



Universidad de Chile
Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

PATROCINANTE

Dra. Paz Robert Canales

Departamento de Ciencia de
Alimentos y Tecnología Química,
Universidad de Chile.

DIRECTOR DE MEMORIA

Dra. Paula Andrea Jiménez Patiño

Departamento de Nutrición,
Universidad de Chile.

CO-DIRECTOR DE MEMORIA

Dra. Paz Robert Canales

Departamento de Ciencia de
Alimentos y Tecnología Química,
Universidad de Chile.

“Efecto de la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto
en polvo sobre la termo-oxidación de aceite de girasol”

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

ELIANA BELEN ALVAREZ LIENQUEO

Santiago de Chile, 2017

Esta memoria fue financiada por el proyecto FONDECYT 11130373

Dedicatoria

A mis padres con todo mi amor...

Agradecimientos

A Dios, a mis padres y hermano, por su amor y apoyo incondicional durante todos los años de mi carrera. En especial a mi madre Eliana por su paciencia, su dedicación, sus horas en vela junto a mí, preocupación y por sus consejos para ser cada día mejor.

A mi director de tesis Dra. Paula Jiménez, por su paciencia, apoyo y a mi co-directora Dra. Paz Robert por tener siempre una buena disposición, y a ambas por su tiempo.

A Lucas, por su cariño, compañía, apoyo, por creer siempre en mí quizás a veces más que yo y por enseñarme a ver las cosas de un modo más simple.

A Marco Arratia, por su amistad durante todos estos años, por las risas y conversaciones que nos han hecho crecer y que espero perduren a través del tiempo.

A Rodolfo Masson, por brindarme su apoyo.

A la vida, por enseñarme a ser agradecida con ella misma.

A todos quienes de diferente manera colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

Índice General

Índice General	iii
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
Summary	ix
1. Introducción	1
1.1 Oxidación lipídica.	2
1.2 Antioxidantes alimentarios.	4
1.3 Secado por atomización.	6
1.4 Palto: fuente de antioxidantes naturales.	7
1.5 Métodos de evaluación de la estabilidad oxidativa.	8
1.6 Hipótesis.	10
1.7 Objetivos del proyecto.	10
2. Materiales y Métodos.	11
2.1 Materiales.	11
2.2 Obtención de extractos de palto (acuosos e hidroalcohólico) de la cáscara y hojas.	11
2.3 Caracterización de los extractos de palto (acuoso e hidroalcohólico) de la cáscara y hojas en polvo.	12
2.3.1 Determinación del contenido de polifenoles totales.	12
2.3.2 Determinación de la actividad antioxidante.	12
2.3.3 Determinación de tocoles.	13
2.4 Caracterización de aceite de girasol.	14
2.5 Estabilidad termo-oxidativa de aceite de girasol sin y con extractos cáscara de palta y hoja de palto en polvo.	14
2.5.1 Adición de los extractos en polvo de cáscara de palta y hojas de palto al aceite de girasol.	14

2.5.2 Determinación de compuestos polares.	15
2.5.3 Determinación de tocoles.	15
2.6 Análisis estadístico.	16
3. Resultados y Discusión.	17
3.1 Caracterización de los extractos de cáscara de palta y hojas de palto.	17
3.1.1 Contenido de polifenoles totales.	17
3.1.2 Actividad antioxidante.	19
3.2 Caracterización química del aceite de girasol.	22
3.3 Estabilidad oxidativa del aceite de girasol sin y con la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto en polvo.	23
3.3.1 Evolución de la formación de CP en la matriz lipídica (AG) con y sin la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto en polvo.	24
3.3.2 Evolución de α -tocoferol para los sistemas de AG con extracto de cáscara de palta y hojas de palto.	27
4. Conclusiones	31
5. Bibliografía	32
6. Anexos	46

Lista de tablas

Tabla 1: Contenido total de polifenoles (CPT) de extractos de cáscara de palta y hojas de palto, antes y después del secado por atomización.

Tabla 2: Actividad antioxidante (FRAP y DPPH) de extractos de cáscara de palta y hojas de Palto, 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: Evolución de CP (%), para los sistemas AG control, AG+EHCP, AG+EACP, AG+EHHP, AG+EAHP y AG + BHA a diferentes horas, sometidos a 180°C.

Tabla 5: Porcentajes de retención de alfa-tocoferol de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 180°C.

Tabla 6: Constantes de velocidad de degradación (K_{obs} (h^{-1})) de alfa-tocoferol en los sistemas de AG control y adicionados con extractos de cáscara de palta y hojas de palto, sometidos a 180°C a las 16 h.

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 180°C.

Figura 2: Porcentajes de retención de alfa-tocoferol de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 180°C.

Figura 3: Constantes de velocidad de degradación (K_{obs} (h^{-1})) de alfa-tocoferol de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 180°C a las 16 h.

Abreviaturas

AG: Aceite girasol
EHCP: Extracto hidroalcohólico de cáscara de palta
EHHP: Extracto hidroalcohólico de hoja de palto
EAHP: Extracto acuoso de hoja de palto
EACP: Extracto acuoso de cáscara de palta
CPT: Contenido de polifenoles totales
AA: Actividad antioxidante
CP: Compuestos polares
IP: Índice de peróxidos
AGL: Acidez libre
T: Tocolos
 α -T: Alfa tocoferol
EAC: Equivalente ácido cafeico
EAG: Equivalente ácido gálico
BHA: Butil hidroxianisol
BHT: Butil hidroxitolueno
TBHQ: Terbutil hidroquinona
PG: Propil galato
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

Resumen

En Chile, el cultivo del árbol de palto (*Persea americana* Mill.) es de gran importancia, siendo la variedad Hass la más cultivada. Como desecho de esta industria, se obtiene gran cantidad de cáscaras y hojas que poseen un interesante y amplio perfil de polifenoles, siendo las procianidinas las más importantes. Estos desechos industriales son una alternativa para la obtención de extractos con antioxidantes naturales y la aplicación de éstos sobre materias grasas, para retrasar el deterioro termo-oxidativo de éstas. Así, el objetivo fue estudiar el efecto de la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo, sobre la estabilidad termo-oxidativa de aceite de girasol sometido a 180°C. Los extractos de cáscara de palta y hojas de palto (cv. Hass) hidroalcohólicos (EHCP y EHHP, respectivamente) y acuosos (EACP y EAHP, respectivamente), se secaron por secado por atomización a 140°C usando Capsul como carrier. Los extractos en polvo se caracterizaron de acuerdo a su contenido de polifenoles totales (CPT) según Folin-Ciocalteu, alfa-tocoferol (α -T) y actividad antioxidante (AA) por DPPH y FRAP.

El aceite de girasol (AG), AG+BHA (200 ppm) y AG con la adición de los extractos de cáscaras de palta (AG+EACP y AG+EHCP) y hojas de palto (AG+EAHP y AG+EHHP) en una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles, se almacenaron bajo condiciones atmosféricas y a 180°C por 28 horas, determinando la formación de compuestos polares y la constante de degradación de tocoferoles.

Los resultados mostraron que el EHCP tuvo un alto contenido de polifenoles y actividad antioxidante y fue capaz de mejorar la estabilidad oxidativa del aceite de girasol sometido a 180°C en relación a los otros extractos. Además, presentó la menor velocidad de degradación de alfa-tocoferol, sugiriendo la regeneración del tocoferol por los polifenoles presentes en el EHCP y representando una potencial alternativa para su utilización e incorporación a matrices lipídicas sometidas a altas temperaturas, agregando a estos subproductos un valor económico.

Summary

"Effect of the addition of extracts of avocado peel and avocado leaves powdered on the thermo-oxidation of sunflower oil"

In Chile, cultivation of the avocado tree (*Persea americana* Mill.) is of great importance, being the Hass variety the most cultivated. As a waste from this industry, we obtain a large amount of peel and leaves that have an interesting and wide profile of polyphenols, with procyanidins being the most important. These industrial wastes are an alternative for obtaining extracts with natural antioxidants and the application of these on fats, to delay the thermo-oxidative deterioration of these. Thus, the objective was to study the effect of the addition of extracts of avocado peel and avocado leaves extract (hydroalcoholic and aqueous) powdered on the thermo-oxidative stability of sunflower oil subjected to 180°C. Hydroalcoholic (EHCP and EHHP, respectively) and aqueous (EACP and EAHP, respectively) extracts were dried by spray-drying at 140°C using Capsul as carrier. The powder extracts were characterized according to their content of total polyphenols (CPT) according to Folin-Ciocalteu, alpha-tocopherol (α -T) and antioxidant activity (AA) by DPPH and FRAP.

Sunflower oil (AG), AG+BHA (200 ppm) and AG with the addition of peel extract (AG + EACP and AG + EHCP) and leaves extract (AG + EAHP and AG + EHHP) in a concentration equivalent to 400 ppm of polyphenols, were stored under atmospheric conditions and at 180°C for 28 hours, determining the formation of polar compounds and the degradation constant of tocopherols.

The results showed that the EHCP had a high content of polyphenols and antioxidant activity and was able to improve the oxidative stability of the sunflower oil subjected to 180°C in relation to the other extracts. In addition, it presented the lower rate of degradation of alpha-tocopherol, suggesting the regeneration of tocopherol by the polyphenols present in the EHCP and representing an alternative potential for its use and incorporation into lipid matrices subjected to high temperatures, adding to these by-products an economic value.

Introducción

Las grasas y aceites de los alimentos pueden sufrir procesos de degradación tales como oxidación, la cual genera como consecuencia, alteraciones en el aroma, sabor, color, pérdida de determinados nutrientes y la formación de compuestos potencialmente nocivos para la salud. Para prevenir estas alteraciones, se pueden utilizar antioxidantes, los cuales son capaces de retrasar la oxidación de diversas sustancias, principalmente de ácidos grasos insaturados (Zamora, 2007; Mattivi, 2004).

En Chile, el cultivo del árbol de palto es de gran importancia, con más de 32.000 ha plantadas, siendo la variedad Hass la más cultivada (87%) (Simfruit, 2014). Como desecho de esta industria, se obtiene gran cantidad de cáscaras y hojas que actualmente no poseen aplicaciones tecnológicas económicamente viables. Sin embargo, las cáscaras de palta y hojas del palto poseen un interesante y amplio perfil de polifenoles. Las procianidinas son los principales componentes en los extractos de cáscaras de palta y hojas de palto con una 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 como antioxidantes naturales en materias grasas para retrasar la oxidación de éstas.

En este trabajo se estudió el efecto de la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto en polvo sobre la termo-oxidación de aceite de girasol durante el almacenamiento bajo condiciones atmosféricas y a temperatura de 180°C, a través de la formación de compuestos polares y la cinética de degradación de tocoferoles.

1.1.- Oxidación lipídica.

La oxidación lipídica es la causa de importantes cambios en el deterioro de las propiedades químicas, sensoriales y nutricionales de los alimentos. Además, los productos de esta oxidación se han relacionado con procesos degenerativos y enfermedades asociadas con el estrés oxidativo a nivel celular, incluyendo al cáncer, aterosclerosis y enfermedades inflamatorias crónicas (Marmot, 2011).

La oxidación lipídica en materias grasas ocurre mediante una serie de reacciones complejas, donde factores tales como: la temperatura, composición en ácidos grasos, concentración de oxígeno, luz, ausencia de compuestos antioxidantes, presencia de ácidos grasos libres, metales, pigmentos, enzimas, compuestos oxidados térmicamente, entre otros afecta su deterioro.

La oxidación de lípidos insaturados ocurre principalmente por auto-oxidación a través de una reacción en cadena de radicales libres que involucra 3 etapas: iniciación, propagación y término (Choe y Min, 2006). La iniciación ocurre por la pérdida de un hidrógeno desde la posición alílica del lípido insaturado (LH) por la presencia de iniciadores (metales, luz ó sensibilizadores) formando un radical alquil ($L\cdot$). En la propagación, el radical alquil ($L\cdot$) reacciona con el oxígeno a velocidades controladas por difusión formando el radical peroxil ($LOO\cdot$), el cual reacciona con otro lípido insaturado (LH), dando lugar a un hidroperóxido ($LOOH$) como producto primario de la oxidación y un nuevo radical alquil ($L\cdot$) que propaga nuevamente la reacción en cadena. Por otro lado, la descomposición de los hidroperóxidos forma una serie de compuestos no radicalarios (productos secundarios de oxidación), como aldehídos, cetonas, alcanos, alcoholes, los cuales son responsables de aromas y sabores indeseables (Cheftel, 1992).

Como resultado de esta oxidación se producen ciertos tipos de deterioro en la materia grasa tales como el deterioro hidrolítico y térmico. El deterioro hidrolítico ocurre como resultado de la presencia de humedad en el alimento. Este involucra la ruptura de los enlaces éster, liberando los ácidos grasos y los diacilgliceridos.

Adicionalmente, la presencia de oxígeno y la exposición a altas temperaturas, produce alteraciones térmicas en los ácidos grasos insaturados, conduciendo a la modificación de triacilglicéridos (TAGs) con al menos una de las tres cadenas grasas alteradas (Choe y Min, 2009).

En el deterioro térmico las reacciones involucradas son básicamente las mismas de la auto-oxidación, aunque a mayor velocidad (Marmesat *et al.*, 2010). Así, a temperatura ambiente o moderada, el proceso de auto-oxidación de los lípidos en los alimentos es relativamente lento (Marmesat *et al.*, 2010). Sin embargo, a altas temperaturas, las reacciones térmicas se aceleran drásticamente (Dobarganes *et al.*, 1988). Los hidroperóxidos prácticamente están ausentes por sobre de los 150°C, indicando que su velocidad de descomposición es superior, en comparación a la de su formación. A su vez, por el efecto de la exposición de materia grasa a elevadas temperaturas por períodos prolongados, las reacciones más importantes que ocurren son la dimerización y polimerización (Fennema, 1985).

Los dímeros cíclicos se originan a elevadas temperaturas, mediante la reacción de Diels – Alder, cuyo producto final es un ciclohexeno tetrasustituido. Así, si la unión ocurre entre dos ácidos grasos del mismo triglicérido son dímeros intramoleculares y entre dos moléculas de triglicéridos son dímeros intermoleculares. Los dímeros acíclicos en cambio, son aquellos que se forman por el mecanismo de unión de radicales libres. El dímero a su vez, puede derivar en polímeros que tienen un alto peso molecular (692 a 1,600 Daltons) y que se forman por la combinación de -CC-, -COC-, -COOC-, oxígeno y dienos conjugados (Moreira *et al.*, 1999; Choe y Min, 2009). La polimerización se produce más fácilmente en aceites con un alto contenido en ácidos grasos linoleico y linolénico (Choe y Min, 2009); también pueden formarse isómeros *trans*, posicionales y monómeros cíclicos. Estos últimos, cuando existen dienos conjugados en la molécula, 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).

A su vez, los compuestos generados por la termo-oxidación pueden ser volátiles y no volátiles (Choe y Min, 2006; Yanishlieva y Marinova, 2001). Los primeros, por su naturaleza, se eliminan en gran parte durante el proceso, mientras que los componentes no volátiles son un grupo variado, tales como: los dímeros de triacilglicerol y polímeros, siendo estos, los principales compuestos formados en aceites térmicamente oxidados (Choe y Min, 2009; Marmesat *et al.*, 2007). Por lo tanto, las reacciones termo-oxidativas son responsables del sabor deseable, el color y la textura de los alimentos, pero también de la formación de constituyentes indeseables que afectan la calidad y el valor nutricional de la fuente lipídica y de los alimentos (Velasco y Dobarganes, 2002; Kalantzakis y Blekas, 2006).

Consecuentemente, el conocimiento de los factores que afectan el deterioro de los lípidos han permitido a la industria de alimentos manejar y retardar la oxidación mediante diversas estrategias, siendo el uso de antioxidantes sintéticos la herramienta más ampliamente utilizada (Yanishlieva, 2004).

1.2.- Antioxidantes alimentarios.

Un antioxidante se ha definido como cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de aquel sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1989; Sies, 1993; Halliwell, 1995). Los compuestos antioxidantes pueden captar radicales libres, iones de metales o donar un hidrógeno para su estabilización y así aumentar la vida útil de los alimentos y retardar el proceso de la oxidación lipídica, que es uno de los principales motivos de deterioro de éstos (Halliwell, 1997).

Dentro de la gama existente de antioxidantes, éstos se han clasificado como

naturales y sintéticos. Entre los sintéticos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran compuestos fenólicos tales como: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), terbutil hidroquinona (TBHQ) y propil galato (PG). Sin embargo, el BHA y BHT han sido restringidos por normas legislativas debido a la controversia sobre sus posibles efectos tóxicos y cancerígenos (Sherwin, 1990). Por esta razón, en los últimos años ha aumentado el interés, por la búsqueda de antioxidantes provenientes desde fuentes naturales, especialmente de origen vegetal y que contengan compuestos fenólicos (Gülçin, 2005).

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos bioactivos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Pokorny y Revobla, 1999). Un ejemplo lo constituyen los polifenoles, los cuales son sintetizados por los vegetales, como producto de su metabolismo secundario. Estos son indispensables para las funciones fisiológicas de los vegetales, tales como su participación en el mecanismo de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). La clasificación de los polifenoles se realiza en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales que presentan estos anillos; siendo los principales grupos de polifenoles los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos (Gülçin, 2006). De los taninos derivan las procianidinas, que son metabolitos secundarios vegetales presentes en frutas, frutos secos, semillas, especias y hortalizas (Gu *et al.*, 2003). Las procianidinas también se conocen como taninos condensados y sus principales unidades constitutivas son (+) - catequina, (-) - epicatequina, (+) - galocatequina y (-) - epigalocatequina 3 galato. Estos flavan-3-ol oligoméricos y poliméricos se unen principalmente por enlaces C4-C8 y C4-C6 (Bittner *et al.*, 2013). Los múltiples grupos hidroxilo fenólicos de las procianidinas pueden tener capacidad antioxidante *in vitro* (Dorenkott *et al.*, 2014).

Otros compuestos con actividad antioxidante corresponden a los tocoles (Gülçin, 2005; Arashisar *et al.*, 2004), los cuales pueden ser clasificados como tocoferoles y tocotrienoles y dentro de cada una de estas dos clases, hay cuatro isómeros (α , β , γ y δ). Estos están formados por un anillo cromano, con un grupo hidroxilo que

puede donar un átomo de hidrógeno a los radicales libres y una cadena lateral hidrofóbica (Burton y Inglot, 1981). Los tocoferoles se encuentran principalmente en aceites vegetales, frutos secos y semillas (Mohdaly *et al.*, 2011).

En este contexto, los extractos vegetales obtenidos a partir de distintas partes de las plantas (flores, semillas, hojas, etc), constituyen una fuente de antioxidantes naturales que presentan en la mayoría de los casos, un conjunto de compuestos bioactivos (polifenoles y otros componentes) con actividad antioxidantes. Si bien, en los extractos vegetales no es posible determinar el efecto antioxidante que ejerce cada compuesto en forma individual (Benavente- García *et al.*, 2000), en muchos casos, se observa que los extractos presentan actividad antioxidante. Por esto, en este estudio se obtendrán y estudiarán extractos hidroalcohólicos y acuosos obtenidos desde cáscaras de palta y hojas de palto.

1.3.- Secado por atomización.

El proceso de secado por atomización es una operación unitaria que consiste en la transformación de una solución o dispersión en un material seco particulado (Calvo *et al.*, 2010). Finalmente, se obtiene un extracto en polvo, que tiene como ventaja en comparación con un extracto líquido, menor susceptibilidad al desarrollo de contaminación microbiológica, menores costos de almacenamiento e implica un ingrediente con mayor concentración y estabilidad de los compuestos bioactivos de interés (Oliveira *et al.*, 2006). De este modo, en este estudio se utilizarán extractos de cáscaras de palta y hojas de palto secados por atomización, usando Capsul® como carrier. Capsul es un almidón químicamente modificado con un componente lipofílico en su estructura, característica que podría mejorar la dispersabilidad de los extractos estudiados en el aceite.

1.4.- Palto: Fuente de antioxidantes naturales.

El palto (*Persea americana* Mill.), conocido también como aguacate o avocado, es un árbol de hoja perenne originario del continente americano, siendo una especie frutal perteneciente a la familia de las lauráceas y que puede alcanzar 12 m de altura (Odepa, 2010). En Chile, el cultivo del árbol de palto es de gran importancia, con más de 32.000 ha plantadas las cuales se distribuyen mayoritariamente en las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana, que concentran más de 90% de la superficie nacional plantada. Las variedades de palta más importantes en Chile corresponden a Fuerte, Negra de La Cruz, Bacon y Hass, siendo esta última la única que se produce durante todo el año y es la más cultivada a nivel nacional (87% del total de la producción anual) (Simfruit, 2014).

Como consecuencia de la gran producción agroindustrial del palto, se producen importantes contenidos de subproductos de esta materia prima, tales como las hojas del palto y la cáscara del fruto. En las hojas del palto, se han descrito contenidos de polifenoles desde 1750 hasta 1930 EAG mg/100g materia seca (Torres *et al.*, 1987), donde los principales polifenoles identificados son los ácidos: cafeíco, clorogénico, cumárico, ferúlico, gálico, hidroxibenzoico, protocatéquico, pirocatequico, resorcílico, sinápico, siríngico y vaníllico (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- β -glucopiranosido, kaempferol 3-O-ramnopiranosido, luteolina, luteolina 7-O-glucosido, rutina, quercetina, quercetrina, quercetina 3-O-arapiranosido, quercetina 3-O- β -glucopiranosido, quercetina 3-O- β -D glucosido y epicatequina (De Almeida *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2007; Owolabi *et al.*, 2010).

A su vez, en la cáscara de palta se ha reportado que el contenido total de polifenoles en promedio es de 457 mg EAG/100g (Terasawa *et al.*, 2006) y en la variedad Hass se ha reportado un contenido de 1260 mg EAG/100g (Wang *et al.*, 2010) siendo identificados compuestos tales como, 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-rutinósido, quercetina 3-O-arabinosilglucósido, 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).

1.5.- Métodos de evaluación de termo-oxidación en matrices lipídicas

La evaluación del deterioro termo-oxidativo de una materia grasa, se realiza mediante la determinación de compuestos secundarios que son formados luego del proceso de oxidación. Entre éstos se encuentra la determinación de compuestos polares, propuesta por Dobarganes *et al.* (1988) y que actualmente corresponde al método oficial (IUPAC, 2000). Este se basa en el fraccionamiento de una materia grasa a través de una columna de sílice activada, mediante elución con solventes orgánicos como lo son el éter de petróleo y éter etílico, 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, 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 este contexto, la adición de los extractos de palto a una matriz lipídica (aceite de girasol) sometida a una temperatura de 180°C, disminuiría la formación de compuestos de degradación, ya que estos extractos presentan una gran variedad de polifenoles, los cuales actúan como donadores de átomos de hidrógeno a los radicales libres primarios (peroxil) formados durante el calentamiento del aceite (Houhoula *et al.*, 2003). Para que los polifenoles actúen como antioxidantes deben ser estables a altas temperaturas, aunque se ha descrito que algunos productos de descomposición de los polifenoles son capaces de donar hidrógeno

nuevamente, a pesar de ser sometidos a altas temperaturas (Murakami *et al.*, 2004).

Así, se ha estudiado la estabilidad térmica a altas temperaturas (180°C) de aceites adicionados con diversos extractos vegetales, tales como: sésamo (Gehan, 2014), granada (Esposito *et al.*, 2014), romero (Alizadeh *et al.*, 2014), maíz (Marina *et al.*, 2014), malva real (*Althea rosea L.*), achicoria (*Cichorium intybus L.*) (Raza *et al.*, 2014). Sin embargo, estos estudios han proporcionado resultados controversiales y no concluyentes.

De acuerdo a estos antecedentes, los subproductos de palto (cáscara y hojas), podrían ser potenciales fuentes de antioxidantes naturales, para ser aplicados en alimentos. Sin embargo, estudios relacionados con el efecto de extractos de palto en la termooxidación de materias grasas son escasos (Terasawa *et al.*, 2006; Rodríguez-Carpena, *et al.*, 2011a, b), lo que motivó el estudio de estas materias primas en esta tesis.

Hipótesis

La adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo a aceite de girasol (AG), mejorará la estabilidad termo-oxidativa (180°C), en comparación al aceite girasol sin la adición de extracto (control).

Objetivos del proyecto

Objetivo General:

Estudiar el efecto de la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo, sobre la estabilidad termo-oxidativa de aceite de girasol sometido a 180°C.

Objetivos Específicos:

- 1.- Elaborar y caracterizar los extractos de cáscara de palta y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en forma líquida y en polvo (secado por atomización).
- 2.- Caracterizar químicamente el aceite de girasol.
- 3.- Estudiar la termo-oxidación de aceite de girasol sometido a 180°C, con y sin la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) en polvo, evaluando la formación de compuestos polares y la degradación de tocoles.

Materiales y métodos

2.1.- Materiales

- Las hojas de palto y cáscaras del fruto, ambos de la variedad Hass, fueron 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 S.A., Chile.
- Modelo lipídico: aceite de girasol (AG) (*Helianthus annuus*) sin antioxidantes sintéticos, marca Natura®, se adquirió en un supermercado local.
- Antioxidante sintético: BHA (butil hidroxianisol), 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.

Cáscara y hojas, en forma independiente, fueron escaldadas en agua a 90°C por 3 min y secadas en estufa a temperatura de 45°C por 18 h, en oscuridad. Las cáscaras y hojas secas se molieron y 400 g de cada una fueron maceradas en 2 L de etanol/agua (50:50 v/v) (extracto hidroalcohólico) o agua (extracto acuoso) con agitación constante durante las primeras 6 h y luego por otras 66 h sin agitación, siempre a temperatura ambiente y oscuridad. Luego, los extractos se filtraron y congelaron 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 alimentaron a un secador por atomización (Spray-Dryer Büchi B-290), a una temperatura del aire de entrada de 140°C y utilizando Capsul como carrier en una proporción de 5%.

2.3.- Caracterización de los extractos de palto (acuosos e hidroalcohólico), de la cáscara y hojas en polvo.

La caracterización de los extractos de cáscara de palta y hojas de palto hidroalcohólico (EHCP y EHHP) y acuosos (EACP y EAHP) incluyeron la determinación del contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante (métodos FRAP y DPPH) y contenido de tocoferoles.

2.3.1.- Determinación del contenido de polifenoles totales.

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 cafeíco) utilizando una curva de calibración (200–600 mg/mL, R^2 0.9901) expresada como equivalentes a ácido cafeíco (EAC).

2.3.2.- Determinación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante de los extractos de cáscara de palta y hojas de palto (EACP, EAHP, EHCP y EHHP) se determinó aplicando los métodos de 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, 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 EC₅₀, 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 Fe⁺³ a 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.

La determinación de tocoferoles en los extractos de cáscaras de palta y hojas de palto (EACP, EAHP, EHCP y EHHP) 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 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 Si-60 (5µm, 4 mm d.i. x 250 mm, Merck, Alemania).

2.4.- Caracterización de aceite de girasol.

El AG se caracterizó por su perfil en ácidos grasos por GC (AOAC, 2003), índice de peróxido (AENOR, 1991), acidez libre (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 de palta y hoja de palto en polvo.

Sistemas lipídicos estudiados:

- AG control (sin adición de extractos de palto)
- AG adicionado con una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles de extracto acuoso de hojas (AG+EAHP)
- AG adicionado con una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles de extracto acuoso de cáscaras (AG+EACP)
- AG adicionado con una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles de extracto hidroalcohólico de hojas (AG+EHHP)
- AG adicionado con una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles de extracto hidroalcohólico de cáscaras (AG+EHCP)
- AG adicionado con una concentración equivalente a 200 ppm de antioxidante sintético (AG+BHA)

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

La adición de los extractos de cáscara de palta (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 de AG. 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 que contenían 5 g de AG con y sin la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto (acuoso e hidroalcohólico) o BHA, se colocaron en tubos de vidrio que se calentaron en una placa calefactora a 180°C, con agitación a 175 rpm por 28 h. Los tubos se retiraron a intervalos específicos de tiempo, tomando muestras 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.

Los CP para muestras de los sistemas (AG; AG+EAHP, AG+EACP, AG+EHHP; AG+EHCP; AG+BHA) 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 correspondió a los triglicéridos no alterados y la segunda a los triglicéridos alterados o compuestos polares totales.

2.5.3.- Determinación de tocoles.

La determinación de tocoferoles para las muestras de los sistemas (AG; AG+EAHP, AG+EACP, AG+EHHP; AG+EHCP; AG+BHA) 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.

Las determinaciones de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos, se realizaron en triplicados 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 cáscara de palta y hojas de palto.

3.1.1.- Contenido de polifenoles totales.

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

Tabla 1: Contenido total de polifenoles (CPT) de extractos de cáscara de palta y hojas de palto, antes y después del secado por atomización.

Contenido de Polifenoles Totales (mg EAC/ g de MS* de hoja o cáscara)		
Extracto	Extracto	Extracto en polvo
EHCP	77,6 ± 5,1 ^{b,D}	166,2 ± 4,6 ^{d,G}
EACP	53,7 ± 4,1 ^{a,B}	89,2 ± 0,7 ^{b,E}
EHHP	51,6 ± 0,3 ^{a,B}	134,0 ± 1,1 ^{c,F}
EAHP	47,6 ± 3,3 ^{a,A}	67,8 ± 2,5 ^{a,C}

EAC: equivalente a ácido cafeíco; 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 ($p < 0,05$), letras minúsculas indican diferencias en un mismo extracto, letras mayúsculas indican diferencias entre extractos (extracto vs extracto en polvo). *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 que el CPT varió en un rango entre 47,6 y 77,6 mg EAC/ g MS de hoja o cáscara, para los extractos antes del secado por atomización y entre 67,8 y 166,2 mg EAC/ g MS de hoja o cáscara, para los extractos en polvo (secados por atomización).

Valores de CPT en extractos de cáscara de palta (cv. Hass) menores al de este estudio reportó Wang *et al.* (2010) en un extracto acetona: agua: ácido acético (70:29.7:0.3, v/v/v) (12,6 mg EAG/ g de cáscara seca liofilizada), Rotta *et al.*

(2016) para un extracto metanólico (10,85 mg EAG/g cáscara secada en horno), Rodríguez-Carpena *et al.* (2011b) en un extracto con etil acetato; (32,93 mg EAG/g de cáscara seca) y Oboh *et al.* (2013) en un extracto con HCl/metanol (1:1 v/v) (30,01 mg EAG/g de cáscara seca). Por otro lado, valores similares o superiores al de este estudio de 89,97 y 78,41 mg EAG/g de cáscara seca para extractos con acetona/agua y metanol/agua (70:30 v/v) reportó Rodríguez-Carpena *et al.* (2011b) y de 77,13 mg EAG/g de cáscara liofilizada para un extracto metanol/agua (1:1 v/v) reportó Chávez *et al.* (2011).

En los extractos de cáscara de palta, el extracto hidroalcohólico presentó un contenido significativamente mayor de CPT, respecto al extracto acuoso. Se reportó que el uso de etanol/agua como solvente de extracción es más eficaz en la extracción de compuestos fenólicos respecto al agua (Mello *et al.*, 2010). La mayoría de los compuestos fenólicos presentes en las matrices vegetales se almacenan en las vacuolas y se extraen comúnmente con disolventes alcohólicos u orgánicos (Ganhão *et al.*, 2010; Alothman *et al.*, 2009; Turkmen *et al.*, 2006). Sin embargo, es difícil desarrollar una norma de procedimiento de extracción de polifenoles, porque la estructura química y en particular la polaridad de los compuestos fenólicos en cada tejido determina en gran medida la capacidad de extracción y consecuentemente, la eficiencia del disolvente para la extracción (Rodríguez-Carpena *et al.*, 2011b).

En hojas de palto (cv. Hass) Oboh *et al.* (2013) reportó un valor de CPT de 43,82 mg EAG/g de hoja de palto seca), siendo este valor comparable a los encontrados en este estudio para EHHP y EAHP (51,6 y 47,6 mg EAC/g hoja seca, respectivamente)

Por lo tanto, estos resultados demuestran que tanto el proceso de extracción, como el disolvente utilizado tiene un impacto significativo en la extracción de CPT. Sin embargo, la comparación entre trabajos es compleja debido a diferencias tanto en el método de extracción como en la expresión de los resultados (equivalente de ácido gálico, ácido cafeico, entre otros) y condiciones agronómicas (época de cosecha, cultivar y zona geográfica entre otros). Dichas variaciones demuestran el

desafío que significa estandarizar la obtención continua de extractos antioxidantes desde fuentes naturales.

En el caso de los extractos en polvo (secados por atomización), estos presentaron un contenido de CPT significativamente mayor ($p < 0,05$) en relación a los extractos (antes del secado por atomización). Estas diferencias se deberían a que a altas temperaturas (como las de secado por atomización) se produce desglicosilación de los polifenoles glicosilados, liberando azúcares, los cuales reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se ha descrito en la literatura que el reactivo de Folin no es específico para polifenoles, reaccionando con moléculas reductoras como azúcares y vitamina C entre otras (Prior *et al.*, 2005, Fernández-Pachón *et al.*, 2006; Ghiselli *et al.*, 2000).

3.1.2.- Actividad antioxidante.

La tabla 2 presenta los valores obtenidos para FRAP y DPPH (expresado como EC_{50}) en los extractos de cáscara de palta y hojas de palto (hidroalcohólico y acuoso) antes y después del secado por atomización.

Tabla 2: Actividad antioxidante (FRAP y DPPH) de extractos de cáscara de palta y hojas de palto, antes y después del secado por atomización.

Extracto	FRAP (mmol Fe^{+2}/g)		$EC_{50}(mg/mL)$	
	Extracto	Extracto en polvo	Extracto	Extracto en polvo
EHCP	0,57±0,005 ^{d,D}	1,33±0,022 ^{c,F}	0,048±0,0002 ^{a,V}	0,043±0,0005 ^{a,U}
EACP	0,17±0,005 ^{a,A}	0,81±0,013 ^{b,E}	0,061±0,0004 ^{c,X}	0,052±0,0056 ^{b,W}
EHHP	0,22±0,004 ^{b,B}	0,83±0,096 ^{b,E}	0,055±0,0004 ^{b,W}	0,063±0,0004 ^{c,X}
EAHP	0,25±0,002 ^{c,B}	0,45±0,003 ^{a,C}	0,106±0,0007 ^{d,Z}	0,075±0,0002 ^{d,Y}

EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palta; EACP: extracto acuoso de cáscara de palta; EHHP: extracto hidroalcohólico de hojas de palto; EAHP: extracto acuoso de hojas de palto. . Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas indican diferencias en un mismo extracto, letras mayúsculas indican diferencias entre extractos (extracto vs extracto en polvo).

Los resultados de la tabla 2, muestran que los valores obtenidos presentan diferencias significativas entre todos los extractos ($p < 0,05$), evidenciando que tanto el origen (hoja o cáscara) o método utilizado (FRAP o DPPH) influyen en estos resultados.

La AA varió en un rango entre 0,17 a 0,57 (mmol Fe^{+2}/g) para FRAP para los extractos antes del secado por atomización y entre 0,45 a 1,33 (mmol Fe^{+2}/g) para los extractos en polvo, siendo estos resultados significativamente mayores ($p < 0,05$).

La comparación de los resultados FRAP de este estudio para los extractos de cáscara de palta y hojas de palto (cv. Hass) y la literatura es escasa. Es así que, Rotta *et al.* (2016) estudiaron la capacidad antioxidante de la cáscara de palta obteniendo para un extracto líquido un valor de 0,00956 mmol Fe^{+2}/g y un valor para extractos metanólicos de cáscara deshidratada de 0,422 mmol Fe^{+2}/g . Ambos valores fueron inferiores (especialmente el primero) a lo encontrado en este estudio en los extractos secados por atomización. A su vez, Oboh *et al.* (2013), determinaron valores de 29,52 y 34,64 mg EAA (equivalentes a ácido ascórbico) /g para hoja y cáscara respectivamente, utilizando HCl/metanol (1:1 v/v) como disolvente de extracción, lo cual debido a las diferentes expresiones de resultados hace difícil una comparación entre ambos estudios pero que, infiriendo de los resultados expuestos, un buen método de secado y la elección del solvente apropiados ayudaría a obtener una mayor cantidad de antioxidantes.

En cuanto al DPPH expresado como EC_{50} varió entre 0,048 y 0,106 (mg/mL) para los extractos antes del secado por atomización y entre 0,043 a 0,075 (mg/mL) para los extractos en polvo y al igual que con la AA, los extractos son significativamente mayores ($p < 0,05$), excepto para EHHP puesto que muestra un mayor valor EC_{50} respecto a la muestra previo al secado, recordando que el índice EC_{50} muestra valores inversamente proporcionales a la capacidad antioxidante de una muestra. Estas diferencias se pueden deber a lo explicado anteriormente, es decir, al

momento de hacer la medición de CPT, el método de Folin-Ciocalteu puede responder positivamente a azúcares reductores, afectando de esta manera el resultado final en la medición de la actividad antioxidante para este extracto.

En comparación de los resultados para DPPH con la literatura, se encuentran a algunos autores tales como, Oboh *et al.* (2013) que estudiaron la capacidad antioxidante de los extractos de palta (cv. Hass) expresando sus resultados como EC₅₀, reportando para la cáscara 0.076 mg/mL y para las hojas 0,072 mg/mL. Ambos valores fueron levemente mayores a los determinados, en general, en este estudio. Owusu *et al.* (2015) por su parte, expresaron sus resultados EC₅₀ (g/mL hoja seca) obteniendo valores de $4,15 \times 10^{-30}$; $5,52 \times 10^{-10}$; $6,57 \times 10^{-5}$ para extractos de acetato de etilo, metanol y cloroformo respectivamente para hojas secadas por aire seco, reconociendo entonces las capacidades antioxidantes que poseen las hojas de palto. A su vez, Kosinska *et al.* (2012) obtuvieron un valor en EC₅₀ de 0,358 mg/mL para un extracto de hojas (cv. Hass) metanólico (80%) secado por liofilización, siendo este resultado muy superior a los obtenidos en el presente estudio.

A su vez, los resultados de FRAP y EC₅₀, muestran que el EHCP presentó una mayor actividad antioxidante (tanto para los extractos previos al secado como para los extractos en polvo), en comparación a los otros extractos. Los valores de EC₅₀ también nos deja ver que la cáscara de palta tiene una mayor actividad antioxidante que las hojas de palto y esto podría atribuirse por el perfil de polifenoles reportado por Chávez *et al.* (2011) y Terasawa *et al.* (2006), donde dejan en evidencia que los extractos de cáscara de palta poseen un alto contenido de catequina y epicatequina. A esto se suma, lo publicado por Wang *et al.* (2010) y Rodríguez-Carpena *et al.* (2011a) donde demostraron que la cáscara de palta tenía una alta actividad antioxidante puesto que la cáscara de la palta es muy rica en procianidinas por lo cual, la AA presente en los extractos se debe a la presencia de diversos polifenoles y otros compuestos menores con capacidades antioxidantes, descartando que los T (tocolos) den un aporte adicional (puesto que

mediante un análisis químico previo, éstos no están presentes en los extractos), lo cual se infiere que debido a la polaridad que presentan los T, los solventes (etanol/agua y agua) no fueron capaces de arrastrar T provenientes tanto de las hojas como de la cáscara de palta.

3.2.- Caracterización del aceite de girasol.

En la tabla 3 se presenta la caracterización química del aceite de girasol (AG) utilizado para realizar los ensayos de termo-oxidación.

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

Aceite de girasol (AG)	
% ésteres metílicos	
Ac. Palmítico C16:0	6,2
Ac. Esteárico C18:0	3,8
Ac. Elaídico C18:1 w9 t	0,1
Ac. Oleico C18:1 w9	24,5
Ac. Oleico C:18 1 isóm	trazas
Ac. Linoleico C18:2 w6 tt	trazas
Ac. Linoleico C18:2 w6	62,4
Ac. Linolénico C18:3 w3	0,2
mg/kg Aceite	
α-Tocoferol	589 ± 4
β-Tocoferol	trazas
δ-Tocoferol	trazas
γ-Tocoferol	trazas
Total	589 ± 8,3
AGL (% ác. Oleico)	0,07 ± 0,114
IP (meqO ₂ / Kg)	1,18 ± 0,001
CP %	4,45 ± 0,11

AG, aceite de Girasol; AGL, ácidos grasos libres; IP, índice de peróxidos; CP, compuestos polares; α-T, alfa-tocoferol.

El perfil en ácidos grasos del aceite de girasol (AG), mostró en general, un alto grado de poliinsaturación representado mayoritariamente por el ácido linoleico (C18:2 ω 6) alcanzando un 62,4%. Estos resultados fueron concordantes con lo descrito por Sebedio *et al.* (1996).

Los parámetros químicos medidos para el AG tales como: ácidos grasos libres (AGL, 0,07% ácido oleico) e índice de peróxidos (IP, 1,18 mEqO₂ peróxido/ Kg AG), cumplieron con los parámetros establecidos en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA, 1996) para su consumo. Estos resultados son comparables con los reportados por Robert *et al.* (2001) con valores de AGL y IP de 0,06 % ácido oleico y 2,00 mEqO₂ peróxido/kg aceite, respectivamente.

El contenido de α -Tocoferol (589 mg/Kg AG) fue superior a los valores publicados por Lechner *et al.* (1999) de 425 mg/kg aceite y Monge-Rojas y Campos (2011) con 50 mg/kg aceite y menor a lo reportado por Branco (2009) y Kamal-Eldin (2006) con valores de 666 mg/kg y 671 mg/kg, respectivamente.

El valor inicial para los compuestos polares (CP) fue de 4,45 %, dentro del rango descrito en la literatura por Lumley (1988) (0,4-6,4%) y Urbancic *et al.* (2014) (4,01 %).

3.3.- Estabilidad oxidativa del aceite de girasol sin y con la adición de extractos de cáscara de palta y hojas de palto en polvo.

La estabilidad oxidativa, de los sistemas lipídicos de AG control (AG sin la adición de extractos), AG con la adición equivalente a 200 ppm de antioxidante sintético BHA (AG+BHA) y AG con la adición de extracto de cáscara de palta y hojas de palto en una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles (AG+EHCP, AG+ EACP, AG+EHHP y AG+EAHP), se determinó mediante la formación de CP durante un calentamiento continuo a 180°C por 28 h.

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

El contenido de compuestos polares es una medida representativa de la alteración total de aceites sometidos a calentamiento (Melton *et al.*, 1994). En la Figura 1 se presenta la formación de compuestos polares (expresados en %) en los sistemas de AG sometidos a un calentamiento continuo de 180°C. Los resultados de esta figura muestran que al inicio (0 h) no existen diferencias significativas para el contenido de CP ($p < 0,05$) entre los sistemas estudiados (Anexo 1).

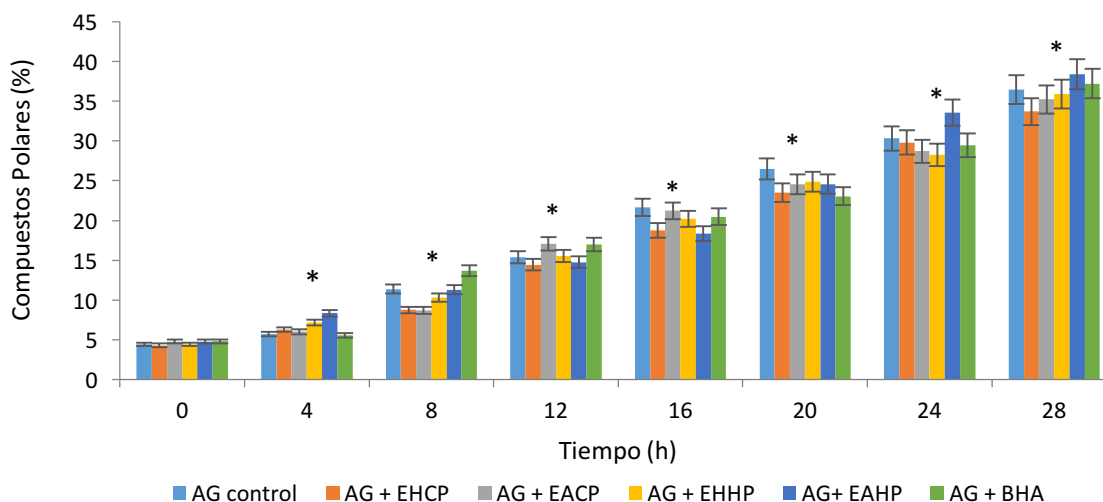


Figura 1: Evolución de CP (%), para los sistemas AG control, AG+EHCP, AG+EACP, AG+EHHP, AG+EAHP y AG + BHA, sometidos a 180°C.

CP: compuestos polares; AG: aceite de girasol; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palta; EHHP: extracto hidroalcohólico de hoja de palto; EAHP: extracto acuoso de hoja de palto; EACP: extracto acuoso de cáscara de palta; BHA: butil hidroxianisol. * indica diferencias significativas

A medida que aumenta el tiempo de calentamiento, aumenta la formación de compuestos polares en todos los sistemas, estos resultados están de acuerdo con aquellos descritos por Matthäus (2006), Bansal *et al.* (2010) y Osawa *et al.* (2012). Además, Takeoka *et al.* (1997) describe que los aceites ricos en ácidos grasos insaturados producen una mayor formación de compuestos polares en relación a los aceites con un mayor contenido de ácidos grasos saturados en su composición.

A las 4 h de calentamiento continuo, la formación de CP fue significativamente menor para el sistema AG+EAHP (8,36%), en comparación al aceite control y a los sistemas adicionados con los extractos. Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo de calentamiento (8 h), la formación de CP fue significativamente menor para los sistemas de AG con extracto de cáscara de palta: AG+EHCP (8,76 %) y AG+EACP (8,74 %). Mientras que, a las 12 h y 16 h CP fue significativamente menor para AG+EHCP (14,44 y 18,76 %, respectivamente) y AG+EAHP (14,76 y 18,38 %). A las 20 h de calentamiento continuo, AG control (26,48 %) sobrepasó el límite de CP de 25 % establecido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (RSA, 1997). A las 24 h de calentamiento, todos los sistemas estudiados superaron el 25 % de CP. Finalmente, a las 28 h de calentamiento, todos los sistemas superaron el 33% de CP, siendo AG+EHCP, el que presentó un contenido de CP significativamente menor (33,7%), en comparación con AG+BHA (37,19 %) y AG+EAHP (38,37 %). Por lo tanto, estos resultados muestran que la adición de EHCP en polvo (equivalente a 400 ppm de polifenoles) al aceite de girasol a 180°C, permitió disminuir significativamente la formación de compuestos polares en AG, en línea con la mayor AA (FRAP y DPPH) en el extracto EHCP.

La mayor actividad antioxidante de EHCP, se puede explicar por el tipo de polifenoles presentes en este extracto, ya que todos los extractos se adicionaron al AG en una concentración equivalente a 400 ppm de polifenoles. Los polifenoles, actúan como donadores de hidrógeno a radicales peroxil formados durante el calentamiento y su potencial antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de sustituyentes dadores de electrones en el anillo estructural (Kuskoski *et al.*, 2005)

En la literatura, no fue posible encontrar estudios que utilizaran los mismos extractos vegetales de este estudio, así como también las condiciones experimentales (temperatura, presencia de oxígeno, entre otros). Sin embargo, se encuentran algunos autores (Farag *et al.*, 2007; Delfanian *et al.*, 2015), que han estudiado el efecto de la adición de otros extractos de origen vegetal retardando la

formación de CP, con respecto a AG control, a temperaturas de fritura (180°C). Es así que Farag *et al.* (2007), estudiaron la adición de jugo de hoja de olivo (cv. *Kronakii*) a AG en diferentes concentraciones en polifenoles (400, 800, 1600 y 2400 ppm) bajo condiciones de calentamiento intermitentemente (180 ± 5 °C) durante 5 h/d por 5 d. Los resultados mostraron que la adición de jugo de hojas de olivo a una concentración de 800 ppm a aceite de girasol mejoró la estabilidad de AG, siendo superior al BHT. Resultados similares se encontraron en el presente estudio, para EHCP (400 ppm de polifenoles), siendo también superior al BHA (200 ppm). Delfanian *et al.* (2015) a su vez, encontraron un mayor efecto protector del extracto metanólico de la hoja de jujubús (*Ziziphus mauritiana* Lam.) adicionado a AG (700 ppm) durante el proceso de fritura (ciclo de calentamiento de 7 min/ 24 h), respecto a AG con antioxidantes sintéticos (BHT, BHA, TBHQ, a 100 ppm) y AG control.

Por otra parte, en todo el periodo de calentamiento, no se observó un efecto antioxidante importante del BHA sobre AG, lo que podría atribuirse a que el BHA, al parecer sería más efectivo en retardar la oxidación en grasas animales que en vegetales (Medina, 1997). Además, la descomposición del BHA se iniciaría alrededor de los 120°C, siendo un compuesto muy volátil en el intervalo de temperatura de entre los 100 a 240°C (Reda, 2011).

Los resultados encontrados en la literatura y en este estudio, sugieren que la adición de antioxidantes naturales (extractos vegetales) a AG como es el caso de EHCP, serían efectivos en mejorar la estabilidad termo-oxidativa a 180 °C de este aceite, mediante una menor formación de CP, por lo que podrían ser utilizados como un sustituto o alternativa frente a los antioxidantes sintéticos, sin embargo, es importante considerar la concentración del extracto adicionado y el tiempo de calentamiento estudiado.

3.3.2.- Evolución de α -tocoferol para los sistemas de AG con extracto de cáscara de palta y hojas de palto.

Una forma de monitorear la oxidación del AG durante el proceso de calentamiento es determinar la concentración de antioxidantes presentes en la materia grasa, especialmente la concentración de tocoferoles (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). Los tocoferoles son los antioxidantes más comunes que se encuentran en los aceites vegetales (Lee *et al.*, 2007) y se cree que la degradación de los tocoferoles durante la oxidación del AG está relacionada con su acción como antioxidante, puesto que los tocoferoles donan su hidrógeno fenólico a los radicales peroxilo ó alquilo del aceite dando como resultado, radicales tocoferoxil y que luego pueden derivar a tocoferoxil semiquinona (Choe y Min, 2009). A esto se suma, que las pérdidas de tocoferol aumentan a medida que aumenta el grado de insaturación del aceite (Kamal-Eldin y Andersson, 1997)

Para la evaluación del contenido de tocoferoles, Decker *et al.* (2005) indicaron que la eficacia antioxidante, puede expresarse como el porcentaje de retención después del tiempo bajo condiciones estandarizadas. Es así que, en la figura 2 se presenta el porcentaje de retención de α -tocoferol (α -T) de los sistemas de AG sometidos a 180°C. Los resultados muestran que, en todos los sistemas estudiados, la concentración de α -T disminuyó a medida que aumentó el periodo de calentamiento a 180°C. Estos resultados están conformes por lo descrito por Rennick y Warner. (2006); Murkovic *et al.* (1997) y Verleyen *et al.* (2001), confirmando que altas temperaturas (180°C) producen una degradación de α -tocoferol en AG.

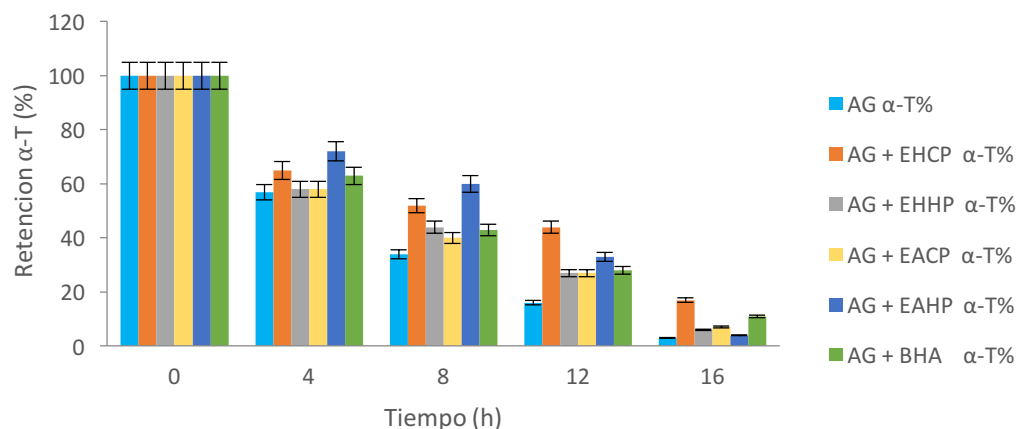


Figura 2: Porcentajes de retención de alfa-tocoferol de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 180°C.

α-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: butil hidroxianisol.

Es así que, la retención de α-tocoferol (Anexo 2) en los distintos sistemas a las 4 h de almacenamiento a 180°C, variaron desde 57 a 72%, teniendo el sistema de AG control la menor retención de α-T. Luego a las 8 y 12 h de calentamiento, no se observaron grandes diferencias sobre la retención de α-T entre los sistemas estudiados. Finalmente, a las 16 h, sólo el sistema AG+EHCP presentó un mayor porcentaje de retención α-T, en comparación a los otros sistemas. Estos resultados son concordantes con las constantes de velocidad de degradación de α-T para los sistemas estudiados.

A su vez, de acuerdo a la figura 3, se observa que, a las 16 h de calentamiento, la constante de degradación de α-T fue significativamente menor ($p < 0,05$) en AG+EHCP ($0,39 \text{ h}^{-1}$) (Anexo 3). Este comportamiento sugiere que α-T, podrían ser regenerados por polifenoles u otros componentes menores presentes en EHCP. Así, Martínez de La Cuesta *et al.* (1995), reportaron que aceites de fritura expuestos a altas temperaturas resisten el deterioro oxidativo, en función del ritmo de destrucción del α-T y a su capacidad de regeneración.

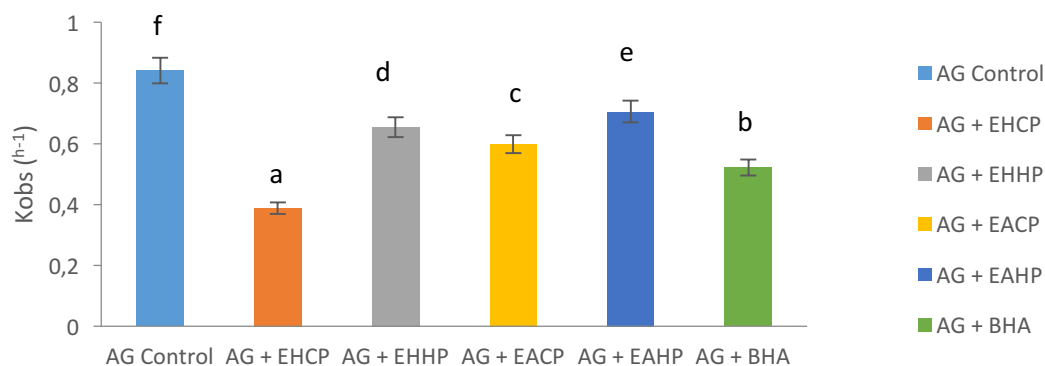


Figura 3: Constantes de velocidad de degradación de alfa-tocoferol (K_{obs} (h^{-1})) de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palta, sometidos a $180^{\circ}C$ a las 16 h.

AG: aceite de girasol; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palta; EHHP: extracto hidroalcohólico de hoja de palta; EAHP: extracto acuoso de hoja de palta; EACP: extracto acuoso de cáscara de palta; BHA: butil hidroxianisol. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos con la literatura, es posible encontrar a autores que han estudiado la degradación de α -T en AG también a $180^{\circ}C$. Es así que, Réblová *et al.* (2009), encontró una retención del 50% de α -T en AG (calentado en placa) a las 1,3 h, lo que indica que la degradación de α -T fue más rápida respecto al presente estudio, donde a las 4 h de calentamiento, se observó una retención para α -T de un 57% para AG control y un rango entre 58 a 72 % para los sistemas de AG con extracto de cáscara de palta y hojas de palta. A su vez, Kreps *et al.* (2016) reportaron una retención de α -T en el AG de 35 % a las 10 h. Esta retención fue superior a la encontrado en este estudio para AG control, con 34 % y 16 % a las 8 h y 12 h, respectivamente. A esto se suma lo reportado por Barrera-Arellano *et al.* (2002) que luego de 8 h de calentamiento de AG a $180^{\circ}C$ perdió el 50% de α -T, siendo este valor concordante con los presentados en el presente trabajo. Por su parte, Fisnar *et al.* (2014) luego de 4 min de calentamiento a $220^{\circ}C$ obtuvieron como resultado que el contenido total de tocoferoles en AG fue aproximadamente 50% del contenido inicial (580 ppm de α -T), con lo cual queda en evidencia la influencia de la temperatura frente a la degradación del α -T.

En este contexto los tocoferoles son muy eficaces para retardar el periodo de inducción, puesto que tanto los tocoferoles como los polifenoles donan hidrógeno a los radicales peroxilo y alquilo de los lípidos y forman especies no radicales más estables (Lucarini *et al.*, 2004). Es así que Velasco y Dobarganes (2002) informaron de la actividad sinérgica de α -tocoferol y compuestos fenólicos en aceite de oliva durante su periodo de almacenamiento. Che Man y Jaswir (2000) en tanto, para el aceite de palma a 180°C reportaron un efecto sinérgico entre extracto de romero y salvia en aceite de palma, mientras Houhoula *et al.* (2003) reportaron el sinergismo entre componentes de un extracto de orégano y aceite de algodón a 180°C.

También Angelo y Neuza (2008) describieron el efecto sinérgico entre el AG y un extracto de cilantro (1600 mg/Kg) por un periodo de 30 h a 180°C, obteniendo como resultado que el extracto de cilantro retardó la oxidación de los lípidos y promovió la retención de α -T en AG. A su vez, Pellegrini *et al.* (2001) informaron la evolución de fenoles totales y α -T a temperaturas de fritura (160-190 °C) en aceite de oliva, obteniendo un contenido similar de α -T y contenidos crecientes de polifenoles, sugiriendo que los polifenoles son estabilizadores efectivos de α -T durante el calentamiento.

En conclusión, en este estudio los resultados indican que, de todos los extractos de palto estudiados, la adición de EHCP en una concentración de 400 mg EAC/Kg de polifenoles, mostró un efecto antioxidante, retardando la formación de compuestos polares hasta las 16 h de calentamiento y aumentó la retención de α -T en AG sometido a 180°C.

Conclusiones

Los extractos de cáscara de palta y hojas de palto, mostraron un aumento en el CPT, después de ser sometidos al secado por atomización. Los extractos hidroalcohólicos de cáscara de palta y hoja de palto, con etanol/agua (50/50 v/v), presentaron una capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales significativamente mayores ($p < 0,05$) en comparación a los extractos acuosos.

El EHCP y EHCP en polvo presentaron el mayor CPT y AA ($p < 0,05$), en comparación a los otros extractos estudiados (EHCP, EAHP y EACP). Además, el EHCP en polvo adicionado a AG retardó la formación de compuestos polares ($p < 0,05$), mejorando la estabilidad termo-oxidativa del AG, por sobre todos los demás sistemas estudiados hasta las 16 h de calentamiento a 180°C.

La cinética de degradación de tocoferoles, reflejada por las constantes de velocidad de degradación, demostró que el EHCP aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) la permanencia del α -tocoferol hasta las 16 h, respecto a los otros sistemas estudiados (AG control, AG+BHA, AG+ EHHCP, AG+EAHP y AG+EACP).

Los extractos de subproductos obtenidos a partir de palto (cáscara y hojas) son fuente de antioxidantes naturales. La capacidad antioxidante de estos extractos y especialmente EHCP, representan una potencial alternativa como antioxidantes naturales para su utilización e incorporación a matrices lipídicas sometidas a altas temperaturas, agregando además a estos subproductos un valor económico.

Bibliografía

AENOR, 1991. Norma UNE 55023-73. Asociación Española de Normalización. Catálogos de Normas UNE, Madrid.

Alizadeh, L., Nayebzadeh, K., Shahin, R., 2014. Antioxidant effect of rosemary and ferulago extracts and synthetic TBHQ on oil oxidation during deep-frying. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 8:135-143

Allothman, M., Bhat, R., Karim, A., 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 115:785–788.

Angelo, P., 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.

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 Edition, Method Ce 8-89.

Arashisar, A., Hisar O., Kaya M., Yanik, T., 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 97:209-214.

Ashton, O., Wong, M., Mcghie, T., Vather, R., Wang, Y., Requejo-Jackman, C., Ramankutty, P., and Woolf, A., 2006. Pigments in Avocado Tissue and Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:10151-10158.

Bansal, G., Zhou, W., Barlow, P., Lo, H., Neo, F., 2010. Performance of palm olein in repeated deep frying and controlled heating processes. *Food Chemistry*. 121:338-347.

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

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., and Del Río, J., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* 0L. Leaves. *Food Chemistry* 68: 457-462.

Benzie, I., Strain, J., 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.

Bittner, K., Rzeppa, S., Humpf, H., 2013. Distribution and quantification of flavan-3-ols and procyanidins with low degree of polymerization in nuts, cereals, and legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:9148–9154.

Branco, V., 2009. Capacidade antioxidante total de oleos vegetais refinados: contribuicao ao estudo de seus determinantes (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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., 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.

Burton, G., Inglot, K., 1981. Autoxidations of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 103: 6472-6477.

Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M., González-Gómez, D., 2010. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray drying: Influence of wall material and olive quality. *European Journal of the Lipid Science Technology*. 112:852–858.

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: 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.

Choe, E, Min, D., 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Food Science and Food Safety*. 5:169–86.

Choe, E, Min D., 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Food Science and Food Safety*. 8:345–358.

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

De Almeida, A., Miranda, M., Simoni, I.C., Wigg, M., and Lagrota, M., 1998. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (*Lauraceae*) leaf infusion. *Phytotherapy Research*. 12:562–567.

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

Delfanian, M., Kenari, R., Sahari, M., 2015. Antioxidative effect of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit skin extract in soybean oil. *Food Science and Nutrition Journal*. 3:74–80.

Ding, H., Chin Y., Kinghorn A., and D'Ambrosi S. 2007. Thermo preventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*. 17: 386-394.

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

Dorenkott, M., Griffin, L., Goodrich, K., Thompson-Witrick, K., Fundaro, G., Ye, L., Stevens, J., Ali, M., O'Keefe, s., Hulver, M., Neilson, A., 2014. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62:2216–2227.

Esposito, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Urbani, S., Veneziani, G., Selvaggini, R., Sordini, B., Servili, M. 2014. Effect of an olive phenolic extract on the quality of vegetable oils during frying. *Food Chemistry*. 176:184-92.

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., 1985. Foods Chemistry. In: Lipids. Editorial Marcel Dekker Inc. Unit State. 139 – 244.

Fernández-Pachón, M., Villaño, D., Troncoso, A., García-Parrilla, M., 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 5:110-122.

Fisnar, J., Dolezal, M., Réblová, Z., 2014. Tocopherol losses during pan-frying. Euro Fed Lipid. 116:1694–1700.

Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M., Morcuende, D., 2010. Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsify raw pork burger patties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58:8854–8861.

Gehan, A., Kahled, M., 2014. Oxidative stability of ghee as affected by natural antioxidants extracted from food processing wastes. Annals of Agricultural Sciences. 59: 213–220.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C., 2000. Total antioxidant capacity is a tool to asses redox status: critical view and experimental data. Free Radical Biology and Medicine. 29:1106-1114.

Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., 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

Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) sedes. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 56: 491–499.

Gülçin, İ., 2006. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitin. *Life Sciences*. 78: 803–811.

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

Halliwell, B., 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*. 55:44-52.

Halliwell, B., Gutteridge, J., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press.

Hirasawa, M., Shimura, K., Shimizu, A., Mura, K., Tokue, C., and 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*. 55:95-101.

Houhoula, P., Oreopoulou, V., Tzia, C., 2003. Antioxidant efficiency during frying and storage of potato chips. *Journal of Science Food and Agriculture*. 83:1499–1503.

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

Kamal-Eldin, A., Andersson, R., 1997. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 74:375–380.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist L., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 31:671–701.

Kamal-Eldin, A., 2006. Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108:1051-1061.

Kalantzakis, G., Blekas, G., 2006. Stability and radical-scavenging activity of heated olive oil and other vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108: 329–335.

Kreps, F., Kyselka, J., Burcov, Z., Schmidt, S., Filip, V., Dubaj, T., Gajdos, P., Certk, M., 2016. Synthesis and analysis of tocopheryl quinone and tocopherol esters with fatty acids in heated sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 118:788– 802.

Kosinska, A., Karamác, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B., and 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: 4613–4619.

Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., Fett, R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnología de Alimentos, Campinas*. 25: 825-827.

Lechner, M., Reiter, B., Lorbeer, E., 1999. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*. 857:231-238.

Lee, J., Lee, Y., Choe, E., 2007. Temperature dependence of the autoxidation and antioxidants of soybean, sunflower, and olive oil. *European Food Research and Technology*. 226:239.

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.

Lucarini, M., Pedulli, G., Guerra, M., 2004. A critical evaluation of the factors determining the effect of intramolecular hydrogen bonding on the o—h bond dissociation enthalpy of catechol and of flavonoid antioxidants. *Chemistry European Journal*. 10:933.

Lumley, I., 1988. Polar compounds in heated oils. In G. Varela, A. E. Bender, and I.D. Morton (Eds.), *Frying of food. Principles, changes, new approaches*. 166–173

Marina, A., Wan Rosli, W., and Neoh, S., 2014. Frying Quality of Virgin Coconut Oil as Affected by *Zea mays* extract (Kualiti Menggoreng Minyak Kelapa Dara Disebabkan oleh Ekstrak *Zea mays*). *Sains Malaysiana Journal*. 43: 1311–1315.

Marmesat, S., Rodrigues, E., Velasco, J., Dobarganes, C., 2007. Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties. *International Journal of Food Science and Technology*. 42: 601-608.

Marmesat, S., Morales, A., Velasco, J., Dobarganes, M., 2010. Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *Grasas y Aceites*. 61:333-340.

Marmot M., 2011. Fruit and vegetable intake reduces risk of fatal coronary heart disease. *European Heart Journal*. 32: 1182- 1183.

Márquez-Ruiz, G., Dobarganes, M.C., 1996. Nutritional and physiological effects of used frying fats, in deep frying. In E.G. *Nutritional and Practical Applications*. AOCS Press. 160-182.

Martínez de La Cuesta, P., Ruiz-Martínez, E., Galeano-Chaparro, M., 1995. Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales en presencia de α - tocoferol. *Grasas y Aceites*. 46:349–353.

Matthäus, B., 2006. Utilization of high-oleic rapeseed oil for deep-fat frying of French fries compared to other commonly used edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108:200–211.

Mattivi, F., 2004. Antioxidantes polifenólicos naturales en la dieta. *Dietas mediterráneas: la evidencia científica*. Pontificia Universidad Católica de Chile. 99 - 112.

Medina, L., 1997. Protección de aceites con antioxidantes. *Soya noticias*. 251:6-10.

Mello, B., Petrus, J. and Hubinger, M., 2010. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*. 96:533–539.

Melton, S., Jafar, S., Sykes, D., Trigiano M., 1994. Review of stability Measurements for frying oils and fried food flavor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 12:1301-1308.

Mohdaly, A., Smetanska, I., Ramadanc, M., Sarhanb, M., and 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.

Monge-Rojas, R., Campos, H., 2011. Tocopherol and carotenoid content of foods commonly consumed in Costa Rica. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 202-216.

Moreira, R., Castell-Perez, M., Barrufet, M., 1999. Deep fat frying: fundamentals and applications. *Food Engineering Series*. Gaithersburg, MD: Aspen. 84-139.

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.

Murkovic, M., Wiltschko, D., Pfannhauser, W., 1997. Formation of α -tocopherolquinone and α -tocopherolquinone epoxides in plant oil *Lipid*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Technol. 99:165–169.

Oboh, G., Adelusi, T., Akinyemi, A., 2013. Inhibitory effect of phenolic extract from leaf and fruit of avocado pear (*Persea americana*) on Fe^{+2} induced lipid peroxidation in rats' pancreas *in vitro*. *FUTA Journal of Research in Sciences*. 9:276-286.

ODEPA, 2010. Características generales de la palta. Disponible en <http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2307.pdf> [Leído: 1 de diciembre, 2016.]

Oliveira, W., Bott, R., Souza, C., 2006. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal brazilian plants. *Drying Technology*. 24: 523–533.

Osawa, C., Gonçalves, L., Gumerato, H., Mendes, F., 2012. Study of the effectiveness of quick tests based on physical properties for the evaluation of used frying oil. *Food Control*. 26:525–530.

Owolabi, M., Jaja, S., Coker, H., 2010. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia*. 76:567-573.

Owusu, N., Saah, S., Mensah, J., Badu, M., Addai-Arhinand, S., Mensah, M., 2015. Phytoconstituents, antimicrobial and antioxidant properties of the leaves of

Persea americana Mill. cultivated in Ghana. Journal of Medicinal Plants Research. 9:933- 939.

Pellegrini, N., Visioli, F., Buratti, S., Brighenti, F., 2001. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49:2532-2538.

Pokorny, J., Reblova, X., 1999. Effect of food components on changes in frying oil. Food Technology and Biotechnology. 37:138-43.

Prabha, T., Ravindranath, B., Patwardhan, M., 1980. Anthocyanins of avocado (*Persea americana* Mill.) peel. Journal of Food Technology. 17: 241-242.

Prior, R., Wu, L., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53:4290-4302.

Raza, S., Rashid, A., William, J., and Razzaq, A., 2014. Evaluation of oxidative stability of sunflower oil at frying temperature in presence of butylated hydroxytoluene and methanolic extracts of medicinally important plants of Pakistan. International Food Research Journal. 21: 331-334

Réblová, Z., Tichovská, D., Doležal, M., 2009. Heating of Plant Oils – Fatty Acid Reactions Versus Tocopherols Degradation. Journal of Food Science. 27:185.

Reda, S., 2011. Evaluation of antioxidants stability by thermal analysis and its protective effect in heated edible vegetable oil. Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas. 31:475-480.

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

Rennick, K., Warner, K., 2006. Effect of elevated temperature on development of tocopherolquinones in oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:2188–2192.

Robert, P., Masson, L., Romero, N., Dobarganes, C., Izaurieta, M., Ortíz, J., Wittig, 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*. 389:389-396.

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.

Rotta, E., Rodrigues de Moraes, D., França, P., Dos Santos, J., Matsushita, M., Visentainer, V., 2016. Use of avocado peel (*Persea americana*) in tea formulation: a functional product containing phenolic compounds with antioxidant activity. *Acta Scientiarum Technology*. 38:23-29.

Sebedio, J., Dobarganes, M., Márquez, G., Wester, I., Christie, W., Dobson, G., Zwobada, F., Chardigny, J., Mairot, Th., Lahtinen, R., 1996. Industrial production of crisps and prefried french fries using sunflower oils. *Grasas y Aceites*. 47:5-13.

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

Simfruit, 2014. Comité de Palta Hass de Chile estima una producción al alza esta próxima temporada. Disponible en < <http://simfruit.cl/noticias-destacadas/818-comite-de-palta-hass-de-chile-estima-una-produccion-al-alza-esta-proxima-temporada.html> > [Leído: 1 de diciembre, 2016.]

Sherwin, E., 1990. Antioxidants in: Food Additives, (eds. A.L. Branen, P.M. Davidson, S. Salminen). Marcel Dekker, New York, 139–193.

Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215:213-9.

Singleton, V., Rossi, J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.

Takeoka, G., Full, G., Dao, L., 1997. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oils and fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:3244–3249.

Terasawa, N., Sakakibara, M., Murata, M., 2006. Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. *Food Science and Technology Research*. 12:55-58.

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.

Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99:835–841.

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.

Velasco, J., Dobarganes, C., 2002. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104:661–676.

Verleyen, T., Kamal-Eldin, A., Dobarganes, C., Verhe, R., 2001. Modeling of alpha tocopherol loss and oxidation products formed during thermoxidation in triolein and tripalmitin mixtures. *Lipids*. 36:719–726.

Wang, W., Bostic, T., Gu, L., 2010. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. 122:1193–1198.

Yanishlieva, N., 2004. Inhibición de la oxidación. In N. Yanishlieva, J. Pokorny y M.Gordon (eds), *Antioxidantes de los Alimentos, Aplicaciones prácticas*. 33-38. Acribia, Zaragoza, España.

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

Zamora, J., 2007. Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*. 34:17-26.

Anexos

Anexo 1: Evolución de compuestos polares con análisis estadístico.

Tabla 4: Evolución de CP (%), para los sistemas AG control, AG+EHCP, AG+EACP, AG+EHHP, AG+EAHP y AG + BHA a diferentes horas, sometidos a 180°C.

Tiempo (h)/ Sistema	0	4	8	12	16	20	24	28
AG	4,45 ± 0,11 ^a	5,73 ± 0,04 ^{a,b}	11,38 ± 0,49 ^b	15,35 ± 0,15 ^b	21,63 ± 0,13 ^c	26,48 ± 0,49 ^b	30,32 ± 0,61 ^b	36,45 ± 0,16 ^{a,b}
AG+EHCP	4,32 ± 0,11 ^a	6,31 ± 0,04 ^b	8,76 ± 0,06 ^a	14,44 ± 0,12 ^a	18,76 ± 0,08 ^a	23,53 ± 0,41 ^a	29,81 ± 0,22 ^{a,b}	33,69 ± 0,16 ^a
AG+EACP	4,79 ± 0,11 ^a	6,03 ± 0,09 ^{a,b}	8,74 ± 0,29 ^a	17,08 ± 0,56 ^c	21,23 ± 0,69 ^c	24,54 ± 0,61 ^{a,b}	28,71 ± 0,08 ^{a,b}	35,21 ± 0,01 ^{a,b}
AG+EHHP	4,44 ± 0,11 ^a	7,22 ± 0,07 ^c	10,35 ± 0,03 ^b	15,57 ± 0,45 ^b	20,22 ± 0,04 ^b	24,91 ± 0,81 ^{a,b}	28,26 ± 0,44 ^a	35,90 ± 1,59 ^{a,b}
AG+EAHP	4,80 ± 0,11 ^a	8,36 ± 0,22 ^d	11,32 ± 0,45 ^b	14,76 ± 0,08 ^a	18,38 ± 0,07 ^a	24,58 ± 0,53 ^{a,b}	33,56 ± 0,63 ^c	38,37 ± 1,21 ^b
AG+ BHA	4,82 ± 0,11 ^a	5,61 ± 0,33 ^a	13,67 ± 0,44 ^c	16,99 ± 0,01 ^c	20,48 ± 0,27 ^{b,c}	23,06 ± 0,75 ^a	29,47 ± 0,67 ^{a,b}	37,19 ± 0,08 ^b

AG: aceite de girasol; EAC: equivalente a ácido cafeico; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palta; EACP: extracto acuoso de cáscara de palta; EHHP: extracto hidroalcohólico de hojas; EAHP: extracto acuoso de hojas. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Anexo 2: Porcentaje de retención de α -Tocoferol

Tabla 5: Porcentajes de retención de alfa-tocoferol de los sistemas de AG control y adicionados con extractos de palto, sometidos a 180°C.

Sistema	Tiempo de calentamiento (h)				
	0	4	8	12	16
AG α -T%	100 ± 4	57 ± 1,1	34 ± 1,1	16 ± 6,5	3 ± 1,3
AG + EHCP α -T%	100 ± 4	65 ± 0,9	52 ± 0,9	44 ± 5,7	17 ± 0
AG + EHHP α -T%	100 ± 4	58 ± 4,6	44 ± 3,3	27 ± 0,6	6 ± 5,2
AG + EACP α -T%	100 ± 4	58 ± 3,5	40 ± 2,9	27 ± 5,6	7 ± 1,0
AG + EAHP α -T%	100 ± 4	72 ± 11,2	60 ± 1,2	33 ± 1,6	4 ± 0,1
AG + BHA α -T%	100 ± 4	63 ± 8,1	43 ± 7,1	28 ± 5,3	11 ± 1,4

AG α -T%: porcentaje de retención de aceite de girasol; AG + EHCP α -T%: porcentaje de retención de aceite de girasol más extracto hidroalcohólico de cáscara de palta; AG + EACP α -T%: porcentaje de retención de aceite de girasol más extracto acuoso de cáscara de palta; AG + EHHP α -T%: porcentaje de retención de aceite de girasol más extracto hidroalcohólico de hoja de palto; AG + EAHP α -T%: porcentaje de retención de aceite de girasol más extracto acuoso de hoja de palto.

Anexo 3: Constante de velocidad de degradación (K_{obs} (h^{-1})) de α -Tocoferol

Tabla 6: Constantes de velocidad de degradación (K_{obs} (h^{-1})) de alfa-tocoferol en los sistemas de AG control y adicionados con extractos de cáscara de palta y hojas de palto, sometidos a 180°C por 16 h.

Sistema	K_{obs} (h^{-1})
AG Control	$0,8417 \pm 0,003^f$
AG + EHCP	$0,3885 \pm 0,34^a$
AG + EHHP	$0,6554 \pm 0,01^d$
AG + EACP	$0,5997 \pm 0,01^c$
AG + EAHP	$0,7065 \pm 0,23^e$
AG + BHA	$0,5217 \pm 0,05^b$

AG: aceite de girasol; EHCP: extracto hidroalcohólico de cáscara de palta; EACP: extracto acuoso de cáscara de palta; EHHP: extracto hidroalcohólico de hojas de palto; EAHP: extracto acuoso de hojas de palto; K_{obs} (h^{-1}): Constante de velocidad de degradación Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).