%, respectivamente.

### **3.3.- Estabilidad oxidativa del aceite de girasol (AG) sin y con la adición de extractos de cáscara y hojas de palto, secados por atomización (en polvo).**

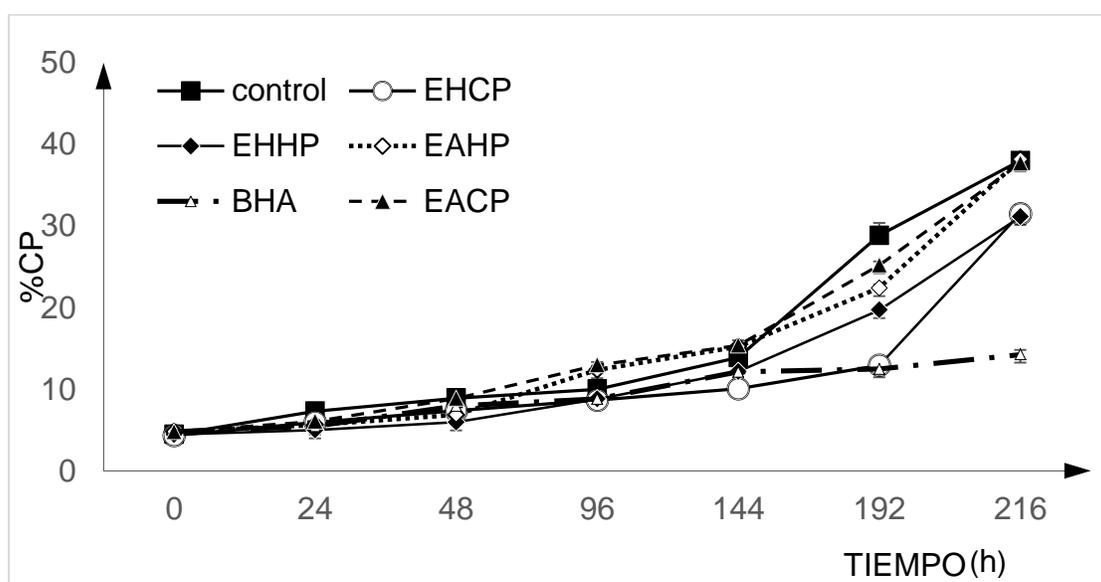
La estabilidad oxidativa, de los sistemas lipídicos de AG control (AG sin la adición de extractos), AG con la adición de 400 ppm de los extractos de cáscara y hoja de palto (AG+EHCP, AG+ EACP, AG+EHHP y AG+EAHP) y AG más 200 ppm de BHA (AG+BHA) (para fines comparativos), se determinó mediante la formación de compuestos polares (CP), durante un calentamiento continuo a 80°C por 216 horas.

#### **3.3.1.- Evolución de la formación de CP en la matriz lipídica (AG) con y sin la adición de extractos de cáscara y hojas de palto (en polvo).**

La figura 1 presenta la formación de compuestos polares (expresados en %) a través del tiempo, en los sistemas de AG, sometidos a un calentamiento continuo de 80°C (tabla se adjunta en anexo). Los resultados muestran que todos los sistemas lipídicos, sin calentamiento (0 horas), contienen porcentajes iniciales de CP similares (4,45 a 4,82%) y a medida que aumentan las horas de calentamiento, se incrementa la formación de CP. El cambio de pendiente que este grafico indica el inicio de las etapas avanzadas de la oxidación y al término del periodo de inducción (Márquez-Ruiz *et al.*, 1999). Existe un leve aumento en CP para todos los sistemas lipídicos, hasta las 144 h (día 6), especialmente para AG+EHCP (10,1%), seguido de AG+EHHP y AG+BHA, ambos con CP de 12%. Posteriormente a las 192 h de calentamiento (día 8), se observa un aumento notorio en el porcentaje de CP de 22,4; 25,2 y 28,9%, para los sistemas AG+EAHP, AG+EACP y AG control, respectivamente, superando los dos últimos sistemas, el valor máximo de CP permitido para aceites de fritura (25%) por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (RSA, 1996). En este mismo tiempo (192 h), sólo AG+EHCP y AG+BHA, disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) la formación de compuestos polares (12,9 y 12,5%, respectivamente), en comparación a los otros sistemas lipídicos. Posteriormente, a las 216 h (día 9) de calentamiento, sólo el sistema AG+BHA, fue capaz de disminuir en forma

significativa ( $p < 0.05$ ) la formación de CP a un 14%. Por lo tanto, bajo las condiciones estudiadas, sólo la adición de EHCP a AG, hasta las 192 h, permitió alargar la vida útil de éste, en comparación a AG control y AG con la adición de los otros extractos. La menor formación de CP en el sistema AG+EHCP, es acorde a un mayor CPT y AA determinada por FRAP y DPPH.

**Figura 1:** Evolución de CP (%) para los sistemas AG control, AG+EHCP, AG+EACP, AG+EHHP, AG+EAHP y AG + BHA sometidos a calentamiento (80°C).



CP: compuestos polares; AG: aceite de girasol; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palto; EHHP: extracto hidroalcohólico de hoja de palto; EAHP: extracto acuoso de hoja de palto; EACP: extracto acuoso de cáscara de palto; BHA: hidroxibutilanisol.

En este contexto, el mecanismo de acción de los polifenoles está relacionado con la capacidad para actuar como donadores de átomos de hidrógeno a los radicales peroxil (Perron y Brumaghim, 2009), formados durante el calentamiento, previniendo de esta manera las reacciones de polimerización que se producen como consecuencia de tratamientos con elevadas temperaturas (Houhoula *et al.*, 2003). Se ha descrito que algunos productos de la hidrólisis de los polifenoles complejos son también capaces de donar un hidrógeno nuevamente, aumentando su potencia antioxidante (Murakami *et al.*, 2004).

En la literatura, no se encontraron estudios que replicaran las condiciones experimentales (temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, luz, método para seguir la oxidación, entre otras) y los tipos de extractos vegetales utilizados en el presente estudio. Los resultados se compararán con estudios que utilizan temperaturas inferiores y superiores (Tavasalkar *et al.*, 2012; Farag *et al.*, 2007; Botega *et al.*, 2009; Angelo y Neuza, 2008). Estos estudios han evaluado el efecto de la adición de extractos de origen vegetal al AG sobre la estabilidad oxidativa de este aceite. Tavasalkar *et al.* (2012), estudiaron la formación de CP en sistemas de AG adicionados con mezclas de antioxidantes naturales (extractos de romero, té verde, ácido carnósico y carnosol) en una concentración de 0,1% (E0,1%) y de 0,02% de antioxidantes sintéticos (terbutilhidroquinona (TBHQ) y butilhidroxianisol (BHA)). Estos sistemas se sometieron a un calentamiento continuo a 50°C por 90 días encontrando valores de CP a los 90 días de 5,1; 5,4 y 8,1%, para los sistemas de AG+TBHQ, AG+E0,1% y AG control, respectivamente. Los dos primeros sistemas fueron capaces de disminuir la formación de CP, en relación al AG control. Un comportamiento similar al que se encontró en el presente estudio con la adición de EHCP (13%), BHA (12,5%) y el AG control (29%), sometidos a 192 horas de calentamiento a 80°C. Las diferencias en CP entre ambos estudios podría explicarse por la temperatura (50 y 80°C, respectivamente) y el tipo de extracto utilizado.

Por otra parte, se han reportado otros estudios donde también han determinado el efecto antioxidante de extractos vegetales en AG, retardando la formación de CP, con respecto al AG control, a temperaturas de fritura (180°C). Farag *et al.* (2007) que adicionaron jugo de hojas de olivo en cantidades equivalentes a 1600 y 2400 mg EAC/Kg por 5 h/día durante 5 días. Botega *et al.* (2009), los cuales adicionaron un extracto comercial de Carob fruit (*Ceratonia siliqua*), Exxenterol®, en concentraciones de 50 mg por kg de aceite, durante periodos continuos de calentamiento de 2, 8 y 16 horas. Angelo y Neuza. (2008), estudiaron un extracto acuoso de cilantro (CE) en una concentración de 1.600 mg/kg, durante un tiempo de calentamiento de 30 horas.

Cabe destacar que en el presente estudio, durante las 216 h totales de calentamiento a 80 °C, el sistema adicionado con el antioxidante sintético (AG+BHA), fue el que presentó la menor formación de CP en el tiempo, en comparación a los otros sistemas estudiados. Este comportamiento fue similar al reportado por Farhoosh *et al.* (2010), quienes adicionaron TBHQ (100 ppm) a AG sometido a 180°C por un periodo de 32 horas. Estos resultados sugirieron que la adición de antioxidantes sintéticos bajo condiciones termo-oxidativas, son efectivos sobre la estabilidad oxidativa de la materia grasa. Contrariamente, en sistemas de fritura donde se incorpora un alimento, el efecto de los antioxidantes sintéticos es menor, lo cual se ha atribuido a la volatilización y/o degradación de los antioxidantes sintéticos por efecto de la humedad incorporada en el sistema (Choe *et al.*, 2007; Warner *et al.*, 2009). Esta explicación podría ser corroborada por los resultados obtenidos en dos estudios: Urbancic *et al.* (2014) y Basuny *et al.* (2013), demostraron que los extractos de romero y jugo de cáscara de berenjena fueron más efectivos, en ciclos avanzados de fritura de alimentos, que los antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHA y BHT), en la formación de CP.

### **3.3.2.- Evolución de $\alpha$ -tocoferol para los sistemas lipídicos con y sin la adición de extractos (AG+EHCP, AG+EACP, AG+EHHP, AG+EAHP, AG+BHA y AG control), sometidos a calentamiento de 80°C.**

La tabla 4 presenta el porcentaje de retención de  $\alpha$ -tocoferol de los sistemas de AG (en anexo se adjunta tabla de los contenidos de  $\alpha$ -tocoferol), calentados a 80°C. Los resultados muestran que en todos los sistemas estudiados, a medida que aumenta el tiempo de calentamiento, disminuye el porcentaje de retención de  $\alpha$ -tocoferol. Estos resultados son acordes con lo encontrado por Barrera-Arellano *et al.* (2002), los cuales estudiaron matrices lipídicas con distintos grados de insaturación y sometidas a 180°C (oleína palma, oliva, girasol alto linoleico, girasol alto oleico, colza y soja), demostrando que la pérdida de tocoferoles es progresiva durante el tiempo de calentamiento, independiente de los niveles iniciales de

tocoles. Además, se reportó que los aceites más poliinsaturados presentan una mayor retención de tocoferoles durante el tratamiento térmico.

**Tabla 4:** Porcentajes de retención y cinéticas de degradación de alfa-tocoferol ( $\alpha$ -T) de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 80°C.

Sistema	Tiempo de calentamiento (h)					$K_{obs}$ ( $h^{-1}$ )
	0	24	48	96	144	
AG $\alpha$ -T%	100	77	48	32	3	$0,022 \pm 0,002^c$
AG + EHCP $\alpha$ -T%	100	77	59	34	8	$0,017 \pm 0,00007^b$
AG + EHHP $\alpha$ -T%	100	78	43	38	5	$0,019 \pm 0,0002^{bc}$
AG + EACP $\alpha$ -T%	100	75	64	12	0	$0,030 \pm 0,0007^d$
AG + EAHP $\alpha$ -T%	100	66	55	41	0	$0,028 \pm 0,002^d$
AG + BHA $\alpha$ -T%	100	48	44	37	11	$0,013 \pm 0,0004^a$

$\alpha$ -T%: porcentaje de alfa-tocoferol; AG: aceite de girasol; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palto; EHHP: extracto hidroalcohólico de hoja de palto; EAHP: extracto acuoso de hoja de palto; EACP: extracto acuoso de cáscara de palto; BHA: hidroxibutilanisol. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Los porcentajes de retención, de  $\alpha$ -tocoferol en los distintos sistemas a las 24 h de almacenamiento a 80°C, variaron desde 48 a 78%, teniendo el sistema de AG+BHA la menor retención de  $\alpha$ -T. Sin embargo, posterior a las 24 h (48 y 96 h), no se observó un efecto importante sobre la retención de  $\alpha$ -tocoferol, por parte de los sistemas de AG adicionados con los extractos. Sólo a las 96 h se produce una disminución importante en  $\alpha$ -tocoferol en el sistema con EACP y en los otros sistemas, a las 144 h. Las constantes de degradación para  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -T), de los distintos sistemas de AG hasta las 144 h de calentamiento, mostraron que el sistema de AG+BHA ( $0,013 h^{-1}$ ) fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) respecto del sistema AG+EHCP ( $0,017 h^{-1}$ ), mostrando el BHA un mayor efecto protector de  $\alpha$ -T en AG. Este comportamiento sugiere que los  $\alpha$ -T, podrían ser regenerados por grupos fenólicos de BHA y polifenoles u otros componentes menores

presentes en EHCP, como describieron Pekarinnen *et al.* (1999) y Marinova *et al.* (2008) en sistemas modelos.

La interacción entre polifenoles y  $\alpha$ -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 o que los flavonoides sean regenerados por los tocoferoles.

En este contexto, existen algunos estudios que han demostrado un efecto protector de los polifenoles sobre  $\alpha$ -tocoferol en AG, pero a altas temperaturas (180°C). Como Angelo y Neuza. (2008) quienes adicionaron polifenoles presentes en un extracto acuoso de cilantro (1600 mg/Kg) por un periodo de 30 horas y Botega *et al.* (2009) quienes lo hicieron con un extracto comercial de Carob fruit (Exxenterol, 50 mg/Kg) por 2, 8 y 16 horas. Ambos trabajos demostraron que el AG con extracto aumento la retención de  $\alpha$ -T, en comparación a AG control.

Por lo tanto, los sistemas de AG+BHA y AG+EHCP, presentaron menores constantes de degradación de  $\alpha$ -tocoferol y menores formaciones de CP. En el caso de AG+EHCP, este comportamiento podría ser atribuido a mayor CPT, AA y/o perfil de polifenoles y compuestos menores con propiedades antioxidantes presentes en el extracto.

El grado de protección de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos sobre las matrices lipídicas, dependería de las estructuras químicas de éstos

(reactividad química hacia radicales peroxil y otros), como ha sido reportado previamente por Pedrielli y Skibsted. (2002) en sistemas modelos

Entre los extractos de palto estudiados, la adición de EHCP en una concentración de 400 mg EAC/Kg a AG mostró un efecto antipolimerizante, retardando la formación de polímeros hasta las 192 horas. Este comportamiento puede ser atribuido a la presencia de polifenoles (y/u otros compuestos menores con propiedades antioxidantes), ya sea por un efecto directo o por regeneración de los tocoferoles presentes en el aceite (Houhoula *et al.*, 2003), sugiriendo que la estructura química de los polifenoles tiene importancia en la protección de la degradación de un aceite. Un efecto antipolimerizante superior al de EHCP, se observó con la adición de BHA a AG en una concentración de 200 ppm.

## CONCLUSIONES

Del trabajo realizado se obtienen las siguientes conclusiones:

1. Los extractos de cáscara y hojas de palto, mostraron un aumento en el CPT, después de ser sometidos al secado por atomización. El EHCP fue el que obtuvo mayor CPT ( $p < 0,05$ ), tanto pre como post secado, en comparación a los demás extractos estudiados (EHHCP, EAHP y EACP). Además, obtuvo una mayor AA pre y post secado por atomización, por sobre todos los extractos estudiados ( $p < 0,05$ ). Con respecto a los disolventes utilizados, para la obtención de los extractos de cáscara y hoja de palto, aquellos que se obtuvieron mediante etanol/agua (50/50 v/v), presentaron una mayor capacidad antioxidante y un mayor contenido de polifenoles totales en comparación a sus símiles obtenidos mediante solución acuosa ( $p < 0,05$ ).
2. El EHCP, retardó la formación de compuestos polares en el AG ( $p < 0,05$ ), durante el periodo de calentamiento hasta las 192 horas, en comparación al control (AG sin extractos adicionados). Sin embargo, el antioxidante sintético (BHA) agregado al AG, evitó que se superara el 25% de compuestos polares (límite establecido), durante todo el periodo de calentamiento (216 horas) y mejoró la estabilidad oxidativa del AG, por sobre todos los demás extractos adicionados (EHCP, EHHCP, EAHP y EACP) y al AG control.
3. La cinética de degradación de tocoferoles, reflejada por las constantes de degradación calculadas, expresadas en  $k_{obs}(h^{-1})$ , demostró que el EHCP aumentó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) la permanencia del  $\alpha$ -tocoferol en comparación al aceite control. Por otra parte, el antioxidante sintético BHA aumentó aún más la retención del  $\alpha$ -tocoferol en forma significativa ( $p < 0,05$ ) en comparación a todos los extractos adicionados (EHCP, EHHCP, EAHP y EACP) y al AG control.

4. De acuerdo a las condiciones estudiadas, sólo el EHCP presentó un efecto antioxidante sobre el AG y mejoró su estabilidad oxidativa hasta las 192 horas de calentamiento. Sin embargo, este efecto fue superado sólo por el antioxidante sintético (BHA).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Ahmad Qasem Mateo, B.H., Ahmad-Qasem, M.H., Cárcel, J.A., García Pérez, J.V.( 2014). Tesis de magister “Influencia del secado y almacenamiento en el potencial antioxidante de extractos de hoja de olivo (Var. Serrana) “. Disponible en URL: <https://riunet.upv.es/handle/10251/56999>. [Consultado el 18 de Abril 2016].
- AENOR. (1991). Norma UNE 55023-73. Asociación Española de normalización catálogo de normas UNE, Madrid.
- Angelo, P., y Neuza, J. (2008). Antioxidant evaluation of coriander extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85:1045–1049.
- Antia, B.S., Okokon, J.E., Okon, P.A. (2005). Hypoglycaemic activity of aqueous leaf extract of *Persea Americana* Mill. *Indian of journal pharmacology*, 37: 325-326.
- AOAC. (2003). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists international, 17th Ed. Gaithersburg, MD.
- AOCS. (1993). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC, in Official method and recommended practices of the American Oil chemists society, 4th edn., AOCS Press, Champaign, Method Ce 8-89.
- Ashton O., Wong M., Mcghie T., Vather R., Wang Y., Requejo-Jackman C., Ramankutty P., Woolf A. (2006) . Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54:10151-10158.
- 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.
- Basuny, A., Arafat, S., Kamel, S. (2013). Polyphenolic compounds of eggplant peel juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during deepfat frying. *Current research in microbiology and biotechnology*, 1(1): 1-8.
- 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. Grosch (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.
- Benzie I., Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239: 70–76.
- Botega, D., Bastida, S., Marmesat, S., Ruiz-Roso, B., Sánchez-Muniz, F. (2009). Carob fruit polyphenols reduce tocopherol loss, triacylglycerol polymerization and oxidation in heated sunflower oil. *Journal of the american oil chemists' society*, 86(5):419–425.
- 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.
- 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.
- Calderon-Oliver, M., Escalona-Buendía, H., Medina-Campos, O., Pedraza Chaverri, J., Pedroza-Islas, R., Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of

- the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *Food science and technology*, 65: 46-52.
- Carelli,A., Franco,I., Crapiste,G. (2005). Effectiveness of added natural antioxidants in sunflower oil. *Grasas y aceites*, 56(4): 303-310.
- Chávez, F., Aranda, M., García, A., Pastene, E. (2011). Antioxidant polyphenols extracted from avocado epicarp (*Persea Americana* Var. Hass) inhibit *Helicobacter pylori* urease. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 10 (3): 265-280.
- 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.
- Chirinos, R., Huamán, M., Betalleluz-Pallardel I., Pedreschi R., Campos D. (2011). Characterization of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food chemistry*, 128:711–716.
- Choe, E, Min, D. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal food science*, 72(5):77–86.
- Cheftel, J.C. (1992). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. pp 265-269. Acribia, Zaragoza, España.
- Crapiste,G., Brevedan, M., Carelli, A. (1999). Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of the american oil chemists' society*,79 (12): 1437- 1443.
- 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.
- Ding, H., Chin Y.W., Kinghorn A.D., D´Ambrosi S. M. (2007). Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *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.

- Dorta, E., Lobo, M.G., Gonzales, M. (2013). Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from Mango seed. *Food and bioprocess technology*, 6(4): 1067-1081.
- 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., 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.
- Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M. (2010). Polar compounds distribution of S sunflower oil as affected by unsaponifiable matters of Bene hull oil (BHO) and tertiary butylhydroquinone (TBHQ) during deep-frying. *Food chemistry*, 122: 381–385.
- Gharavi N., Haggarty S., El-Kadi A. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tertbutylhydroquinone and its metabolites. *Journal current drug metabolism*, 8: 1-7.
- Gupta, M.P., Arias, T.D., Correa, M., Lamba, S. (1979). Ethnopharmacognostic observations on Panama medicinal plants. *Journal crude drug research*, 17: 115-130.
- Hamid, K., Abdullah, A., Jusoh, K., Subramaniam, V. (2010). Antioxidant activity of pinkflesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food analytical methods*, 4: 100-107.
- Hirasawa, M., Shimura, K., Shimizu, A., Mura, K., Tokue, C., Arai, S. (2008). Quantification and functional analysis of dietary fiber and polyphenols in avocado (*Persea americana*). *Journal of the Japanese society for food science and technology*, 55(3): 95-101.
- 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.
- His, S., Kao, Y., Wang, P., Chao, H., Huang, Ch., Liu, H., Shih, L., Tschen, S., Lin Ch., Kao Y. (2009). Grape seed procyanidins improve diabetic symptoms in

- mice with streptozotocin-induced diabetes. *The open physiology journal*, 2: 6-13.
- 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., Haleem S., Akhtar M., Zia-ul-Haq M., Akbar J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food research international*, 41:194–200.
- IUPAC. (2000). The determination of polar compounds, polymerised and oxidised triacylglycerols and diacylglycerols in oils and fats. *Pure and applied chemistry*, 72: 1563-1575.
- Jiménez P., Masson L., Barriga A., Chávez J., Robert P. (2011). Oxidative stability of oils containing olive leaf extracts obtained by pressure, supercritical and solvent-extraction. *European journal of lipid science and technology*, 113(4): 497-505.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2:41–60.
- Kim, S.-Y., Jeong, S.-M., Park, W.-P., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S.- C. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food chemistry*, 97: 472–479.
- Kosinska, A., Karamác, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., Dykes, G. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea Americana* Mill. Peels and seeds of two varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (18): 4613–4619.
- Maestro-Duran., Broja-Padilla, B. (1993). Antioxidant activity of phenolic compounds. *Seminario internacional*, 44: 112-147 Carmona , ESPAGNE,
- Marinova, E., Toneva, A., Yanishlieva, N. (2008). Synergistic antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food chemistry*, 106: 628–633.

- Marmesat, S., Morales, A., Velasco, J., Dobarganes, M.C. (2010). Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas y aceites*, 61 (4):333-340.
- Martín, M.J., Morales, M.E., Gallardo, V., Ruiz, M.A. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm*, 50(1): 43-50.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 6: 271-278.
- Márquez-Ruiz, G., Martín, M., Jorge, N., Ruiz, M., Dobarganes, M. (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(4):421-425.
- Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez, M. V., Velasco, J., Dobarganes, C., Decker, E. A., Elias, R. J., & McClements, D. J. (2010). Preventing oxidation during frying of foods. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Management in different industry sectors*, 2: 239-273.
- Mohdaly, A., Smetanska, I., Ramadanc, M., Sarhanb, M., Mahmoudb, A. (2011). Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial crops and products*, 34: 952– 959.
- Muñoz, A., Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista horizonte médico*, 7(1):23-31.
- 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.
- Nacz, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetable: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41:1523-1542.
- Oboh, G., Adelusi, T., Akinyemi, A. (2013). Inhibitory effect of phenolic extract from leaf of avocado pear (*Persea americana*) on Fe<sup>2+</sup> Induced lipid

- peroxidation in rats páncreas in vitro. *Futa journal of research in sciences*, 2: 276-286.
- ODEPA. (2009). Cifras de la agricultura 10/10/2009. Disponible en URL: <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr?idcla=2&idcat=4&idn=1909>. [Consultado el 1 de junio 2016].
- Ojewole, J., Amabeokn, G. (2006). Anticonvulsant effect of *Persea Americana* Mill (Lauraceae) (avocado) Leaf aqueous extract in mice. *Phytotherapy research*, 20: 696-700.
- Oliveira, W., Bott, R., Souza, C. (2006). Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. *Drying technology*, 24(4): 523–533.
- Owolabi, M.A., Ja 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.
- Pandey, K., Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2 (5): 270-278.
- Pedrielli, P., Skibsted, L. 2002. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on  $\alpha$ -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.
- Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron bindin cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 53:75–10.
- Prabha, T. N., Ravindranath, B., Patwardhan, M.V. (1980). Anthocyanins of avocado (*Persea americana*) peel. *Journal of food science and technology*, 17(5): 241-242.
- 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.

- Puiggròs F., Sala, E., Vaque, M. (2009). In vivo, in vitro, and in silico studies of Cu/Zn-superoxide dismutase regulation by molecules in grape seed procyanidin extract. *Journal of the agricultural and food chemistry*, 57: 3934–3942.
- 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.
- Rice-evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology & medicine*, 20: 933-956.
- Robert, P., Masson, L., Romero, N., Dobarganes, M., Izaurieta, M., Ortiz, J., Witting, E. (2001). Fritura industrial de patatas críps. Influencia del grado de insaturación de la grasa de fritura sobre la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento. *Grasas y aceites*, 52: 389-396.
- Rodríguez-Carpena, J., Morcuende, D., Estévez, M. (2011a). Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat science*, 89: 166–173.
- Rodríguez-Carpena, J., Morcuende, D., Andrade, M., Kylli, P., Estévez, M. (2011b). Avocado (*Persea Americana* Mill.) phenolics, In vitro antioxidant and antimicrobial activities, and Inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: 5625–5635.
- Serra, A., Macia, A., Romero, M., Valls, J., Blade, C., Lluís, A., Motilva, M. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in vitro and in vivo models. *British journal of nutrition*, 103: 944–952.
- Shahidi, F., Han, X. (1993). Encapsulation of foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 33(6): 501-547.
- Shahidi, F., Zhong Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical society reviews*, 39: 4067-407.

- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology viticulture*, 16: 144-158.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J., Dommès, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food chemistry*, 113: 1226–1233.
- Tavasalkar, S., Mishra, H., Madhavan, S. (2012). Evaluation of antioxidant efficacy of natural plant extracts against synthetic antioxidants in sunflower oil. *Open access scientific reports*, 1(11):2-5.
- Terasawa, N., Sakakibara, M., Murata, M. (2006). Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. *Food science and technology research*, 12: 55-58.
- Thompson, D., Moldeus, P. (1988). Citotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochemistry pharmacology*, 37: 2201-2207.
- Torres, A., Mau-Lastovicks, T., Rezaaiyan, R. (1987). Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal of agricultural and food chemistry*, 35: 921–925.
- Tuberoso, C., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P. (2006). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food chemistry*, 103: 1494–1501
- Urbancic S., Kolar, M., Dimitrijevic, D., Demsar, L. (2014). Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato with rosemary extract during deep-fat frying. *LWT - Food science and technology*, 57: 671-678.
- Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Rodríguez, K., Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., López, J., Perez-Won, M. (2009) Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). *Food chemistry*, 117: 647–653.
- Wang, W., Bostic, T., Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food chemistry*, 122: 1193–1198.

- Warner, K., Gupta, M. K., & White, P. J. (2004). Chemical and physical reactions in oil during frying. *Frying technology and practices*. pp 16-28. AOCS Press Champaign, Illinois, USA.
- Warner, K., Gehring, M.M. (2009). High-temperature natural antioxidant improves soy oil for frying. *Journal food society*, 74: 500-505.
- Yanishlieva, N., Marinova E. (2001). Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European journal of lipid science and technology*, 103: 752-767.
- Zhu Q., Liang Ch., Cheng K., Peng X., Lo Ch., Shahidi F., Chen F., Ho Ch., Wang M. (2009). Trapping effects of green and black tea extracts on peroxidation-derived carbonyl substances of seal blubber oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57: 1065–1069.