



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**“ESTABILIDAD OXIDATIVA Y VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE CHOIBÁ  
(*Dipteryx oleifera* Benth.) SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE ROMERO  
(*Rosmarinus officinalis* L.)”**

**ANA MARÍA PIEDRAHITA CORREA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
MEDELLÍN  
2015**

**“ESTABILIDAD OXIDATIVA Y VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE CHOIBÁ (*Dipteryx oleifera* Benth)  
SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)”**

**ANA MARÍA PIEDRAHITA CORREA**

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos.**

**DIRECTOR:  
Benjamín Alberto Rojano  
Qco. MSc. PhD.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
MEDELLÍN  
2015**

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Medellín, 24 de Febrero de 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primero a Dios por permitirme culminar exitosamente mis estudios, llenándome de sabiduría y determinación para alcanzar las metas propuestas.

A mi familia, especialmente a mi madre, Julieta Correa, y mi abuela, María Restrepo, por ser un soporte incondicional y llenarme de fortaleza en los momentos en los que estuve a punto de flaquear.

A mi director el Dr. Benjamín Alberto Rojano, por compartir conmigo su conocimiento y guiar mi desarrollo profesional a lo largo de este proceso.

Al Dr Álvaro Alfonso Cogollo, Director de Investigación del Jardín Botánico de Medellín Joaquín Antonio Uribe, por su disposición permanente y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio Ciencia de los Alimentos por su amistad y colaboración incondicional, especialmente a Verónica Villacorta, Marlyn Rada y Andrés Felipe Alzate.

A mis amigos, que siempre estuvieron en los momentos difíciles para hacerme sonreír y alentarme a seguir adelante.

## CONTENIDO

### 1) Contenido

INTRODUCCIÓN.....	13
<b>1 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>2 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 ALMENDRA DE CHOIBÁ ( <i>Dipteryx oleifera</i> Benth.).....	16
2.2 FENÓMENOS OXIDATIVOS.....	17
2.2.1 Radicales libres.....	17
2.2.2 Oxidación de lípidos.....	20
2.3 ANTIOXIDANTES.....	25
2.3.1 Mecanismos de acción.....	25
2.3.2 Antioxidantes sintéticos.....	26
2.3.3 Antioxidantes naturales.....	26
2.3.4 Extracto de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	28
2.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA Y VIDA ÚTIL.....	29
<b>3 CAPÍTULO 1: ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE ALMENDRA DE CHOIBÁ (<i>Dipteryx oleifera</i> Benth.) SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....</b>	<b>31</b>
<b>4 CAPÍTULO 2: ESTUDIO CINÉTICO DE LA DEGRADACIÓN OXIDATIVA DEL ACEITE DE ALMENDRA DE CHOIBÁ (<i>Dipteryx oleifera</i> Benth.) CON ADICIÓN DE EXTRACTO DE ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....</b>	<b>70</b>
<b>5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la almendra de Choibá ( <i>Dipteyx oleifera</i> Benth).....	17
<b>Tabla 2.</b> Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. ....	18
<b>Tabla 3.</b> Energías de abstracción de átomos de hidrógeno en diferentes sistemas de dobles enlaces presentes en ácidos grasos.....	21
<b>Tabla 4.</b> Productos finales de oxidación de lípidos.....	23

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fruto de Choibá ( <i>Dipteryx oleifera</i> Benth).....	168
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de la descomposición de hidroperóxidos y formación de compuestos secundarios de peroxidación lipídica. ....	222
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de formación de hidroperóxidos.....	233
<b>Figura 4.</b> Curvas de reacción de la peroxidación lipídica. ....	244
<b>Figura 5.</b> Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles. ....	266
<b>Figura 6.</b> Estructura del A) $\alpha$ -Tocoferol, B) $\beta$ -Tocoferol, C) $\gamma$ -Tocoferol y D) $\delta$ -Tocoferol. ....	277
<b>Figura 7.</b> Estructura química de los flavonoides.....	288
<b>Figura 8.</b> Estructura química del A) Ácido carnósico y B) Ácido rosmarínico.....	2929

## LISTA DE ABREVIACIONES

<	Menor que
>	Mayor que
%	Porcentaje
$A_0$	Concentración de A en el tiempo cero
$[A]^m$	Concentración de A elevado al orden aparente m de reacción
<b>AAPH</b>	2,2'-azo-bis 2-amidino-propano dihidrocloruro
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AC</b>	Ácido camósico
<b>AOM</b>	Active Oxygen Method
<b>AR</b>	Ácido rosmarínico
<b>ArOH</b>	Antioxidante
<b>ArO·</b>	Radical generado a partir del antioxidante
<b>ArOH<sup>+</sup></b>	Radical catiónico generado a partir del antioxidante
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Bario
<b>BDE</b>	Energía de disociación de enlace
<b>BHA</b>	Butil hidroxianisol
<b>BHT</b>	Butil hidroxitolueno
<b>°C</b>	Grados Celcius
<b>cm</b>	Centímetro
<b>%CPT</b>	Porcentaje de compuestos polares totales
<b>DC</b>	Dienos Conjugados
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
$\epsilon$	Coefficiente de absorptividad molar
$E_A$	Energía de activación (J/mol)
<b>EMA</b>	Error medio absoluto
<b>ER</b>	Extracto de Romero
<b>ERNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>EROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>exp</b>	Función exponencial
<b>f</b>	Factor de dilución
$Fe^{2+}$	Hierro ferroso
$Fe^{3+}$	Hierro férrico
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Hierro
<b>g</b>	Gramos
<b>GAE</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>h</b>	Horas
<b>HAT</b>	Transferencia de un átomo de hidrógeno
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>4-HNE</b>	4-hidroxi-2-hexenal
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua



<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>HO·</b>	Radical Hidroxilo
<b>HO<sup>-</sup></b>	Ion Hidroxilo
<b>HOO·</b>	Radical hidroperoxilo
<b>IP</b>	Potencial de ionización
<b>J</b>	Joule (Kg m <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> )
<b>K<sub>A</sub></b>	Constante de velocidad aparente
<b>K<sub>TBARS</sub></b>	Constante de velocidad aparente para la formación de TBARS
<b>K<sub>VP</sub></b>	Constante de velocidad aparente para la formación de VP
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litros
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>λ</b>	Longitud de onda
<b>m</b>	Metro
<b>M</b>	Molar
<b>MDA</b>	Malondialdehido
<b>meq</b>	Miliequivalentes
<b>μL</b>	Microlitros
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>μmol</b>	Micromoles
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Minimoles
<b>min</b>	Minuto
<b>mol</b>	Moles
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	Tiocianato de amonio
<b>nm</b>	Nanometros
<b>nmol</b>	Nanomoles
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno Singlete
<b><sup>3</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno Triplete
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>ORAC</b>	Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno
<b>P</b>	Valor de protección
<b>PBS</b>	Phosphate buffer sodium
<b>PG</b>	Propil galato
<b>p/p</b>	Peso/peso
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>PV</b>	Peroxide value
<b>Q<sub>10</sub></b>	Factor de aceleración
<b>r<sup>2</sup></b>	Coeficiente de correlación lineal

<b>R</b>	Constante universal de los gases ideales (8.314 J/mol K)
<b>R<sup>·</sup></b>	Radical lipídico
<b>R<sup>-</sup></b>	Anión de lípido
<b>RH</b>	Lípido
<b>ROO<sup>·</sup></b>	Radical peroxilo
<b>ROOH</b>	Hidroperóxido lipídico
<b>r<sub>A</sub></b>	Tasa de formación de A
<b>s</b>	Segundos
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>1sen</b>	Estado singlete excitado
<b>3sen</b>	Estado triplete excitado
<b>SET</b>	Transferencia de un electron
<b>t</b>	Tiempo
<b>TBARS<sub>0</sub></b>	TBARS en el tiempo cero de reacción
<b>TEAC</b>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
<b>tm</b>	Tiempo que un aceite con antioxidante tarda en alcanzar un VP 100meq Oxígeno/Kg
<b>tc</b>	Tiempo que un aceite sin antioxidante tarda en alcanzar un VP de 100meq Oxígeno/Kg
<b>T</b>	Temperatura absoluta (°K)
<b>TBA</b>	Ácido 2-tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico
<b>TBHQ</b>	Terbutil hidroxiquinona
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta visible
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>VP</b>	Valor de peróxido
<b>VP<sub>0</sub></b>	Valor de peróxido en el tiempo cero de reacción
<b>W</b>	Peso
<b>ω9</b>	Omega 9

## RESUMEN

El almendro amarillo o Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) es una especie arbórea que pertenece a la familia Fabaceae. La almendra que se encuentra al interior del fruto del Choibá, es una fuente promisoriosa de aceite vegetal, con contenidos importantes de ácido oleico (52-54%) lo que le confiere propiedades de elevada calidad nutricional. A fin de promover el aprovechamiento de esta fuente oleaginosa para la obtención de aceite comestible, es necesario garantizar la estabilidad de este producto a lo largo de toda la cadena de producción y distribución, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la estabilidad oxidativa y estimar el tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá crudo y comparar este comportamiento con el obtenido al adicionar extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) como aditivo antioxidante. Para cumplir con este objetivo se plantearon dos estudios: el primero consistió en evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá, a  $100\pm 1^\circ\text{C}$  y con aireación (1150mL aire/min), suplementado con extracto de romero, en una concentración de 1000mg/L (ER1000) y 1500mg/L (ER1500), y con Butil Hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 200mg/L. Como control se empleó aceite sin adición de extracto. La evaluación de la oxidación de las muestras, se hizo a través del seguimiento de la aparición de productos de oxidación: Dienes Conjugados (DC), valor de peróxido (VP), especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y porcentaje de Compuestos Polares Totales (%CPT). Los resultados revelaron que la adición de extracto de romero a 1500mg/L (ER1500) reduce significativamente la formación de hidroperóxidos (VP) y compuestos polares totales (%CPT) en el aceite, inclusive más que el BHT.(200mg/L). A partir de este resultado se planteó el estudio de vida útil del aceite, crudo y con adición de extracto de romero a 1500mg/L (ER1500), sometido a tres condiciones de temperatura:  $35\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $45\pm 1^\circ\text{C}$  y  $55\pm 1^\circ\text{C}$ . Como índice de deterioro del aceite se evaluó la aparición de hidroperóxidos (VP) y de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) en el tiempo. Los resultados permitieron establecer que la reacción de formación de hidroperóxidos (VP) sigue un modelo cinético de primer orden y que la velocidad de formación de estos compuestos es dependiente de la temperatura, según la ecuación de Arrhenius, con un valor de energía de activación de 4611,5071 J/mol para el control y de 7409,5771 J/mol para el tratamiento ER1500. El tiempo de vida útil estimado para el tratamiento ER1500, en términos de la formación de hidroperóxidos, fue 47.86% mayor que en el aceite sin adición de extracto, lo que evidencia la efectividad de este tipo de extractos en la estabilización de matrices lipídicas y permite establecer las condiciones de uso y mecanismos de estabilización apropiadas para prolongar la vida de anaquel del aceite obtenido.

**Palabras clave:** Choibá-Extracto de Romero-Peroxidación Lipídica-Estabilidad Oxidativa-Vida Útil-Arrhenius-Cinética

## ABSTRACT

Yellow almond or Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) is a specie belonging to the family Fabaceae. Almond found inside the fruit of Choibá, is a promising source of vegetable oil, with significant content of oleic acid (52-54%) which gives it properties of high nutritional quality. To promote the use of this oilseed source for obtaining edible oil, is necessary to ensure the stability of the product throughout the entire chain of production and distribution; so the aim of this study was to evaluate the oxidative stability and estimate the shelf life of Choibá oil and compare this behavior with that obtained by adding rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) as an antioxidant additive. To achieve this goal two studies were presented: the first was to evaluate the oxidative stability of Choibá oil, at  $100\pm 1^{\circ}\text{C}$  with aeration (1150mL air / min), supplemented with rosemary extract, at a concentration of 1000mg/L (RE1000) and 1500mg/L (RE1500) , and with Butyl Hydroxytoluene (BHT) at a concentration of 200mg/L. Oil without addition of extract was used as a control. Evaluation of oxidation of the samples was done by monitoring the appearance of oxidation products: Conjugated Dienes (CD), peroxide value (PV), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and percentage of Total Polar Compounds (%TPC). The results showed that addition of rosemary extract to 1500mg/L (RE1500) significantly reduces the formation of hydroperoxides (PV) and total polar compounds (%TPC) in the oil, even more than BHT. (200mg/L). From this result it was evaluated de shelf life of Choibá oil, with and without addition of rosemary extract at 1500mg/L (ER1500) subjected to three temperature conditions:  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $45\pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ . As oil deterioration index was evaluated the rate of appearance of hydroperoxides (PV) and the rate of appearance of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) over time. The results establish that the reaction of formation of hydroperoxides (PV) follows a first order kinetic model and that the rate of formation of these compounds is dependent upon the temperature, according to the Arrhenius equation, with an activation energy value of 4611,5071J/mol for control sample and 7409,5771J/mol for RE1500 treatment. The estimated shelf life for RE1500 treatment, in terms of the formation of hydroperoxides, was 47.86% higher than in the oil without addition of extract, which shows the effectiveness of such extracts in stabilization of lipid matrices and allows establish the terms of use and appropriate mechanisms of stabilization to improve the stability of the oil obtained

**Keywords:** Choibá-Rosemary Extract-Lipid Peroxidation-Oxidative Stability-Shelf Life-Arrhenius-Kinetics

## INTRODUCCIÓN

El Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.), también conocido como almendro de montaña o almendro amarillo, pertenece a la familia de las Fabaceae y se distribuye desde Nicaragua hasta el noroeste de Colombia desde el nivel del mar hasta los 800 metros de altitud (Zarucchi, 2001). Esta especie arbórea ha sido empleada para la obtención de madera; cerca del 40% de la población ha sido empleada en la explotación maderera, para la construcción de puentes, elaboración de pisos industriales, mangos de herramientas agrícolas y maquinaria industrial por lo que ha sido categorizada como una especie vulnerable (Cárdenas & Salinas, 2006).

El fruto del Choibá contiene una única almendra oleaginosa, negra y alargada. Estudios preliminares acerca de la composición del aceite obtenido de esta fuente revelan que está constituido principalmente por ácido oleico, en una proporción del 52.41% respecto a los demás ácidos presentes, lo que le atribuye características de elevada calidad nutricional y organoléptica (Zapata-Luján et al., 2013). Sin embargo, esa misma composición que le otorga sus propiedades, limita su uso en la industria de los alimentos, ya que un elevado contenido de ácidos grasos insaturados está relacionado con una alta susceptibilidad a la ocurrencia de reacciones de oxidación que conducen a la rancidez de los aceites, en las que se generan productos primarios de oxidación como peróxidos e hidroperóxidos, los cuales a través de reacciones paralelas producen compuestos secundarios, en su mayoría volátiles, tipo aldehídos, cetonas y ácidos, y no volátiles como dímeros, trímeros y polímeros (Barrera-Arellano, 1998); que alteran las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos y que provocan efectos negativos sobre la salud del consumidor (Aladedunye & Przybylski, 2014).

Con el fin de retardar las reacciones de peroxidación lipídica, tradicionalmente se han empleado antioxidantes de origen sintético como el Butil hidroxitolueno (BHT), Terbutil hidroxiquinona (TBHQ) y el Butil hidroxianisol (BHA) (Frankel et al., 1994; Ding & Zou, 2012); (Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., & German, 1994) sin embargo, se ha encontrado que estos tienen efectos negativos sobre la salud, contribuyendo al aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras (Bauer et al., 2001). Debido a esto, en los últimos años, las investigaciones se han direccionado hacia el hallazgo de antioxidantes de origen natural, como carotenoides, antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos que puedan eventualmente remplazar el uso de los antioxidantes sintéticos (Rodríguez-Rojo et al., 2012; Rivero-Pérez et al., 2008; Nour et al., 2013). El extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) ha demostrado tener una actividad antioxidante comparable con la actividad mostrada por el BHT en medios lipofílicos; debido a su elevado contenido de ácido carnósico y rosmarínico, este extracto puede interaccionar más fuertemente con las matrices lipídicas, protegiendo a este tipo de sustratos de la oxidación, convirtiéndolo en un buen candidato para ser usado como aditivo a fin de prolongar la vida útil de grasas y aceites sin los efectos negativos que se presentan al emplear antioxidantes sintéticos (Zhang et al., 2010; Urbančič et al., 2014; Zapata et al., 2014).

Los estudios de estabilidad oxidativa y vida útil de las grasas y aceites, constituyen una fuente importante de información para la aplicación de mecanismos de estabilización y conservación de los mismos, y abren las puertas al estudio de técnicas de preservación con antioxidantes de origen natural, como el extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) que permitan remplazar eventualmente el uso de antioxidantes sintéticos así como promover el estudio científico y

tecnológico de semillas oleaginosas, como el Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) como fuentes promisorias de aceites comestibles, contribuyendo a la preservación de especies catalogadas como vulnerables.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre la estabilidad oxidativa y la vida útil del aceite de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.).

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la capacidad antioxidante y el contenido de metabolitos secundarios del extracto de romero.

Evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de Choibá suplementado, con extracto de romero, y sin suplementar.

Predecir el tiempo de vida útil de aceite de Choibá suplementado, con extracto de romero, y sin suplementar, en términos de aparición de productos de oxidación, a través de la determinación del parámetro Q10.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 ALMENDRA DE CHOIBÁ (*Dipteryx oleifera* Benth.)

El Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.), también conocido como almendro de montaña o almendro amarillo, pertenece a la familia de las Fabaceae y se distribuye desde Nicaragua hasta el noroeste de Colombia desde el nivel del mar hasta los 800 metros de altitud (Zarucchi, 2001). En Colombia se ha encontrado en el Valle Bajo del río Cauca y en la región norte del andén Pacífico, en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Bolívar y Chocó (Arrázola et al., 2009); crece en un bosque húmedo tropical en regiones con una precipitación media anual de 3000 a 5500 mm, en suelos bien drenados, rocosos o arenosos (Cárdenas & Salinas, 2006).

Debido a la calidad de la madera obtenida de esta fuente, en Colombia cerca del 40% de la población ha sido empleada en la explotación maderera, para la construcción de puentes, elaboración de pisos industriales, mangos de herramientas agrícolas y maquinaria industrial por lo que ha sido categorizada como una especie vulnerable (Cárdenas & Salinas, 2006). El fruto del Choibá es una vaina ovoide, gruesa y dura, con una única semilla oleaginosa, negra y alargada; su desarrollo se da en la época en que está terminando la estación de lluvias y comienza a madurar en la estación seca a finales de diciembre, hay frutos maduros desde enero hasta marzo (Figura 1) (Cogollo, 2004).

**Figura 1.** Fruto de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.).



Tradicionalmente las almendras son tostadas para consumo como fruto seco y en algunas regiones del pacífico colombiano han sido empleadas en la elaboración de pastas, bebidas y dulces con alto valor energético (Cárdenas & Salinas, 2006). Estudios bromatológicos, fitoquímicos y de aceites esenciales realizados a la semilla de Choibá demostraron que puede ser empleada para consumo humano sin ningún riesgo para la salud (Arrázola et al., 2009). Desde el punto de vista nutricional, la almendra de Choibá presenta un alto contenido de aceite (Tabla 1), la que a su vez está constituida en un 52.4% por ácido oleico (Zapata-Luján et al., 2013), sin embargo son escasas las investigaciones realizadas a cerca de la estabilidad y mecanismos de conservación del aceite obtenido de esta fuente, por lo que su uso ha sido limitado.



**Tabla 1.** Composición de la almendra de Choibá (*Dipteyx oleifera* Benth).

COMPONENTE	PORCENTAJE EN BASE HÚMEDA (P/P)
Cenizas	2.32
Grasa bruta	18.09
Fibra cruda	2.6
Proteínas (%N x 6.25)	12.4
Almidón	32.6
Humedad y otras materia volátiles	12.6

Fuente: Propia. Laboratorio Ciencia de los Alimentos.

## 2.2 FENÓMENOS OXIDATIVOS

Las reacciones de oxidación sufridas por los alimentos ocasionan la degradación de compuestos funcionales y nutricionales, y a la aparición de compuestos tóxicos y características sensoriales desagradables que hacen que el producto deje de ser atractivo para el consumidor (Min & Boff, 2002). Éstas son causadas por los radicales libres que provocan una serie de reacciones en cascada que terminan con la formación de compuestos volátiles y no volátiles precursores de los olores y sabores característicos de la rancidez (Jensen et al., 2005).

**2.2.1 Radicales libres.** Los radicales libres son especies altamente reactivas por poseer un electrón desapareado en su orbital más externo. Dentro de éstas encontramos las llamadas especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERNS) que incluyen tanto a radicales libres como a especies no radicalarias que pueden generar fácilmente radicales libres y/o causar daño oxidativo (Halliwell, 2011). En la tabla 2 se muestran las especies reactivas, radicales y no radicales, más importantes.

**Tabla 2.** Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Radicales		No radicales	
Hidroxilo	$^{\circ}\text{OH}$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	$\text{RO}^{\circ}$	Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Peroxilo	$\text{ROO}^{\circ}$	Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}^{\circ}$	Ácido hipocloroso	HClO
Superóxido	$\text{O}_2^{\circ-}$	Ácido nitroso	$\text{HNO}_2$
Óxido nítrico	$\text{NO}^{\circ}$	Catión nitrilo	$\text{NO}^{+2}$
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2^{\circ}$	Peroxinitrito	$\text{ONOO}^{\circ}$
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Alquilperoxinitrito	ROONO
		Ozono	$\text{O}_3$
		Ácido hipobromoso	HBrO

Fuente: (Lozada & García, 2009).

Debido a su elevada inestabilidad, las especies reactivas provocan daño oxidativo sobre proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Nagmoti et al., 2012; Kumar et al., 2012) lo que ha sido asociado con la aparición de enfermedades crónicas como arteriosclerosis, cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Agrawal et al., 2011).

**2.2.1.1 Mecanismos de generación de radicales libres en alimentos.** La aparición de especies reactivas en los alimentos es inevitable debido a su naturaleza biológica. Las EROS reaccionan con lípidos, proteínas, azúcares y vitaminas, disminuyendo la calidad nutricional, química y física de los productos alimenticios. Debido a lo anterior es necesario entender los mecanismos de formación de estas especies, y su interacción con los componentes de los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento de los mismos.

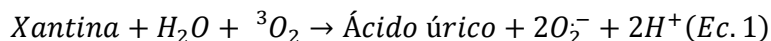
A continuación se describen los procesos de generación de las principales especies reactivas en los alimentos:

- **Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ).** Esta especie puede ser formada de manera química, fotoquímica o enzimática; sin embargo, su producción en alimentos, se atribuye a un mecanismo químico que involucra la presencia de sensibilizadores, luz y oxígeno triplete (An & Choe, 2012).

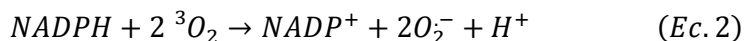
Algunos foto-sensibilizadores como las clorofilas, feofitinas, porfirinas, riboflavina, mioglobina y colorantes sintéticos presentes en los alimentos pueden absorber energía de la luz rápidamente pasando a un estado singlete excitado (1sen). A fin de regresar a su estado basal, el sensibilizador puede perder esa energía por medio de la liberación de calor, emisión de fluorescencia o por una conversión intersistemática, que consiste en pasar de su estado singlete (1sen) a un estado triplete (3sen), para finalmente regresar a su estado basal, a través de la emisión de fosforescencia. Debido a que el tiempo de vida

media del estado triplete (3sen) es mayor al del estado singlete (1sen), éste puede reaccionar con el oxígeno triplete ( $^3O_2$ ) circundante para formar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) con lo que nuevamente regresa a su estado basal (Min & Boff, 2002).

- **Anión superóxido ( $O_2^-$ ).** Puede ser generado enzimática o químicamente a partir de oxígeno triplete ( $^3O_2$ ), que es la forma más estable y abundante de oxígeno molecular. Una de las enzimas que produce anión superóxido en alimentos es la xantina-oxidasa. Esta enzima actúa sobre la xantina o hipoxantina en presencia de oxígeno triplete para producir  $O_2^-$  (Ecuación 1)



La NADPH-oxidasa es otra de las enzimas asociadas a la generación de anión superóxido en alimentos; aunque el mecanismo exacto no se conoce muy bien, su acción está relacionada con la producción de EROS durante el desarrollo de células de tejidos vegetales (Ecuación 2)

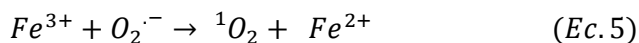


Otros mecanismos propuestos para la generación de  $O_2^-$  incluyen el uso de microondas, radiación gamma, pulsos eléctricos entre otros usados en el procesamiento de los alimentos.

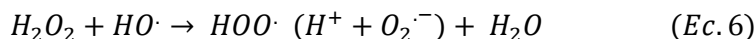
- **Radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ).** Esta especie, la más reactiva de las EROS, causa daños sobre membranas celulares y lipoproteínas, por lo que su presencia ha sido asociada a la formación de hidroperóxidos en las reacciones de auto-oxidación de ácidos grasos insaturados (Dal-Prá et al., 2013). En los alimentos este radical es formado a partir del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por rompimiento homolítico del enlace oxígeno-oxígeno, inducido por calor, radiación UV (Ecuación 3), o por descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición a través de la reacción de Fenton (Ecuación 4) (Rao-P et al., 2011).



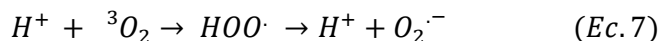
La reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  es el paso determinante en la reacción de Fenton y es catalizado por la presencia de anión superóxido, lo que favorece la formación de radical hidroxilo (Ecuación 5)



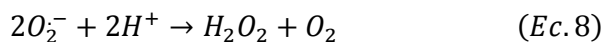
- **Radicales hidroperóxido ( $HOO\cdot$ ).** Es la forma protonada del anión superóxido; se produce por la reacción entre el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) (Ecuación 6).



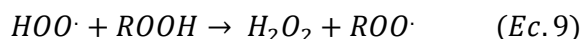
El radical hidroperoxilo también puede producirse por la reacción entre el oxígeno triplete y un átomo de hidrógeno producido a través de la radiólisis del agua durante los procesos de inhibición microbiana de alimentos con pulsos eléctricos (Ecuación 7)



- **Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Esta especie reactiva no radicalaria puede ser formada por dismutación espontánea del anión superóxido aunque la velocidad de reacción es muy baja en soluciones acuosas o alcohólicas (Ecuación 8).



Otra forma en que se puede producir peróxido de hidrógeno es a través de la reacción entre radicales hidroperoxilo (HOO·) y los hidroperóxidos (ROOH) formados durante los procesos de oxidación de ácidos grasos (Ecuación 9)

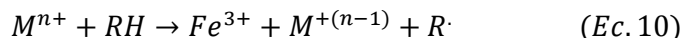


**2.2.2 Oxidación de lípidos.** La velocidad de oxidación de los lípidos es dependiente de diversos factores entre los que se incluyen la temperatura, la presencia de inhibidores o catalizadores y la naturaleza o composición de la grasa o aceite. Estos factores son importantes para determinar el tipo de oxidación sufrida por el lípido.

Dependiendo del tipo de oxígeno involucrado, las reacciones de degradación lipídica se clasifican en reacciones de auto-oxidación, cuando se dan en presencia de oxígeno triplete (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) y oxidación foto-sensibilizada cuando ocurren por acción de oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Choe & Min, 2006a).

**2.2.2.1 Auto-oxidación.** Los fenómenos de peroxidación lipídica consisten en una serie de reacciones en cadena que se dividen en tres etapas principales: Iniciación, propagación y terminación. La intensidad de los cambios sufridos por los lípidos durante este proceso depende de sus propiedades fisicoquímicas; particularmente de su grado de insaturación, y de la presencia de factores promotores de oxidación entre los que se destacan la exposición al oxígeno y la luz, así como la presencia de iones metálicos y temperaturas elevadas (Roman et al., 2013).

Durante la etapa de iniciación, los radicales libres y otras especies reactivas abstraen un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado para formar un radical lipídico (R·) (Roman et al., 2013). El radical hidroxilo (HO·) es el más eficiente de las EROS para abstraer dicho hidrógeno e iniciar las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica. Este proceso es catalizado por la presencia de luz ultravioleta y trazas de metales como el Fe(II), Cr(II), Pb(II) y el Cd(II) (Ecuación 10) (Benedet & Shibamoto, 2008).



Otro factor determinante en la velocidad de degradación de los lípidos, es la posición y grado de insaturación de los ácidos grasos constituyentes; en la tabla 3 se presenta la energía de disociación del enlace R-H para varios sistemas de dobles enlaces, a menor energía de disociación del enlace R-H mayor susceptibilidad de un sustrato a ser oxidado.

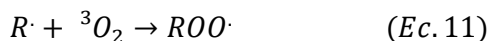
**Tabla 3.** Energías de abstracción de átomos de hidrógeno en diferentes sistemas de dobles enlaces presentes en ácidos grasos.

	E (Kj / mol)	Facilidad de abstracción del H
H-CH=CH <sub>2</sub>	431	
H- CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	419	
H- CH <sub>2</sub> -CH= CH <sub>2</sub>	356	
R- HCH-CH=CH- CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	322	
R(CH <sub>2</sub> =CH)- HCH- CH <sub>2</sub> -	310	1
R-CH=CH-HCH-CH=CH	272	62
ROOH	377	

Fuente: (Shahidi & Zhong, 2005).

Como puede notarse en la tabla 3, la energía requerida para abstraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso es dependiente de su posición en la molécula; si dicho átomo se encuentra ubicado en el carbono adyacente a un doble enlace, y más aún si se encuentra entre dos dobles enlaces, puede ser removido con mayor facilidad, es decir, tiene una energía de disociación menor, por lo que se espera, con una mayor probabilidad, que el ataque de los radicales libres se presente en dicha posición (Choe & Min, 2006b).

La segunda etapa de la peroxidación lipídica es la propagación; durante esta fase el radical R· reacciona con el oxígeno (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) para formar el radical peroxilo (ROO·), el cual una vez formado reacciona con nuevas moléculas de lípido (RH) para formar una nueva molécula de radical lipídico (R·) y el correspondiente hidroperóxido (ROOH) (Ecuaciones 11 y 12) (Fagali & Catalá, 2009).

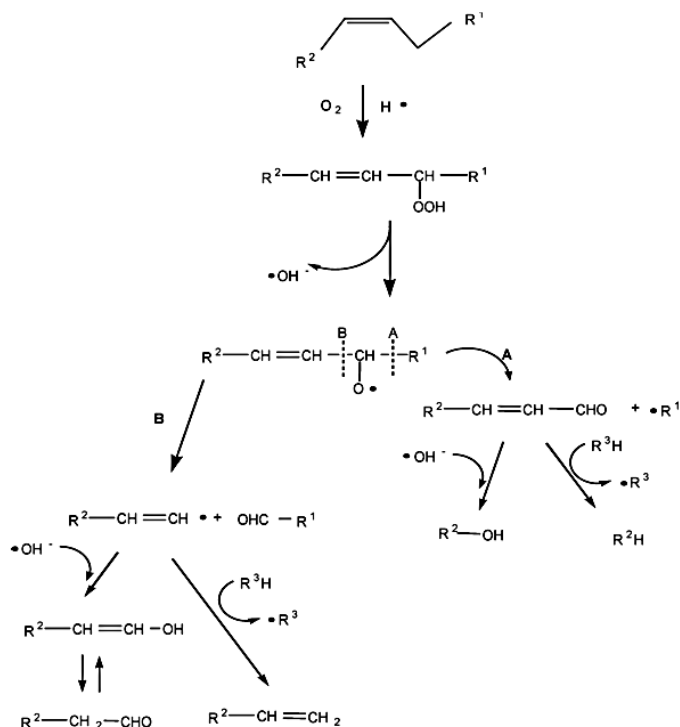


Bajo condiciones de temperatura elevadas y/o en presencia de metales, los hidroperóxidos formados se descomponen, por rompimiento homolítico del enlace oxígeno-oxígeno, en radicales alcoxilo (RO·) e hidroxilo (HO·) con lo que se propaga el proceso de oxidación de los ácidos grasos (Ecuación 13) (Fagali & Catalá, 2009).



Los radicales alcoxilo (RO·) formados en la descomposición de los hidroperóxidos sufren una β-escisión del enlace carbono-carbono para producir oxo-compuestos y radicales alquílicos saturados e insaturados (Figura 2) (Choe & Min, 2006b).

**Figura 2.** Mecanismo de la descomposición de hidroperóxidos y formación de compuestos secundarios de peroxidación lipídica.



Fuente: (Choe & Min, 2006a).

Finalmente durante la etapa de terminación los diferentes radicales formados reaccionan entre sí para formar productos no radicalarios tipo aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, e hidrocarburos (Ecuaciones 14-17), con lo que el proceso de auto-oxidación llega a su fin.



Entre los productos finales de oxidación se destacan la presencia de malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) y acroleína, asociados a la aparición de olores y sabores rancios en los alimentos, a daños en la integridad y fluidez de las membranas celulares, y a la inhibición de procesos (Fagali & Catalá, 2009). En la tabla 4 se presentan los productos finales más comunes en el proceso de auto-oxidación de los lípidos.

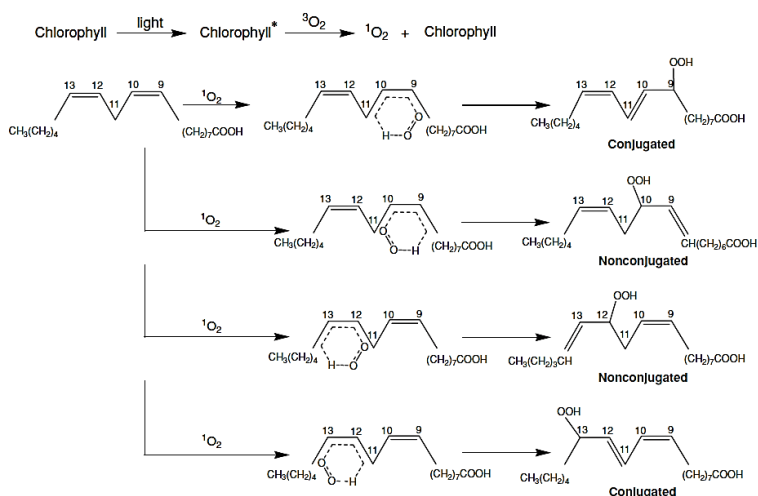
**Tabla 4.** Productos finales de oxidación de lípidos.

CLASE	ÁCIDO OLEICO	ÁCIDO LINOLEICO	ÁCIDO LINOLÉNICO
<b>Aldehídos</b>	Octanal	Pentanal	Propanal
	Nonanal	Hexanal	Butanal
	2-Decenal	2-Octenal	2-Butenal
	Decanal	2-Nonenal	2-Pentenal
		2,4-Decadienal	Malonaldehído
		Malonaldehído	2-Hexenal
<b>Ácidos Carboxílicos</b>	Heptanoato de metilo	Hepatanoato de metilo	Heptanoato de metilo
	Octanoato de metilo	Octanoato de metilo	Octanoato de metilo
	8-Oxooctanoato de metilo	8-Oxooctanoato de metilo	Nonanoato de metilo
	9-Oxononanoato de metilo	9-Oxononanoato de metilo	9-Oxononanoato de metilo
	10-Oxodecanoato de metilo	10-Oxodecanoato de metilo	10-Oxodecanoato de metilo
<b>Alcoholes</b>	1-Heptanol	1-pentanol	
		1-Octen-3-ol	
<b>Hidrocarburos</b>	Heptano	Pentano	Etano
	Octano		Pentano

Fuente: (Choe & Min, 2006b).

**2.2.2.2 Oxidación foto-sensibilizada.** Este mecanismo de degradación de los ácidos grasos consiste en el ataque directo del oxígeno singlete sobre un doble enlace de un ácido graso insaturado para producir hidroperóxidos alílicos, sin la formación de radicales libres como ocurre en la auto-oxidación; así que ésta no es una reacción en cadena y no posee un periodo de inducción. La posición y tipo del doble enlace cambia durante dicha reacción pudiendo pasar de la forma cis a trans. En la figura 3 se presenta el mecanismo de formación de hidroperóxidos del ácido linoléico por foto-oxidación.

**Figura 3.** Mecanismo de formación de hidroperóxidos.



Fuente: (Choe & Min, 2006b).

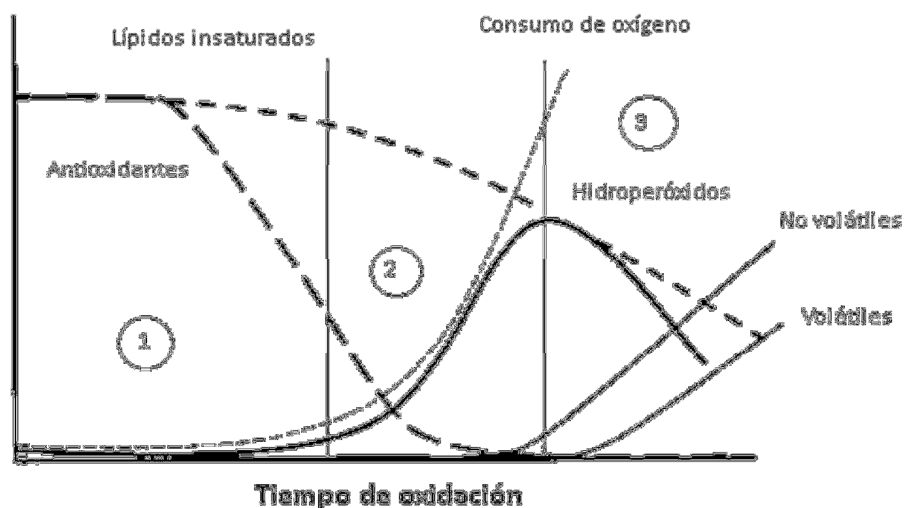
Este tipo de degradación lipídica es comúnmente encontrada en aceites comestibles que contienen algunos pigmentos, tipo clorofilas, que actúan como sensibilizadores, durante el almacenamiento y en presencia de luz.

Los hidroperóxidos formados a través de la foto-oxidación siguen el mismo proceso de descomposición descrito en el apartado anterior, con lo cual se generan productos finales de oxidación tipo aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, alcoholes, hidrocarburos, entre otros, tales como los presentados en la tabla 4.

La velocidad de las reacciones de foto-oxidación es mucho más alta que la presentada en los procesos de auto-oxidación (Lee & Choe, 2011); sin embargo ciertos factores, entre los que se incluyen temperatura elevadas, pueden favorecer los procesos de auto-oxidación, que requieren de energías de activación mayores, sobre los de oxidación foto-sensibilizada. Otro factor importante es la composición del aceite; los ácidos grasos poli-insaturados son más susceptibles a la oxidación por oxígeno triplete, debido a que requieren una menor energía de activación para la formación del radical lipídico que los mono-insaturados (Min & Boff, 2002).

En la figura 4 se presentan las curvas de las diferentes etapas de descomposición de los ácidos grasos durante los procesos de auto-oxidación y oxidación foto-sensibilizada. Durante las etapa de iniciación (1) la concentración de lípidos insaturados e hidroperóxidos permanece constante, producto de la acción de los antioxidantes presentes que retardan la tasas de descomposición de los lípidos; una vez éstos empiezan a ser consumidos las tasas de descomposición de lípidos, de consumo de oxígeno y formación de hidroperóxidos aumentan de manera exponencial durante la etapa de propagación (2); finalmente durante la etapa de terminación (3) los hidroperóxidos formados comienzan a descomponerse con la consecuente formación de productos volátiles y no volátiles a los que se atribuye la rancidez organolépticamente detectable.

**Figura 4.** Curvas de reacción de la peroxidación lipídica.



Fuente: (Shahidi & Zhong, 2005).



## 2.3 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es definido como toda aquella sustancia que estando en bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente su oxidación (Halliwell & Gutteridge, 1999). Aunque los antioxidantes tradicionalmente han sido asociados a la inhibición de la peroxidación lipídica, los radicales libres también pueden atacar otro tipo de sustratos; así el término “sustrato oxidable”, incluye casi todos los componentes presentes en los alimentos y tejidos vivos: proteínas, carbohidratos y DNA, entre otros (Eskin & Przybylski, 2000).

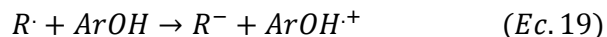
**2.3.1 Mecanismos de acción.** Los antioxidantes se dividen en dos categorías, primarios y secundarios, según la etapa de oxidación en la que intervengan. Los primarios, también conocidos como bloqueadores de cadena (scavengers), actúan en la segunda etapa de la propagación atrapando radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) a través de tres mecanismos principales: transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), transferencia de un electrón (SET) ó por medio de reacciones de adición. Por su parte los secundarios actúan en la etapa de iniciación evitando la formación de radicales libres a través de la quelación de iones metálicos y absorción de radiación UV, que actúan como catalizadores de las reacciones de oxidación y descomposición de hidroperóxidos, y sobre la primera etapa de la propagación a través de la captación de oxígeno y desactivación de oxígeno singlete (Shahidi & Naczk, 2004).

**2.3.1.1 Mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT).** Los antioxidantes primarios que actúan a través de este mecanismo tienen la capacidad de donar fácilmente un átomo de hidrógeno de los radicales libres (Ecuación 18)



La energía de activación de la reacción de transferencia de hidrógeno, aumenta con el aumento de la energía de disociación del enlace  $\text{ArO-H}$  (BDE), de esta manera, la eficiencia de un antioxidante que actúe a través de este mecanismo aumenta a medida que disminuye la energía de disociación de dicho enlace. Además el radical del antioxidante formado, debe ser más estable que el radical inicial. En este sentido los compuestos fenólicos son excelentes antioxidantes primarios, debido a que los radicales  $\text{ArO}\cdot$  formados son relativamente estables debido a la deslocalización de electrones desapareados por resonancia del anillo aromático (Choe & Min, 2006a).

**2.3.1.2 Mecanismo de transferencia de un electrón (SET).** En este mecanismo de estabilización de radicales libres, el antioxidante tiene la capacidad de donar un electrón al radical, formando un anión del radical y un radical catiónico del antioxidante (Ecuación 19)



En este mecanismo, el factor energético más importante es el potencial de ionización (IP) que indica la facilidad con la cual el antioxidante puede donar un electrón; a menor potencial de ionización mejor actividad antioxidante. La estabilidad del catión  $\text{ArOH}\cdot^+$  está nuevamente determinada por la naturaleza y tipo de sustituyentes del antioxidante.

Los mecanismos HAT y SET pueden ocurrir de manera simultánea, sin embargo las velocidades de reacción son diferentes; de esta manera, los factores de energía de disociación del enlace (BDE) y potencial de ionización (IP), permiten establecer cuál es el mecanismo de acción antioxidante más favorable (Bentes et al., 2011).

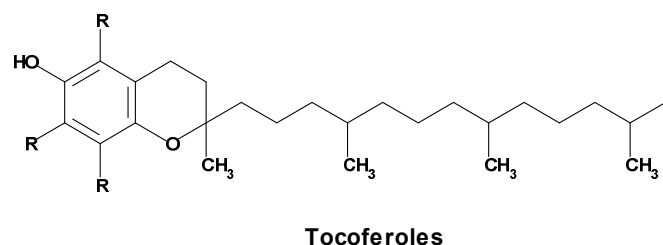
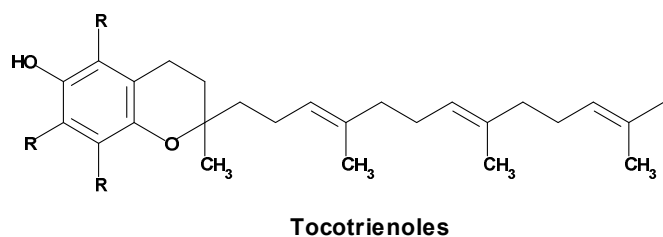
**2.3.2 Antioxidantes sintéticos.** Estos antioxidantes son ampliamente empleados en la industria como aditivos por su alto grado de estabilidad, eficacia y bajo costo. Los más comunes son el Butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA), Terbutil hidroxiquinona (TBHQ) y el Propilgalato (PG). Debido a sus efectos sobre la salud, las cantidades en que pueden ser empleadas en los alimentos son reguladas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estudios toxicológicos han revelado que el BHA y BHT promueven la generación células cancerígenas en roedores (Sakai et al., 1997). Este hecho acompañado de la tendencia actual de la reducción y eliminación del uso de aditivos sintéticos ha conllevado a la búsqueda y uso de antioxidantes de origen natural.

**2.3.3 Antioxidantes naturales.** La mayoría de antioxidantes naturales son compuestos fenólicos. Éstos se caracterizan por presentar en su estructura un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (OH). En este grupo de compuestos se incluyen un gran número de metabolitos secundarios de las plantas, que difieren entre sí por su estructura y reactividad; que van desde estructuras simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos con estructuras complejas como los flavonoides (Eskin & Przybylski, 2000). Los mecanismos de acción antioxidante de estos compuestos han sido ampliamente discutidos en la literatura; entre ellos se destacan la capacidad atrapadora de radicales libres y quelante de iones metálicos (precursores de las reacciones de oxidación); así como otros mecanismos que involucran la inhibición de enzimas como las lipooxigenasas involucradas en los procesos de peroxidación lipídica, y la NADPH oxidasa y Xantina oxidasa implicadas en la formación de EROS (Guardado-Yordi et al., 2012).

A continuación se describen los principales grupos de antioxidantes de origen natural.

**2.3.3.1 Tocoferoles y tocotrienoles.** Estos compuestos, conocidos también como cromanoles, presentan una estructura básica constituida por un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Existen ocho formas estructurales que se dividen en cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles; éstos difieren entre sí por la insaturación de la cadena lateral. Los tocoferoles tienen una cadena lateral saturada, y los tocotrienoles una cadena lateral con tres insaturaciones en las posiciones 3, 7 y 11 (Figura 5).

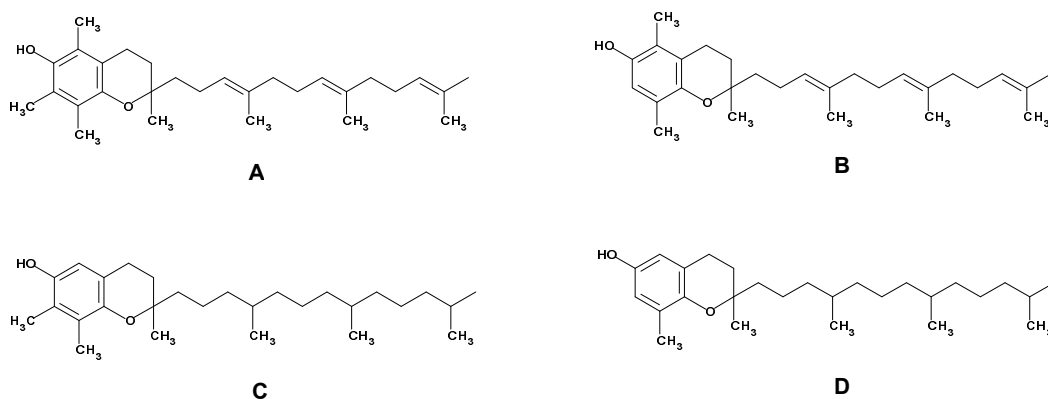
**Figura 5.** Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.



Fuente: (Sayago et al., 2007).

Dentro de cada grupo, las cuatro formas estructurales encontradas se designan como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  dependiendo del número y posición de los grupo metilo en el anillo cromano (Figura 6) (Sayago et al., 2007)

**Figura 6.** Estructura del A)  $\alpha$ -Tocoferol, B)  $\beta$ -Tocoferol, C)  $\gamma$ -Tocoferol y D)  $\delta$ -Tocoferol.

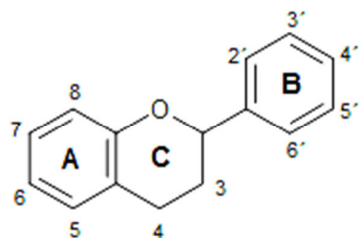


Fuente: (Sayago et al., 2007).

Los tocoferoles y tocotrienoles están presentes en las partes verdes de las plantas, en las hojas y en semillas oleaginosas y son reconocidos como potentes inhibidores de los procesos de peroxidación lipídica en alimentos y sistemas biológicos (Aladedunye & Przybylski, 2013). Estos compuestos se encuentran en cantidades considerables en aceites vegetales, por lo que su presencia se ha asociado a una mayor estabilidad frente a los fenómenos de oxidación. Los tocoferoles compiten con los ácidos grasos por los radicales peroxilo (ROO $\cdot$ ), lo que permite retardar la etapa de propagación durante la auto-oxidación de los aceites. El mecanismo de acción antioxidante a través del cual actúan estos compuestos, consiste en la transferencia de un átomo de hidrógeno del grupo OH del anillo cromano al radical peroxilo, para formar un hidroperóxido lipídico (ROOH) y un radical tocoferoxi, el cual se estabiliza por resonancia en el anillo aromático (Polak et al., 2011).

**2.3.3.2 Flavonoides.** Los flavonoides son sustancias bioactivas producidas por los sistemas de defensa de las plantas como respuesta a condiciones de estrés y ataque de patógenos (Hurtado-Fernández et al., 2010). Su estructura básica está constituida por dos anillos fenólicos (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) en una combinación C6-C3-C6, encontrándose a menudo hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5' (Figura 7). La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides; los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianidinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados) y los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas) (Ravishankar et al., 2013).

**Figura 7.** Estructura química de los flavonoides.



Fuente: (Ravishankar et al., 2013).

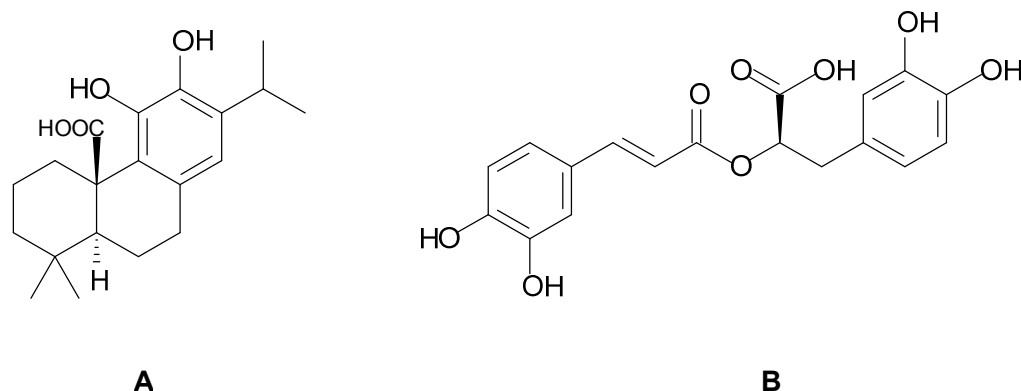
El mecanismo de acción antioxidante de los flavonoides está basado en su capacidad para ceder hidrógenos de los grupos hidroxilo sustituyentes; así tanto el grado de hidroxilación como la posición de dichos grupos en el anillo, juegan un papel importante en la actividad antioxidante y la inhibición de la peroxidación lipídica (Guardado Yordi et al., 2012).

**2.3.3.3 Ácidos fenólicos.** Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios, que engloban un gran grupo de compuestos de origen natural, con un amplio espectro de actividades biológicas, entre las que se destacan su actividad antimicrobiana, anti-inflamatoria, antiviral y antioxidante (Arceusz & Wesolowski, 2013). Este grupo está constituido por un rango amplio de ácidos benzoicos sustituidos y derivados del ácido hidroxi-cinámico; ambos tipos están distribuidos en la naturaleza en forma libre o conjugada, como ésteres y/o glucósidos (Plazonić et al., 2009). Algunos ácidos como el clorogénico, rosmarínico, cafeico y ferúlico pertenecientes a la familia de los ácidos fenólicos se encuentran presentes en grandes concentraciones en extractos y aceites esenciales de plantas y especias, lo que ha potenciado investigaciones a cerca de los componentes químicos presentes en ellas y su potencial uso como conservantes y antioxidantes de origen natural sin efectos adversos para la salud (Eskin & Przybylski, 2000).

**2.3.4 Extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.).** Los extractos de plantas y especias son empleados en la industria de alimentos como agentes saborizantes, como productos farmacéuticos y como bio-conservantes, debido a sus propiedades funcionales, antimicrobianas y antioxidantes

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) perteneciente a la familia de las Lamiaceae, es una planta perenne originaria del mediterráneo; esta especie ha tenido gran interés debido a su reconocida actividad antibacteriana y su efecto antiproliferativo de células cancerígenas de colon, seno, hígado y ovario, entre otros (Tai et al., 2012; González-Vallinas et al., 2013). Dicha actividad se ha asociado a la presencia de compuestos como el ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico, (Figura 8) a los que además se atribuye la elevada actividad antioxidante exhibida por los extractos obtenidos de esta fuente (Almela et al., 2006; Özcan & Arslan, 2011; Jordán et al., 2014). Debido a esto, diferentes extractos de romero han sido empleados en la estabilización de diversas matrices alimenticias, en donde ha demostrado tener un marcado efecto protector contra fenómenos de peroxidación lipídica (Tironi et al., 2010), por lo que en la actualidad se ha venido empleando en la estabilización de aceites y grasas (Doolaeghe et al., 2012).

**Figura 8.** Estructura química del A) Ácido carnósico y B) Ácido rosmarínico.



Fuente: (Eskin & Przybylski, 2000).

Esta composición química se ve afectada por la región de origen y las condiciones ambientales a las que están sometidos los cultivos de romero, así como por el método de extracción del mismo, por lo que investigaciones recientes han apuntado a identificar los factores que pueden afectar sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antivirales y antibacteriales, así como a la búsqueda de tecnologías de extracción que permitan conservar dichas propiedades a lo largo del proceso de obtención de estos extractos (Peshev et al., 2011). Todos los estudios coinciden en destacar que la actividad antioxidante está directamente relacionada con la composición del extracto obtenido del romero; de esta manera se resalta el rol de la tecnología en la producción de dichos extractos y consecuentemente en la actividad antioxidante de los mismos (Vicente et al., 2013).

## 2.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA Y VIDA ÚTIL

La estabilidad oxidativa hace referencia a la resistencia de los lípidos a la oxidación; puede ser expresada como el periodo de tiempo requerido para alcanzar un punto crítico de oxidación. Este parámetro sirve como indicador del comportamiento y vida útil de los lípidos, y depende de la composición del aceite, de las condiciones de procesamiento y almacenamiento, la temperatura, la concentración y tipo de oxígeno, la presencia de metales y de antioxidantes, entre otros (Guillén & Cabo, 2002). La determinación de este parámetro es de gran importancia para la industria de los alimentos, pues a partir de los resultados obtenidos, es posible optimizar y controlar el proceso de producción para garantizar la obtención de un aceite de elevada calidad (García-Moreno et al., 2013).

Existen diversas maneras de realizar un estudio de vida útil, sin embargo los más empleados son los estudios acelerados, en donde es posible predecir, en corto tiempo y bajo condiciones de almacenamiento extremas, la vida de anaquel de un producto en condiciones normales (García-García et al., 2008). A fin de acelerar el proceso de deterioro de los alimentos, se emplean condiciones de almacenamiento que normalmente involucran temperaturas elevadas. La suposición principal que se hace en este tipo de estudios es que al almacenar los alimentos a una mayor temperatura se aceleran las reacciones de deterioro y por lo tanto se disminuye el tiempo de vida útil. Así, la vida útil en condiciones normales es obtenida por extrapolación de los datos obtenidos en la determinación acelerada (Man, 2002).

La calidad es un atributo complejo y dinámico en los alimentos, que influye en el grado de aceptabilidad por el consumidor. A través de un estudio cuidadoso de los componentes del alimento y del proceso, es posible determinar qué reacciones tienen los efectos más críticos en la tasa de deterioro de los mismos. A partir de este análisis, es posible representar la pérdida de calidad de un alimento como la pérdida de uno o más índices cuantificables, o como la aparición de un producto indeseable (A) (Steele, 2004). En alimentos con un elevado contenido de lípidos la estabilidad oxidativa, medida a través de la aparición de productos de oxidación constituye un índice cuantificable de pérdida de calidad que puede prestarse para monitorear la vida útil de los aceites durante el almacenamiento (Kozak & Samotyja, 2013).

La tasa de aparición o pérdida de un atributo A puede ser representada por la ecuación 20, conocida también como ecuación de velocidad.

$$r_A = -\frac{dA}{dt} = K[A]^m \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde K es la constante de velocidad aparente y m es el orden aparente de la reacción. El término aparente hace referencia a que la ecuación 20 no representa el mecanismo global del fenómeno estudiado. A continuación se presentan las ecuaciones de velocidad resueltas para valores de m= 0, 1, 2 (Ecuaciones 21-23).

$$A = A_0 - Kt \quad m = 0 \quad (\text{Ec. 21})$$

$$A = A_0 e^{-kt} \quad m = 1 \quad (\text{Ec. 22})$$

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + Kt \quad m = 2 \quad (\text{Ec. 23})$$

La mayoría de las reacciones de pérdida de calidad en alimentos, y por tanto involucradas en la disminución de la vida útil de los mismos, han sido clasificadas como reacciones de cero o de primer orden, por lo que los datos experimentales, obtenidos en la realización de estudios de vida útil, se ajustan muy bien a las ecuaciones mostradas anteriormente (Cunha & Oliveira, 2000).

A fin de determinar la constante de velocidad (K) y el orden aparente (m) de la reacción es posible desarrollar diversas metodologías; una de ellas, la más empleada, consiste en realizar mediciones de un índice cuantificable en el tiempo bajo condiciones controladas de temperatura. Los datos obtenidos son ajustados a la ecuación 21 y a las formas linealizadas de las ecuaciones 22 y 23; mediante el coeficiente de regresión lineal se determina el orden aparente de reacción y a partir de la pendiente se obtiene el valor de la constante de velocidad aparente (Salazar et al., 2007).

Las ecuaciones cinéticas para la estimación de vida útil son específicas para cada matriz alimenticia y para cada condición ambiental estudiada. Entre los factores ambientales que pueden tenerse en cuenta a la hora de realizar un estudio de vida útil, la temperatura es el factor más involucrado en este tipo de estudios. El efecto de la temperatura en el deterioro de los alimentos ha sido un fenómeno ampliamente estudiado. En la mayoría de estudios se ha propuesto la utilización de la ecuación de Arrhenius como la más apropiada para describir el efecto de la temperatura en la velocidad de degradación en matrices alimenticias complejas (Ecuación 24)

$$K = K_A \exp\left(\frac{-E_A}{RT}\right) \quad (\text{Ec. 24})$$

**3 CAPÍTULO 1: ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE ALMENDRA DE CHOIBÁ  
(*Dipteryx oleifera* Benth.) SUPLEMENTADO CON EXTRACTO DE ROMERO  
(*Rosmarinus officinalis* L.)**

**Por A.M. Piedrahita,<sup>a</sup> A. Cogollo,<sup>b</sup> B.A. Rojano.<sup>c\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratorio Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.  
Medellín, Colombia

<sup>b</sup>Jardín Botánico de Medellín "Joaquín Antonio Uribe". Medellín, Colombia

<sup>c</sup>Laboratorio Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.  
Medellín, Colombia

(\*brojano@unal.edu.co)

## RESUMEN

### Estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.)

#### suplementado con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) perteneciente a la familia Fabaceae, es una especie promisoría para la obtención de aceites comestibles de elevada calidad nutricional. El 54% del contenido lipídico corresponde a ácido oleico, lo que lo hace susceptible de sufrir reacciones de peroxidación lipídica. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), a 1000mg/L (ER1000) y 1500mg/L (ER1500), sobre la estabilidad del aceite de almendra de Choibá. Como control positivo se empleó Butil hidroxitolueno (BHT) a 200mg/L y como control negativo (Control) se empleó aceite sin adición de extracto. El avance en la oxidación del aceite, a  $100\pm 1^{\circ}\text{C}$  y con aireación (1150mL aire/min), fue evaluado a través de la medición de productos de oxidación: dienos conjugados (DC), valor de peróxido (VP), especies reactivas al ácido 2-tiobarbúrico (TBARS) y porcentaje de compuestos polares totales (%CPT). La adición de extracto de romero a 1500mg/L (ER1500) disminuye significativamente la formación de productos de oxidación en el aceite, en términos de la aparición de hidroperóxidos (VP) y %CPT, más que el BHT a 200mg/L; los resultados anteriores demostraron que el extracto de romero aumentó el tiempo de estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá, lo que avalúa el uso de este extracto en la estabilización de matrices lipídicas. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en términos de la aparición de DC y TBARS.

*PALABRAS-CLAVE: Choibá - Dipteryx oleifera - Estabilidad oxidativa - Extracto de romero - Peroxidación Lipídica*



## ABSTRACT

### **Oxidative stability of Choibá oil (*Dipteryx oleifera* Benth.) supplemented with rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) belonging to Fabaceae is a promising specie for the production of edible oil of high nutritional quality. The lipid content correspond to 54% of oleic acid, which makes it susceptible to lipid peroxidation reactions. The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.), at 1000mg/L (RE1000) and 1500mg/L (RE1500), on the Choiba's oil stability. As a positive control Butylated hydroxytoluene (BHT) at 200mg/L was used, and as negative control (Control) oil without addition of extract was used. Progress in oil oxidation, at  $100\pm 1^{\circ}\text{C}$  with aeration (1150mL air/min) was evaluate through the measurement of oxidation products: conjugated dienes (CD), peroxide value (PV), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and percentage of total polar molecules (%TPM). The addition of rosemary extract at 1500mg/L (RE1500) significantly reduces de formation of oxidation products in the oil, in terms of the appearance of hydroperoxides (PV) and %TPM, more than BHT at 200mg/L; the results revealed that rosemary extract increased oxidative stability of Choibá oil, which admit the use of this extract in stabilization of lipid matrices. No significant differences between treatments in terms of the appearance of DC and TBARS were found.

**KEY-WORDS:** *Choibá – Dipteryx oleifera - Oxidative stability - Rosemary extract -Lipid peroxidation*

## 1. INTRODUCCIÓN

El Choibá o almendro amarillo (*Dipteryx oleifera* Benth.) es una especie arbórea que pertenece a la familia Fabaceae; se distribuye desde Nicaragua hasta el noroeste de Colombia desde el nivel del mar hasta los 800 metros de altitud (Zarucchi, 2001). Su uso principal es la obtención de madera; cerca del 40% de su población ha sido explotada, por lo que ha sido categorizada como una especie vulnerable (VU A2ac). El fruto del Choibá es una vaina ovoide, en cuyo interior se encuentra una única almendra, que tradicionalmente es secada para ser consumida directamente o en la elaboración de bebidas energéticas (Cárdenas & Salinas, 2006; Arrázola et al., 2009). Estudios previos sobre la composición del aceite obtenido de las almendras de Choibá reportan que está constituido por ácido oleico en un 52% como componente principal y otros ácidos grasos insaturados menores, dándole a la almendra una elevada calidad nutricional (Zapata-Lujan et al., 2013). Sin embargo, esta misma condición lo hace susceptible de sufrir reacciones de oxidación que provocan el deterioro del aceite.

La peroxidación lipídica o auto-oxidación es la forma más común de oxidación sufrida por ácidos grasos insaturados, y es considerada la principal causa de deterioro de las grasas y aceites comestibles durante el almacenamiento o los tratamientos con calor, como los procesos de fritura y cocción de alimentos (Taghvaei et al., 2014). Este fenómeno consiste en una serie de reacciones auto-catalíticas, en donde el oxígeno reacciona con los ácidos grasos insaturados, para formar productos intermedios y finales de oxidación, que afectan las propiedades organolépticas y nutricionales del aceite (Roman et al., 2013). Adicionalmente, los compuestos generados durante el proceso de descomposición de los aceites pueden ser absorbidos por los alimentos procesados y ocasionar efectos negativos sobre la salud del consumidor (Aladedunye & Przybylski, 2013).

Con el fin de retardar las reacciones de peroxidación lipídica, tradicionalmente se han empleado antioxidantes de origen sintético como el Butil hidroxitolueno (BHT), Ter-butil hidroxiquinona

(TBHQ) y el Butil hidroxianisol (BHA); sin embargo, su uso ha sido restringido debido al riesgo potencial sobre la salud de los consumidores (Gunstone, 2002; Ding & Zou, 2012). Este hecho ha generado una tendencia creciente hacia la reducción y eliminación del uso de aditivos sintéticos y potenciado la búsqueda de antioxidantes de origen natural ricos en carotenoides, antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Rivero-Pérez et al., 2008; Nour et al., 2013). Para conseguir este objetivo, investigaciones recientes han centrado su atención en el estudio de la actividad antioxidante de productos de origen vegetal como frutos, plantas y especias, identificadas como fuentes importantes de compuestos polifenólicos responsables de dicha actividad, permitiendo su aplicación y uso tecnológico en la industria de grasas, aceites y alimentos (Rodríguez-Rojo et al., 2012).

Dentro de las plantas más estudiadas se encuentra el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), especia que ha tenido gran interés debido a su reconocida actividad antibacteriana y su efecto antiproliferativo de células cancerígenas de colon, seno, hígado y ovario, entre otros (Tai et al., 2012; González-Vallinas et al., 2013). Gran parte de la actividad biológica del romero está asociada a la presencia de compuestos atrapadores de radicales libres, como el ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico, metabolitos que aportan una elevada actividad antioxidante (Almela et al., 2006; Estévez et al., 2007; Martínez et al., 2013; Jordán et al., 2014).

Diferentes extractos de romero han sido empleados en la estabilización de diversas matrices alimenticias, en donde han demostrado tener un marcado efecto protector contra fenómenos de peroxidación lipídica estabilizando así las grasas y aceites (Doolaege et al., 2012, Zapata et al., 2014).

Por todo lo anterior el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de la adición de extracto de romero sobre la estabilidad oxidativa del aceite extraído de las almendras de Choibá, con el fin de constituir una fuente importante de información para la aplicación de mecanismos de

estabilización y conservación de aceites, y promover el estudio científico y tecnológico de semillas oleaginosas como fuentes promisorias de aceites comestibles.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Las almendras de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) fueron obtenidas de frutos caídos y recogidos del suelo de manera aleatoria, en la región del bajo cauca en el departamento de Antioquia (Colombia), asegurando que se encontraban sin ningún daño fisiológico aparente. Una vez seleccionadas se almacenaron en bolsas plásticas y se llevaron al laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, donde posteriormente fueron secadas, en una estufa de vacío a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas para garantizar la eliminación de humedad, y molidas para proceder con la extracción del aceite.

### **2.2. Preparación del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Hojas secas de romero, cultivadas en el departamento de Tolima (Colombia), fueron pulverizadas en un procesador de alimentos industrial (Ika-Werk®); posteriormente se sometieron a extracción por percolación utilizando etanol como disolvente, en una relación 1:5. El extracto etanólico se filtró a través de un papel tipo Whatman (GF/A, 110mm) y el percolado se destiló a vacío a  $40^{\circ}\text{C}$  en un evaporador rotatorio (Heidolph®). Finalmente, el extracto se secó en una estufa de vacío a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas para garantizar la eliminación de cualquier residuo de solvente. El extracto obtenido fue de color verde oscuro, el cual se disolvió en glicerol y se almacenó en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  previo a su uso.

## 2.3 Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de ácido carnósico y rosmarínico del extracto de romero

Para la determinación de la actividad antioxidante y contenido de ácidos carnósico (AC) y rosmarínico (AR) del extracto de romero, se tomaron 50µL de la muestra original y se disolvieron en 950µL de etanol. A partir de esta solución se realizaron las diluciones necesarias para cada uno de los análisis realizados.

### *Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)*

*ORAC hidrofílico:* El procedimiento experimental está basado en reportes previos de Ou et al. (2002) en esta evaluación se empleó TROLOX® como estándar y condiciones controladas de temperatura (37±1°C) y pH (7.4). Las lecturas se realizaron a una λ de excitación de 493nm y de emisión de 515nm. Para el desarrollo de la metodología se utilizaron soluciones estándar de fluoresceína 1x10<sup>-2</sup>M disuelta en buffer fosfato (PBS) pH 7.4 (75mM) y AAPH (2,2'-azo-bis 2-amidino-propano dihidrocloruro) 0.6M en PBS (75mM). La muestra se preparó mezclando 21µL de fluoresceína, 2.899µL de PBS, 30µL del extracto (muestra problema) y 50µL de AAPH. El efecto protector del antioxidante se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína, entre el control negativo y la muestra, y se comparó con la curva patrón. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto (µmol Trolox/g de extracto), de acuerdo a la siguiente expresión.

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^0)}{(AUC_{Trolox} - AUC^0)} f[Trolox]$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC<sup>0</sup> área bajo la curva para el control, AUC<sub>Trolox</sub> área bajo la curva para el Trolox, f es el factor de dilución del extracto (Prior et al., 2005). La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro PerkinElmer® LS55.

*ORAC lipofílico:* se siguió el procedimiento previamente descrito a excepción de que la muestra y el trolox fueron preparados con ciclodextrina metilada (7%) y en una mezcla de acetona-agua al

50%. Las disoluciones se agitaron durante 1 hora y se procedió al análisis de acuerdo con lo descrito en el método ORAC hidrofílico. Los valores reportados corresponden a la suma de los ORAC hidro y lipofílicos respectivamente.

#### *Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH*

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre estable que presenta una coloración púrpura en medio metanólico, su coloración disminuye como consecuencia de la donación de un electrón de un antioxidante. Para la determinación de la capacidad antioxidante por este método, 10µL de muestra se adicionaron a 990µL de una solución metanólica de DPPH, y se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar este radical, por medio de la disminución en la absorbancia a 517nm, luego de 30 minutos de reacción, y se comparó este valor con la curva de referencia construida con TROLOX® como patrón. Los resultados fueron expresados como valores TEAC (µmol Trolox/g de muestra) (Rojano et al., 2008). La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV/ Vis.

#### *Determinación del contenido de fenoles totales*

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi, (1965) con algunas modificaciones. A 50µL de la muestra se adicionaron 125µL del reactivo de Folin, y 400µL de carbonato de sodio 7.1% (p/v), ajustando con agua destilada hasta 1000µL, se realizó la lectura espectrofotométrica a 760nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar ácido gálico (fenol). Los resultados fueron expresados como miligramos de ácido gálico equivalentes por gramo de muestra (mg GAE/g de muestra).

### *Determinación del contenido de ácido carnósico y rosmarínico del extracto de romero*

El contenido de ácido carnósico (AC) y rosmarínico (AR) del extracto de romero fue determinado mediante análisis por HPLC según el protocolo modificado de Martínez et al. (2013). El extracto etanólico de romero fue filtrado a través de un tamaño de poro de 0.45µm y se hicieron diluciones en etanol grado HPLC antes de la inyección al cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo líquido (Shimadzu, LC-20AD), equipado con un auto inyector SIL-20A /HT, un módulo de comunicación CBM-20A y un (PDA) SPD-M20A, calibrado a 284nm. La cuantificación de ambos ácidos se llevó a cabo en una columna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) 250\*4. La fase móvil fue programada como un gradiente lineal desde 95% de A (840mL de agua, 150mL de acetonitrilo y 8.5mL de ácido acético) y 5% de B (metanol) hasta 100% de B, en 40 minutos con un flujo de 0.6mL/min y un volumen de inyección de 20µL. La identificación de ambos ácidos fue realizada por comparación de los tiempos de retención con los de los estándares puros, ambos obtenidos de Sigma- Aldrich. La cuantificación de ambos ácidos fue realizada a través de la realización curvas de calibración en concentraciones de 0-80mg/L y de 0-1000mg/L, para el ácido carnósico y rosmarínico respectivamente.

### **2.3. Extracción del aceite de la almendra de Choibá**

La extracción del aceite de la almendra de Choibá se realizó según el método reportado por Thiex et al. (2003), técnica empleada para la extracción de aceites de cereales y semillas, que emplea el equipo Soxhlet y solventes volátiles para extraer la materia grasa presente en las semillas. El solvente empleado fue hexano con muy buenos rendimientos en la extracción de aceites de semillas vegetales (Dutta et al., 2014)

### **2.4. Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de almendra de Choibá**

Para la determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de almendra de Choibá se empleó un cromatógrafo de gases CG 6890N Agilent acoplado a un detector selectivo MS 5973N Agilent y

equipado con un inyector Split/splitless. La temperatura del inyector fue  $300\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Las muestras previamente derivatizadas, para facilitar su detección como metil ésteres (FAME), fueron inyectadas automáticamente en el modo splitless. Se empleó una columna HP-5 ms (5% fenilmetil siloxano) de 30m, 0.25mm con un espesor de película  $0.25\mu\text{m}$  y una temperatura máxima de  $325\pm^{\circ}\text{C}$ . Para identificar el tipo de ácido graso presente se empleó la base de datos NIST 98 (Zapata-Luján et al., 2013).

## **2.5. Estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá**

A 30mL de aceite de almendra de Choibá se adicionó extracto de romero hasta obtener concentraciones finales de 1000mg/L (ER1000) y 1500mg/L (ER1500). Como control positivo se utilizó BHT (Butil hidroxitolueno) a una concentración de 200mg/L y como control negativo se tomó una muestra de aceite sin antioxidante (Control). Las muestras así preparadas se sometieron a una temperatura de  $100\pm 1^{\circ}\text{C}$  y a un flujo de aire de 1150mL/min. Con el fin de evaluar el efecto de la adición del extracto de romero sobre la estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá, se hizo seguimiento de la aparición de productos primarios, intermedios y finales de oxidación: dienos conjugados (DC), valor de peróxido (VP), especies reactivas al ácido 2-tiobarbúrico (TBARS) y porcentaje de compuestos polares totales (%CPT). Las muestras fueron recolectadas cada hora a partir de la hora 3, hasta completar 10 horas de experimentación. Los análisis de VP y CD no se realizaron para las muestras tomadas en las horas 3 y 4.

### *Determinación de dienos conjugados (DC)*

El contenido de DC se determinó por el procedimiento descrito por Shahidi et al. (2005), con algunas modificaciones. 0.02g de aceite de almendra de Choibá se mezclaron con 2000 $\mu\text{L}$  de ciclohexano, se agitaron en un vortex (Fischer Scientific®) por 10 segundos y se leyó la absorbancia a 234nm, en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum UV-Vis), en donde los dienos conjugados presentan su máximo de absorción. Un incremento en la



absorbancia es indicativo de oxidación en el aceite. Los valores de dienos conjugados se calcularon según la siguiente expresión:

$$DC [\mu\text{mol DC/g de aceite}] = \frac{\left(\frac{\text{Abs}_{234} * 2000}{\epsilon * l}\right)}{W}$$

Donde  $\text{Abs}_{234}$  es la absorbancia de la muestra a 234nm,  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar ( $25250\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  es la longitud de la celda (1.0cm), y 2000 es un factor que involucra el volumen de ciclohexano (2mL) y el factor de conversión de unidades (1000  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) y  $W$  es el peso de la muestra en gramos.

#### *Valor de peróxido (VP)*

El valor de peróxido se determinó mediante el método descrito por Shantha & Decker (1994), con algunas modificaciones. Este método se fundamenta en la capacidad de los peróxidos lipídicos de oxidar el  $\text{Fe}^{2+}$  hasta  $\text{Fe}^{3+}$ . A 0.03g de muestra se adicionaron 3.5mL de cloroformo:metanol (7:3), la mezcla se agitó por 10 segundos. Luego se tomó 1mL de la solución anterior y se adicionaron 50 $\mu\text{L}$  de una solución  $\text{Fe}^{3+}$ , preparada a partir de  $\text{FeSO}_4$  (0.144M) y  $\text{BaCl}_2$  en HCl (0.4M), y 50 $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (0.44M), se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 510nm en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV/ Vis. Los resultados se expresaron como miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de aceite (meq Oxígeno/Kg de aceite).

#### *Determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)*

Esta técnica permite cuantificar el malondialdehído (MDA), uno de los compuestos finales de la peroxidación lipídica. El MDA se combina con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) en una relación 1:2 para formar un complejo fluorescente, el cual se mide a 500nm de excitación y 550nm de emisión en un equipo de fluorescencia PerkinElmer® LS55. A 500 $\mu\text{L}$  de muestra se adicionaron 80 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 15% y 160 $\mu\text{L}$  TBA (0.6%). Luego, se adicionaron 600 $\mu\text{L}$  de butanol, se agitó y se efectuaron las respectivas mediciones. Los resultados fueron expresados como

nanomoles de malondialdehído por mililitro de aceite (nmol MDA/mL de aceite), a partir de la curva de calibración realizada con MDA como patrón (Williamsom et al., 2003, Ospina et al., 2014).

#### *Determinación del porcentaje de Compuestos Polares Totales (%CPT)*

Se determinó el contenido de compuestos polares totales de acuerdo al método de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) bajo la norma 2.507 de 1987; usando cromatografía de adsorción en columna de sílica gel como fase fija y una mezcla de solventes (hexano: éter etílico (90:10) v/v) como fase móvil, para la elución de los compuestos no polares (los triglicéridos no alterados), y así obtener luego por diferencia de pesos el contenido de compuestos polares y sus respectivos porcentajes (Juárez et al., 2005).

## **2.7 Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron por triplicado, reportándose los valores medios y sus desviaciones estándar. Diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos fueron estimadas a través de un análisis de varianza (ANOVA) para las variables evaluadas, con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Este análisis fue realizado usando el paquete estadístico RStudio (R-3.0.3, Windows FAQ) y las gráficas fueron realizadas por Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA).

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Actividad antioxidante del extracto de romero**

En la tabla 1, se presenta el contenido de fenoles totales, y ácidos rosmarínico (AR) y carnósico (AC) del extracto de romero obtenido en la presente investigación. El potencial antioxidante de los compuestos fenólicos ha tenido un creciente interés debido a su capacidad para inhibir o retardar

las reacciones de peroxidación lipídica en los alimentos (Bubonja-Sonje et al., 2011). Estudios preliminares acerca de la composición de diferentes extractos de romero han reportado un elevado contenido de carnosol, ácido carnosólico y rosmarínico, compuestos altamente antioxidantes y otros compuestos fenólicos de menor actividad (Almela et al., 2006; Jordán et al., 2014). Estas sustancias pueden actuar como antioxidantes a través de un mecanismo que involucra la transferencia de átomos de hidrógeno, estabilizando radicales libres formados durante los procesos de oxidación ácidos grasos insaturados (Tironi et al., 2010).

Los resultados revelaron un contenido de fenoles totales de 91.01mg GAE/g extracto; resultado comparable lo reportado por Erkan et al. (2008) y Hernández-Hernández et al. (2009) quienes encontraron contenidos de 162.00 y 109.50mg GAE/g extracto, respectivamente. El contenido de ácidos carnosólico y rosmarínico del extracto obtenido fue de 245.66mg AC/L y 20466.89 mg AR/L, respectivamente; un contenido similar de ácido carnosólico (360mg AC/L) y menor de ácido rosmarínico (500mg AR/L) fue reportado por Rodríguez-Rojo et al. (2012) para extractos etanólicos de otras latitudes. Hernández-Hernández et al. (2009) reportaron un contenido superior de ácido Carnosólico (263400 mg AC/L de extracto) y menor de ácido rosmarínico (14100mg AR/L).

Esta diferencia en la concentración de ácido rosmarínico y carnosólico del extracto de romero, puede deberse a diferentes factores como por ejemplo, la región de origen y las condiciones ambientales, así como por el método de extracción, lo que afecta directamente sus propiedades antioxidantes (Peshev et al., 2011).

En la tabla 2 se presenta la actividad antioxidante, medida por los métodos DPPH y ORAC, del extracto de romero. Los resultados obtenidos por el método DPPH (557.47 $\mu$ mol Trolox/g de extracto), revelaron una mayor actividad antioxidante que lo reportado por Wojdylo et al. (2007) (51.3 $\mu$ mol Trolox/g de extracto) pero menor a lo reportado por Vallverdú-Queralt et al. (2014) con un valor de 1980 $\mu$ mol Trolox/g de extracto.

Un comportamiento similar se observó en los resultados de capacidad atrapadora de radicales de oxígeno, en donde, el extracto de romero con un valor ORAC de 3440.00 $\mu$ mol Trolox/g de extracto, presenta una mayor actividad que lo reportado previamente por Bentayeb et al. (2014) (599.34 $\mu$ mol Trolox/g de extracto)

Al comparar los resultados obtenidos en la presente investigación, con lo reportado para especias con contenidos similares de fenoles totales, medidos por el método de Folin-Ciocalteu, pudo determinarse una mayor actividad antioxidante por el método DPPH que algunos extractos etanólicos de chinchilcona (414.70 $\mu$ mol Trolox/g de extracto), cedrón (512.80 $\mu$ mol Trolox/g de extracto) y toronjil (253.80 $\mu$ mol Trolox/g de extracto). Similar a lo observado en los resultados de capacidad atrapadora de radicales de oxígeno, en donde, el extracto de romero presentó una mayor actividad que los extractos de chinchilcona (2326.20 $\mu$ mol Trolox/g de extracto), cedrón (1175.00 $\mu$ mol Trolox/g de extracto) y toronjil (476.60 $\mu$ mol Trolox/g de extracto) (Chirinos et al., 2013).

Los resultados anteriores señalan el uso potencial del extracto de romero cultivado en las zonas andinas colombianas como aditivo antioxidante en la industria de los alimentos, con el fin de sustituir el uso de antioxidantes sintéticos, cuya aplicación es cada vez más restringida, debido a los reconocidos efectos nocivos para la salud del consumidor (Ding & Zou, 2012).

### **3.2. Caracterización del aceite de almendra de Choibá**

El grado y velocidad de deterioro de los lípidos, no sólo depende de la temperatura y la exposición al oxígeno; sino también de la composición del aceite, por ejemplo, el grado de insaturación es un factor que influye de manera directa en la cinética de las reacciones de degradación (Guillén & Cabo, 2002; Choe & Min, 2006; García-Moreno et al., 2013; Martínez-Yusta & Guillén, 2014); aceites comestibles con un alto contenido de ácidos grasos insaturados, especialmente ácidos grasos poli-insaturados, son más susceptibles a la oxidación (Zhang et al.,

2010), por lo cual, el tipo y concentración de ácidos grasos presentes en un aceite constituye un parámetro de calidad importante en la selección de aceites de origen vegetal (Fernández-Iglesias et al., 2014).

La caracterización del aceite de la almendra de Choibá, es un paso primordial para evaluar su estabilidad oxidativa y los posibles mecanismos de estabilización que permitan prolongar su vida útil, y promover el uso de esta especie como fuente alimentaria.

El proceso de extracción del aceite alcanzó un rendimiento de 18.09%; este valor es menor al contenido de grasa (57%) reportado por Arrázola et al. (2009) pero cercano al 24.72% obtenido por Zapata-Luján et al. (2013) para almendras de Choibá recolectadas en la misma región pero en cosechas que difieren entre sí por un periodo de aproximadamente dos años.

En la tabla 3 se presenta el porcentaje de ácidos grasos encontrados en el aceite de almendra de Choibá. Los resultados revelaron que el aceite está constituido por un 54.03% de ácido oleico, 11.27% de ácido palmítico y en menor proporción por ácido linoleico (1.09%); valores similares a los reportados previamente por Zapata-Luján et al. (2013). El contenido de ácido oleico del aceite de almendra de Choibá, es comparable con lo reportado para aceites de alta ingesta como el de oliva (60-70%) y el de girasol mid-oleico (50-70%) (Izquierdo et al., 2002).

Algunas investigaciones han concluido que un contenido elevado de ácido oleico en aceites, está asociado con la disminución del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares por su efecto en la reducción del colesterol LDL y triglicéridos en la sangre (López-Huertas, 2010; Dhakal et al., 2014). Asimismo, estudios recientes han sugerido que este ácido graso mono-insaturado, tiene un potencial en la disminución del riesgo a padecer varios tipos de cáncer entre los que se destacan el de seno, estómago y ovarios (Menéndez et al., 2006).

Los resultados anteriores ratifican la posibilidad de emplear la almendra de Choibá como una fuente promisoría para la obtención de aceite comestible de elevada calidad nutricional.

### **3.3. Estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá**

La estabilidad oxidativa hace referencia a la resistencia de los lípidos a la oxidación y constituye un indicador importante del comportamiento y la vida útil de los aceites. Este parámetro depende de diversos factores como la temperatura, la concentración de oxígeno, la presencia de metales y de antioxidantes y la composición del aceite (Guillén & Cabo, 2002; García-Moreno et al., 2013). A pesar de que el ácido oleico es más estable frente a los fenómenos oxidativos que otros ácidos grasos poli-insaturados, como el linoléico, sigue siendo susceptible a sufrir reacciones de oxidación asociadas con la pérdida de valor nutricional y desarrollo de sabores y olores desagradables característicos de la rancidez (Pereyra-Irujo & Aguirrezábal, 2007); de tal manera, es pertinente un estudio que permita evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá.

Las figuras 1, 2, 3 y 4 muestran el comportamiento de la aparición de dienos conjugados (DC), valor de peróxido (VP), especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y porcentaje de compuestos polares totales (%CPT), respectivamente, en presencia y ausencia del extracto romero (ER1000 y ER1500) y BHT (200mg/L), cuando se tienen condiciones aceleradas de oxidación en el aceite ( $100\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 1150mL/min).

Las reacciones de auto-oxidación son un complejo sistema de reacciones en cadena que se dividen en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación. Durante la etapa de iniciación, los radicales libres y otras especies reactivas, abstraen un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado para formar un radical lipídico ( $\text{R}\cdot$ ) (Roman et al., 2013). Una medida del grado de avance de esta etapa durante el proceso oxidativo, es la aparición de los sistemas de

dobles enlaces conjugados, que son especies iniciales formadas a partir del radical lipídico ( $R\cdot$ ) por deslocalización del electrón desapareado (Choe & Min, 2006).

Como puede observarse en la figura 1, durante las primeras seis horas para todos los casos (Control, ER1000, ER1500 y BHT), se presentó un incremento gradual en la formación de dienos conjugados, expresados como  $\mu\text{mol DC/g}$  de aceite, alcanzando un máximo a las siete horas ( $22\mu\text{mol DC/g}$  de aceite), tiempo a partir del cual comenzaron a disminuir hasta  $15\mu\text{mol DC/g}$  de aceite. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) en la formación de dienos conjugados entre tratamientos para cada uno de los tiempos analizados.

A pesar de no ser una técnica adecuada para la evaluación de aceites con alto contenido de ácido oleico, ácido graso mono-insaturado, que no produce sistemas de dobles enlaces conjugados durante los procesos de auto-oxidación, la medición de los mismos permite establecer las condiciones bajo las que los aceites deben ser empleados y almacenados sin que se vean afectadas sus propiedades organolépticas y nutricionales (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013). En el aceite de almendra de Choibá la formación de dienos conjugados es baja, pero aún así perceptible debido a la presencia de ácidos grasos poli-insaturados, que a pesar de que se encuentran en menor proporción con respecto al contenido de ácido oleico, dan inicio a las reacciones de oxidación y conducen a la formación de cadenas conjugadas (Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2010; Roman et al., 2013).

La cuantificación de hidroperóxidos en aceites comestibles es un método comúnmente empleado para medir el grado de oxidación. Estos compuestos son formados durante la segunda etapa de la peroxidación lipídica. Durante esta fase, el radical  $R\cdot$  reacciona con el oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ) para formar el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), el cual una vez formado reacciona con nuevas moléculas de lípido ( $\text{RH}$ ) para formar una nueva molécula de radical lipídico ( $R\cdot$ ) y el correspondiente hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) (Fagali & Catalá, 2009).

Como se observa en la figura 2, en el aceite de almendra de Choibá, se presenta una tendencia creciente en la formación de hidroperóxidos a lo largo de las diez horas de experimentación, para todos los casos. La concentración de estos compuestos aumenta de manera leve durante las primeras seis horas del ensayo, que corresponden al periodo de inducción de la peroxidación, y a partir de la hora siete aumentan de manera marcada, durante periodo de propagación de las reacciones de peroxidación lipídica.

Al comparar entre tratamientos en cada tiempo estudiado, es posible notar que a partir de las nueve horas se presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, siendo el tratamiento ER1500 el que presenta el mayor efecto protector sobre el aceite de almendra de Choibá, mostrando una reducción en la producción de hidroperóxidos del 60.91% frente al control, comparado con el tratamiento ER1000 y el BHT, que reducen el contenido de hidroperóxidos en un 30.17 y 21.54%, respectivamente. Estudios previos a cerca de la efectividad de diferentes extractos de romero en la estabilización oxidativa de lípidos, han demostrado que extractos de romero, con elevados contenido de ácido carnósico y/o rosmarínico, reducen hasta en un 50% la velocidad de formación de hidroperóxidos en grasas animales y aceites vegetales, como el de girasol y el de maíz. Adicionalmente se ha encontrado que estos extractos son más efectivos que mezclas comerciales de antioxidantes sintéticos, como el Butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA) y Propilgalato (PG) en la estabilización de aceites de origen vegetal (Che-Man & Jaswir, 2000; Zhang et al., 2010).

Las diferencias entre los tratamientos a partir de la novena hora, puede deberse a que los peróxidos lipídicos son compuestos inestables especialmente a elevadas temperaturas; y en las horas iniciales las tasas de formación y descomposición de los mismos es elevada, haciendo que el efecto de la adición del antioxidante en la estabilización del radical lipídico formado, sólo pudiera notarse al final del experimento, en donde dichas velocidades tienden a disminuir (Guillén



& Cabo, 2002). Resultados similares fueron reportados en estudios de estabilidad de aceites con contenidos similares de ácido oleico (Zhang et al., 2010; Pitaro et al., 2013).

Una forma directa de comparar el efecto antioxidante de las dosis de romero empleadas en el ensayo, 1000mg/L (ER1000) y 1500mg/L (ER1500), y el BHT a 200mg/L, es a través del cálculo del valor de protección ( $P=t_m/t_c$ ), definido como la razón del tiempo ( $t_m$ ) que un aceite con adición de antioxidante tarda en alcanzar un valor de peróxido de 100meq Oxígeno/Kg de aceite, con relación al tiempo ( $t_c$ ) que tarda la muestra Control (aceite sin antioxidante) en alcanzar el mismo valor. Este parámetro constituye una medida de la estabilidad del aceite y describe la habilidad de los antioxidantes para retardar la oxidación. A mayor P, mayor será la estabilidad del aceite y mayor la actividad del antioxidante estudiado (Samotyja & Małecka, 2007).

En la tabla 4 se presentan las ecuaciones que modelan el comportamiento observado en la formación de hidroperóxidos y el valor de protección, calculado a partir de dichas ecuaciones, en el aceite de almendra de Choibá estabilizado con extracto de romero y BHT. El modelo de ajuste de los datos experimentales (exponencial) fue seleccionado de acuerdo con el coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ), y el porcentaje de error medio absoluto (EMA), como se muestra en la tabla 4.

Para el tratamiento que contenía extracto de romero a 1500mg/L (ER1500) este valor fue calculado como un valor predictivo en base a la curva de tendencia exponencial en la formación de hidroperóxidos del aceite de Choibá ( $r^2=0.9519$ ), ya que durante el experimento el tratamiento ER1500 no alcanzó el valor de 100 meq Oxígeno/Kg de aceite. El comportamiento exponencial exhibido, ha sido reportado previamente en la literatura para la formación de peróxidos lipídicos durante las etapas de iniciación y propagación de las reacciones de oxidación de lípidos (Farhoosh & Hoseino-Yazdi, 2013; Pinchuk & Lichtenberg, 2014).

De acuerdo con el valor de protección (P) calculado para todos los tratamientos, el extracto de romero ER1500 (P:1.0933) reveló un mejor comportamiento en la estabilización del aceite de almendra de Choibá, seguido por el tratamiento ER1000 (P: 1.0102) y finalmente por el tratamiento que contenía BHT a 200mg/L (P:1.0084).

Lo anterior, evidencia la capacidad del extracto de romero en la inhibición de los procesos de rancidez sufridos por el aceite de almendra de Choibá bajo las condiciones estudiadas.

Es bien sabido que los hidroperóxidos formados durante las etapas iniciales de la auto-oxidación no ocasionan la alteración sensorial de los lípidos, sin embargo, los productos de descomposición de los mismos, como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, hidrocarburos y productos más oxidados de alta polaridad son los principales responsables de la formación de olores y sabores característicos de la rancidez, y la determinación de este tipo de compuestos es un parámetro importante para establecer la estabilidad de un aceite o grasa comestible (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013). Entre los productos finales de oxidación se destacan la presencia de malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) y acroleína, asociados a la aparición de olores y sabores rancios en los alimentos (Fagali & Catalá, 2009).

La técnica TBARS permite cuantificar la presencia de MDA, como una medida del grado de avance de las reacciones de oxidación en lípidos, en términos de productos secundarios de oxidación. En la figura 3 se observa un aumento marcado en la concentración de MDA, desde la hora cero hasta la hora seis, en todos los tratamientos evaluados, pasando de un valor promedio 1.43 a 23.13nmol MDA/mL de aceite; tiempo tras el cual disminuye hasta un valor de 7.89nmol MDA/mL de aceite a las diez horas. El comportamiento observado puede deberse a la oxidación posterior de productos secundarios y la formación de ácidos carboxílicos y otros compuestos, que no son reactivos al ácido 2-tiobarbitúrico (Taghvaei et al., 2014).

A pesar de que no existen diferencias significativas entre los casos estudiados ( $p > 0.05$ ), es posible notar que la tendencia en la aparición de MDA para la muestra ER1500 fue menor que la observada en los demás tratamientos. Algunos autores han reportado que la adición de extractos de romero en aceites, disminuye considerablemente la velocidad de descomposición de los hidroperóxidos formados durante las etapas iniciales, y por lo tanto disminuye la tasa de aparición de compuestos finales de oxidación, como el MDA, lo que puede explicar el comportamiento observado en el aceite de almendra de Choibá con adición de extracto de romero a 1500mg/L (Samotyja & Małecka, 2007).

Otra forma de seguir el proceso oxidativo de un aceite es determinando los productos finales de oxidación como un todo, que son en su mayoría compuestos polares entre los que se incluyen además triacilglicerol oxidados y oligomerizados, ácidos grasos libres, mono y diacilglicerol, esterol y compuestos productos de la degradación de los antioxidantes empleados (Farhoosh & Tavassoli-Kafrani, 2010). La determinación del porcentaje de estos compuestos polares totales (%CPT) en los aceites ofrece un buen indicador de oxidación, y en muchos países es considerada una de las formas más seguras y efectivas para la evaluación de estabilidad y estado oxidativo de los mismos, por lo que se han establecido límites para este parámetro, que oscilan entre el 25 y 27%, para el uso aceites comestibles (Urbančič et al., 2014).

En la figura 4 se presenta el porcentaje de compuestos polares totales (%CPT) en el aceite de almendra de Choibá a lo largo del estudio de estabilidad. En la medida que el proceso de oxidación avanza el %CPT aumenta, obteniéndose, en la hora diez, para el tratamiento ER1500, la menor concentración de estos componentes (56.25%). El control y los ensayos ER1000 y BHT, alcanzaron valores finales de 79, 81.25 y 78.75%, respectivamente. Los resultados de %CPT respaldan la explicación dada para el comportamiento observado en la generación de MDA en el aceite de Choibá, que suponía la degradación de compuestos secundarios en productos finales tipo ácidos carboxílicos que representan una porción significativa de los productos determinados

a través de este método. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el control, el tratamiento ER1000 y el BHT, pero sí entre éstos y el tratamiento ER1500. Los compuestos polares formados durante el proceso oxidativo del aceite de Choibá, siguen un comportamiento similar a lo reportado en estudios de estabilidad para aceites comestibles usados en procesos de fritura como el de girasol, en donde se observa un aumento constante en el %CPT, a medida que avanza el proceso oxidativo (Aladedunye & Przybylski, 2013; Aladedunye & Przybylski, 2014). A pesar de lo anterior la muestra control y el tratamiento ER1500 exceden el %CPT de descarte (25%) del aceite en la hora seis y siete, respectivamente.

Diferentes autores han encontrado que el uso de extractos de plantas y especias, como el romero, disminuye la velocidad de peroxidación lipídica de las matrices en las que se emplean (Coronado et al., 2002; Wang et al., 2011; Doolaee et al., 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio se recomienda el uso de extracto de romero en el aceite de almendra de Choibá, que preferiblemente debe ser empleado, en procesos que no requieran temperaturas elevadas que puedan ocasionar su rápido deterioro.

#### **4. CONCLUSIONES**

A pesar de que no existen diferencias significativas en la formación de dienos conjugados y MDA entre los casos analizados, los resultados de valor de peróxido y %CPT, mostraron un efecto protector del extracto de romero (1500mg/L) contra la oxidación del aceite de Choibá, siendo incluso es más efectivo que el BHT a 200mg/L. El romero cultivado en la zona andina colombiana es rico en ácido rosmarínico; este compuesto demostró ser estable reteniendo su actividad a temperaturas elevadas (100°C) como las empleadas en el presente estudio. Lo resultados anteriores avalúan el uso de esta especia, en la estabilización de matrices lipídicas; además

permiten potenciar el estudio y uso de nuevas semillas oleaginosas, como la almendra de Choibá, como fuentes promisorias de aceites comestibles.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la DIME y al laboratorio ciencia de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por el apoyo prestado para la ejecución del presente trabajo.

## REFERENCIAS

- Aladedunye F, Przybylski R. 2013. Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food Chem* **141(3)**, 2373–2378.
- Aladedunye F, Przybylski R. 2014. Phosphatidylcholine and dihydrocaffeic acid amide mixture enhanced the thermo-oxidative stability of canola oil. *Food Chem* **150**, 494–499.
- Almela L, Sánchez-Muñoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatogr* **1120**, 221–229.
- Arrázola GS, Osorio JA, Alvis A. 2009. Elaboracion de una bebida nutricional en polvo a partir de la almendra Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.). *Temas Agrar* **14(1)**, 32–38.
- Bentayeb K, Vera P, Rubio C, Nerín C. 2014. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: the case of essential oils. *Food Chem* **148**, 204–208.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chem* **127(4)**, 1821–1827.

- Cárdenas LD, Salinas NR. 2006. *Especies maderables amenazadas I parte*; en D Cárdenas L & N. R. Salinas (Eds.) *Libro rojo de plantas de Colombia*, 4th ed, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI, Bogotá, 75-79.
- Che-Man YB, 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 Chem* **69**, 301–307.
- Chirinos R, Pedreschi R, Rogez H, Larondelle Y, Campos D. 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crop Prod* **47**, 145–152.
- Choe E, Min DB. 2006. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr Rev Food Sci F* **5**, 169–186.
- Coronado SA, Trout GR, Dunshea FR, Shah NP. 2002. Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. *Meat Sci* **62(2)**, 217–224.
- Dhakal KH, Jung KH, Chae JH, Shannon JG, Lee JD. 2014. Variation of unsaturated fatty acids in soybean sprout of high oleic acid accessions. *Food Chem* **164**, 70–73.
- Ding M, Zou J. 2012. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food Chem* **131(3)**, 1051–1055.
- Doolaee EHA, Vossen E, Raes K, De-Meulenaer B, Verhé R, Paelinck H, De-Smet S. 2012. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. *Meat Sci* **90(4)**, 925–931.
- Dutta R, Sarkar U, Mukherjee A. 2014. Extraction of oil from *Crotalaria Juncea* seeds in a modified Soxhlet apparatus: Physical and chemical characterization of a prospective bio-fuel. *Fuel* **116**, 794–802.

- Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem* **110(1)**, 76–82.
- Estévez M, Ramírez R, Ventanas S, Cava R. 2007. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *Food Sci Technol* **40(1)**, 58–65.
- Fagali N, Catalá A. 2009. Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Physics Lipids* **159(2)**, 88–94.
- Farhoosh R, Hoseini-Yazdi SZ. 2013. Shelf-life prediction of olive oils using empirical models developed at low and high temperatures. *Food Chem* **141(1)**, 557–565.
- Farhoosh R, Tavassoli-Kafrani MH. 2010. Polar compounds distribution of sunflower oil as affected by unsaponifiable matters of Bene hull oil (BHO) and tertiary-butylhydroquinone (TBHQ) during deep-frying. *Food Chem* **122(1)**, 381–385.
- Fernández-Iglesias A, Quesada H, Díaz S, Pajuelo D, Bladé C, Arola L, Josepa-Salvadó M, et al. 2014. Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chem* **165**, 14-20.
- García-Moreno PJ, Pérez-Gálvez R, Guadix A, Guadix EM. 2013. Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *Food Sci Technol* **51(1)**, 303–308.
- González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, De la Cueva A, Vargas T, Santoyo S, García-Risco MR, Fornari T, Reglero G, Ramírez de Molina A. 2013. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol Res* **72**, 61–68.
- Guillén MD, Cabo N. 2002. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem* **77(4)**, 503–510.

- Gunstone FD. 2002. *Vegetable oils in food technology: Composition, Properties and Uses*. FD Gunstone (Ed.) 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Boca Raton.
- Hernández-Hernández E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores ME, Guerrero-Legarreta I. 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci* **81(2)**, 410–417.
- Izquierdo N, Aguirrezábal L, Andrade F, Pereyra V. 2002. Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crop Res* **77**, 115–126.
- Jordán MJ, Castillo J, Bañón S, Martínez-Conesa C, Sotomayor JA. 2014. Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food Chem* **151**, 212–218.
- Juárez M, Masson L, Sammán N. 2005. Deterioro del aceite de soya hidrogenado empleado en la fritura de un alimento cárnico. *Grasas Aceites* **56(1)**, 53–58.
- Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. 2010. Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *Food Sci Technol* **43(9)**, 1379–1386.
- Lopez-Huertas E. 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res* **61(3)**, 200–207.
- Martínez ML, Penci MC, Ixtaina V, Ribotta PD, Maestri D. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *Food Sci Technol* **51(1)**, 44–50.
- Martínez-Yusta A, Guillén MD. 2014. Deep-frying. A study of the influence of the frying medium and the food nature, on the lipidic composition of the fried food, using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *Food Res Int* **62**, 998-1007.



- Menéndez JA, Papadimitropoulou A, Vellon L, Lupu R. 2006. A genomic explanation connecting “Mediterranean diet”, olive oil and cancer: oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory “PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site” complexes at the Her-2/neu (erbB-2) oncogene promoter in the breast, ovarian and stomach cancer cells. *Eur J Cancer* **42(15)**, 2425–2432.
- Nour V, Stampar F, Veberic R, Jakopic J. 2013. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chem* **141(2)**, 961-966.
- Ospina JC, Rojano BA, Ochoa O, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J. 2014. Development of frankfurter-type sausages with healthier lipid formulation and study of its nutritional, sensory and stability properties. *Eur J Lipid Sci Tech* . Aceptado Julio 25 2014.
- Ou B, Huang D, Hamppsch-Woodill M. 2002. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J Agr Food Chem* **50(11)**, 3122–3128.
- Pereyra-Irujo GA, Aguirrezábal LAN. 2007. Sunflower yield and oil quality interactions and variability: Analysis through a simple simulation model. *Agr Forest Meteorol* **143**, 252–265.
- Peshev D, Peeva LG, Peev G, Baptista IIR, Boam AT. 2011. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Chem Eng Res Des* **89(3)**, 318–327.
- Pitaro S, Fiorani L, Jorge N. 2013. Antioxidant Activity of Basil and Oregano Extracts Added To Soybean Oil for Accelerated Storage Test. *J Food Biochem* **37(4)**, 485–490.
- Prior R, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agr Food Chem* **1**, 4290–4302.
- Rivero-Pérez MD, Muñiz P, González-Sanjosé ML. 2008. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food Chem Toxicol* **46(8)**, 2815–2822.

- Rodríguez-Rojo S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J Food Eng* **109(1)**, 98–103.
- Rojano B, Saez J, Schinella G, Quijano J, Velez E, Gil MA, Notario R. 2008. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J Mol Struct* **877**, 1-6.
- Roman O, Heyd B, Broyart B, Castillo R, Maillard MN. 2013. Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *Food Sci Technol* **52(1)**, 49–59.
- Samotyja U, Malecka M. 2007. Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. *Food Chem* **104(1)**, 317–323.
- Shahidi F, Zhong Y. 2005. Lipid Oxidation: Measurement Methods. In F. Shahidi (Ed.) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Sixth ed, John Wiley & Sons, 357–385.
- Shantha C, Decker EA. 1994. Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *J AOAC* **77**, 421–424.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* **16(3)**, 144–158.
- Taghvaei M, Jafari SM, Mahoonak AS, Nikoo AM, Rahmanian N, Hajitabar J, Meshginfar N. 2014. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. *Food Sci Technol* **56(1)**, 124–130.
- Tai J, Cheung S, Wu M, Hasman D. 2012. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine* **19(5)**, 436–443.
- Tironi VA, Tomás MC, Añón MC. 2010. Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Food Sci Technol* **43(2)**, 263–272.

- Thiex NJ, Anderson S, & Gildemeister B. 2003. Crude fat, hexanes extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/submersion method): collaborative study. *J AOAC Int* **86(5)**, 899–908.
- Urbančič S, Kolar MH, Dimitrijevic D, Demsar L, Vidrih R. 2014. Stabilisation of sunflower oil and reduction of acrylamide formation of potato rosemary extract during deep-fat frying. *Food Sci Technol* **57(2)**, 671-678 .
- Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huélamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventos RM. 2014. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem* **154**, 299–307.
- Wang H, Liu F, Yang L, Zu Y, Wang H, Qu S, Zhang Y. 2011. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chem* **128(1)**, 93–99.
- Williamsom K, Hensley K, Floyd R. 2003. Fluorometric and colorimetric assessment of Thiobarbituric acid-reactive lipid aldehydes in biological matrices. *Meth Biol Oxi Stress, Springer*. 57–67.
- Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* **105(3)**, 940–949.
- Zapata A, Vanegas LS, Rojano BA. 2014. Oleína de Palma Estabilizada con Antioxidante Natural de Romero en un Proceso Discontinuo de Fritura. *Inf Tecnol* **25(2)**, 131-140.
- Zapata-Luján A, Cogollo-Pacheco A, Rojano BA. 2013. Potencial nutracéutico del aceite de la almendra de choibá o almendro de montaña (*Dipteryx oleifera* Benth.) Nutraceutical potential of Choibá almond oil or mountain almond (*Dipteryx oleifera* Benth.). *Rev Cub Plant Med* **18(3)**, 368–380.
- Zarucchi J. 2001. Dipteryx (Fabaceae), en W Stevens, C Ulloa- Ulloa, A Pool, & O Montiel (Eds.), *Monographs in systematic botany from. The Missouri Botanical Garden*, St. Louis, 85-89.

Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen X, Wang F, Liu F. 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem* **118**(3), 656–662.

## TABLAS

Tabla 1

Contenido de fenoles totales, ácido carnósico y ácido rosmarínico del extracto de romero.

<b>Metabolito</b>	<b>(mg/g)</b>	<b>(mg/L)</b>
<b>FENOLES TOTALES</b>	91.010±1.780	86459.50±1691.00
<b>ÁCIDO CARNÓSICO</b>	0.259±0.003	245.66±3.01
<b>ÁCIDO ROSMARÍNICO</b>	21.544±0.005	20466.89±4.52

<sup>a</sup>Los valores son expresados como la media ± SD del análisis para cada muestra por triplicado (n=3). Concentración extracto seco (0.95g/mL).

Tabla 2

Capacidad antioxidante del extracto de romero.

<b>Método</b>	<b>(<math>\mu\text{mol Trolox/g}</math> de extracto)</b>	<b>(<math>\mu\text{mol Trolox/L}</math> de extracto)</b>
<b>DPPH</b>	557.47 $\pm$ 28.78	529596.50 $\pm$ 27341.00
<b>ORAC</b>	3440.18 $\pm$ 71.43	3268171.00 $\pm$ 67858.50

<sup>a</sup>Los valores son expresados como la media  $\pm$  SD del análisis para cada muestra por triplicado (n=3). Concentración extracto seco (0.95g/mL).

Tabla 3

Porcentaje de ácidos grasos del aceite de almendra de Choibá.

<b>Ácido Graso</b>	<b>%</b>
Laúrico (C12:0)	2.59
Mirístico (C14:0)	9.09
Palmítico (C16:0)	11.27
Esteárico (C18:0)	3.88
Oleico (C18:1)	54.03
Linoleico (C18:2)	1.09
Araquidónico (C20:0)	0.92
Gondoico (C20:1)	4.11
Behémico (C22:0)	9.07
Erúcico (C22:1)	1.94
Lignocérico (C24:0)	7.83

Tabla 4

Ecuaciones de modelo de formación de hidroperóxidos en el aceite de almendra de Choibá, y valor de protección (P) para los tratamientos ER1000, ER1500 y BHT.

Tratamiento	Ecuación	$r^2$	EMA	P( $t_m/t_c$ )
Control	VP= $\exp(-0.283906 + 0.567194*t)$	0.9864	0.1496	1.0000
ER1000	VP = $\exp(-1.17 + 0.663246*t)$	0.9661	0.3240	1.0101
ER1500	VP = $\exp(-0.573462 + 0.549521*t)$	0.9519	0.3100	1.0933
BHT	VP= $\exp(-0.871298 + 0.630025*t)$	0.9664	0.2840	1.0084



## TITULOS DE FIGURAS

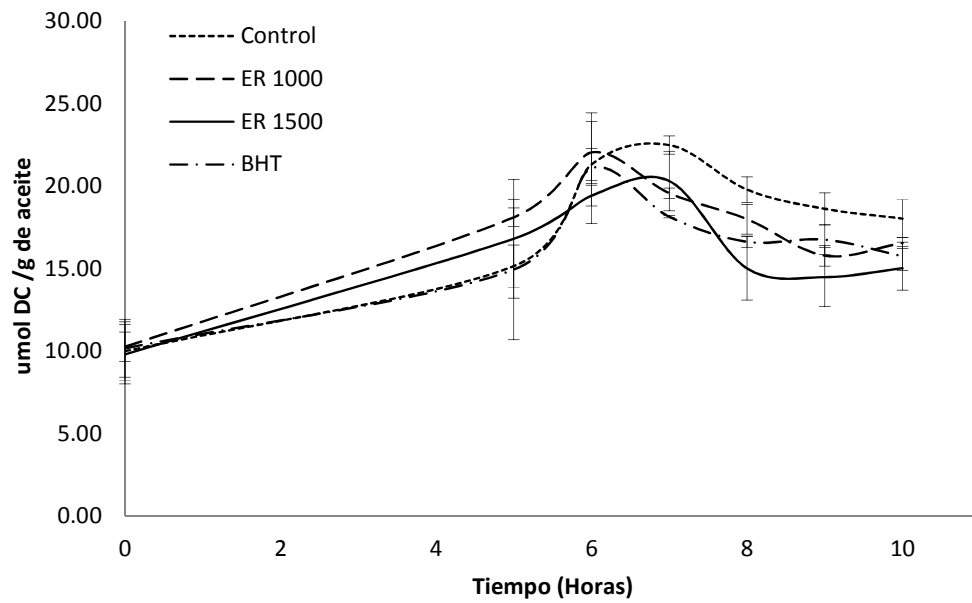
**Figura 1.** Producción de dienos conjugados (DC) en el aceite de almendra de Choibá ( $100\pm 1^\circ\text{C}$  y 1150mL Aire/min)

**Figura 2.** Producción de hidroperóxidos (VP) en el aceite de almendra de Choibá ( $100\pm 1^\circ\text{C}$  y 1150mL Aire/min)

**Figura 3.** Producción de Malondialdehído (MDA) en el aceite de almendra de Choibá ( $100\pm 1^\circ\text{C}$  y 1150mL Aire/min)

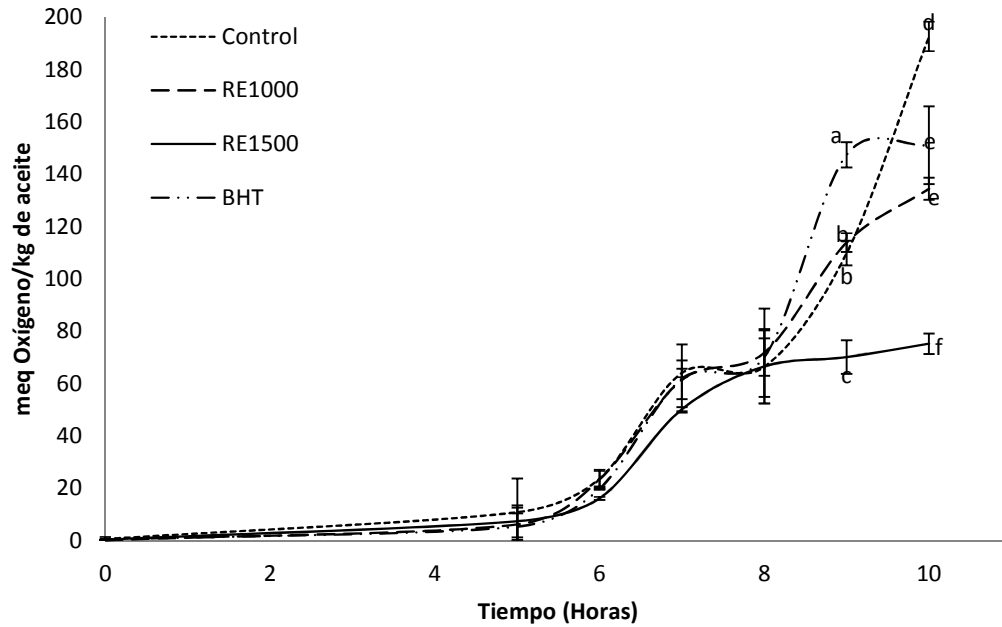
**Figura 4.** Porcentaje de Compuestos Polares Totales (%CPT) en el aceite de almendra de Choibá ( $100\pm 1^\circ\text{C}$  y 1150mL Aire/min)

Figura 1.



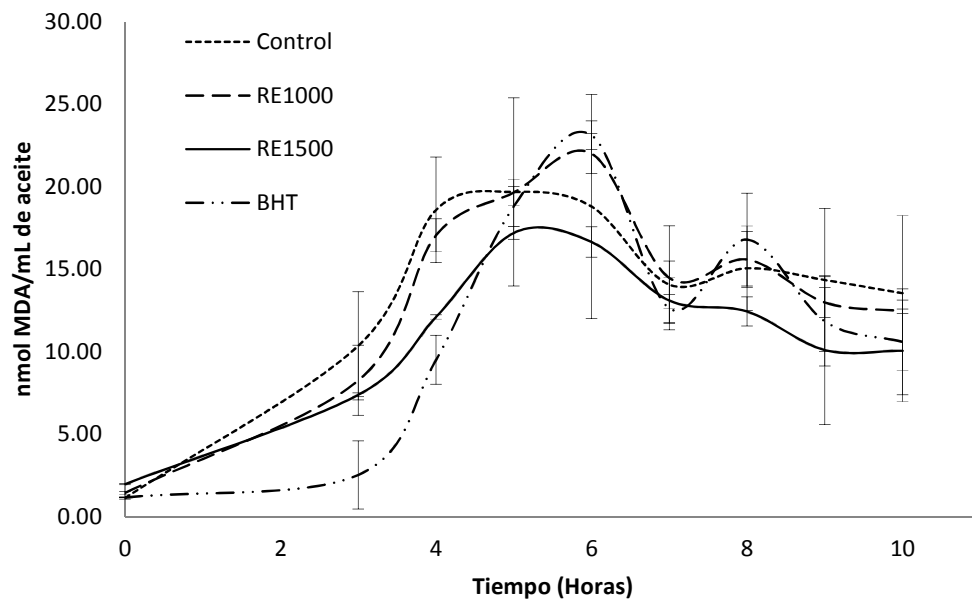
<sup>a</sup> Las líneas representan la media para cada tratamiento empleado (-----) Control, (---) Extracto de romero 1000mg/L (ER1000), (—) Extracto de romero 1500mg/L (ER1500) y (-·-) BHT 200mg/L del análisis para cada muestra por triplicado (n=3). No existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en ninguno de los tiempos estudiados ( $p>0.05$ )

Figura 2.



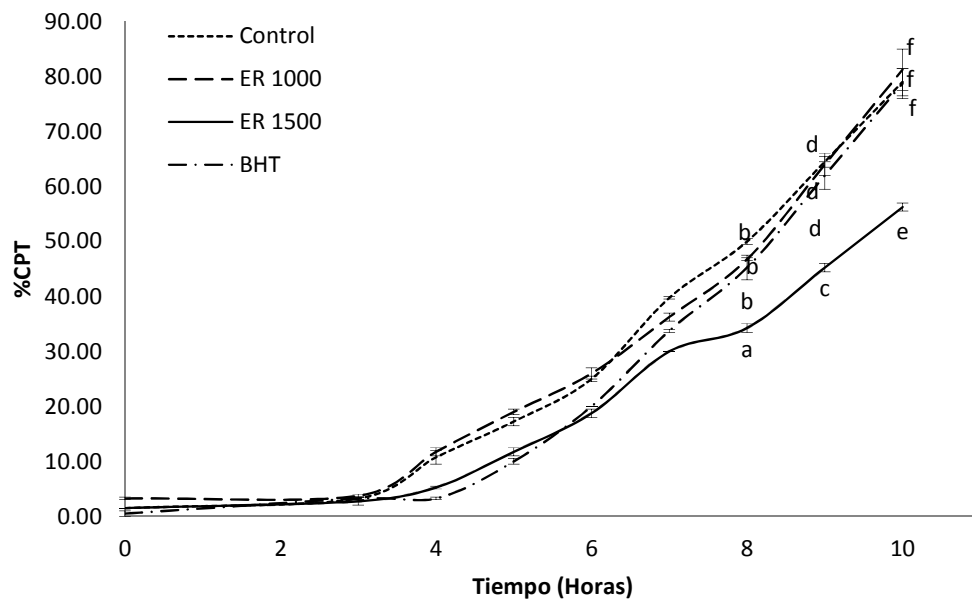
<sup>a</sup> Las líneas representan la media para cada tratamiento empleado (-----) Control, (---) Extracto de romero 1000mg/L (ER1000), (—) Extracto de romero 1500mg/L (ER1500) y (- · -) BHT 200mg/L del análisis para cada muestra por triplicado (n=3). Las medias a partir del tiempo 9 horas con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Figura 3.**



<sup>a</sup> Las líneas representan la media para cada tratamiento empleado (.....) Control, (---) Extracto de romero 1000mg/L (ER1000), (—) Extracto de romero 1500mg/L (ER1500) y (-.-) BHT 200mg/L del análisis para cada muestra por triplicado (n=3). No existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en ninguno de los tiempos estudiados ( $p>0.05$ )

Figura 4.



<sup>a</sup> Las líneas representan la media para cada tratamiento empleado (-----) Control, (---) Extracto de romero 1000mg/L (ER1000), (—) Extracto de romero 1500mg/L (ER1500) y (-·-) BHT 200mg/L del análisis para cada muestra por triplicado (n=3). Las medias a partir del tiempo 8 horas con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ).

**4 CAPÍTULO 2: ESTUDIO CINÉTICO DE LA DEGRADACIÓN OXIDATIVA DEL ACEITE DE ALMENDRA DE CHOIBÁ (*Dipteryx oleifera* Benth.) CON ADICIÓN DE EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)**

**Por A.M. Piedrahita,<sup>a</sup> A. Cogollo,<sup>b</sup> B.A. Rojano.<sup>c\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratorio Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.  
Medellín, Colombia

<sup>b</sup>Jardín Botánico de Medellín "Joaquín Antonio Uribe". Medellín, Colombia

<sup>c</sup>Laboratorio Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.  
Medellín, Colombia

(\*brojano@unal.edu.co)

## RESUMEN

### **Estudio cinético de la degradación oxidativa del aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) con adición de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**

El Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) es una fuente promisoría de aceite comestible de elevada calidad nutricional con un importante contenido de ácido oleico (52-54%). El objetivo del presente estudio fue evaluar la cinética de degradación y el tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá, a 35°C, 45°C y 55°C, sin adición de antioxidantes (Control) y con adición de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) a una concentración 1500mg/L (ER1500). Como índice de oxidación del aceite se realizó el seguimiento de productos intermedios y finales de oxidación: valor de peróxido (VP) y especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Los resultados revelaron que las reacciones de oxidación siguen un modelo cinético de primer orden para VP, y de orden cero para TBARS. Adicionalmente, se encontró que la velocidad de formación de hidroperóxidos (VP) fue dependiente de la temperatura de almacenamiento, según la ecuación de Arrhenius, con un valor de energía de activación de 4611,5071 J/mol para el tratamiento Control y de 7409,5771 J/mol para el tratamiento ER1500. La adición de extracto de romero, a una concentración de 1500mg/L, aumentó el tiempo de vida útil a 25°C del aceite de almendra de Choibá en un 45.16% en términos de la aparición de hidroperóxidos. Los resultados de TBARS no se ajustaron al modelo de Arrhenius; el seguimiento de la aparición de Malondialdehído (MDA) no fue un buen parámetro para la determinación del tiempo de vida útil.

**PALABRAS-CLAVE:** *Choibá - Dipteryx oleifera – Vida útil - Extracto de romero - Peroxidación Lipídica*

## ABSTRACT

### **Kinetic study of the oxidative degradation of Choibá oil (*Dipteryx oleifera* Benth.) with addition of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) is a promising source of edible oil with high nutritional quality and a significant content of oleic acid (52-54%). The aim of this research was to evaluate the degradation kinetics and shelf-life of Choibá oil at 35°C, 45°C and 55°C without addition of antioxidants (Control) and with addition of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) at 1500mg/L of concentration (RE1500). Progress in oil oxidation was measured through the extent of oxidation products: peroxide value (PV) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Results revealed that the oxidation reactions follow a first order kinetic model for PV, and zero order kinetic model for TBARS. Additionally, it was found that the rate of formation of hydroperoxides (PV) was dependent on the storage temperature, according to the Arrhenius equation, with an activation energy of 4611,5071 J/mol for Control treatment and 7409,5771 J/mol for RE1500 treatment. The addition of rosemary extract at a concentration of 1500mg/L , increased shelf-life of Choibá oil at 25°C in 45.16%, in terms of the appearance of hydroperoxides. Result of TBARS didn't adjust to Arrhenius model, thus measurement of malondialdehyde (MDA) wasn't a useful parameter for shelf-life determination of Choibá oil.

**KEY-WORDS:** *Choibá – Dipteryx oleifera – Shelf life - Rosemary extract -Lipid peroxidation*



## 1. INTRODUCCIÓN

Con el aumento en la demanda de alimentos saludables, en las últimas décadas, se ha promovido el estudio de nuevas fuentes de aceites vegetales con contenidos considerables de ácidos grasos insaturados, como el oleico y linoleico, a los que diferentes estudios han atribuido beneficios sobre la salud del consumidor, pues han demostrado tener un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares, disminuyendo los niveles de colesterol LDL y triglicéridos en sangre (López-Huertas, 2010; Le Goff, 2014) ; adicionalmente contribuyen a la disminución del riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer, como el de seno y colon (Menéndez et al., 2006; Dhakal et al., 2014).

El aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) con un contenido de ácido oleico de alrededor del 54% constituye una fuente importante de omega 9 ( $\omega$ 9), lo que lo posiciona como un aceite de elevada calidad nutricional (Zapata-Luján et al., 2013). Sin embargo, a la hora de promover el uso y producción de un aceite vegetal a partir de esta especie, es necesario garantizar la calidad del producto obtenido a lo largo de todo el periodo comercial. En este sentido es importante tener en cuenta las diferentes reacciones que se pueden presentar durante el almacenamiento y que conducen a la pérdida de calidad de las grasas y aceites.

La calidad es un atributo complejo y dinámico de los alimentos que influye de manera directa en el grado de aceptación por parte de los consumidores. A través de un estudio cuidadoso de los alimentos y del procesamiento de los mismos, es posible establecer qué reacciones tienen un impacto crítico en la vida útil de un producto alimenticio (Steele, 2004). Alimentos con un elevado contenido lipídico, son susceptibles a sufrir reacciones de oxidación que son consideradas la forma de deterioro más común sufrida por los lípidos durante las etapas de producción, almacenamiento y distribución (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013). La auto-oxidación consiste en una serie de reacciones en cadena que no sólo generan la aparición de olores y sabores desagradables sino que, además, conducen a la acumulación de compuestos que pueden ser

nocivos para la salud de los consumidores (Wasowicz et al., 2004; Aladedunye & Przybylski, 2013).

A fin de retardar los procesos de rancidez, los lípidos son suplementados con antioxidantes sintéticos como el Butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA); estos compuestos tienen la capacidad de actuar a través de la estabilización de los radicales libres formados durante la auto-oxidación, debido a la presencia de grupos fenólicos en su estructura, pero debido a sus reconocidos efectos nocivos para la salud (Gunstone, 2002; Ding & Zou, 2012) se han comenzado a sustituir por compuestos con actividad antioxidante provenientes de fuentes naturales, como extractos de plantas y especias (Barrera-Arellano, 1998; Jordán et al., 2014).

Diferentes estudios han evaluado el efecto de la adición de extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre la estabilidad oxidativa de aceites vegetales, encontrando que es tan efectivo como otros antioxidantes sintéticos comúnmente empleados, incluso a temperaturas elevadas como las alcanzadas durante los procesos de fritura (Zhang et al., 2010; Urbančič et al., 2014; Zapata et al., 2014). Un estudio previo, demostró que el extracto de romero, a una concentración de 1500mg/L, disminuye significativamente la velocidad de formación de hidroperóxidos (VP) y compuestos polares totales (%CPT) en el aceite de almendra de Choibá, inclusive más que el BHT (200mg/L), por lo que puede ser considerado como un buen aditivo para la estabilización del aceite obtenido de esta fuente (Piedrahita et al. 2015)

Dentro de las ventajas del uso de antioxidantes naturales se incluye el hecho de ser considerados como aditivos "GRAS"; en el 2005 el extracto de romero fue clasificado como aditivo alimenticio por la comisión europea en la directriz 2010/69/EU, lo que convierte a este extracto en un buen candidato para remplazar los antioxidantes sintéticos usados tradicionalmente, sin afectar las características organolépticas y nutricionales de los aceites en los que se emplea (Urbančič et al., 2014).

El seguimiento de la aparición de productos intermedios y finales de oxidación constituye un índice cuantificable de la rapidez de deterioro de las grasas y aceites, que puede prestarse para monitorear la vida útil de ese tipo de productos durante el almacenamiento (Kozak & Samotyja, 2013).

Así, a partir de datos experimentales es posible determinar las ecuaciones que modelan el comportamiento cinético de deterioro del aceite así como los diferentes parámetros del modelo de Arrhenius, que evalúa el efecto de la temperatura sobre la velocidad de deterioro, y que en conjunto permiten, por extrapolación, determinar la vida útil del aceite a una temperatura a partir de datos experimentales obtenidos a otra (Salazar de Marcano et al., 2007; Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013).

Debido a que las reacciones de peroxidación lipídica ocurren lentamente a temperatura ambiente, usualmente se emplean test de estabilidad acelerados que permiten establecer periodos de vida útil aproximados, en tiempos menores. La temperatura es el parámetro más comúnmente empleado para acelerar el proceso de oxidación de los lípidos debido a que incrementa la velocidad de reacción de manera exponencial (Wasowicz et al., 2004; Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013).

Diferentes métodos se han implementado para determinar la vida útil de los lípidos, que son por lo general pruebas aceleradas o inducidas, como el AOM (Active Oxygen Method), prueba de estufa (Oven Test), Bomba de Oxígeno y Rancimat, entre otras. A pesar de que estos métodos proporcionan un estimativo de la estabilidad oxidativa, no necesariamente tienen una alta correlación con la vida de anaquel del producto (Barrera-Arellano, 1998), pudiendo ocasionar una subestimación o sobreestimación del tiempo de estabilidad de los aceites (Kaya et al., 1993). Adicionalmente, se ha encontrado que el mecanismo de oxidación de los aceites cambia con el aumento de la temperatura por encima de los 60°C, por lo cual se recomienda la aplicación de estudios de estabilidad en condiciones controladas que empleen temperaturas entre 40°C y 60°C

en los que, la extrapolación de los resultados a condiciones ambientales, pueda proveer hasta cierto grado resultados más aceptables (Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013).

En la actualidad son escasos los estudios de estabilidad realizados al aceite de almendra de Choibá; en ese sentido el objetivo del presente estudio fue evaluar la cinética de degradación del aceite de almendra de Choibá, suplementado con extracto de romero a una concentración de 1500mg/L y sin suplementar aplicando el modelo linealizado de Arrhenius.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Preparación del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Hojas secas de romero, cultivadas en el departamento de Tolima (Colombia), fueron pulverizadas en un procesador de alimentos industrial (Ika-Werk®); posteriormente se sometieron a extracción por percolación utilizando etanol como disolvente, en una relación 1:5. El extracto etanólico se filtró a través de un papel tipo Whatman (GF / A, 110mm) y el percolado se destiló a vacío a 40°C en un evaporador rotatorio (Heidolph®). Finalmente, el extracto se secó en una estufa de vacío a 30°C durante 2 horas para garantizar la eliminación de cualquier residuo de solvente. El extracto obtenido, de color verde oscuro, fue disuelto en glicerol y almacenado en refrigeración a 4°C previo a su uso.

### **2.2 Extracción del aceite de la almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.)**

Las almendras de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) fueron obtenidas de frutos caídos y recogidos del suelo de manera aleatoria, en la región del bajo cauca en el departamento de Antioquia (Colombia), asegurando que se encontraban en buen estado, sin ningún daño fisiológico

aparente. Una vez seleccionadas se almacenaron en bolsas plásticas y se llevaron al laboratorio Ciencia de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, donde se obtuvieron las almendras, que posteriormente fueron secadas y molidas para proceder con la extracción del aceite.

La extracción del aceite de la almendra se realizó según el método reportado por Thiex et al., (2003), técnica empleada para la extracción de aceites de cereales y semillas, que emplea el equipo Soxhlet y solventes volátiles para extraer la materia grasa presente en las semillas. El solvente empleado fue hexano el cual presenta buenos rendimientos en la extracción de aceites de semillas vegetales (Dutta et al., 2014).

### **2.3 Determinación de vida útil del aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.)**

A 30mL de aceite de almendra de Choibá se adicionó extracto de romero hasta obtener una concentración final de 1500mg/L a lo que se denominó ER1500. Como control negativo (Control) se empleó aceite sin adición de extracto. Las muestras así preparadas fueron almacenadas en frascos ámbar cerrados a tres temperaturas:  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $45\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Con el fin de calcular los parámetros del modelo cinético de deterioro del aceite y del modelo matemático de Arrhenius, que da cuenta del efecto de la temperatura sobre la velocidad de degradación, se realizó el seguimiento de la aparición de compuestos intermedios y finales de oxidación: valor de peróxido (VP), sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbúrico (TBARS).

En el diseño experimental no se consideró la evaluación de un control positivo debido a que, en estudios previos de estabilidad al aceite de almendra de Choibá, se encontró que el extracto de romero a 1500mg/L tuvo un efecto protector superior al mostrado por el aceite con adición de BHT (200mg/L), en condiciones aceleradas de oxidación en donde fue empleada una temperatura superior ( $100\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) a las evaluadas en la presente investigación (Piedrahita et al, 2015).

### *Valor de peróxido (VP)*

El valor de peróxido se determinó mediante el método descrito por Shantha & Decker (1994) con algunas modificaciones. Este método se fundamenta en la capacidad de los peróxidos lipídicos de oxidar el  $\text{Fe}^{2+}$  hasta  $\text{Fe}^{3+}$ . A 0.03g de muestra se adicionaron 3.5mL de cloroformo:metanol (7:3), la mezcla se agitó por 10 segundos. Luego se tomó 1mL de la solución anterior y se adicionaron 50 $\mu\text{L}$  de una solución  $\text{Fe}^{3+}$ , preparada a partir de  $\text{FeSO}_4$  (0.144M) y  $\text{BaCl}_2$  en HCl (0.4M), y 50 $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (0.44M), esta mezcla se incubó por un periodo de 20 minutos en la oscuridad; pasado dicho tiempo se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 510nm en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV/ Vis. Los resultados se expresaron como miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de aceite (meq Oxígeno/Kg de aceite).

### *Determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)*

Esta técnica permite cuantificar el Malondialdehído (MDA), uno de los compuestos finales de la peroxidación lipídica. El MDA se combina con ácido 2- tiobarbitúrico (TBA) en una relación 1:2 para formar un complejo fluorescente, el cual se mide a 500nm de excitación y 550nm de emisión en un equipo de fluorescencia PerkinElmer® LS55. A 500 $\mu\text{L}$  de muestra se adicionaron 80 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA 15%) y 160 $\mu\text{L}$  TBA (0.6%), esta mezcla se incubó por 20 minutos a 90°C y por 10 minutos en un baño con hielo. Transcurrido este periodo, se adicionaron 600 $\mu\text{L}$  de butanol, se agitó y se efectuaron las respectivas mediciones. Los resultados fueron expresados como nanomoles de malondialdehido por mililitro de aceite (nmol MDA/mL de aceite), a partir de la curva de calibración realizada con MDA como patrón (Williamsom et al., 2003).

## **2.4 Estudio cinético de la peroxidación lipídica en el aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.)**

El cambio en la calidad de una grasa o aceite puede ser medido a través de la aparición o desaparición de uno o más índices cuantificables, simbolizados por A (VP y TBARS); la velocidad

de aparición o desaparición de A puede ser en general representada por la siguiente ecuación de velocidad:

$$r_A = -\frac{dA}{dt} = K[A]^m \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde K es la constante de velocidad y m es el orden de reacción aparente. A continuación se presenta la ecuación de velocidad cuando m es 0, 1 y 2, respectivamente.

$$A = A_0 - Kt \quad m = 0 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$A = A_0 e^{-kt} \quad m = 1 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + Kt \quad m = 2 \quad (\text{Ec. 4})$$

A fin de establecer el orden de reacción, se graficaron los valores de A (VP y TBARS) en función del tiempo, y mediante regresión lineal se obtuvo el modelo matemático más representativo de la cinética de deterioro del aceite de almendra de Choibá (Steele, 2004).

## **2.5 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de degradación del aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.)**

La relación entre la constante de velocidad K y la temperatura pueden ser expresadas a través del modelo matemático de Arrhenius presentado a continuación:

$$K = K_A \exp\left(\frac{-E_A}{RT}\right) \quad (\text{Ec. 5})$$

O en su forma linealizada

$$\ln(K) = \ln(K_A) - \frac{E_A}{RT} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde K es la constante de velocidad,  $K_A$  es la constante de la ecuación de Arrhenius,  $E_A$  es la energía de activación, R es la constante universal de los gases (8.3144 J/mol K), y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin. En teoría una gráfica de  $\ln(K)$  versus  $1/T$ , conocida como gráfica de Arrhenius, es una línea recta con pendiente  $E_A/R$ . Adicionalmente el factor de aceleración, conocido como el factor  $Q_{10}$ , fue calculado a partir de los parámetros obtenidos del modelo matemático de Arrhenius (Man, 2002).

## 2.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, reportándose los valores medios y sus desviaciones estándar. El ajuste de los datos experimentales a los modelos cinéticos fue realizado mediante un análisis de regresión lineal, y los valores de R-cuadrado reportados.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La susceptibilidad de los lípidos frente a los fenómenos de oxidación es a menudo evaluada a través de la medición de la concentración de productos intermedios y finales de oxidación, después de la incubación de la muestra bajo ciertas condiciones de almacenamiento, durante un periodo de tiempo determinado (Pinchuk & Lichtenberg, 2014).



Uno de los productos más importantes de la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos (Fagali & Catalá, 2009); estos compuestos son formados durante las primeras etapas de oxidación y su seguimiento constituye un parámetro importante en la determinación de la estabilidad oxidativa y vida útil de los lípidos (Pinchuk & Lichtenberg, 2014). En la figura 1 se presenta el comportamiento en la formación de hidroperóxidos en el aceite de almendra de Choibá con y sin adición de extracto de romero, a 35°C, 45°C y 55°C.

En las etapas iniciales la velocidad de aparición de hidroperóxidos es baja, más aún en presencia de antioxidantes, que atrapan de manera eficiente la mayoría de radicales formados; consecuentemente la concentración de estos compuestos en el aceite permanece baja hasta que la mayoría de los antioxidantes presentes son consumidos; una vez esto sucede las tasas de reacción aumentan de manera exponencial hasta que no quedan más sustratos oxidables (Laguerre et al., 2007; Pinchuk & Lichtenberg, 2014).

A fin de estimar el tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá, en términos de la aparición de hidroperóxidos, se procedió a determinar los parámetros del modelo cinético al que mejor se ajustan los datos experimentales. Inicialmente se determinó el orden de reacción aparente, a través de un análisis de regresión lineal. La mayoría de las reacciones responsables del deterioro en los alimentos han sido clasificadas como de orden cero, primer y segundo orden (Cunha & Oliveira, 2000). Estas ecuaciones cinéticas son específicas para cada alimento y para cada temperatura estudiada (Steele, 2004).

Los coeficientes de regresión lineal ( $r^2$ ) indicaron que el modelo cinético, al que se ajustaron los resultados del estudio de la degradación del aceite de almendra de Choibá, corresponde a un modelo de primer orden (Ec. 7), para todos los tratamientos (Control y ER1500).

$$\ln(PV) = \ln(PV_0) - K_{PV} * t \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde  $K_{VP}$  es la constante de velocidad para la formación de hidroperóxidos,  $t$  es el tiempo de reacción y  $VP_0$  es el valor de peróxido en el tiempo cero de reacción.

En la tabla 1 se presentan los coeficientes de regresión lineal ( $r^2$ ) y los parámetros,  $K_{VP}$  y  $\ln(VP_0)$  del modelo cinético de primer orden obtenido.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción durante la peroxidación lipídica del aceite de almendra de Choibá. A medida que aumentó la temperatura de ensayo, aumentó el valor de la constante de velocidad.

A fin de establecer la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura se realizaron las gráficas de Arrhenius,  $\ln(K_{VP})$  Vrs  $1/T$ , mostradas en la figura 2, para los tratamientos Control y ER1500, respectivamente; para dichos cálculos se tomaron los valores de constante de velocidad de formación de hidroperóxidos,  $K_{VP}$ , obtenidas de los modelos cinéticos de primer orden en cada temperatura evaluada.

Cuando se emplean tres puntos para la elaboración de las gráficas de Arrhenius, los límites de confianza para los parámetros del modelo son generalmente amplios. En caso de requerirse límites de confianza más estrechos, deben incluirse más temperaturas en el rango de interés (Steele, 2004) Sin embargo, como primera aproximación a la vida útil de un producto alimenticio es posible emplear sólo tres puntos en la elaboración de las gráficas de Arrhenius, siempre que se cubra un rango de temperatura en donde posiblemente no haya cambios en el mecanismo de reacción predominante (Ragnarsson & Labuza, 1976).

Como puede observarse, los datos experimentales, obtenidos para ambos tratamientos (Control y ER1500), se ajustan bien al modelo linealizado de Arrhenius. Así a partir de los resultados a 35°C, 45°C y 55°C es posible predecir, con buena aproximación, el valor de la constante de velocidad y el tiempo de vida útil a cualquier otra temperatura (Man, 2002; Sathivel et al., 2008).

A pesar de que la concentración de hidroperóxidos en grasas y aceites ha sido regulada por la legislación, y existen límites de concentración máximos permisibles, la rancidez, definida como el deterioro organoléptico de los lípidos, sólo es detectable una vez ha comenzado el proceso de descomposición de los hidroperóxidos durante las etapas finales de oxidación, con la consecuente formación de compuestos volátiles tipo aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos carboxílicos responsables de la aparición de olores y sabores desagradables que constituyen un parámetro de rechazo por parte del consumidor (Wasowicz et al., 2004; Farhoosh & Hoseini-Yazdi, 2013; Pinchuk & Lichtenberg, 2014).

Aunque el nivel de hidroperóxidos formados en una grasa o aceite, no da información acerca de la formación de productos secundarios de oxidación, responsables de la rancidez, este parámetro puede ser empleado como indicador de la calidad de aceites. En general, los productos secundarios de oxidación son formados por la descomposición de hidroperóxidos cuando estos alcanzan un valor de aproximadamente 20meq Oxígeno/Kg de aceite (Kaya et al., 1993; Babalola & Apata, 2011), razón por la cual se tomará este valor como el límite para la determinación del tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá a 25°C.

En la tabla 2 se presenta el coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ) obtenido del ajuste de los datos al modelo linealizado de Arrhenius, los valores de energía de activación  $E_A$ , la constante de velocidad ( $K_{25^\circ C}$ ) estimada a temperatura ambiente (25°C) y el tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá a esa misma temperatura, para los ensayos Control y ER1500, tomando 20meq Oxígeno/Kg de aceite como valor máximo de hidroperóxidos permitido. El factor de aceleración,  $Q_{10}$ , para la formación de hidroperóxidos fue también calculado.

Los valores de energía de activación obtenidos para los tratamientos Control y ER1500 fueron de 4611.5071 y 7409.5771J/mol, respectivamente; estos son menores a los valores reportados para reacciones de formación de hidroperóxidos, en estudios de estabilidad de aceite de semilla de palma Coroba (31.13Kj/mol) almacenado a 15, 25 y 35°C durante un periodo de 150 días, y de

aceite crudo de abadejo (33.2Kj/mol) almacenado a 4, 24 y 40°C por un periodo de 12 semanas, encontrándose en el límite inferior de los rangos estimados para reacciones de rancidez de lípidos (2.4-240Kj/mol). (Salazar de Marcano et al., 2007; Sathivel, 2008).

Adicionalmente, en el aceite de almendra de Choibá suplementado con extracto de romero (ER1500), el valor de la energía de activación aumenta alrededor de un 60% con respecto al aceite sin suplementar (Control). Según la teoría cinética la energía de activación, definida como la energía promedio que las moléculas deben adquirir para participar en una reacción (Galindo-Hernández & Méndez-Ruiz, 2003), permanece constante en tanto el mecanismo de reacción no cambie. La adición de antioxidantes, cambios en la presión parcial del oxígeno, y otros factores pueden alterar el mecanismo y por consiguiente la energía de activación (Ragnarsson & Labuza, 1976; Pinchuk & Lichtenberg, 2014).

Un aumento en el valor de  $E_A$  es indicativo de un aumento de la resistencia a la peroxidación lipídica (Farshoosh et al., 2008). De esta manera un aumento de 60% en el valor de la energía de activación en el tratamiento ER1500 es indicativo de que el extracto de romero disminuye la velocidad de oxidación del aceite de almendra de Choibá, lo cual se ve reflejado en el tiempo de vida útil calculado a 25°C, en donde la adición de extracto de romero extiende en un 45.16% la vida útil de este aceite.

Diferentes estudios de estabilidad de lípidos han indicado que no existe relación entre el valor inicial de hidroperóxidos y la vida útil de aceites; sin embargo, debido a la elevada inestabilidad de los mismos, a altas temperaturas se provee la energía necesaria iniciar las reacciones de descomposición de hidroperóxidos, con la consecuente formación de productos finales de oxidación y más radicales que aceleran la etapa de propagación de la peroxidación lipídica, lo que aumenta la velocidad de degradación y disminuye el valor de la energía de activación de la reacción. Así, es de esperarse que la reducción del contenido de hidroperóxidos iniciales y de otros compuestos precursores de las reacciones de oxidación, presentes en los aceites crudos,

como el estudiado, ayude a aumentar la estabilidad oxidativa y el tiempo de vida útil de este tipo de productos (Makhoul et al., 2006).

En investigaciones previas acerca de la estabilidad del aceite de almendra de Choibá, se evaluó el efecto de la adición de extracto de romero sobre la velocidad de formación de hidroperóxidos en condiciones aceleradas de oxidación ( $100\pm 1^\circ\text{C}$  y 1150mL aire/min), y fue evidente el efecto de la temperatura y la concentración inicial de hidroperóxidos en la velocidad de formación y descomposición de estos compuestos en el aceite, lo que explica las diferencias encontradas en los tiempos de estabilidad obtenidos en ambos estudios. Los cambios de temperatura pueden ocasionar cambios en el mecanismo de reacción de la peroxidación lipídica y por consiguiente en la energía de activación, con lo que es posible causar predicciones erróneas de la vida útil a temperatura ambiente sobre la base de datos experimentales colectados a temperaturas muy alejadas de la misma (Ragnarsson & Labuza, 1976).

La magnitud del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción de la oxidación del aceite de almendra de Choibá, en términos de VP, puede ser evidenciada a partir del factor de aceleración  $Q_{10}$  calculado. La adición de extracto de romero disminuye este factor en un 1.37% cuando se compara con la muestra Control. En general un mayor  $Q_{10}$  es indicativo de que sólo se requiere un pequeño cambio de temperatura para producir un cambio en la velocidad de peroxidación lipídica (Farhoosh et al., 2008).

Uno de los productos mayoritarios de descomposición de hidroperóxidos es el Malondialdehído (MDA) que puede ser fácilmente cuantificable a través de la técnica TBARS (Fagali & Catalá, 2009).

A fin de estimar el tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá en términos de la aparición de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), se procedió a determinar los

parámetros del modelo cinético de forma análoga a lo descrito en el estudio de formación de peróxidos lipídicos.

En la figura 3 se presenta el comportamiento de la formación de MDA en el aceite de almendra de Choibá (Control), y estabilizado con extracto de romero (ER1500), a 35°C, 45°C y 55°C.

El análisis de regresión lineal, indicó que el modelo cinético al que mejor se ajustaron los datos corresponde a un modelo de orden cero (Ec. 8)

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t \quad (Ec. 8)$$

Donde  $K_{TBARS}$  es la constante de velocidad para la formación de MDA (nmol MDA/mL-día),  $t$  es el tiempo de reacción y  $TBARS_0$  son los nmol de MDA/mL de aceite en el tiempo cero de reacción.

En la tabla 3 se presentan los coeficientes de regresión lineal ( $r^2$ ) y los parámetros,  $K_{TBARS}$  y  $TBARS_0$ , del modelo cinético de orden cero obtenidos para cada tratamiento a cada temperatura estudiada.

De manera análoga, a partir de los datos del modelo cinético de orden cero, se realizó la gráfica de Arrhenius mostrada en la figura 4.

Estudios de estabilidad oxidativa en productos fritos y en productos cárnicos han encontrado que niveles de malondialdehído (MDA) superiores a 1mg MDA/Kg (5.97nmol MDA/mL), son indicativo de rancidez (Suman et al., 2010; Kamel & El Sheikh, 2012; Ortuño et al., 2014).

En la tabla 2 se presenta el coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ) obtenido del ajuste de los datos al modelo linealizado de Arrhenius, los valores de energía de activación  $E_A$ , la constante de velocidad ( $K_{25^\circ C}$ ) estimada a temperatura ambiente (25°C), el tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá a esa misma temperatura y el factor  $Q_{10}$ , para los ensayos Control y ER1500, tomando 5.97nmol MDA/mL de aceite como parámetro de corte.

Un valor cercano a 1 en el coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ) indica que el modelo de Arrhenius es aplicable a los datos experimentales obtenidos, y que la energía de activación,  $E_A$ , permanece constante en el rango de temperatura estudiado. Como puede notarse del coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ), el grado de ajuste de los datos experimentales al modelo de Arrhenius, para el tratamiento que contenía extracto de romero a 1500mg/L (ER1500), es pobre ( $r^2=0.7464$ ). Lo anterior puede corroborarse a partir de los valores de constantes de velocidad obtenidas para las temperaturas 45°C y 55°C en el tratamiento ER1500, en las cuales no se observa un efecto de la temperatura sobre la velocidad de formación de malondialdehído (MDA). A pesar de lo anterior, el tiempo de vida útil estimado a 25°C para el tratamiento Control fue 15.59% menor que el obtenido para el tratamiento ER1500, y el factor  $Q_{10}$  fue menor para la muestra control que para el tratamiento ER1500. Este último resultado se debe a que la energía de activación para la formación de TBARS en la muestra ER1500 fue menor que para el tratamiento control. Sin embargo, este resultado podría conducir a conclusiones erróneas debido al poco ajuste de los datos experimentales al modelo mencionado anteriormente.

Esto puede ser debido a que a las temperaturas estudiadas se presente un cambio en el mecanismo de reacción, y/o a que otras reacciones se vuelvan importantes e influyen la velocidad de formación de este compuesto (Ragnarsoon & Labuza, 1976; Nelson & Labuza, 1994). En el caso estudiado se observa que la muestra Control (aceite sin antioxidante) se ajusta bien al modelo de Arrhenius ( $r^2=0.8990$ ), lo que sugiere que la adición del antioxidante puede alterar el curso de las reacciones de peroxidación, lo que conduce a la obtención de datos de energía de activación y tiempos de vida útil erróneos a través de este modelo. Por consiguiente el seguimiento de la aparición de MDA no fue un buen parámetro para la determinación del tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá.

## **4 CONCLUSIONES**

El seguimiento de la aparición de hidroperóxidos constituye un buen parámetro para la determinación de la estabilidad oxidativa y tiempo de vida útil del aceite de almendra de Choibá. Los resultados revelaron que la velocidad de formación de peróxidos lipídicos sigue un modelo cinético de primer orden, dependiente de la temperatura, y bien descrito por el modelo linealizado de Arrhenius.

En el aceite crudo sin adición de antioxidantes (Control) el tiempo de vida útil estimado a 25°C, en términos de la formación de hidroperóxidos, fue de 38 días, mientras que en el aceite con adición de extracto de romero (ER1500) fue de 55 días. Los resultados de la presente investigación sugieren, que la adición de extracto de romero aumenta la estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá, a través de la estabilización de los radicales libres formados en las etapas iniciales de la peroxidación, ratificando la posibilidad de emplear este tipo de extractos en la estabilización de aceites comestibles.

El seguimiento de la aparición de productos secundarios de oxidación, a través de la técnica TBARS, ha sido empleado con buenos resultados en la determinación de estabilidad oxidativa de diferentes aceites vegetales; sin embargo en la presente investigación esta técnica no fue relevante a la hora de estimar un tiempo aproximado de vida útil en el aceite de almendra de Choibá, para los tratamientos Control y ER1500.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la DIME proyecto con código 18870 y al laboratorio ciencia de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por el apoyo prestado para la ejecución del presente trabajo.



## REFERENCIAS

- Aladedunye F, Przybylski R. 2013. Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food Chem* **141(3)**, 2373–2378.
- Babalola TOO, Apata DF. 2011. Chemical and quality evaluation of some alternative lipid sources for aqua feed production. *Agr Biol J North Am* **2(6)**, 935–943.
- Barrera-Arellano D. 1998. Estabilidad y utilización de nitrógeno en aceites y grasas. *Grasas Aceites* **49(1)**, 55–63.
- Cunha M, Oliveira FAR. 2000. Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the first-order Arrhenius model under linearly increasing temperature profiles. *J Food Eng* **46**, 53–60.
- Dhakal KH, Jung KH, Chae JH, Shannon JG, Lee JD. 2014. Variation of unsaturated fatty acids in soybean sprout of high oleic acid accessions. *Food Chem* **164**, 70–73.
- Ding M, Zou J. 2012. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food Chem* **131(3)**, 1051–1055.
- Dutta R, Sarkar U, Mukherjee A. 2014. Extraction of oil from *Crotalaria Juncea* seeds in a modified Soxhlet apparatus: Physical and chemical characterization of a prospective bio-fuel. *Fuel* **116**, 794–802.
- Fagali N, Catalá A. 2009. Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Physics Lipids* **159(2)**, 88–94.

- Farhoosh R, Hoseini-Yazdi SZ. 2013. Shelf-life prediction of olive oils using empirical models developed at low and high temperatures. *Food Chem* **141(1)**, 557–565.
- Farhoosh R, Niazmand R, Rezaei M, Sarabi M. 2008. Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *Eur J Lipid Sci Tech* **110**, 587-592.
- Galindo-Hernández F, Méndez-Ruiz F. 2003. Determinación de la energía de activación para la reacción de  $H + H_2$  mediante el cálculo de superficie de energía potencial. *Rev Mex Física* **49(3)**, 264–270.
- Gunstone FD. 2002. Vegetable oils in food technology: Composition, Properties and Uses. FD Gunstone (Ed.) 1st ed. *Blackwell Publishing Ltd*, Boca Raton.
- Jordán MJ, Castillo J, Bañón S, Martínez-Conesa C, Sotomayor JA. 2014. Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food Chem* **151**, 212–218.
- Kamel SM, El Sheikh DM. 2012. Quality Evaluation of Some Commercially Fried Fast Food. *Food Sci Quial Manag* **10**, 28–36.
- Kaya A, Tekin AR, Oner MD. 1993. Oxidative Stability of Sunflower and Olive Oils: Comparison between a Modified Active Oxygen Method and Long Term Storage. *Lebensm-wiss.u. Technol* **26**, 464–468.
- Kozak W, Samotyja U. 2013. The use of oxygen content determination method based on fluorescence quenching for rapeseed oil shelf-life assessment. *Food Control* **33(1)**, 162–165.
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res* **46(5)**, 244–282.
- Le Goff W. 2014. A new piece in the puzzling effect of n-3 fatty acids on atherosclerosis?. *Atherosclerosis* **235(2)**, 358–362.

- López-Huertas E. 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res* **61(3)**, 200–207.
- Makhoul H, Ghaddar T, Toufeili I. 2013. Identification of some rancidity measures at the end of the shelf life of sunflower oil. *Eur J Lipid Sci Technol* **108(2)**, 143–148.
- Man D. 2002. Food industry briefing series: Shelf Life. First. USA: *Blackwell Science Ltd*.
- Menéndez JA, Papadimitropoulou A, Vellon L, Lupu R. 2006. A genomic explanation connecting “Mediterranean diet”, olive oil and cancer: oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, induces formation of inhibitory “PEA3 transcription factor-PEA3 DNA binding site” complexes at the Her-2/neu (erbB-2) oncogene promoter in the breast, ovarian and stomach cancer cells. *Eur J Cancer* **42(15)**, 2425–2432.
- Nelson KA, Labuza TP. 1994. Water Activity and Food Polymer Science□: Implications of State on Arrhenius and WLF Models in Predicting Shelf Life. *J Food Eng* **22**, 271–289.
- Ortuño J, Serrano R, Jordán MJ, Bañón S. 2014. Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400 mg kg<sup>-1</sup>. *Meat Sci* **96(4)**, 1452–1459.
- Piedrahita AM, Cogollo A, Rojano B. 2015. Estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.) suplementado con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). *Grasas Aceites*, In press.
- Pinchuk I, Lichtenberg D. 2014. Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points. *Chem Phys Lipids* **178**, 63–76.
- Ragnarsson JO, Labuza TP. 1976. Accelerated shelf-life testing for oxidative rancidity in foods -a review. *Food Chem* **2**, 291–307.

- Salazar de Marcano E, Belén D, Marín G, Moreno H. 2007. Cinética de deterioro del aceite de la semilla de la palma coroba. *Cien Bás Tecnol* **19(2)**, 172–182.
- Sathivel S, Huang J, Prinyawiwatkul W. 2008. Thermal properties and applications of the Arrhenius equation for evaluating viscosity and oxidation rates of unrefined pollock oil. *J Food Eng* **84(2)**, 187–193.
- Shantha C, Decker EA. 1994. Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *J AOAC* **77**, 421–424.
- Steele R. 2004. Understanding and measuring the shelf-life of food. Washington, DC, Woodhead Publishing Limited. 42–65.
- Suman SP, Mancini RA, Joseph P, Ramanathan R, Konda MKR, Dady G, Yin S. 2010. Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef. *Meat Sci* **86(4)**, 994–998.
- Thiex NJ, Anderson S, & Gildemeister B. 2003. Crude fat, hexanes extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/submersion method): collaborative study. *J AOAC Int* **86(5)**, 899–908.
- Urbančič S, Kolar MH, Dimitrijevic D, Demsar L, Vidrih R. 2014. Stabilisation of sun flower oil and reduction of acrylamide formation of potato rosemary extract during deep-fat frying. *Food Sci Technol* **57(2)**, 671-678 .
- Wasowicz E, Gramza A, Hes M, Jelen HH, Korczak J, Malecka M, Mildner-Szkudlarz S, Rudzinska M, Samotyja U, Zawirska-Wojtasiak R. 2004. Oxidation of lipids in food. *J Food Nutr Sci* **13**, 87–100.
- Williamsom K, Hensley K, Floyd R. 2003. Fluorometric and colorimetric assessment of Thiobarbituric acid-reactive lipid aldehydes in biological matrices. *Meth Biol Oxi Stress, Springer*. 57–67.

Zapata A, Vanegas LS, Rojano, BA. 2014. Oleína de Palma Estabilizada con Antioxidante Natural de Romero en un Proceso Discontinuo de Fritura. *Inf Tecnol* **25(2)**, 131-140.

Zapata-Luján A, Cogollo-Pacheco A, Rojano BA. 2013. Potencial nutracéutico del aceite de la almendra de choibá o almendro de montaña (*Dipteryx oleifera* Benth.) Nutraceutical potential of Choibá almond oil or mountain almond (*Dipteryx oleifera* Benth.). *Rev Cub Plant Med* **18(3)**, 368–380.

Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen X, Wang F, Liu F. 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem* **118(3)**, 656–662.

## TABLAS

Tabla 1

Coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ) y parámetros del modelo cinético de primer orden,  $K_{VP}$  (meq Oxígeno/Kg-día) y  $\text{Ln}(VP_0)$  (meq Oxígeno/Kg), para la formación de hidroperóxidos en el aceite de almendra de Choibá, para los tratamientos Control y ER1500 a 35°C, 45°C y 55°C.

Tratamiento	Temperatura °C	$r^2$	$K_{VP}$	$\text{Ln}(VP_0)$
<b>Control</b>	35	0.913978	0.1037	-0.7790
	45	0.953495	0.1142	-1.7689
	55	0.948943	0.1157	-1.6573
<b>ER1500</b>	35	0.892329	0.0966	-1.8790
	45	0.945623	0.1070	-1.7955
	55	0.947013	0.1152	-2.0033

Tabla 2

Energía de activación  $E_A$  (J/mol), constantes de velocidad  $K_{VP25}$  (meq Oxígeno/Kg-día) y  $K_{TBARS25}$  (nmol MDA/mL-día) y tiempos de vida útil (días) estimados a 25°C, en términos de la formación de hidroperóxidos (VP) y de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico para los tratamientos Control y ER1500

Parámetro	Tratamiento	$r^2$	$E_A$	$K_{25^\circ C}$	Vida útil	$Q_{10}$
<b>VP</b>	Control	0.8520	4611,5071	0.0989	38.17	2.6482
	ER1500	0.9950	7409,5771	0.0880	55.40	2.6118
<b>TBARS</b>	Control	0.8990	21233,3979	0.1277	53.48	2.3745
	ER1500	0.7464	11304,2582	0.1105	61.82	2.5415

Tabla 3

Coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ) y parámetros del modelo cinético de orden cero,  $K_{TBARS}$  (nmol MDA/mL-día) y  $TBARS_0$  (nmol MDA/mL), para la formación de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) en el aceite de almendra de Choibá, para los tratamientos Control y ER1500 a 35°C, 45°C y 55°C

Tratamiento	Temperatura °C	$r^2$	$K_{TBARS}$	$TBARS_0$
<b>Control</b>	35	0.9836	0.1609	-0.8612
	45	0.9944	0.2415	0.1482
	55	0.8892	0.2659	4.6998
<b>ER1500</b>	35	0.9514	0.1226	-0.8612
	45	0.9855	0.1612	-0.2368
	55	0.9761	0.1601	1.0754



## TÍTULOS DE FIGURAS

**Figura 1.** Evolución de la formación de hidroperóxidos (VP) en el aceite de almendra de Choibá con (ER1500) y sin adición de extracto de romero (Control) a 35°C, 45°C y 55°C.

**Figura 2.** Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de formación de hidroperóxidos (VP) en el aceite de almendra de Choibá con y sin adición de extracto de romero (Control y ER1500).

**Figura 3.** Evolución de la formación de especies reactivas al ácido-2-tiobarbitúrico (TBARS) en el aceite de almendra de Choibá con (ER1500) y sin adición de extracto de romero (Control) a 35°C, 45°C y 55°C.

**Figura 4.** Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de formación de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) en el aceite de almendra de Choibá con y sin adición de extracto de romero (Control y ER1500).

Figura 1.

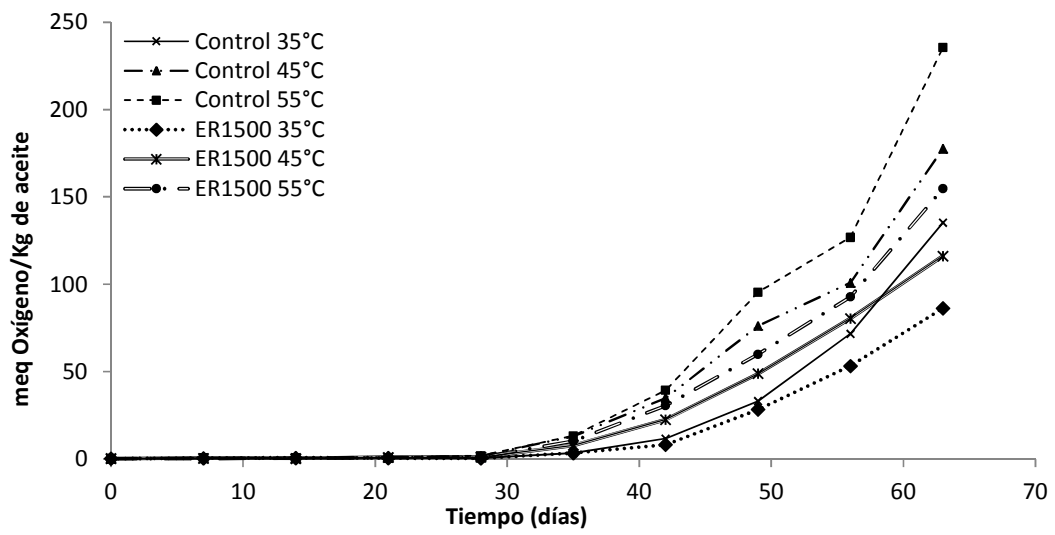


Figura 2.

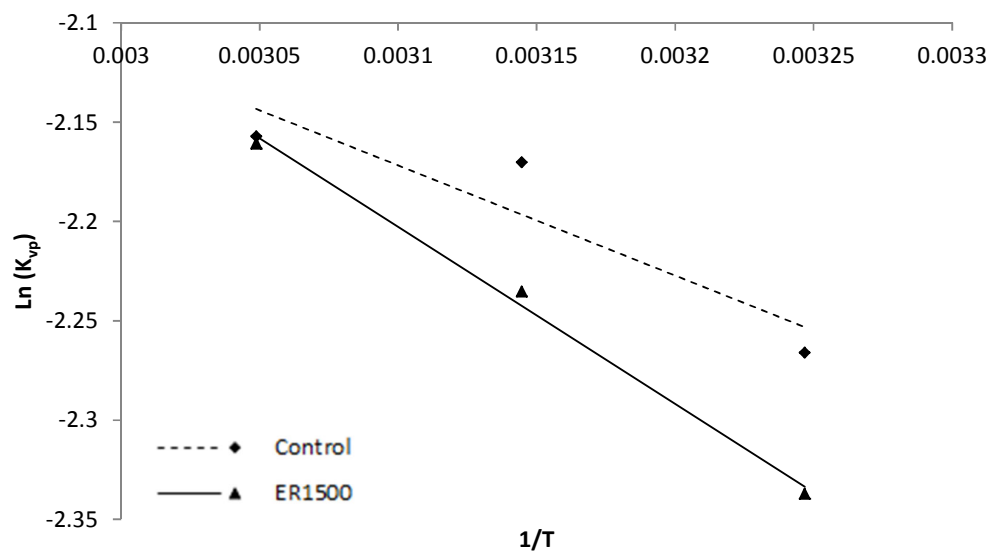


Figura 3.

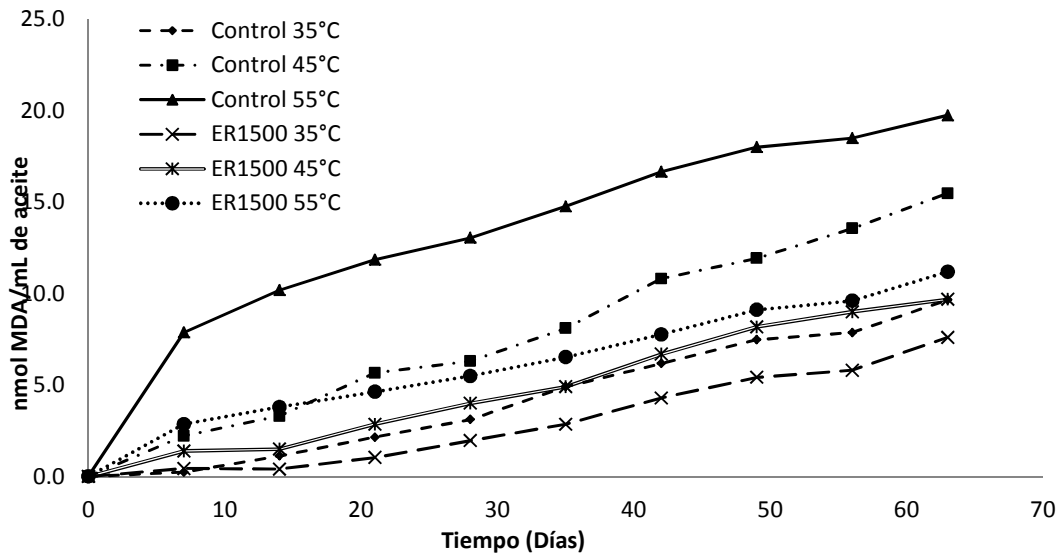
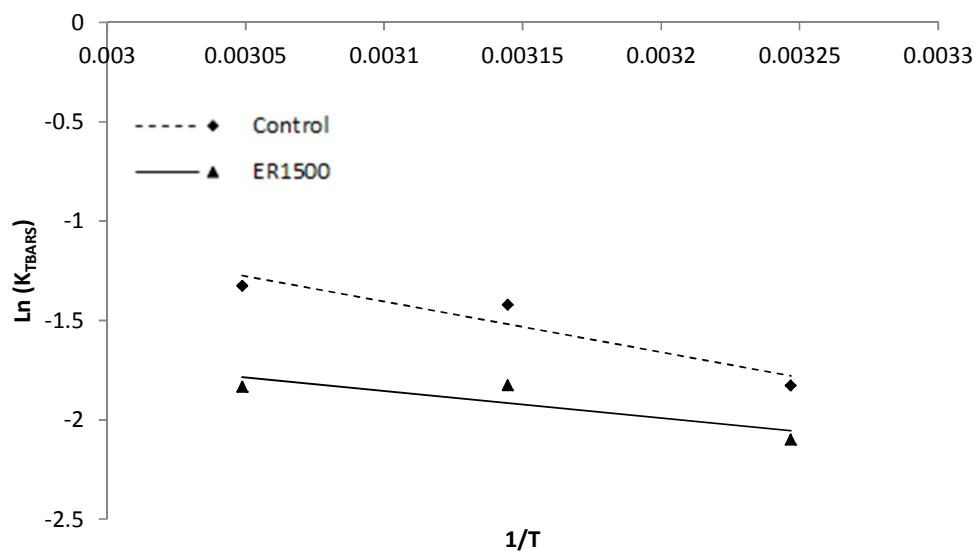


Figura 4.



## 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El extracto de romero demostró tener una elevada capacidad antioxidante medida por los métodos DPPH (557.47 $\mu$ mol Trolox/g de extracto) y ORAC (3440.18 $\mu$ mol Trolox/g de extracto). Este comportamiento se atribuyó al elevado contenido de ácido rosmarínico (20466.89mg/L) que poseía el extracto obtenido; los valores obtenidos son comparables con lo reportado en investigaciones previas para extractos etanólicos de romero, sin embargo el contenido de ácido carnósico (245.66mg/L) fue menor a lo reportado previamente.
- El aceite de almendra de Choibá obtenido estuvo constituido por un 54.03% de ácido oleico. El elevado contenido de este ácido es comparable con lo reportado para aceites de alta ingesta como el de girasol (mid oleico) y oliva, reconocidos por su elevada calidad nutricional.
- La adición de extracto de romero, a una concentración 1500mg/L, demostró mejorar la estabilidad oxidativa del aceite de almendra de Choibá, sometido a condiciones aceleradas de oxidación (100°C y 1150mL aire/min), en términos de aparición de hidroperóxidos (VP), en un 60.91%, y de compuestos finales de oxidación, expresados como porcentaje de Compuestos Polares Totales (%CPT), en un 28.78%, comparado con el control (aceite sin antioxidante): Este comportamiento demostró ser mejor que el correspondiente al aceite con adición de BHT (200mg/L), que aumentó la estabilidad en un 21.54%, en términos de VP, y en un 0.31%, en términos de %CPT.
- El estudio de vida útil del aceite de almendra de Choibá, en el rango de temperatura estudiado (35°C-55°C), permitió determinar que la formación de hidroperóxidos (VP) siguió una cinética de primer orden y que la formación de Malondialdehído (MDA), determinado a través de la técnica TBARS, se ajustó a un modelo cinético de orden cero.
- La velocidad de formación de hidroperóxidos (VP) en el aceite de almendra de Choibá presentó un comportamiento dependiente de la temperatura, ajustándose al modelo matemático de Arrhenius, con una energía de activación de 4611,5071J/mol para el aceite sin antioxidante, y de 7409,5771J/mol para el aceite suplementado con extracto de romero a una concentración de 1500mg/L. Sin embargo, la velocidad de formación especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) no se ajustó al modelo de Arrhenius, posiblemente debido a un cambio en el mecanismo de reacción en el rango de temperatura estudiado.
- La adición de extracto de romero, a una concentración de 1500mg/L, aumentó el tiempo de vida útil a 25°C del aceite de almendra de Choibá en un 45.16% en términos de la aparición de hidroperóxidos.

- A fin de determinar un posible cambio en el mecanismo de reacción para la formación de especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), en el rango de temperatura estudiado, se recomienda la realización de estudios cinéticos posteriores en un rango que incluya temperaturas superiores a 60°C.
- Se recomienda el uso de aceite de almendra de Choibá en procesos que no involucren temperaturas elevadas, como las encontradas en procesos de fritura, debido a la baja estabilidad que presenta en estas condiciones.
- De acuerdo con los resultados anteriores se recomienda la refinación del aceite de almendra de Choibá a fin de promover su uso como aceite comestible, y bajo estas condiciones la realización de estudios de estabilidad posteriores que permitan evaluar el efecto del proceso de refinado sobre el tiempo de vida útil de este aceite.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S., Kulkarni, G. T., & Sharma, V. N. (2011). A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 62–68.
- Aladedunye, F., & Przybylski, R. (2013). Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food chemistry*, 141(3), 2373–2378.
- Aladedunye, F., & Przybylski, R. (2014). Phosphatidylcholine and dihydrocaffeic acid amide mixture enhanced the thermo-oxidative stability of canola oil. *Food chemistry*, 150, 494–499.
- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of chromatography. A*, 1120(1-2), 221–229.
- An, S., & Choe, E. (2012). Effects of mustard oil addition to tuna oil-enriched emulsion on the oxidation under singlet oxygen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(3), 267–270.
- Arceusz, A., & Wesolowski, M. (2013). Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, 215–220.
- Arrázola, G. S., Osorio, J. A., & Alvis, A. (2009). Elaboracion de una bebida nutricional en polvo a partir de la almendra Choibá (*Dipteryx oleifera* Benth.). *TEMAS AGRARIOS*, 14(1), 32–38.
- Barrera-Arellano, D. (1998). Estabilidad y utilización de nitrógeno en aceites y grasas. *Grasas y Aceites*, 49(1), 55–63.
- Bauer, A. K., Dwyer-Nield, L. D., Hankin, J. A., Murphy, R. C., & Malkinson, A. M. (2001). The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology*, 169(1), 1–15.
- Benedet, J. a., & Shibamoto, T. (2008). Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 107(1), 165–168.
- Bentes, A. L. a, Borges, R. S., Monteiro, W. R., De Macedo, L. G. M., & Alves, C. N. (2011). Structure of dihydrochalcones and related derivatives and their scavenging and antioxidant activity against oxygen and nitrogen radical species. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(2), 1749–1760.
- Cárdenas L, D., & Salinas, N. R. (2006). Libro Rojo de las Plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas I parte. Cárdenas L & N. R. Salinas, Eds. Libro rojo de plantas de Colombia (4th ed., p. 234). Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.
- Choe, E., & Min, D. (2006a). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(1), 1–22.



- Choe, E., & Min, D. B. (2006b). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169–186.
- Cogollo, A. (2004). Manejo in situ y ex situ del almendro (*Dipterix oleifera* Benth) como base para un modelo de uso sostenible de productos vegetales no maderables en la región del Bajo cauca Antioqueño. Medellín: Fundación Jardín Botánico de Medellín.
- Cunha, L. M., & Oliveira, F. A. R. (2000). Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the first-order Arrhenius model under linearly increasing temperature profiles. *Journal of Food Engineering*, 46, 53–60.
- Dal Prá, V., Dolwitsch, C. B., Domingos da Silveira, G., Porte, L., Frizzo, C., Tres, M. V., Mossi, V., et al. (2013). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction, chemical characterisation and antioxidant potential of *Brassica oleracea* var *capitata* against HO, O<sub>2</sub>(•-) and ROO. *Food chemistry*, 141(4), 3954–3959.
- Ding, M., & Zou, J. (2012). Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food Chemistry*, 131(3), 1051–1055.
- Doolaeghe, E. H. A., Vossen, E., Raes, K., De Meulenaer, B., Verhé, R., Paelinck, H., & De Smet, S. (2012). Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver pâtés. *Meat science*, 90(4), 925–931.
- Eskin, N. A. M., & Przybylski, R. (2000). Antioxidants and Shelf Life of Foods. In D. Robinson & N. Michael Eskin (Eds.), *Food Shelf Life Satability* (Vol. 10, pp. 168–202). Manitoba, Canadá: CRC Press.
- Fagali, N., & Catalá, A. (2009). Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chemistry and physics of lipids*, 159(2), 88–94.
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1054–1059.
- García Moreno, P. J., Pérez Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2013). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 303–308.
- García-García, P., López-López, a., & Garrido-Fernández, a. (2008). Study of the shelf life of ripe olives using an accelerated test approach. *Journal of Food Engineering*, 84(4), 569–575.
- González-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., De la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., García-Risco, M. R., et al. (2013). Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological research*: the official journal of the Italian Pharmacological Society, 72, 61–68.
- Guardado Yordi, E., Molina Pérez, E., Joao Matos, M., & Uriarte Villares, E. (2012). Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In J. Bouayed & T. BOHN (Eds.), *Nutrition, Well-Being and Health* (pp. 23–48). E.U: InTech.

- Guillén, M. D., & Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77(4), 503–510.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends in pharmacological sciences*, 32(3), 125–130.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. . (1999). *Free radicals in biology and medicine*. (3rd editio.). Oxford New York: Clarendon Press (Oxford and New York).
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(5), 1130–1160.
- Jensen, P. N., Danielsen, B., Bertelsen, G., Skibsted, L. H., & Andersen, M. L. (2005). Storage stabilities of pork scratchings , peanuts , oatmeal and muesli: Comparison of ESR spectroscopy , headspace-GC and sensory evaluation for detection of oxidation in dry foods. *Food Chemistry*, 91, 25–38.
- Jordán, M. J., Castillo, J., Bañón, S., Martínez-Conesa, C., & Sotomayor, J. a. (2014). Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food chemistry*, 151, 212–218.
- Kozak, W., & Samotyja, U. (2013). The use of oxygen content determination method based on fluorescence quenching for rapeseed oil shelf-life assessment. *Food Control*, 33(1), 162–165.
- Kumar, U., Mishra, M., & Prakash, V. (2012). Assessment of antioxidant enzymes and free radical scavenging activity of selected medicinal plants. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(3), 58–63.
- Lee, J., & Choe, E. (2011). Effects of phospholipids on the antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in the singlet oxygen oxidation of canola oil. *New biotechnology*, 28(6), 691–697.
- Lozada, S. M., & García, L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 17, 172–179.
- Man, D. (2002). *Food industry briefing series: Shelf Life*. (D. Man, Ed.) (First.). USA: Blackwell Science Ltd.
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(2), 58–72.
- Nagmoti, D. M., Khatri, D. K., Juvekar, P. R., & Juvekar, A. R. (2012). Antioxidant activity free radical-scavenging potential of *Pithecellobium dulce* Benth seed extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(2), 37–43.
- Nour, V., Stampar, F., Veberic, R., & Jakopic, J. (2013). Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food chemistry*, 141(2), 961–966.
- Özcan, M. M., & Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, 129(1), 171–174.

- Peshev, D., Peeva, L. G., Peev, G., Baptista, I. I. R., & Boam, a. T. (2011). Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Chemical Engineering Research and Design*, 89(3), 318–327.
- Plazonić, A., Bucar, F., Males, Z., Mornar, A., Nigović, B., & Kujundzić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules* (Basel, Switzerland), 14(7), 2466–2490.
- Polak, T., Žlender, B., Lušnic, M., & Gašperlin, L. (2011). Effects of coenzyme Q10,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on oxidation of cholesterol in chicken liver pâté. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1052–1058.
- Rao-P, S., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), 2–7.
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(12), 2821–2831.
- Rivero-Pérez, M. D., Muñiz, P., & González-Sanjosé, M. L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and chemical toxicology*, 46(8), 2815–2822.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, a., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98–103.
- Roman, O., Heyd, B., Broyart, B., Castillo, R., & Maillard, M.-N. (2013). Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 52(1), 49–59.
- Sakai, A., Miyatab, N., & Takahashi, A. (1997). Promoting activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) en BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Letters*, 115, 213–220.
- Salazar de Marcano, E., Belén, D., Marín, G., & Moreno, H. (2007). Cinética de deterioro del aceite de la semilla de la palma coroba. *Ciencias básicas y tecnología*, 19(2), 172–182.
- Sayago, A., Marín, M. I., Aparicio, R., & Morales, M. T. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58(1), 74–86.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2004). *Phenolics in Food and nutraceuticals*. Boca Raton Florida: CRC Press LLC.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Sixth., pp. 357–385). John Wiley & Sons.
- Steele, R. (2004). *Understanding and measuring the shelf-life of food*. (C. Press, Ed.) (pp. 42–65). Washington, DC: Woodhead Publishing Limited.

- Tai, J., Cheung, S., Wu, M., & Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*: international journal of phytotherapy and phytopharmacology, 19(5), 436–443.
- Tironi, V. A., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2010). Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 263–272.
- Urbančič, S., Kolar, M. H., Dimitrijević, D., Demšar, L., & Vidrih, R. (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(2), 671–678.
- Vicente, G., Molina, S., González-Vallinas, M., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G., & Ramírez de Molina, A. (2013). Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *The Journal of Supercritical Fluids*, 79, 101–108.
- Zapata, A., Vanegas, L. S., & Rojano, B. a. (2014). Oleína De Palma Estabilizada Con Antioxidante Natural De Romero En Un Proceso Discontinuo De Fritura. *Información tecnológica*, 25(2), 131–140.
- Zapata Luján, A., Cogollo Pacheco, Á., & Rojano, B. A. (2013). Potencial nutracéutico del aceite de la almendra de choibá o almendro de montaña (*Dipteryx oleifera* Benth.) Nutraceutical potential of Choibá almond oil or mountain almond (*Dipteryx oleifera* Benth.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 368–380.
- Zarucchi, J. (2001). *Dipteryx* (Fabaceae). In W. Stevens, C. Ulloa- Ulloa, A. Pool, & O. Montiel (Eds.), *Monographs in systematic botany from The Missouri Botanical Garden*. (p. 85). St. Louis: MBG.
- Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662.

## ANEXOS

### ANÁLISIS DE VARIANZA

#### Anexo 1. ANOVA MEDIDAS REPETIDAS EN EL TIEMPO – DIENOS CONJUGADOS

Variable dependiente: Dienos Conjugados (DC)

Factores: Antioxidante- Tiempo

Numero de niveles: 4

Réplicas: 3

	<i>numDF</i>	<i>denDF</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo	1	74	18.487702	0.0001
Antioxidante	3	74	1.06933	0.3671

Dado que el valor p de la prueba F es mayor a 0.05 no hay evidencia de que existan diferencias estadísticamente significativas entre los modelos para los tratamientos empleados (Control, ER1000, ER1500, BHT), en ninguno de los tiempos estudiados.

#### Anexo 2. ANOVA MEDIDAS REPETIDAS EN EL TIEMPO – VALOR DE PERÓXIDO

Variable dependiente: Valor de peróxido (VP)

Factores: Antioxidante- Tiempo

Numero de niveles: 4

Réplicas: 3

	<i>numDF</i>	<i>denDF</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo	1	74	1042.3534	<0.0001
Antioxidante	3	74	1.3661	0.2598
Tiempo:Antioxidante	3	74	1.2966	0.2820

Dado que el valor p de la prueba F es mayor a 0.05 no hay evidencia de que existan diferencias estadísticamente significativas entre los modelos para los tratamientos empleados (Control, ER1000, ER1500, BHT). Sin embargo dado que en las etapas finales del ensayo se nota una diferencia entre tratamientos que pudiera ser significativa, y debido a que no hay evidencia estadística de interacción entre los factores,  $p > 0.05$  para la interacción (Tiempo: Antioxidante), se planteó el ANOVA para cada uno de los tiempos estudiados. A continuación se presentan los resultados para cada tiempo en donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

## Anexo 2.1. ANOVA (Tiempo 9 horas) – VALOR DE PERÓXIDO

Variable dependiente: Valor de peróxido (VP)

Factores: Antioxidante

Numero de niveles: 4

Réplicas: 3

	<i>numDF</i>	<i>denDF</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo	1	6	5817.803	<0.0001
Antioxidante	3	6	119.460	<0.0001

Dado que el valor  $p < 0.05$  para el factor antioxidante, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de Valor de peróxido en el tiempo 9 horas entre los niveles del factor Antioxidante (Control, ER1000, ER1500 y BHT), con un nivel de confianza del 95%.

	<i>Error Estándar</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-t</i>	<i>Valor-P</i>
Control:ER1000	4.092586	6	0.97724	0.3662
Control:ER1500	4.092586	6	9.71222	0.0001
Control:BHT	4.092586	6	9.16266	0.0001
ER1000:ER1500	4.092586	6	10.68946	0.0000
ER1000:BHT	4.092586	6	8.18542	0.0002
ER1500:BHT	4.092586	6	18.874874	0.0000

La prueba de comparación de medias permitió determinar que medias son significativamente diferentes de las otras ( $p < 0.05$ ), y a estas fueron asignadas letras diferentes.

## Anexo 2.2. ANOVA (Tiempo 10 horas) – VALOR DE PERÓXIDO

Variable dependiente: Valor de peróxido (VP)

Factores: Antioxidante

Numero de niveles: 4

Réplicas: 3

	<i>numDF</i>	<i>denDF</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo	1	6	3069.1054	<0.0001
Antioxidante	3	6	101.2455	<0.0001

Dado que el valor  $p < 0.05$  para el factor antioxidante, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de Valor de peróxido en el tiempo 10 horas entre los niveles del factor Antioxidante (Control, ER1000, ER1500 y BHT), con un nivel de confianza del 95%.

	<i>Error Estándar</i>	<i>GI</i>	<i>Valor-t</i>	<i>Valor-P</i>
Control:ER1000	6.835290	6	8.49979	0.0001
Control:ER1500	6.835290	6	17.16036	0.0000
Control:BHT	6.835290	6	6.07010	<0.0001
ER1000:ER1500	6.835290	6	8.660570	0.0001
ER1000:BHT	6.835290	6	2.429687	0.0512
ER1500:BHT	6.835290	6	11.09026	0.0000

La prueba de comparación de medias permitio determinar que medias son significativamente diferentes de las otras ( $p < 0.05$ ), y a estas fueron asignadas letras diferentes.

### **Anexo 3. ANOVA MEDIDAS REPETIDAS EN EL TIEMPO – TBARS**

**Variable dependiente: Especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)**

**Factores: Antioxidante- Tiempo**

**Numero de niveles: 4**

**Réplicas: 3**

	<i>numDF</i>	<i>denDF</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo	1	74	19.63382	<0.0001
Antioxidante	3	74	1.14461	0.3377

Dado que el valor p de la prueba F es mayor a 0.05 no hay evidencia de que existan diferencias estadísticamente significativas entre los modelos para los tratamientos empleados (Control, ER1000, ER1500, BHT), en ninguno de los tiempos estudiados.

### **Anexo 4. ANOVA MEDIDAS REPETIDAS EN EL TIEMPO – %CPT**

**Variable dependiente: Porcentaje de compuestos polares totales (%CPT)**

**Factores: Antioxidante- Tiempo**

**Numero de niveles: 4**

**Réplicas: 3**

	<i>numDF</i>	<i>denDF</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo	1	98	607.2863	<0.0001
Antioxidante	3	98	6.0659	0.0008
Tiempo:Antioxidante	3	98	3.5280	0.0577

Dado que el valor p de la prueba F es menor a 0.05 hay evidencia estadística de que existen diferencias entre los modelos obtenidos para los tratamientos empleados (Control, ER1000, ER1500, BHT). A las medias diferentes fueron asignadas letras diferentes.

**Anexo 5. Análisis de regresión modelo cinético primer orden para valor de peróxido. Control 35°C.**

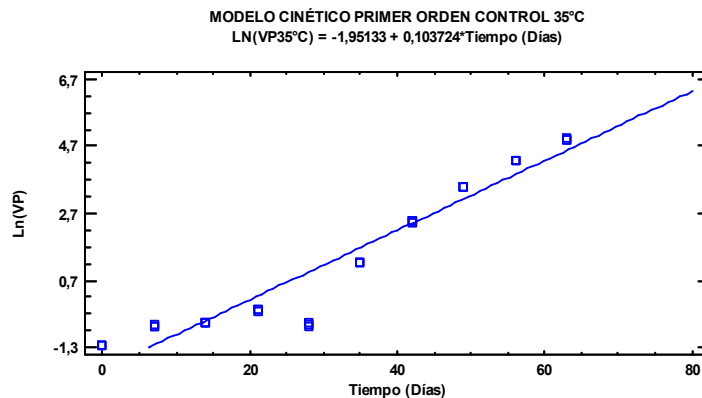
**Variable dependiente: Ln(Valor de peróxido); Ln (VP)**

**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de primer orden**

$$\ln(VP) = \ln(VP_0) - K_{VP} * t$$

$$\ln(VP) = -1.95133 + 0.103724 * t$$



**Coefficientes**

	<i>Mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Estadístico-T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-1.95133	0.224729	-8.68306	0.0000
Pendiente	0.103724	0.00601366	17.2481	0.0000

**Análisis de varianza**

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>R-Cuadrado</i>	<i>Error medio absoluto</i>
Modelo	130.476	1	130.476	297.50	0.0000	91.3978	0.493382
Residuo	12.2802	28	0.43858				
Total	142.757	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 91.3978, es posible concluir que el modelo cinético de primer orden ajusta correctamente los datos experimentales

**Anexo 6. Análisis de regresión modelo cinético primer orden para valor de peróxido. Control 45°C.**

**Variable dependiente: Ln(Valor de peróxido); Ln (VP)**

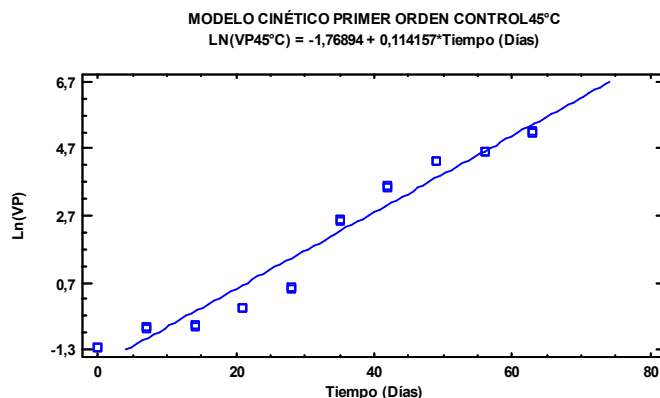
**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de primer orden**



$$\ln(VP) = \ln(VP_0) - K_{VP} * t$$

$$\ln(VP) = -1.76894 + 0.114157 * t$$



### Coefficientes

	Mínimo cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-1.76894	0.178048	-9.93516	0.0000
Pendiente	0.114157	0.00476449	23.96	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	158.044	1	158.044	574.08	0.0000	95.3495	0.4504
Residuo	7.70838	28	0.275299				
Total	165.753	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 95.3495, es posible concluir que el modelo cinético de primer orden ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 7. Análisis de regresión modelo cinético primer orden para valor de peróxido. Control 55°C.

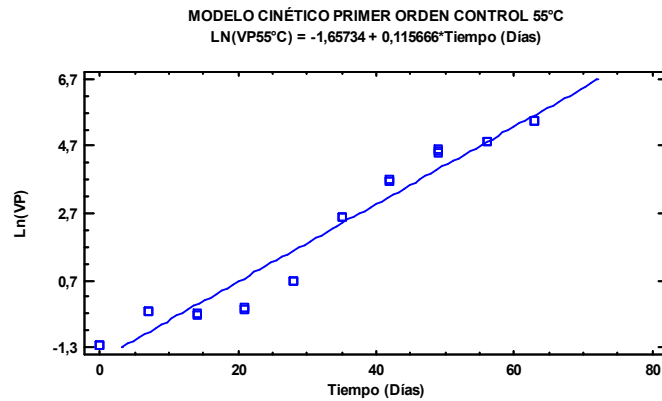
Variable dependiente: Ln(Valor de peróxido); Ln (VP)

Variable independiente: Tiempo (Días)

Modelo cinético de primer orden

$$\ln(VP) = \ln(VP_0) - K_{VP} * t$$

$$\ln(VP) = -1.65734 + 0.115666 * t$$



### Coeficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-1.65734	0.189476	-8.74698	0.0000
Pendiente	0.115666	0.00507029	22.8125	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	162.249	1	162.249	520.41	0.0000	94.8943	0.456603
Residuo	8.72963	28	0.311772				
Total	170.979	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 94.8943, es posible concluir que el modelo cinético de primer orden ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 8. Análisis de regresión modelo cinético primer orden para valor de peróxido. ER1500 35°C.

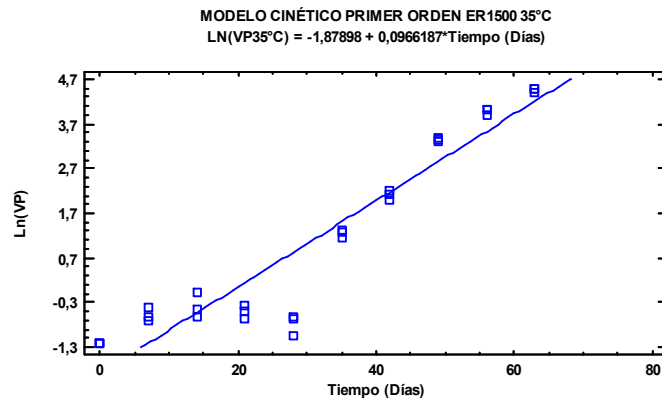
Variable dependiente: Ln(Valor de peróxido); Ln (VP)

Variable independiente: Tiempo (Días)

Modelo cinético de primer orden

$$Ln(VP) = Ln(VP_0) - K_{VP} * t$$

$$Ln(VP) = -1.87898 + 0.0966187 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-1.87898	0.237023	-7.92744	0.0000
Pendiente	0.0966187	0.00634263	15.2332	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	113.212	1	113.212	232.05	0.0000	89.2329	0.527059
Residuo	13.6606	28	0.487877				
Total	126.873	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 89.2329, es posible concluir que el modelo cinético de primer orden ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 9. Análisis de regresión modelo cinético primer orden para valor de peróxido. ER1500 45°C.

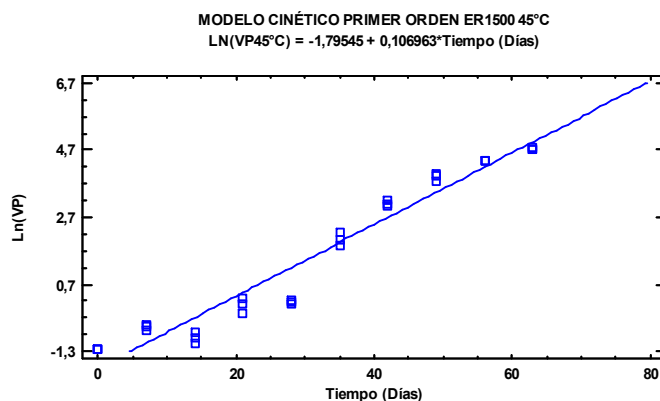
Variable dependiente: Ln(Valor de peróxido); Ln (VP)

Variable independiente: Tiempo (Días)

Modelo cinético de primer orden

$$Ln(VP) = Ln(VP_0) - K_{VP} * t$$

$$Ln(VP) = -1.79545 + 0.106963 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-1.79545	0.181143	-9.91178	0.0000
Pendiente	0.106963	0.00484731	22.0664	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	138.751	1	138.751	486.93	0.0000	94.5623	0.443349
Residuo	7.97867	28	0.284953				
Total	146.73	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 94.5623, es posible concluir que el modelo cinético de primer orden ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 10. Análisis de regresión modelo cinético primer orden para valor de peróxido. ER1500 55°C.

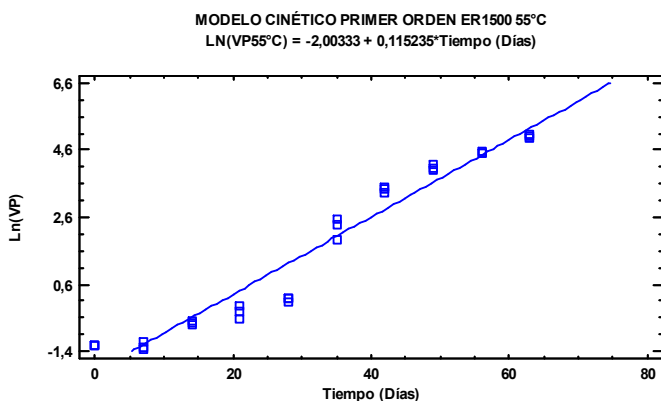
Variable dependiente: Ln(Valor de peróxido); Ln (VP)

Variable independiente: Tiempo (Días)

Modelo cinético de primer orden

$$Ln(VP) = Ln(VP_0) - K_{VP} * t$$

$$Ln(VP) = -2.00333 + 0.115235 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor P
Intercepto	-2.00333	0.192501	-10.4069	0.0000
Pendiente	0.115235	0.00515124	22.3703	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	161.041	1	161.041	500.43	0.0000	94.7013	0.440679
Residuo	9.01058	28	0.321806				
Total	170.052	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 94.7013, es posible concluir que el modelo cinético de primer orden ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 11. Análisis de regresión modelo cinético de orden cero para TBARS. Control 35°C.

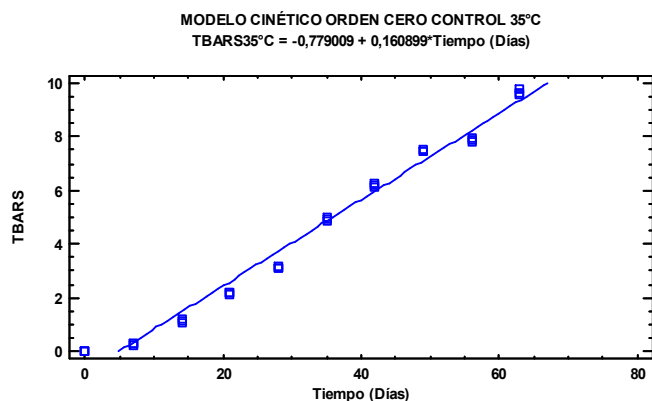
**Variable dependiente: TBARS (nmol MDA/mL de aceite)**

**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de orden cero**

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t$$

$$TBARS = -0.779009 + 0.160899 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-0.779009	0.146867	-5.30419	0.0000
Pendiente	0.160899	0.00393009	40.9403	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	313.964	1	313.964	1676.11	0.0000	98.3569	0.359867
Residuo	5.24487	28	0.187317				
Total	319.209	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 98.3569, es posible concluir que el modelo cinético de orden cero ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 12. Análisis de regresión modelo cinético de orden cero para TBARS. Control 45°C.

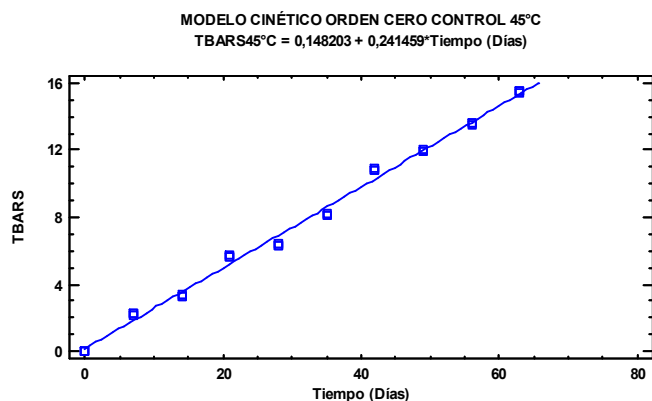
**Variable dependiente: TBARS (nmol MDA/mL de aceite)**

**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de orden cero**

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t$$

$$TBARS = 0.148203 + 0.241459 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	0.148203	0.127925	1.15852	0.2564
Pendiente	0.241459	0.00342321	70.536	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	707.064	1	707.064	4975.32	0.0000	99.4404	0.305836
Residuo	3.9792	28	0.142114				
Total	711.044	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 99.4404, es posible concluir que el modelo cinético de orden cero ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 13. Análisis de regresión modelo cinético de orden cero para TBARS. Control 55°C.

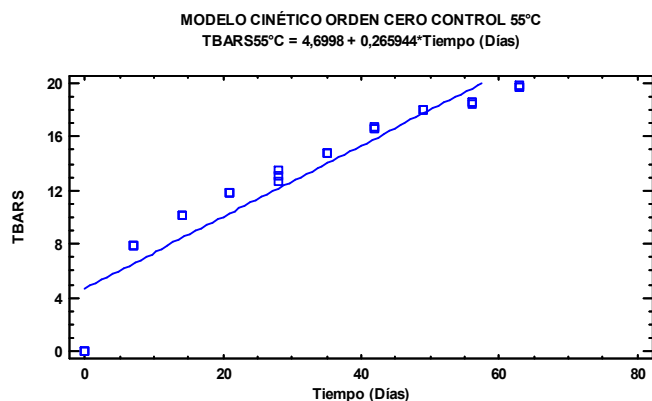
**Variable dependiente: TBARS (nmol MDA/mL de aceite)**

**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de orden cero**

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t$$

$$TBARS = 4.6998 + 0.265944 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	4.6998	0.662926	7.08948	0.0000
Pendiente	0.265944	0.0177396	14.9915	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	857.732	1	857.732	224.75	0.0000	88.9217	1.49177
Residuo	106.861	28	3.81646				
Total	964.593	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 88.9217, es posible concluir que el modelo cinético de orden cero ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 14. Análisis de regresión modelo cinético de orden cero para TBARS. ER1500 35°C.

**Variable dependiente: TBARS (nmol MDA/mL de aceite)**

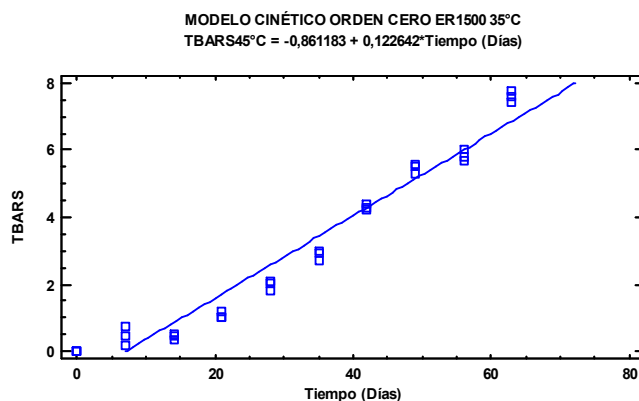
**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de orden cero**

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t$$

$$TBARS = -0.861183 + 0.122642 * t$$





### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-0.861183	0.195798	-4.39832	0.0001
Pendiente	0.122642	0.00523948	23.4073	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	182.41	1	182.41	547.90	0.0000	95.138	0.485585
Residuo	9.32193	28	0.332926				
Total	191.732	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 95.138, es posible concluir que el modelo cinético de orden cero ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 15. Análisis de regresión modelo cinético de orden cero para TBARS. ER1500 45°C.

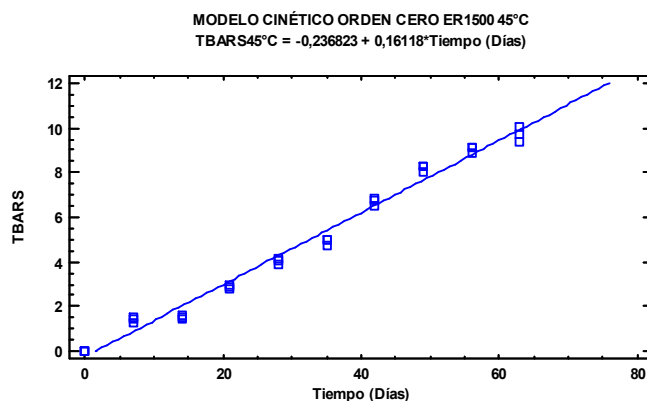
**Variable dependiente: TBARS (nmol MDA/mL de aceite)**

**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de orden cero**

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t$$

$$TBARS = -0.236823 + 0.16118 * t$$



### Coefficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	-0.236823	0.13831	-1.71226	0.0979
Pendiente	0.16118	0.00370112	43.5489	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	315.059	1	315.059	1896.50	0.0000	98.5451	0.351338
Residuo	4.65154	28	0.166126				
Total	319.711	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 98.5451, es posible concluir que el modelo cinético de orden cero ajusta correctamente los datos experimentales.

### Anexo 16. Análisis de regresión modelo cinético de orden cero para TBARS. ER1500 55°C.

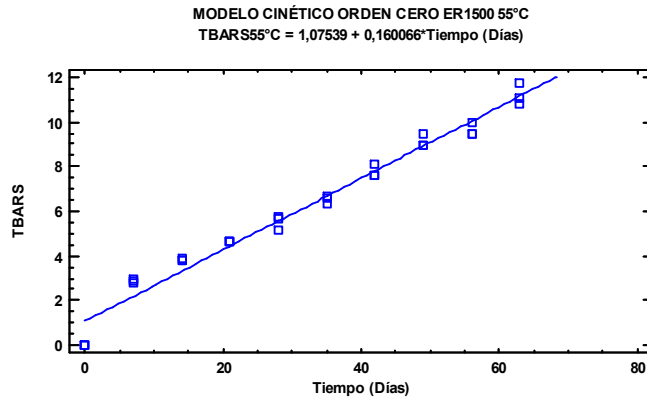
**Variable dependiente: TBARS (nmol MDA/mL de aceite)**

**Variable independiente: Tiempo (Días)**

**Modelo cinético de orden cero**

$$TBARS = TBARS_0 - K_{TBARS} * t$$

$$TBARS = 1.07539 + 0.160066 * t$$



### Coeficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	1.07539	0.176946	6.07749	0.0000
Pendiente	0.160066	0.004735	33.8048	0.0000

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	310.719	1	310.719	1142.76	0.0000	97.6084	0.399803
Residuo	7.61324	28	0.271902				
Total	318.332	29					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 97.6084, es posible concluir que el modelo cinético de orden cero ajusta correctamente los datos experimentales.

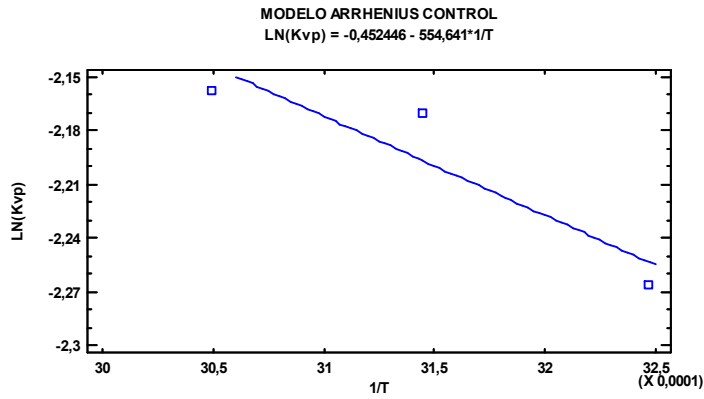
### Anexo 17. Análisis de regresión modelo Arrhenius valor de peróxido. Ensayo CONTROL.

Variable dependiente: Ln(K<sub>vp</sub>)

Variable independiente: 1/T

$$\ln(K_{vp}) = \ln(K_A) - \frac{E_a}{RT}$$

$$\ln(K_{vp}) = -0.452446 - 554.641 * \frac{1}{T}$$



### Coeficientes

	<i>Mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Estadístico-T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.452446	0.727563	-0.621865	0.6458
Pendiente	-554.641	231.136	-2.39963	0.2514

### Análisis de varianza

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>R-Cuadrado</i>	<i>Error medio absoluto</i>
Modelo	0.00603044	1	0.0060304	5.76	0.2514	85.2032	0.0176126
Residuo	0.00104728	1	0.0010472				
Total	0.00707771	2					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 85.2032, es posible concluir que el modelo lineal de Arrhenius ajusta correctamente los datos experimentales.

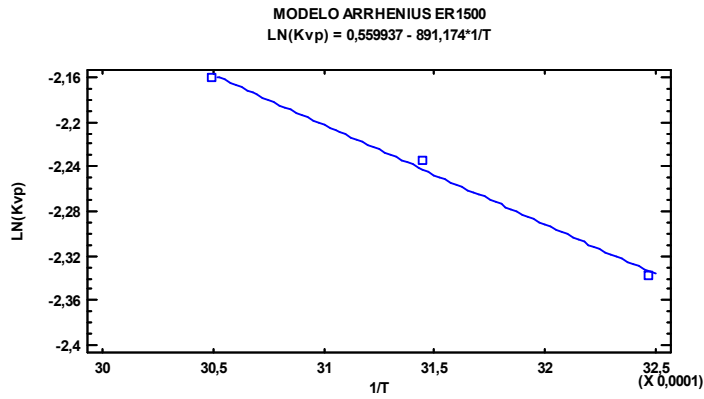
### Anexo 18. Análisis de regresión modelo Arrhenius valor de peróxido. Ensayo ER1500.

Variable dependiente: Ln(Kvp)

Variable independiente: 1/T

$$\ln(K_{vp}) = \ln(K_A) - \frac{E_a}{RT}$$

$$\ln(K_{vp}) = 0.559937 - 891.174 * \frac{1}{T}$$



### Coefficientes

	<i>Mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Estadístico-T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0.559937	0.198951	2.81444	0.2173
Pendiente	-891.174	63.2039	-14.1	0.0451

### Análisis de varianza

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>R-Cuadrado</i>	<i>Error medio absoluto</i>
Modelo	0.0155686	1	0.0155686	198.81	0.0451	99.4995	0.00481613
Residuo	0.000078309	1	0.000078309				
Total	0.0156469	2					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 99.4995, es posible concluir que el modelo lineal de Arrhenius ajusta correctamente los datos experimentales.

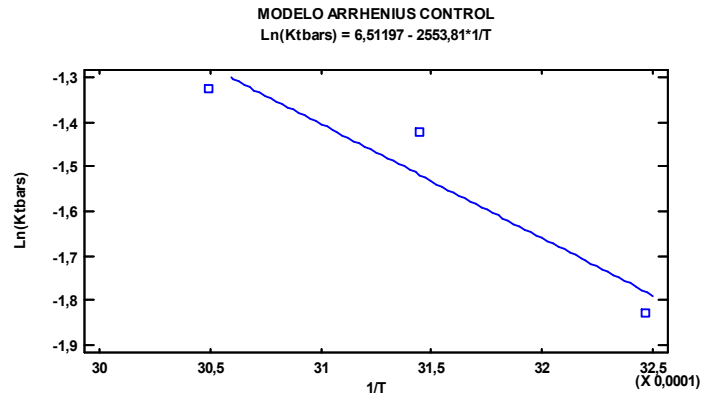
### Anexo 19. Análisis de regresión modelo Arrhenius TBARS. Ensayo CONTROL.

Variable dependiente:  $Ln(K_{tbars})$

Variable independiente:  $1/T$

$$Ln(K_{tbars}) = Ln(K_A) - \frac{E_a}{RT}$$

$$Ln(K_{tbars}) = 6.51197 - 2553.81 \cdot \frac{1}{T}$$



### Coeficientes

	Mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico-T	Valor-P
Intercepto	6.51197	2.69373	2.41745	0.2497
Pendiente	-2553.81	855.76	-2.98426	0.2058

### Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P	R-Cuadrado	Error medio absoluto
Modelo	0.12785	1	0.12785	8.91	0.2058	89.9049	0.123627
Residuo	0.0143558	1	0.0143558				
Total	0.142206	2					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 89.9049, es posible concluir que el modelo lineal de Arrhenius ajusta correctamente los datos experimentales.

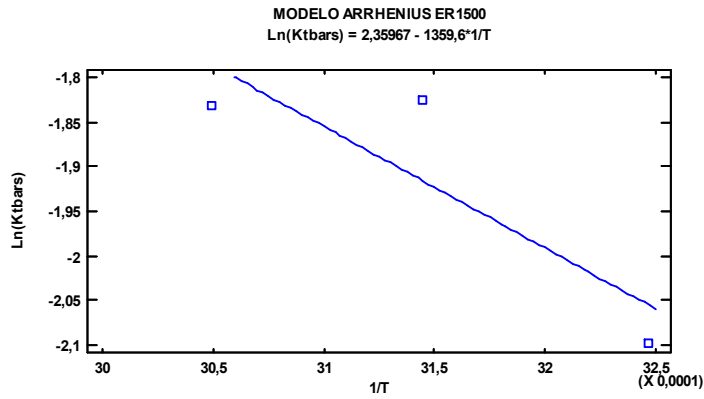
### Anexo 20. Análisis de regresión modelo ArrheniusTBARS. Ensayo CONTROL.

**Variable dependiente: Ln(Ktbars)**

**Variable independiente: 1/T**

$$\text{Ln}(K_{tbars}) = \text{Ln}(K_A) - \frac{E_a}{RT}$$

$$\text{Ln}(K_{tbars}) = 2.35967 - 1359.6 \cdot \frac{1}{T}$$



### Coeficientes

	<i>Mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	2.35967	2.49439	0.945992	0.5177
Pendiente	-1359.6	792.432	-1.71574	0.3359

### Análisis de varianza

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>R-Cuadrado</i>	<i>Error medio absoluto</i>
Modelo	0.0362368	1	0.0362368	2.94	0.3359	74.6434	0.0603832
Residuo	0.0123097	1	0.0123097				
Total	0.0485465	2					

Dado que el coeficiente de correlación R- cuadrado fue de 74.6434, es posible concluir que el modelo lineal de Arrhenius NO ajusta correctamente los datos experimentales.

## **Anexo 21. Formato presentación artículo revista Grasas y Aceites**

**The title should accurately, clearly, and concisely reflect the importance and content of the paper in one sentence**

**By Name I. One,<sup>a</sup> N. Name Two<sup>b</sup> and Name I. Three<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> The affiliation should be the institution where the work was conducted.

<sup>b</sup> Include so many affiliations as needed.

(\* corresponding author: e-mail@address)



## **RESUMEN**

### **Translate the title into Spanish if possible**

Translate the summary into Spanish if possible. If you do not know Spanish, the Editorial Board will do it for you. Nevertheless, to be sure that the translation is accurate, we ask authors to do the translation or to confirm that our translation is adequate.

*PALABRAS-CLAVE: Translate– Into – Spanish – And – Order – Alphabetically*

## **SUMMARY**

### **Repeat the title**

All manuscripts must be accompanied by an abstract. The abstract should briefly state the problem or purpose of the research, indicate the experiments carried out, summarize the principal findings, and point out major conclusions. Please, include only one paragraph and no more than 200 words.

*KEY-WORDS: Select – About – Six – Words – In – Alphabetical – Order*

## **5. INTRODUCTION**

Discuss relationships of the study to previously published work, but do not reiterate or attempt to provide a complete literature survey. The objective for the research being reported, and its significance, originality, or contribution to new knowledge in the field, should be clearly and concisely stated. Do not include or summarize current findings in this section.

Cite appropriate references. Citation of authors in the text should appear in one of the two following forms. At the end of a sentence include the author and the year between parenthesis (First and Second, 2006; First et al., 2007). If you cite the name of the author, include the year between parentheses: according to First et al. (2007). Initials should not be included in these citations.

## **6. MATERIALS AND METHODS**

### **6.1. Subtitle One**

The origin of special apparatus, reagents, and biological materials used, should be described. Reagents normally found in the laboratory and preparations described in standard textbooks or texts should not be listed. Specific experimental methods should be sufficiently detailed for others to repeat the experiments unequivocally. Omit details of procedures that are common knowledge to those in the field. Brief highlights of published procedures may be included, but details must be left to the literature cited. Cite references as described above. Describe statistical design and methods in this section.

### **6.2. Subtitle Two**

Divide this section in so many subsections as needed. If you need to divide a subsection, do not use numbers. Include the title in italics as follow.

## *Division 1*

Avoid dividing subsections as much as possible.

## **7. RESULTS**

### **7.1. Subtitle One**

Results and discussion may be presented in separate sections or combined into a single section, whichever format conveys the results in the most lucid fashion. Divide this section in so many subsections as needed. If you need to divide a subsection, do not use numbers. Include the title in italics as indicated above.

### **7.2. Subtitle Two**

Data should be presented into either tables or figures, but do not repeat the data. The tables and figures should be mentioned in the text consecutively and numbered with Arabic numerals, and inserted at the end of the manuscript. Tables and figures should be carefully designed to maximize comprehension of the experimental data with superfluous information excluded.

Tables must be created using a table format feature. Ensure each data is in its own table cell. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be grouped after the References section. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by superscript letters. The sequence of letters should proceed by row than by column. Each Table should provide with a descriptive heading, which, together with the individual column heading, should make the table, self-explanatory. A model Table is included at the end of this template.

Insert the illustrations into the word-processing file following the Tables. Artwork should be sequentially numbered using Arabic numbers. Figures should have captions. Figure captions should be included after the Tables and previously to the Figures.

Remove all color from graphics. Only readable and accurately represented images are acceptable. GRASAS Y ACEITES reserves the option to reject images that are not of satisfactory quality for publication.

## **8. DISCUSSION**

Be complete but concise in discussing findings, comparing results with previous work and proposing explanations for the results observed. Avoid speculation unsupported by the data obtained. Concluding statements may be either incorporated at the end of this section or under a separate Conclusions section. Citations should be according to the described above.

## **9. CONCLUSIONS**

Concluding statements may be either incorporated in this section or at the end of Discussion section or Results and Discussion section. Do not repeat the discussion. Include only concluding statements.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Use this section to acknowledge people, organizations, and financing. You may state grant numbers and sponsors here.

## REFERENCES

The list of references should be typed in alphabetical order according to the following examples:

Author AB, Author BJ, Author C. 2007. Title of the article. *Abbreviated Journal* **Volume**, initial page–final page.

Author C, Author BJ. 2007. Title of the chapter, in Name I (Ed.) *Title of the Book*. Editorial, place, initial page–final page.

Author M, Author CJ. 2007. *Title of the Book*. Editorial, Place.

Author K. 2007. Title of the patent. Patent number.

## TABLES

Table 1

**Table title**

<b>Column heading</b>	<b>Column heading</b>	<b>Column heading</b>	<b>Column heading</b>	<b>Column heading</b>
Data	Data	Data	Data	Data
Data	Data	Data	Data	Data
Data	Data	Data	Data	Data
Data	Data	Data	Data	Data

<sup>a</sup> Use footnotes to give experimental details, explain abbreviations, show significance, etc.

<sup>b</sup> Footnotes may be used in table title, column headings or individual data.

## **FIGURE CAPTIONS**

**Figure 1.** Include a brief description of the figure, preferably in one or two sentences. The caption should be understandable without reference to the text.

**INCLUDE FIGURES HERE**

## Anexo 22. Carta Aceptación artículo

Dear **Benjamin Rojano**,

Thank you for your successful paper submission to Food and Nutrition Sciences (FNS). Your paper information is as follows:

Login Name: [brojano@unal.edu.co](mailto:brojano@unal.edu.co)

Paper ID: 2701505

Paper Title: Kinetic study of the oxidative degradation of choibá oil (*Dipteryx oleifera* Benth.) with addition of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.)

Submission Time: 2015-01-23 23:53:44

Please be advised that without prior consent from FNS, this paper should not be submitted elsewhere for publication within three months of its submission to FNS

Furthermore, you are encouraged to recommend 4 reviewers with acknowledged expertise in the related research field(s). **Please send us a cover letter, including the basic information of the proposed reviewers (name, affiliation, E-mail) and the main reason(s) you recommend them. It will be great if you could also give a web page for each reviewer in the cover letter.**

Nomination of potential referees can be made via our paper submission system. You should hear from us within 30 days.

Best regards,

Editorial Assistant of FNS  
Scientific Research Publishing  
Email: [fns@scirp.org](mailto:fns@scirp.org)  
<http://www.scirp.org/journal/fns>