



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EFFECTO DE ANTIOXIDANTES NATURALES
EN LA ESTABILIDAD DEL ACEITE DE HÍGADO
DE RAYA (*Rhinoptera bonasus*)**

T E S I S

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

ELIZABETH COTA QUINOÑEZ

Hermosillo, Sonora.

Febrero, 2011.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Efecto de Antioxidantes Naturales en la Estabilidad del Aceite de Hígado de
Raya (*Rhinoptera bonasus*)

T E S I S

Para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

ELIZABETH COTA QUINOÑEZ

Hermosillo, Sonora.

Febrero, 2010.

APROBACIÓN


Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada Evaluación del efecto de antioxidantes en la estabilidad del aceite de hígado de raya de la especie *Rhinoptera bonasus* presentada por Q.B. Elizabeth Cota Quiñonez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Gerardo Navarro García
Asesor



Dra. Nohemí Gámez Meza
Secretario



Dr. Luis Ángel Medina Juárez
Sinodal



Dr. Jesús Ortega García
Sinodal



Dr. Jorge Pino Alea
Sinodal

DEDICATORIA

A Dios, quien me permitió culminar una meta mas en mi vida, por darme salud, fuerza, motivación, voluntad, fe y una familia que me apoyo durante este transcurso.

A mi familia, quien me ha enseñado que juntos podemos superar cualquier situación difícil, por darme fuerzas y apoyo incondicional.
A mi padre por la confianza que ha puesto en mí.
A mi madre por su fortaleza y ejemplo.
A mi hermana por ser mi cómplice en esta aventura llamada vida.
A mi hermano, nunca es tarde para volver a empezar.

“Para poder desarrollarnos y conducirnos a un auténtico compromiso con la vida, lo primero que se hace indispensable es creer en uno mismo...”

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, no tanto por los momentos fáciles y felices, sino por las adversidades, las cuales me han permitido valorar la vida y vivirla con humildad y agradecimiento; así como a mi **Familia**, quienes son el motor que me ayuda a superarme día con día. Los amo.

A la **Universidad de Sonora (UNISON)**, al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS)** y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la formación otorgada y el apoyo para mi desarrollo profesional.

A mi director de tesis, **Dr. Gerardo Navarro García**, por hacerme parte de este proyecto, el cual me dejó una gran satisfacción.

A la **Dra. Nohemí Gámez Meza**, por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas y la disponibilidad para culminar este proyecto.

Al **Dr. Luis Ángel Medina Juárez**, por las facilidades que me brindó durante este trayecto.

Al **Dr. Jesús Ortega**, por la paciencia al instruirme y compartir sus conocimientos.

Al **Dr. Jesús Pino**, por su colaboración y aportación en el proyecto.

A cada una de las personas del **DICTUS**; abarcaría mucho si nombro a cada una de ellas, pero mis agradecimientos también van para ustedes, por su apoyo y amistad durante estos años.

INDICE

ÍNDICE	<i>iv</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vi</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>vii</i>
RESUMEN	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	3
1.1. Generalidades de los Aceites	3
1.1.1. Acidos grasos saturados	4
1.1.2. Acidos grasos monoinsaturados	4
1.1.3. Acidos grasos poliinsaturados	5
1.1.4. Clasificación de los ácidos grasos poliinsaturados	6
1.1.5. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados	6
1.1.6. Beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3	8
1.1.7. Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados	9
1.2. Oxidación de los Aceites	10
1.2.1. Evaluación de la rancidez oxidativa en los lípidos	12
1.3. Antioxidantes	14
1.3.1. Antioxidantes sintéticos	15
1.3.2. Antioxidantes naturales	17
1.3.3. Reglamento del uso de antioxidantes	20
1.3.4. Elección del antioxidante	21
1.4. Fuente de Ácidos Grasos Omega 3	21
II. HIPÓTESIS	25
III. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo General	26
3.2. Objetivos Particulares	26

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Extracción del Aceite	27
4.2. Descripción Experimental	27
4.3. Caracterización del Aceite	28
4.3.1. Perfil de ácidos grasos	28
4.3.2. Tocoferoles	28
4.3.3. Valor de Peróxido (VP)	29
4.4. Evaluación del Efecto Protector de los Antioxidantes Sobre el Aceite	29
4.4.1. Estabilidad del aceite mediante oxidación acelerada por calentamiento	30
4.4.2. Determinación de la actividad antioxidante por el Método de Schaal	30
4.4.3. Determinación de compuestos volátiles por SPME	31
4.5. Análisis Estadístico	32
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Caracterización del Aceite	33
5.1.1. Perfil de ácidos grasos	33
5.1.2. Tocoferoles	34
5.1.3. Valor de Peróxidos	35
5.2. Evaluación del Efecto Protector de los Antioxidantes Sobre el Aceite	35
5.2.1. Estabilidad del aceite mediante oxidación acelerada por calentamiento	35
5.2.2. Determinación de la actividad antioxidante por el Método de Schaal	40
5.2.3. Determinación de compuestos volátiles por SPME	44
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS	55

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Estructura general del triacilglicérido	3
2	Estructura molecular de un ácido graso saturado	4
3	Estructura del ácido oleico	5
4	Estructuras de ácidos grasos poliinsaturados	5
5	Esquematación de la nomenclatura de los ácidos grasos omega-3 y omega-6	6
6	Ejemplificación del proceso de conversión de ácidos grasos omega 3 y omega 6 en sus correspondientes metabolitos	7
7	Reacción de la rancidez hidrolítica de un triacilglicérido	11
8	Esquema del proceso de la rancidez oxidativa de un ácido graso	12
9	Mecanismo de acción de los antioxidantes sobre el radical libre	16
10	Estructura química de antioxidantes sintéticos. (1) TBHQ; (2) BHT; (3) BHA	17
11	Estructura química de antioxidantes naturales	20
12	Previsiones de producción mundial de aceite; 2006 - 2012	23
13	Estadísticas de captura de rayas a nivel nacional 2009	24
14	Estabilidad oxidativa de <i>Rhinoptera bonasus</i> en los cinco tratamientos;(Control, TBHQ: terbutilhidroquinona; Toc: tocoferol; Rom: extracto de romero; AC: ácido cafeico)	40
15	Valor de peróxido del aceite de <i>Rhinoptera bonasus</i> con antioxidantes durante el almacenamiento a 60°C	43
16	Correlación entre el valor de peróxidos y compuestos volátiles para 1-penten-3-ol, 2-decenal y 2-octenal	46

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
1	Perfil de ácidos grasos del aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i>	34
2	Caracterización del aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i>	35
3	Actividad antioxidante del TBHQ en el aceite e raya <i>Rhinoptera bonasus</i>	36
4	Actividad antioxidante del ácido cafeico en el aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i>	37
5	Actividad antioxidante del tocoferol en el aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i>	38
6	Actividad antioxidante del extracto de romero en el aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i>	39
7	Valor de peróxido en el aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i> almacenado a 60°C durante 35 días	42
8	Compuestos volátiles identificados en aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i> sin antioxidantes	48
9	Compuestos volátiles identificados en aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i> adicionado con 0.02% de TBHQ	49
10	Compuestos volátiles identificados en aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i> adicionado con 0.06% de ácido cafeico	50
11	Compuestos volátiles identificados en aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i> adicionado con 2.5% de extracto de romero	51
12	Compuestos volátiles identificados en aceite de raya <i>Rhinoptera bonasus</i> adicionado con 0.5% de tocoferol	52

RESUMEN

El alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que posee el aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus* lo hace vulnerable a la oxidación; por lo cual, se evaluó el efecto de antioxidantes naturales sobre la estabilidad oxidativa del aceite, principalmente, de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Las concentraciones de los antioxidantes fueron: 0.02% (p/p) de TBHQ; 0.02, 0.03, 0.06 y 0.1% (p/p) de ácido cafeico; 0.02, 1, 2.5 y 5% (p/p) de extracto de romero y 0.02, 0.3, 0.5 y 0.8% (p/p) de α -tocoferol. La estabilidad oxidativa se evaluó por medio de un estudio acelerado por calentamiento a 150°C por 3 horas. Solo un 61.4% de EPA y 53.9% de DHA se mantuvo en el aceite sin antioxidantes. De los antioxidantes evaluados el que mostró una mayor protección fue el extracto de romero cuando se adicionó a 2.5% (p/p), donde no se observó pérdida de estos ácidos grasos, superando la protección del TBHQ. El aumento al 5% (p/p) del extracto de romero redujo su capacidad de inhibir la oxidación de EPA y DHA. El tocoferol a 0.5% (p/p) presentó un mayor porcentaje de EPA y DHA de 83.7 y 84.8%, respectivamente. Mientras que el nivel óptimo encontrado para el ácido cafeico se presentó a la concentración de 0.06% (p/p) con un 86.5 de EPA y 79% DHA, respectivamente. El valor de peróxidos determinado durante la prueba de Schaal en el aceite, arrojó que el aceite control alcanzó los 8 meq/Kg a los 17 días; el aceite evaluado con TBHQ al igual que el ácido cafeico a los 21 días, seguido por el tocoferol a los 24 días y finalmente el aceite con extracto de romero alcanzó dicho valor hasta los 28 días de tratamiento. Extrapolando estos resultados se traduce a un tiempo de vida útil de 17 meses para el aceite sin ningún tipo de protección; 21 meses para el aceite adicionado con TBHQ a 0.02% (p/p) y 0.06% (p/p) de ácido cafeico; 24 meses utilizando tocoferol a 0.5% (p/p) y 28 meses con 2.5% (p/p) de extracto de romero. Se identificaron 16 compuestos volátiles, detectados en mayor concentración el 2,4-decadienal y 1-penteno-3-ol; mientras que el heptaldehído, octaldehído y el nonaldehído en menor. 2-heptenal, 1-penteno-3-ol, 2-decenal, 1-octanal, 2-octenal y 2,4-heptadienal, presentaron un incremento durante el tiempo de almacenamiento; encontrándose correlaciones entre el valor de peróxido y su concentración en el 2-decenal, 1-penteno-3-ol y 2-octanal; compuestos que pueden ser utilizados como indicadores adecuados para medir el avance de la rancidez oxidativa en dicho aceite.

ABSTRACT

The high content of polyunsaturated fatty acids has liver oil *Rhinoptera bonasus*, makes it vulnerable to oxidation; therefore, we evaluated the effect of adding natural antioxidants on the oxidative stability of oil, mainly from eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The concentrations of antioxidants were 0.02% of TBHQ, 0.02, 0.03, 0.06 and 0.1% caffeic acid, 0.02, 1, 2.5 and 5% rosemary extract and 0.02, 0.3, 0.5 and 0.8% of α -tocopherol. The oxidative stability was evaluated by means of an accelerated study by heating at 150 ° C for 3 hours. Only 61.4% of EPA and DHA 53.9% remained in the oil without antioxidants. Of the three antioxidants tested showed that greater protection was rosemary extract when added to 2.5%, where there was no loss of these fatty acids, surpassing the protection of TBHQ. The increase of 5% of rosemary extract reduced its ability to inhibit the oxidation of EPA and DHA. Tocopherol to 0.5% had a higher percentage of EPA and DHA from 83.7 and 84.8% respectively. While the optimal level found for caffeic acid was presented to the concentration of 0.06% with a 86.5 79% EPA and DHA, respectively. The peroxide value determined during the Schaal test in the oil, control oil showed that reached the 8 meq / kg at 17 days; oil TBHQ evaluated as caffeic acid at 21 days, followed by tocopherol at 24 days and finally the oil with rosemary extract that value reached up to 28 days of treatment. Extrapolating these results are translated into a lifetime of 17 months for the oil without any protection, 21 months for the oil with added TBHQ at 0.02% and 0.06% caffeic acid, 24 months using Tocopherol at 0.5% and 28 months with 2.5% rosemary extract. As for the determination of volatile compounds the 2.4-decadienal and 1-penten-3-ol were detected in increased quantities and heptaldehyde, nonylaldehyde octylaldehyde and in lower concentrations. 2-heptenal, 1-penten-3-ol, 2-decenal, 1-octanal, 2-octenal and 2.4-heptadienal were the only ones who showed an increase during storage time, found correlations between the peroxide value and its concentration in the 2-decenal, 1-penten-3-ol and 2-octanal; compounds that can be used as indicators to measure progress of oxidative rancidity in the oil.

INTRODUCCIÓN

El interés hacia los aceites marinos se ha incrementado notablemente, ya que éstos constituyen la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPI ω -3) (O'Sullivan et al., 2005); con un contenido alto de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Dicho aceite se obtiene como subproducto en la elaboración de harina de pescado, o directamente del hígado de algunas especies.

Del año 2005 al 2009, la producción de aceite de pescado presentó un incremento considerable de un 29%, con una producción de 13,596 toneladas en el 2009 (Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca, 2009). Según previsiones se cree que para el año 2012 la producción de aceite supere las 130,000 toneladas (Graciani-Constante, 2006); generando esto una elevada demanda, por lo que se necesitarán materias primas nuevas para su obtención. En México una fuente interesante es el hígado de raya; estudios realizados en rayas del Golfo de México reportaron contenidos de EPA y DHA entre 8-13% (Navarro et al., 2010); nivel similar al reportado en otros aceites reconocidos tradicionalmente por su contenido alto de AGPI, como el tiburón y el bacalao quienes, presentan alrededor de 28-29% y 12-14%, respectivamente (Gunstone, 2004). Según SAGARPA en el año 2009 las estadísticas de pesca a nivel nacional fueron de 7,198 toneladas, desafortunadamente de esta pesquería solo se utiliza su carne y en algunos casos la piel.

Se conoce que los aceites ricos en ω -3 poseen cualidades nutrimentales y farmacológicas, y su ingesta esta relacionada con importantes efectos en la salud (De Leonardis y Macciola, 2003); estudios han demostrado reducir factores de riesgo asociados a enfermedades degenerativas, incluyendo cáncer, desordenes cardiovasculares, y condiciones inflamatorias; razón por la cual, se han hecho esfuerzos para incorporar estos aceites a los productos alimenticios (Let, 2007). Sin embargo, el número alto de insaturaciones que poseen los hace vulnerables a la oxidación; y cuando carecen de una protección adecuada, mediante algún agente antioxidante, son propensos a la autooxidación en contacto con el oxígeno atmosférico (Medina et al., 2008); siendo el desarrollo de la rancidez oxidativa un factor decisivo, que afecta el almacenamiento, la vida útil, la calidad y el uso del producto (Bartee et

al., 2007).

Los antioxidantes son utilizados con la finalidad de disminuir el grado de oxidación, incrementado su estabilidad (Bartee et al., 2007; Merrill et al., 2008). Los principales antioxidantes sintéticos utilizados son el tert-butilhidroquinona (TBHQ), butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), entre otros (DeLeonardis y Macciola, 2003); aunque su uso está restringido por sus probables efectos tóxicos, por lo que actualmente se han tratado de efectuar investigaciones sobre el uso de antioxidantes naturales (Siriwardhana et al., 2004; Moreno-Alvarez, et al., 2007) como el tocoferol, extracto de romero, ácido cafeico, palmitato de ascorbilo, o diversos compuestos fenólicos.

La adición de antioxidantes para aumentar la estabilidad del aceite de raya *Rhinoptera bonasus* no ha sido reportado, por lo cual en el presente trabajo se evaluó la capacidad del tocoferol, romero y ácido cafeico para retardar la oxidación del EPA y DHA, sometiendo al aceite a una temperatura de 150°C; su eficiencia fue comparada con TBHQ.

I. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1. Generalidades de los Aceites

Los lípidos son los principales componentes del tejido adiposo; junto con los carbohidratos y las proteínas constituyen los principales componentes de las células. Básicamente, son compuestos orgánicos de carbono, hidrógeno y oxígeno; se les encuentra en forma líquida o sólida (Fennema, 2000). Bioquímicamente son insolubles en agua, pero se disuelven fácilmente en disolventes orgánicos; además de tener carácter apolar, gracias a la cantidad de átomos de carbono e hidrógeno que se encuentran unidos covalentemente (Belitz et al., 1997).

Los lípidos están constituidos por una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos quienes presentan una cadena hidrocarbonada larga, en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo (Figura 1). Básicamente, los ácidos grasos sirven como almacén de energía (triacilglicéridos), además de ser constituyentes estructurales de las membranas celulares (fosfolípidos de las biocapas) y ser precursores de ciertas sustancias (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) con funciones biológicas importantes como, intervenir en el desarrollo del sistema nervioso, regulación de la presión sanguínea, reacciones inflamatorias, mecanismos de defensa del sistema inmune y la acción de determinadas hormonas (Badui, 2006).

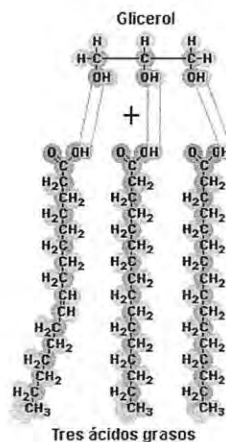


Figura 1. Estructura general del triacilglicérido.

Fuente: <http://www.maph49.galeon.com/biomol2/glycerol.html>

Los ácidos grasos han sido clasificados en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, esto en base a la longitud de la cadena, el número de carbonos y el enlace que presentan (Badui, 2006). Tanto los ácidos grasos saturados como los monoinsaturados son biosintetizados por los organismos, caso que no ocurre con los poliinsaturados; razón por la cual son considerados esenciales, por lo que tienen que ser ingeridos a través de los alimentos o de complementos (Gunstone, 2004).

1.1.1. Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados carecen de enlaces covalentes dobles, en donde la cadena hidrocarbonada se encuentra saturada de hidrógenos. La mayoría son sólidos a temperatura ambiente y son utilizados por el organismo para la construcción de membranas y el envío de señales eléctricas. Se encuentran en las grasas animales, como por ejemplo, manteca, sebo y mantequilla; así como en algunos vegetales, como el chocolate y el coco. La Figura 2 muestra las estructuras de algunos ácidos grasos saturados (Miller et al. 2003).

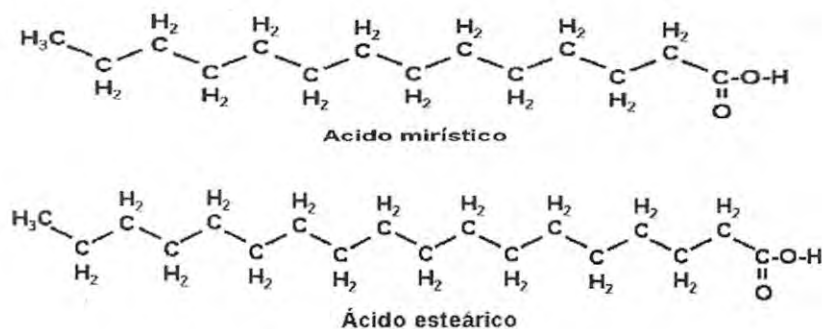


Figura 2. Estructura molecular de un ácido graso saturado.

Fuente: www.uib.es/facultat/ciencias

1.1.2. Ácidos grasos monoinsaturados

*Son aquellos que en su estructura presentan un doble enlace, se encuentran en grandes

cantidades en los alimentos provenientes de las plantas como el aceite de oliva, cacahuete, aguacate y el aceite de canola. La estructura de uno de ellos se presenta en la Figura 3 (Murray et al., 2004).

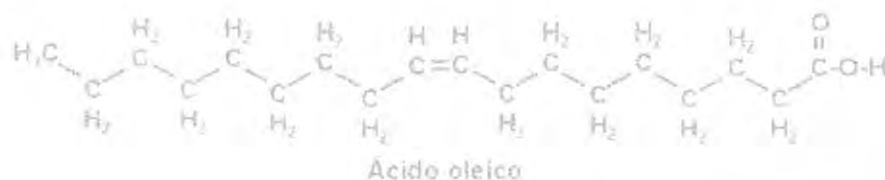


Figura 3. Estructura del ácido oleico.

Fuente: www.uib.es/facultat/ciencias

1.1.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Son ácidos carboxílicos de cadena larga con dos o más dobles enlaces entre los átomos de carbono. Su importancia radica en el mantenimiento de todas las células y en la producción de prostaglandinas, sustancias que regulan muchos procesos corporales, como la inflamación y coagulación de la sangre. Están presentes en algunos aceites de origen vegetal. Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentra al linoléico, linolénico, araquidónico, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). La estructura de algunos de ellos se presenta en la Figura 4 (Murray et al., 2004).

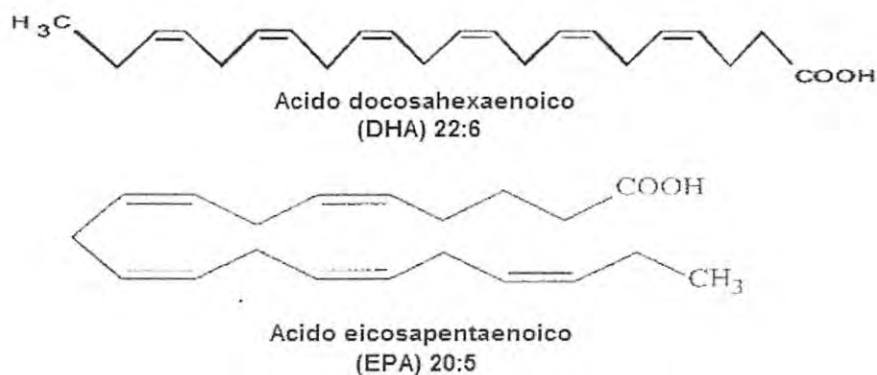


Figura 4. Estructuras de ácidos grasos poliinsaturados.

Fuente: www.scielo.cl

1.1.4. Clasificación de los ácidos grasos poliinsaturados

Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran dos familias importantes: omega-3 (ω -3) y omega 6 (ω -6). Su estructura es de cadena larga y la posición que ocupa en ella el doble enlace da lugar a sus nombres, la que se indica con la letra griega *omega* (última letra del alfabeto griego) y un número que designa en qué enlace, contando desde el grupo metilo terminal de la cadena donde se encuentra la insaturación; es decir, los ω -3 presentan su primera insaturación entre los carbonos 3 y 4, mientras que los ω -6 la presentan entre los carbonos 6 y 7, su estructura se muestra en la Figura 5 (Mahan et al., 2001).

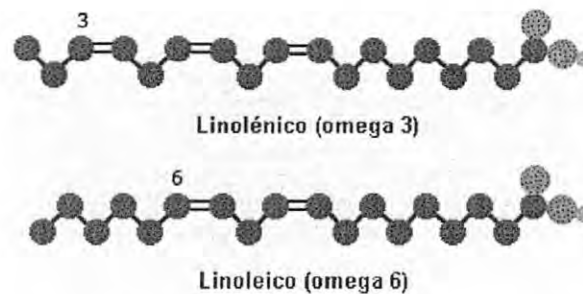


Figura 5. Esquematación de la nomenclatura de los ácidos grasos omega-3 y omega-6.
Fuente: web.educastur.princast.es

1.1.5. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados

A partir del ácido linoléico y linolénico, se generan en los organismos ácidos grasos de cadena mas larga, de la serie ω -3 y ω -6, por medio de procesos enzimáticos (Tres-Oliver, 2009). Los principales ácidos grasos ω -3 son el α -linolénico y sus metabolitos, el EPA y DHA. Mientras que en el caso de los ω -6 el ácido linoléico es precursor del ácido araquidónico (Valenzuela et al., 2001; Morris, 2005).

Durante el proceso de biosíntesis, se llevan a cado una serie de desaturaciones y elongaciones sucesivas, como se muestra en la Figura 6; en donde las desaturaciones agregan un doble enlace a través de la eliminación de hidrógeno, mientras que las elongaciones

agregan dos átomos de carbono; generando de esta forma ácidos de cadena mas larga (Burdge 2005; Belitz et al., 1997). El proceso de desaturación suele ser lento, mientras que el de elongación es rápido. Durante estos procesos tanto el ácido linoléico como el linolénico comparten las mismas enzimas, teniendo este último ácido mayor afinidad con la primera enzima en actuar: la $\Delta 6$ -desaturasa (Valenzuela et al., 2001). Este proceso de conversión se caracteriza por ser limitado y lento en los humanos, en el humano adulto solo el 8% de ácido linolénico se convierte en EPA, mientras que menos del 0.1% da lugar al DHA (Williams y Burdge, 2006; Tres-Oliver, 2009). Además, existen factores que afectan a la tasa de conversión y uno de ellos parece ser una ingesta abundante de ácido linoléico, típica de las dietas vegetarianas (Valenzuela et al., 2001).

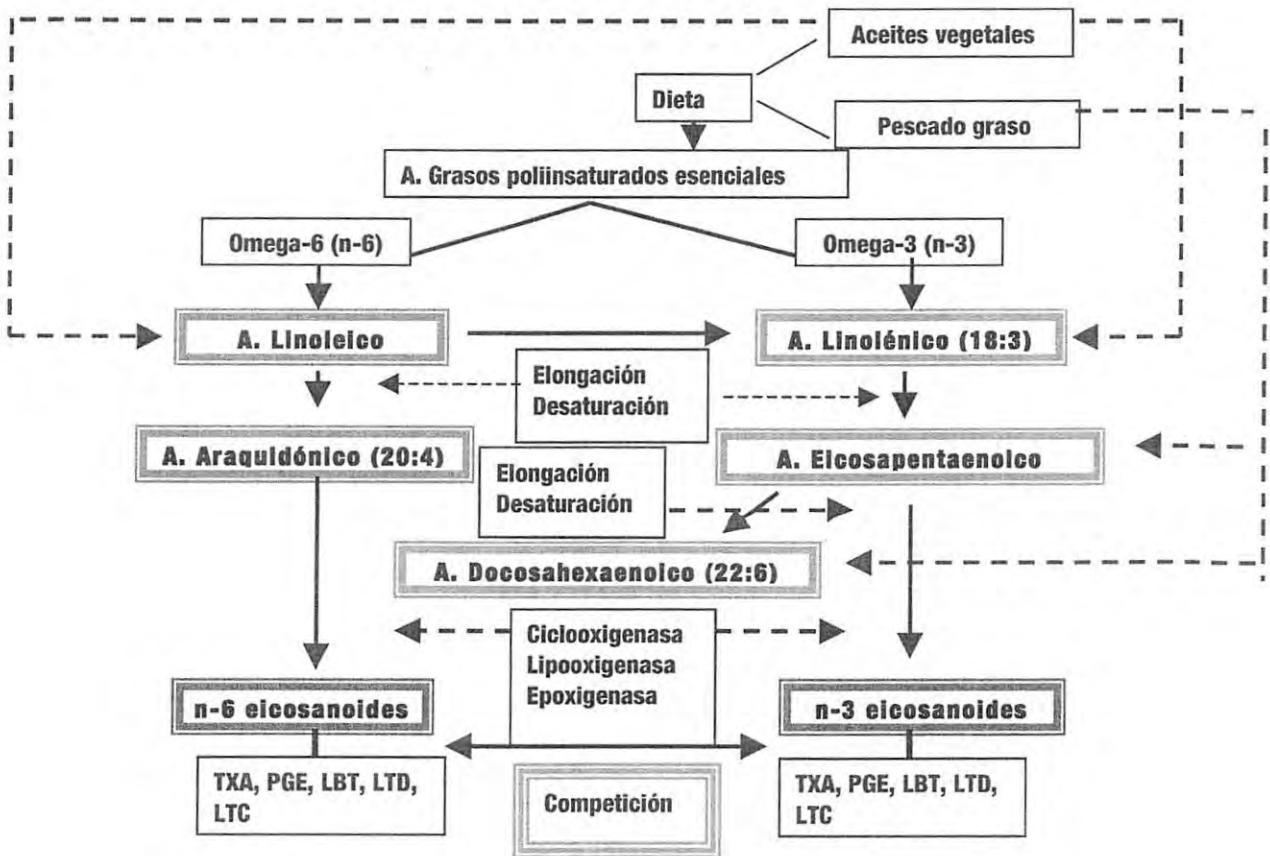


Figura 6. Ejemplificación del proceso de conversión de ácidos grasos omega 3 y omega 6 en sus correspondientes metabolitos.

1.1.6. Beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3

Resulta incuestionable el importante papel que desempeñan los ácidos grasos poliinsaturados ω -3, en especial el ácido eicosapentaenoico y el docosahexaenoico en la nutrición humana (Medina et al., 2003). En base a estudios epidemiológicos y clínicos, se ha señalado que el consumo de éstos ácidos grasos reducen la incidencia de mortalidad coronaria (Frisenfeldt-Horn et al., 2008) y la muerte por arritmias, este efecto se debe en gran medida a que a partir de estos ácidos grasos se producen en el organismo eicosanoides que impiden la formación de trombos en las arterias reduciendo la agregación plaquetaria (Din et al., 2004). Esto implica que las plaquetas que circulan en la sangre no se adhieran unas con otras, previniendo de esta manera la formación de coágulos, además de ser vaso-dilatadores. En general, los ácidos grasos poliinsaturados fluidifican la sangre y protegen contra los ataques cardíacos, apoplejías, derrames cerebrales, angina de pecho (Moon y Shibamoto 2009); a su vez que reducen las concentraciones plasmáticas de triacilglicéridos y colesterol. Esto resulta importante ya que las enfermedades cardiovasculares representan la primera causa de muerte en el mundo y según las previsiones de la Organización Mundial de la Salud, esta situación se agravará en los próximos años en los países en vías de desarrollo (Caballero et al, 2006).

Su ingestión también puede ayudar a mantener el equilibrio mental y tratar la depresión, actualmente están siendo usados en el tratamiento de esquizofrenia (Navarro et al., 2004a). A nivel neuronal, el DHA participa en la neurogénesis, en la migración de las neuronas desde zonas ventriculares a la periferia, en la mielinización y en la sinaptogénesis. Además provee un desarrollo cerebral adecuado en el feto (Frisenfeldt-Horn et al., 2008), ya que el desarrollo del sistema nervioso y en especial del cerebro, ocurre durante los últimos tres meses del embarazo (Valenzuela y Nieto, 2001). Es aquí donde comienza en forma activa la formación de las neuronas y donde el requerimiento de DHA aumenta considerablemente. No está claro aún si el feto en este estado del desarrollo es capaz de formar todo el DHA que requiere este proceso, por lo que se recomienda su ingestión a las mujeres durante su embarazo, ya que la madre traspasa al feto sus reservas de DHA, acumuladas en el hígado y en el tejido adiposo.

También, los ácidos grasos poliinsaturados ω -3, son fundamentales en la formación estructural y funcionamiento visual de los humanos (Siriwardhana et al., 2004; Navarro et al., 2004b), ya que constituyen más del 30% de la estructura de los conos y bastones de la retina, al mismo tiempo que facilita el movimiento de la rodopsina en los fotorreceptores, permitiendo la transformación del estímulo visual en una señal eléctrica (Valenzuela y Nieto, 2001). Están implicados también en la formación de las membranas celulares, debido a su grado alto de poliinsaturación, los cuales le aportan gran fluidez, esencial para que las proteínas de la membrana puedan tener la movilidad que requieren, ya sea en la superficie de las membranas o en el interior de la bicapa lipídica (Valenzuela, 2003b).

Se ha comprobado también que tienen propiedades antiinflamatorias en enfermedades de las articulaciones (Frisenfeldt-Horn et al., 2008), reduciendo los niveles de prostaglandinas, sustancias responsables de algunos de los procesos inflamatorios (Mette et al., 2005).

1.1.7. Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos poliinsaturados

Organizaciones de la salud se han dedicado a orientar a la población a incrementar la ingesta de ω -3; la Organización Mundial de la Salud indica que el total de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 debe de cubrir del 1 al 2% de la energía total diaria; mientras que otras asociaciones, como la Asociación Americana de la Salud y el Comité Científico de Nutrición recomiendan la ingesta de pescado, por lo menos dos veces a la semana (Pazos et al., 2008).

En la deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 se presenta retardo de crecimiento, lesiones cutáneas, deficiencias en la reproducción, hígado graso y polidipsia; mientras que la deficiencia de ω -3 retarda el crecimiento y la reproducción, pero se relaciona con una disminución en el aprendizaje, alteraciones de la visión y polidipsia (Mahan et al., 2001); además se han acumulado pruebas que relacionan esta deficiencia con el trastorno de déficit de atención e hiperactividad.

1.2. Oxidación de los Aceites

Si bien, el número alto de insaturaciones que poseen los aceites de pescado les confieren sus importantes beneficios, estas a su vez los hacen vulnerables a la oxidación; siendo una de las causas principales que limita la vida útil de muchos productos (Steele, 2004; Medina et al., 2008), ocasionando problemas en la industria alimenticia debido a la generación de sabores y olores indeseables, lo cual deteriora su calidad organoléptica (Fennema, 2000). Además se generan productos de degradación química, como radicales libres, peróxidos, hidroperóxidos, aldehídos y cetonas, los cuales reaccionan con otros ingredientes dietéticos, como vitaminas, proteínas y otros lípidos, provocando con esto una disminución de su valor y disponibilidad biológica durante la digestión, siendo perjudiciales para la salud humana (Navarro et al., 2004b). El proceso de oxidación presenta una etapa inicial conocida como período de inducción donde se presenta una formación lenta de hidroperóxidos (Steele, 2004). No todos los aceites presentan la misma susceptibilidad a la oxidación, por una parte, su deterioro depende del tipo de aceite; siendo los de origen marino más susceptibles que los vegetales (Steele, 2004). Los factores que promueven la oxidación es la presencia de ácidos grasos libres, oxígeno, temperatura, el área superficial y la composición de ácidos grasos, ya que entre mayor es su concentración, la oxidación se presenta con mayor rapidez (Jiménez-Alvarez et al., 2008).

Se conocen dos mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo este proceso: rancidez hidrolítica y rancidez oxidativa.

Rancidez hidrolítica (lipólisis): esta reacción está catalizada por enzimas lipolíticas, en este proceso el triacilglicérido reacciona con el agua en presencia de lipasas y calor (Figura 7). Por cada molécula de agua, se libera una molécula de ácido graso; es decir, si la grasa reacciona con tres moléculas de agua se obtiene una molécula de glicerol más tres ácidos grasos libres (Madhavi et al., 1995).

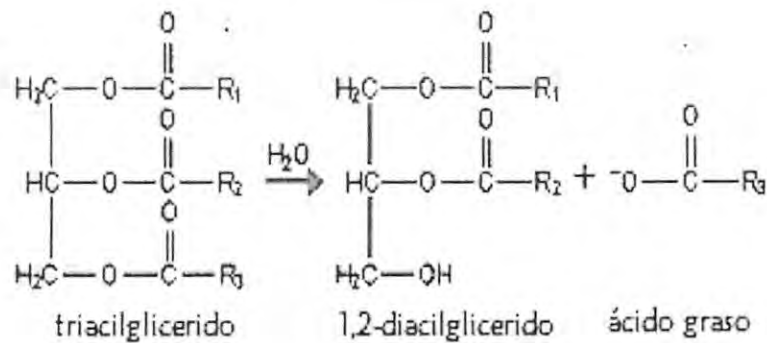


Figura 7. Reacción de la rancidez hidrolítica de un triacilglicérido.

Rancidez oxidativa (autooxidación): es uno de los mecanismos más comunes, se basa en la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos. A medida que se incrementa la concentración de ácidos grasos insaturados, la autooxidación se ve favorecida. Este mecanismo se da por la presencia de radicales libres provocando una reacción en cadena, la cual se divide en tres pasos: iniciación, propagación y terminación (Madhavi et al., 1995).

Iniciación: el proceso inicia con la formación de radicales libres (R^{\bullet}), lo cual ocurre cuando un ácido graso insaturado tiene contacto con el oxígeno, que oxida directamente al grupo metilo del ácido graso. El radical libre ataca al grupo metileno de otro ácido graso quitándole un átomo de hidrógeno, formando de esta manera un nuevo radical libre. Los compuestos formados en esta etapa no poseen sabor ni olor, por lo que no generan cambios en cuanto al sabor, pero reaccionan rápidamente debido a su inestabilidad; dando lugar a la fase de propagación.

Propagación: a partir de los radicales libres formados en la primera etapa se presenta una serie de reacciones en cadenas, generando nuevos radicales libres. Estos radicales captan un electrón del oxígeno formando radicales peróxilo (ROO^{\bullet}), los cuales pueden reaccionar con otros ácidos grasos formando hidroperóxidos ($ROOH$) y un nuevo radical libre (R^{\bullet}).

Terminación: finalmente en la última etapa los radicales libres pueden reaccionar entre sí, formando dímeros (RR), hidroperóxidos ($ROOH$) y peróxilos ($ROOR$) llegando de esta forma a un término, como se esquematiza en la Figura 8. La ruptura de los peróxidos da lugar a la formación de aldehídos y cetonas, responsables del olor rancio de los aceites (Laguerre et al., 2007).

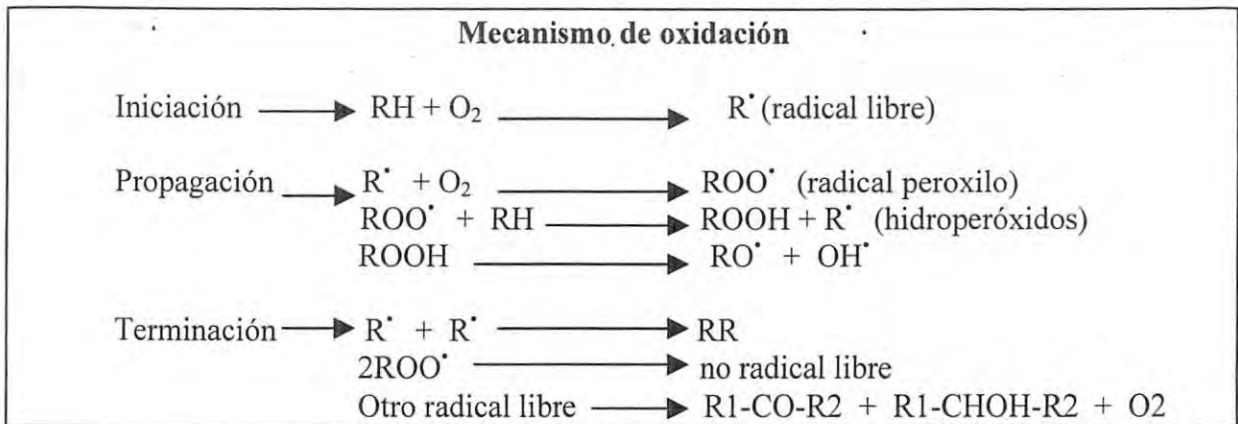


Figura 8. Esquema del proceso de la rancidez oxidativa de un ácido graso.
Fuente: Frankel, 1980.

1.2.1. Evaluación de la rancidez oxidativa en los lípidos

A raíz de que la aceptabilidad y calidad nutricional de los productos alimenticios van de la mano con su descomposición oxidativa y es importante conocer su tiempo de vida útil; por lo que se han desarrollado métodos para determinar el grado de oxidación utilizando pruebas aceleradas bajo condiciones adversas, lo cual permite comparar la estabilidad de diversos aceites y determinar el tipo y la concentración adecuada de antioxidante; donde el período de inducción se considera una medida de la resistencia del aceite a la autooxidación.

Existen diversas pruebas utilizadas para determinar la estabilidad de un aceite y comparar la eficacia de un antioxidante. Aunque cada método posee ventajas y desventajas, todos son utilizados con la misma finalidad (O'Brien, 2003).

Método de Schaal: este método fue desarrollado por ciertas industrias para evaluar la estabilidad de muestras en tiempos cortos. Las muestras se almacenan a una temperatura de 62±2 °C en un recipiente abierto que permita el contacto con el oxígeno atmosférico hasta su enranciamiento; periódicamente se evalúa su sabor o se le determina el valor de peróxido observando su evolución a través del tiempo. La estabilidad es medida como el número de días antes de que la rancidez sea detectada, utilizando el valor de peróxido. Su ventaja es que

se requiere poco equipo de laboratorio. Se ha encontrado una buena relación con el método de oxígeno activo (Khan y Shahidi, 2001; Allen, 1999).

Método del oxígeno activo: este método ha sido utilizado ampliamente para estimar la estabilidad oxidativa. Según el método de la AOCS (Cd-12-57) se basa en mediciones periódicas del valor de peróxido de una muestra calentada a 97.8 °C con bombeo de aire continuo. La estabilidad es expresada como el tiempo requerido para que el valor de peróxido alcance los 100 meq/kg de aceite. La desventaja es que se requiere sumo cuidado para poder obtener resultados reproducibles, ya que es un método empírico.

Bomba de oxígeno: la industria del petróleo ha utilizado este método durante muchos años para determinar la resistencia de la gasolina a la oxidación y ha sido adaptado para evaluar la estabilidad oxidativa de grasas y aceites. Se determina la velocidad con la que la muestra absorbe oxígeno, la cual se dispersa en un filtro a una presión de oxígeno de 50 psi. La bomba se coloca en agua caliente y se mide el tiempo necesario para reducir la presión a 2 psi. Se obtiene una curva de presión de oxígeno contra tiempo, donde el tiempo en el que ocurre una baja de presión repentina es tomado como una medida de la estabilidad oxidativa de la muestra. Este método ofrece algunas ventajas sobre el método del oxígeno activo ya que es 1.5 veces más rápido, posee mayor reproducibilidad de resultados, y aunque requiere menos tiempo su desventaja es que solo puede analizarse una muestra a la vez (Cubero, 2002).

Absorción de oxígeno: se determina el tiempo necesario para absorber una determinada cantidad de oxígeno en condiciones específicas de oxidación (Allen, 1999).

Método Rancimat (AOCS, Cd 12b-92): actualmente es uno de los más utilizados. Este método consiste en burbujear aire a 20 Lh⁻¹ en la muestra a una temperatura de 100°C, midiendo el tiempo de inducción en horas (De Leonardis y Macciola, 2003). Determina los productos volátiles de degradación por medio de conductimetría. Los componentes volátiles son atrapados en agua destilada, lo que provoca que se presente una variación en la conductividad eléctrica. El tiempo de conductividad se determina gráficamente. Su ventaja radica en el equipo automatizado que se utiliza, requiriendo menor tiempo y atención; siendo más preciso

y reproducible. Se ha encontrado una buena relación con el método del oxígeno activo (Widlak, 2000).

Por otra parte, los productos secundarios de oxidación (aldehidos, cetonas, ester de acidos grasos) tienen una naturaleza volátil, los cuales le confieren el sabor rancio y olor indeseable a los aceites. (Olsen et al., 2005). En los últimos años se han reportado diversas investigaciones acerca de la determinación de estos compuestos (Morales, 1997); Dentro de las técnicas empleadas, se encuentran la destilación/extracción simultanea (Le Guen et al 2000), espacio de cabeza estático y dinámico (Girard y Naki, 1993). La micro extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) acoplada a la cromatografía de gases ha sido altamente útil para la determinación de estos compuestos; es un método sencillo y rápido en comparación a los métodos que implican extracción con disolventes o destilación. Una fibra recubierta con una fase sólida se inserta en un recipiente sellado, por lo general un vial de vidrio. Los compuestos volátiles en el espacio son adsorbidos en la fase sólida de la fibra, para posteriormente ser desorbidos en un cromatógrafo de gases para su identificación. Este análisis está influenciado por varios factores, uno de ellos es la fibra, ya que de ella depende que los volátiles sean adsorbidos. Es importante también el volumen de la muestra, el cual debe ser suficiente para que los volátiles se generen en suficiente cantidad; es importante tener en cuenta la agitación de la muestra, ya que ella aumenta la tasa de difusión de compuestos en el espacio libre; así como la temperatura de extracción; ya que un incremento resulta en un aumento de la cantidad de compuestos volátiles que se extraen; sin embargo podría alterar la muestra (Guadayon et al., 1997).

1.3. Antioxidantes

Una medida eficaz para controlar el proceso oxidativo es la inactivación de los radicales libres mediante la adición de antioxidantes, los cuales pueden ser de origen sintético o natural. Son considerados aditivos, ya que se adicionan intencionalmente para favorecer su conservación y no para cambiar su valor nutricional. Actúan interceptando al oxígeno, previniendo la formación de radicales libres, secuestrando metales y degradando productos de oxidación primarios (Carreras-Ferrer, 2004).

Por lo tanto, un antioxidante es aquella sustancia capaz de retardar el proceso de oxidación de algún producto propenso al deterioro oxidativo (Carelli et al., 2005), evitando la formación de olores, sabores desagradables y otros compuestos perjudiciales, ya que poseen la habilidad de detener la reacción en cadena de los radicales libres, cediéndoles electrones, lo cual detiene eficazmente el ciclo dañino. Según la FDA (Food and Drug Administration) los antioxidantes son aquellas sustancias que pueden ser aplicadas a los alimentos con el objetivo de preservarlos al retardar la deterioración, rancidez o decoloración debidas a la oxidación. Por lo tanto, debe ser capaz de generar un radical libre, más estable y menos dañino después de reaccionar con un radical, donde ocurre una donación de un electrón al radical, dando por resultado un radical proveniente del antioxidante que puede ser inerte, estable o presentar cierta reactividad (Figura 9). Se estima que la vida útil de muchos productos alimenticios aumenta entre un 15 hasta 200% con el uso de antioxidantes (Moon y Shibamoto, 2009).

1.3.1. Antioxidantes Sintéticos

A pesar de su frecuente uso (Lilon et al., 2008) han sido fuertemente cuestionados, debido a sus posibles efectos tóxicos y carcinogénicos (Bera et al., 2006); estudios en animales experimentales desarrollaron lesiones estomacales, hemorragias y tumores carcinogénicos con su administración; por lo que su empleo y dosis están estrictamente regulados e incluso restringidos en algunos países (Azizkhani y Zandi, 2009; Dudonne et al., 2009). En los Estados Unidos su uso está sujeto a la regulación por la FDA; y por la norma oficial NMX-F-252 SCFI-2005 en México.

Son utilizados en diversos productos como alimentos, fármacos y cosméticos, siendo relativamente seguros, se caracterizan por poseer una actividad alta, eficiencia y estabilidad a dosis bajas. Los más utilizados son el BHT, BHA y TBHQ, su estructura se muestra en la Figura 10 (Siriwardhana et al., 2004; DeLeonardis y Macciola, 2003); el BHT y BHA son inadecuados en aceites marinos altamente insaturados; mientras que el TBHQ tiene una capacidad antioxidante excelente en aceites crudos (Anwar et al., 2006).

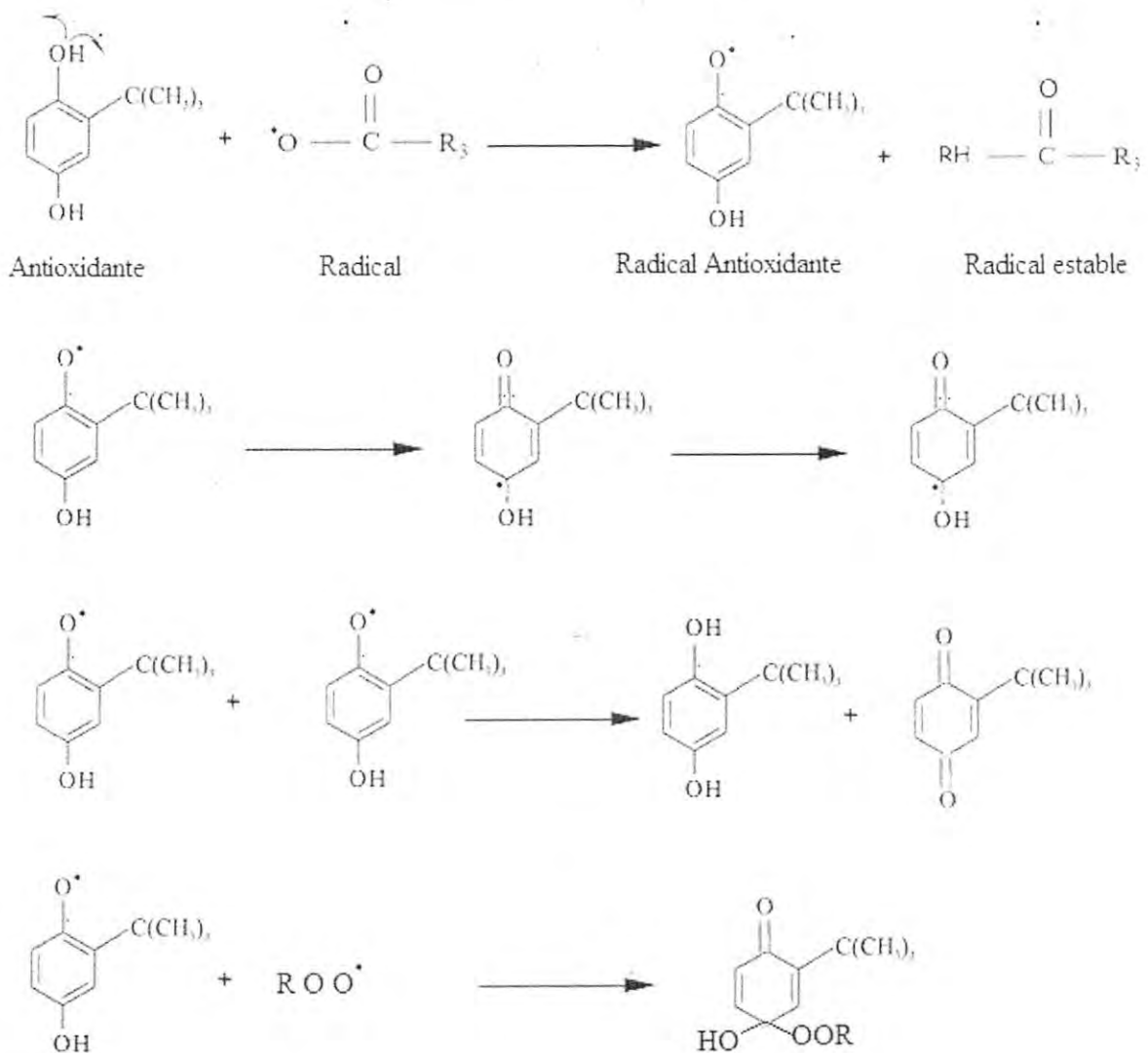


Figura 9. Mecanismo de acción de los antioxidantes sobre el radical libre.
Fuente: Leopoldini, 2011.

Terbutilhidroquinona (TBHQ): es el más eficaz y potente de los antioxidantes ordinarios como protector de aceites poliinsaturados, contra la autooxidación y no plantea problemas de coloración o de cambios de sabor. Es sólido de color blanco, cristalino moderadamente soluble en grasas e insoluble en agua.

Butilhidroxitolueno (BHT): su estructura química es similar al BHA. Es sólido, de color blanco, cristalino, sin olor ni sabor, soluble en tolueno y en disolventes orgánicos;

prácticamente insoluble en agua. Presenta mayor solubilidad en grasas que el BHA e igual poder antioxidante. Su aplicación es más efectiva en grasas animales que en aceites de origen vegetal; presenta una actividad débil si no se combina con otros antioxidantes (Lusas, 2001). Su acción antioxidante consiste en la donación de un átomo de hidrógeno a un radical peroxi o alcohoxi, interfiriendo con la peroxidación lipídica. (Concha-Moya y Vivanco-Lovazzano, 2006)

Butilhidroanisol (BHA): está conformado por una mezcla de dos isómeros 3-ter-butil-4-hidroxianisol y 2-ter-butil-4-hidroxianisol. Es insoluble en agua, pero soluble en éter de petróleo; alcohol. A determinadas concentraciones es soluble en grasas y aceites. A temperaturas elevadas el BHA presenta un ligero olor fenólico. Posee una eficiencia alta y estabilidad frente a los cambios de pH. Es efectivo en el control de los ácidos grasos de cadena corta.

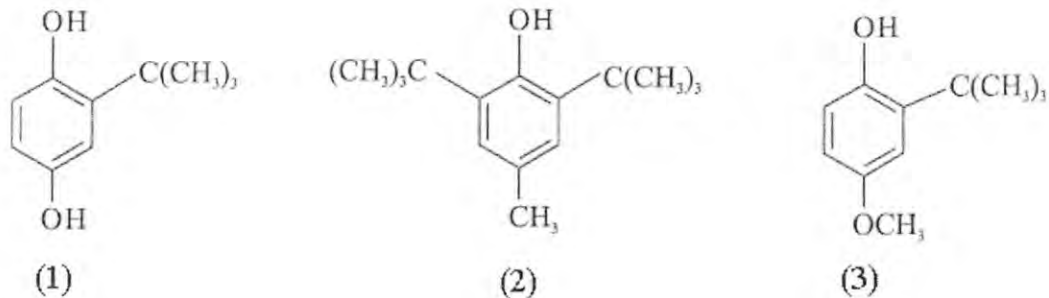


Figura 10. Estructura química de antioxidantes sintéticos. (1) TBHQ; (2) BHT; (3) BHA. Fuente: sigma-aldrich.com/supelco

1.3.2. Antioxidantes naturales

La preocupación por la toxicidad de los antioxidantes sintéticos ha generado la búsqueda de compuestos naturales con propiedades antioxidantes, nutrimentales y terapéuticas, con la finalidad de sustituirlos. Ante esta situación, una gran cantidad de trabajos de investigación se han realizado con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de compuestos fitoquímicos (Gamez-Meza et al., 1999; Baydar, 2007; Moreno-Alvarez 2007;

Farag, 2007; Gámez-Meza et al., 2009). Estos fitoquímicos han resultado sustancias antioxidantes naturales más seguras y deseables. Se han encontrado productos de origen vegetal como especias, semillas oleaginosas, pulpa y cáscara de cítricos, cáscara de coco, avena, soja, hidrolizado de productos vegetales, proteínas microbianas y de origen animal; los cuales poseen compuestos con actividad antioxidante, como flavonoides (quercetina, rutina), ácidos orgánicos (derivados del ácido cinámico) ácido gálico, *trans*-resveratrol, cumarinas, entre otros; los cuales están siendo ampliamente utilizados en la industria alimenticia; aunque para su empleo deben de cumplir ciertas exigencias, entre ellas la de superar las pruebas de inocuidad (González-Aguilar et al., 2005). Estos compuestos presentan en su estructura química un anillo aromático insaturado, gracias a lo cual se catalogan dentro del grupo químico de los compuestos fenólicos (Moon y Shibamoto, 2009). La presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático del fenol es necesaria para que estos compuestos presenten actividad antioxidante. Dichos compuestos son capaces de frenar el proceso oxidativo al intervenir en el proceso de propagación estabilizando un radical libre de un ácido graso al donar una molécula de hidrógeno, la cual es más reactiva, formando de esta forma un producto más estable (Baydar, 2007; Valenzuela et al., 2003b).

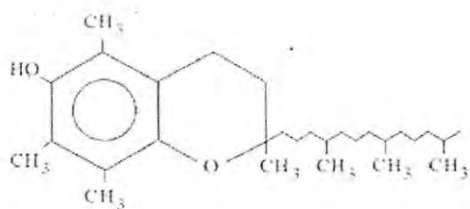
Actualmente la tendencia en la industria alimenticia es disminuir el uso de antioxidantes sintéticos y aumentar los naturales, dentro de los más utilizados en la prevención del proceso oxidativo se encuentra al tocoferol, ácido cafeico y extracto de romero, cuya estructura se observa en la Figura 11 (Azizkhani y Zandi, 2009; Siriwardhana et al., 2004; Riziner-Hrasi et al., 2000).

Tocoferoles: son los antioxidantes más distribuidos en la naturaleza y los más importantes encontrados de manera natural en los aceites vegetales (Gokturk-Baydar et al., 2007). Existen cuatro homólogos, alfa, beta, gama, delta, algunos autores han señalado el orden de actividad antioxidante como $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ (Sayago et al., 2007; Kulas y Ackman 2001); esta su actividad está influenciada por su concentración, temperatura y luz, entre otros factores (Nawar, 1993). Su máxima actividad antioxidante se presenta a niveles relativamente bajos, resultando inofensivos para la salud humana (Martinez et al., 1995). Pueden actuar de dos formas; ya sea capturando el oxígeno o bien inhibiendo la reacción de auto-oxidación

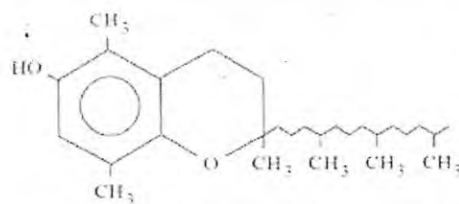
estabilizando los radicales libres (Ranken, 1993; Sayazo et al., 2007). Se comercializan como concentrados de tocoferoles, su aspecto es viscoso, de color rojo e inodoro, insoluble en agua y soluble en alcohol, disolventes orgánicos y aceites; no son volátiles como el BHA y el BHT, no alteran el sabor del alimento como en el caso del TBHQ y no producen coloraciones. El tocoferol, a concentraciones de 0,02% es más efectivo que el BHA y el BHT. En un ensayo realizado con mezcla de tocoferoles éste resultó tan eficaz como el TBHQ y superior al BHT (Torres-Faran, 2004).

Extracto de romero: se ha demostrado que el poder antioxidante de los extractos de algunas plantas pueden ser usados para retardar o prevenir la oxidación lipídica en una gran variedad de productos (Bhale, 2007). El romero es una planta aromática con evidencia de uso como planta medicinal, culinaria y en la industria cosmética. Su extracto es conocido por presentar una actividad antioxidante alta (Gámez-Meza et al., 2009), con propiedades antibacteriales y antiinflamatorias; debido a la presencia de importantes compuestos fenólicos encargados de prevenir la degradación de lípidos en ciertos productos (Stefanovits-Banyai et al., 2003). En 1999 Frankel reportó al carnosol, ácido carnosico, rosmanol, epirosmanol e isorosmanol como los compuestos fenólicos responsables de su actividad antioxidante (Ramalho, 2008; Bhale, 2007).

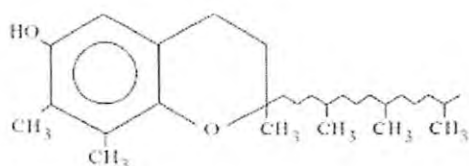
Ácido cafeico: es un ácido no nitrogenado encontrado en varias plantas. Posee dos grupos hidroxilos. Es un compuesto fenólico, el cual actúa como un inhibidor cancerígeno. *In vitro* es conocido por su actividad antioxidante. Es conocido por ser un compuesto fenólico muy común en plantas y puede encontrarse en semillas, frutas, tubérculos y herbáceas. El poder antioxidante y otras importantes propiedades biológicas del ácido cafeico están científicamente sustentadas (DeLeonardis y Macciola, 2003).



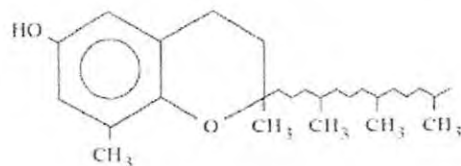
alfa tocoferol



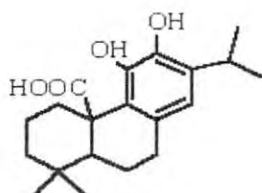
beta tocoferol



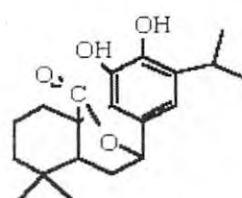
gama tocoferol



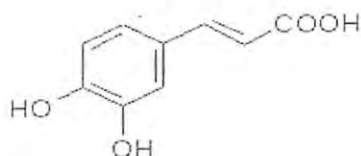
delta tocoferol



ácido carnosico



carnosol



ácido cafeico

Figura 11. Estructura química de antioxidantes naturales.
Fuente: Leopoldini, 2011; Pita-Rodríguez, 1997.

1.3.3. Reglamento del uso de antioxidantes

El uso de los antioxidantes como aditivos en los EE.UU. está estrictamente sometido a los reglamentos establecidos por la FDA (Food and Drug Administration). En los sintéticos su concentración total autorizada no debe exceder el 0.02% del peso fresco ya sea individual o en combinaciones. Mientras que los antioxidantes naturales carecen de concentraciones límites;

sin embargo, el tocoferol por ejemplo, en algunos alimentos no es permitido su uso por encima de determinadas concentraciones: 0.0002% en productos lácteos, 0.002% en alimentos infantiles, 0.03% en crustáceos y 0.05% en especias, hierbas y productos aromatizantes (O'Brien, 2003). Generalmente los niveles estipulados son adecuados para brindar una buena estabilidad; sin embargo, entre otros factores, su efectividad varía en función de la cantidad que se utilice, ya que tanto un exceso como una deficiencia generan problemas de estabilidad (Pazos et al., 2006).

1.3.4. Elección del antioxidante

El empleo de los antioxidantes es variado; sin embargo, antes de usarlos, se deben considerar algunos factores que influyen en forma determinante en su eficiencia (Bartee, 2007). Esta eficiencia está relacionada con numerosos factores, importantes a tener en cuenta en su elección: potencia, propiedades de solubilidad y volatilidad, facilidad de incorporación al producto, concentración adecuada, resistencia a los tratamientos, sensibilidad al pH, tendencia a producir coloraciones o aromas extraños, adición fuera de tiempo, disponibilidad, costo y por supuesto que sea seguro su uso. Esto se complica aun más por las dificultades de predecir el funcionamiento del antioxidante en presencia de prooxidantes y antioxidantes que el mismo producto contiene; se asume que con su uso se obtendrá un beneficio, lo cual no siempre ocurre y el daño oxidativo puede aumentar, por lo tanto la adición de antioxidantes debe realizarse después de una previa evaluación (Carreras-Ferrer, 2004). Su adición puede realizarse directamente a los aceites inmediatamente de su extracción, pero en gran parte depende del producto o de la función que se espera de él; en algunos casos se obtienen mejores resultados si el antioxidante se añade con un diluyente volátil. También pueden aplicarse en forma de aerosoles, baños en disoluciones o suspensiones.

1.4. Fuente de Ácidos Grasos Omega 3

Hasta el presente, los aceites de pescado constituyen la mejor fuente de ácidos grasos poliinsaturados ω -3, en particular EPA y DHA (Le Néchet1 et al., 2007; Let at al., 2007); por

lo cual, la incorporación de éste aceite como parte de una dieta normal ofrece una oportunidad de incrementar su ingesta (Fomuso et al., 2002; Jiménez-Alvarez et al., 2008). Dicho aceite se obtiene como subproducto en la elaboración de harina de pescado, como es el caso de la sardina, la anchoveta o el menhaden, por mencionar algunos; o bien, directamente del hígado de algunas especies como el tiburón y el bacalao (Navarro y col., 2004), quienes presentan aproximadamente 28-29% y 12-14% de aceite, respectivamente (Gunstone, 2004).

Todas estas fuentes de aceite de pescado, son consideradas recursos biológicos importantes desde el punto de vista ecológico, pesquero, alimenticio, turístico y económico; ya que la mayor parte está destinada al consumo humano directo y con mayor intensidad, los subproductos de su procesamiento industrial se utilizan para la obtención de una serie de derivados de gran importancia y valor económico, como las harinas, productos farmacéuticos, pieles y aceites (NOM, 2004).

Aproximadamente el 25 % de las 106 millones de toneladas de peces silvestres que anualmente se capturan se considera pez forraje (FAO 2007) utilizado para la elaboración de harina y aceite de pescado (Alder & Pauly, 2006). Del año 2005 al 2009 la producción de aceite de pescado a nivel nacional presentó un incremento considerable del 29 %. En el 2009 su producción fue de 13,596 toneladas, siendo el estado de Sonora el de mayor aporte con un 76 % seguido por Sinaloa con un 9.3% (Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca, 2009). Este aceite posee diversas aplicaciones, utilizándose principalmente en piensos para peces de criadero, en la industria alimenticia, en la elaboración de cápsulas de ω -3 como suplementos, así como para fines de investigación científica.

Se estima que la producción mundial entre 2006 y 2012 (Figura 12) alcance las 130,794 toneladas, donde el 18.4% será de origen animal y el resto vegetal (Graciani-Constante, 2006). En el campo de la acuicultura se estima un incremento de un 16 al 55%, al igual que en el campo farmacéutico (0.4 a 2%) (Gunstone, 2004); generando una elevada demanda en el mercado, por lo que se necesitarán nuevas materias primas para su obtención. En México una fuente interesante es el hígado de la raya, donde estudios realizados en especies del Golfo de California (Navarro-García et al., 2004), mostraron que el hígado representa entre 5-11 % del peso del organismo, con un contenido de grasa que alcanza el 50 % de su peso, con un

porcentaje de EPA más DHA de 16 a 18% de los ácidos grasos presentes, nivel similar al encontrado en otros aceites de pescado reconocidos por un alto aporte de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Según la SAGARPA en el año 2009 las estadísticas de pesca a nivel Nacional fueron de 7,198 toneladas, siendo el estado de Baja California Sur con 1,504 toneladas, el de mayor volumen aportado de estos ejemplares; seguido por Sonora con 1113 toneladas, Campeche 1017 toneladas, para Tabasco 814 toneladas y por último Sinaloa con 747 toneladas, como se muestra en la Figura 13. De esta pesquería solo se utiliza su carne reportándose en algunos casos el empleo de la piel. Al extraer los filetes, el hígado, importante fuente de aceite, es desechado. Es por eso, que con el fin de aprovechar de forma eficiente el hígado de raya, es necesaria la obtención de información básica, teniendo en cuenta la variabilidad respecto a la composición lipídica de los organismos en general, en función de la talla, sexo, desarrollo embrionario, área geográfica y época del año (Nichols, 1998; Boran, 2006).



Figura 12. Previsiones de producción mundial de aceite; 2006 – 2012.
Fuente: Graciani-Constante, 2006.

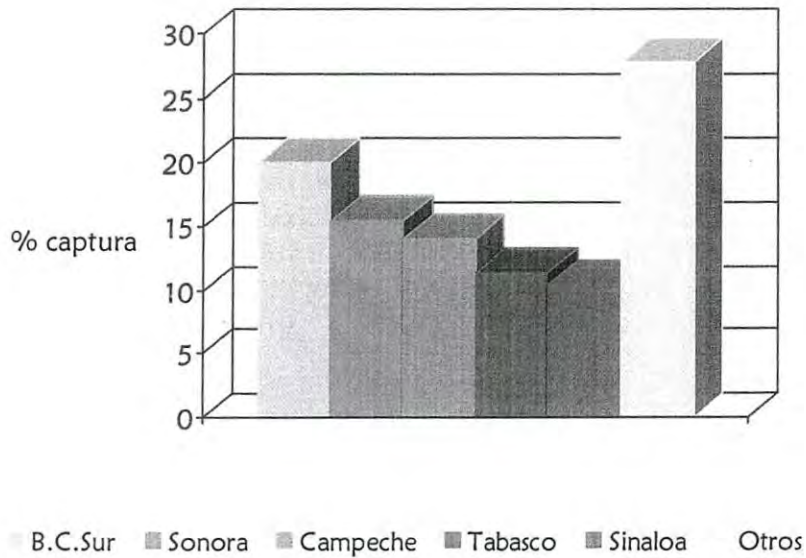


Figura 13. Estadísticas de captura de rayas a nivel Nacional 2009.
Fuente: Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2009.

Desafortunadamente, la literatura disponible sobre investigaciones realizadas en aceite de hígado de raya en México (Navarro et al, 2004a) y a nivel internacional es limitada (Val Ould-El Kebir et al., 2003). Por lo cual, resulta fundamental para la producción de aceite crudo de hígado de raya la investigación del control del proceso de oxidación que tiene lugar durante su almacenamiento buscando, con la adición de antioxidantes naturales o sintéticos, su protección frente a este proceso, ya que en gran medida define la calidad del producto.

2. HIPÓTESIS

Los antioxidantes naturales pueden ofrecerle al aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus*, un nivel similar de protección a la oxidación que el que se obtiene con los productos sintéticos tradicionalmente utilizados en la industria de los aceites comestibles.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de la inclusión de antioxidantes naturales sobre el deterioro oxidativo del aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus*, con la finalidad de alargar su vida útil y llegar a sustituir el uso de antioxidantes sintéticos.

3.2. Objetivos Particulares

- Evaluar la estabilidad del aceite con los antioxidantes naturales mediante un estudio de almacenamiento acelerado.
- Seleccionar la concentración de antioxidante que brinde una mayor protección al ácido eicosapentaenoico (EPA) y del ácido docosahexaenoico (DHA) del aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus*.
- Identificar los compuestos volátiles generados durante el almacenamiento acelerado y determinar que compuestos pueden utilizarse como marcadores para monitorear el proceso de oxidación.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Extracción del Aceite

Para este estudio se utilizaron hígados de raya *Rhinoptera bonasus* capturadas durante la pesca comercial en la costa de Ceybaplaya, en el estado de Campeche.

A los organismos recién capturados, se les extrajo el hígado, los cuales fueron etiquetados y colocados en bolsas de polietileno y puestas en congelación -20°C. Las muestras congeladas fueron enviadas vía terrestre en camiones para transporte de productos congelados al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), donde se mantuvieron en congelación a -25°C hasta su análisis.

Los hígados de cada espécimen fueron descongelados, pesados, cortados y homogeneizados por 2 minutos, usando una cortadora/mezcladora (14-507-7M, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Inmediatamente el hígado homogeneizado fue sujeto a la extracción de los lípidos, calentándolos a 45 ± 1 °C por 1 h, según el procedimiento descrito por Kang et al., (1998). Posteriormente, el aceite se separó de la fase proteína-agua por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga de laboratorio C-600 de la marca Sol-Bat.

4.2. Descripción Experimental

Se tomó el aceite extraído de cada uno de los hígados de *Rhinoptera bonasus* y fueron colocados en recipientes de polietileno con atmósfera de nitrógeno y recubiertos con papel aluminio, para formar la muestra a partir de la cual se realizó el estudio. Primeramente se hizo una caracterización del aceite recién extraído: perfil de ácidos grasos, contenido de tocoferoles y peróxidos; mientras que el resto se mantuvo a -55°C hasta su posterior análisis.

4.3. Caracterización del Aceite

4.3.1. Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron derivatizados a sus ésteres metílicos correspondientes empleando $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ 7% (Ce 2-66; AOCS, 2009). La identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) se obtuvieron por cromatografía gaseosa capilar en un cromatógrafo de gases (Varian Inc., Walnut Creek, CA) modelo CP-3800; equipado con un detector de ionización de flama y helio como gas acarreador; provisto de una columna capilar CP-Sil 88 (50mX0.25mm DI; Varian). Las temperaturas del inyector y del detector fué de 250 y 270°C, respectivamente. El programa de temperatura inicial fue a 195°C incrementándose 5°C/min. hasta 240°C manteniéndose por 3 min. Los componentes individuales se identificaron comparando el tiempo de retención con los de una mezcla estándar de EMAG (Supelco-Sigma, Aldrich Química, México). Se utilizó el ácido tricosanoico (C23:0) como estándar interno (Nuchek Prep, Inc. N-23-M).

4.3.2. Tocoferoles

La determinación de tocoferoles fue realizada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) (Medina-Juárez et al., 2000). Se utilizó un cromatógrafo Varian (Walnut Creek, CA) modelo 9050, equipado con un detector de luz ultravioleta (Varian modelo 3400) y una columna Lychrosorb Si 60 (25 cm. X 4 mm., 5 μm . Supelco-Sigma, Aldrich Química, México). La fase móvil utilizada fue una mezcla de hexano/isopropanol, 99.5: 0.5 (v/v) previamente filtrada (0.45 μm), con un flujo de 1.7 mL/min. La longitud de onda empleada fue de 292 nm. 2 g de aceite se diluyeron en 25 mL de hexano y fueron filtrados al vacío usando un filtro de 0.45 μm . Se inyectaron 100 μL directamente al HPLC. Los picos cromatográficos fueron identificados y cuantificados por comparación con los tiempos de retención y las áreas de los estándares de α -tocoferol, β -tocoferol y γ -tocoferol (Sigma, Aldrich Química, México).

4.3.3. Valor de Peróxido (VP)

Durante la primera etapa de la oxidación se forman los peróxidos y su determinación es utilizada para monitorear dicho proceso; y en base a esto es posible determinar el período de inducción, período en el cual se da un drástico aumento de los peróxidos; y sirve para determinar la aceptabilidad del aceite. El valor máximo de peróxidos varía de acuerdo al criterio de diferentes autores; desde el punto de vista sensorial algunos investigadores (Robards et al, 1988; Schnepf et al, 1991) consideran inaceptable los aceites comestibles cuando alcanzan un valor de 7.5 meqO₂/Kg; 7-8 meqO₂/ Kg en aceites crudos (Huss, 1988); 10 meqO₂/Kg de aceite; otros autores definen como valor máximo 8 meqO₂/Kg (Boran et al. 2006), criterio que fue utilizado para este estudio.

El VP se determinó de acuerdo al método de la AOCS Cd 8b-90, (2009). Esta técnica está basada en la capacidad de los compuestos para liberar yodo al momento de reaccionar con yoduro de potasio (KI). Los lípidos son disueltos en un solvente orgánico (ácido acético glacial-cloroformo, en una proporción 2:1) al que posteriormente se le agrega un exceso de KI, una vez terminada la reacción, el yodo que se libera se titula con tiosulfato de sodio, usando almidón como indicador. El contenido se expresa en términos de meq de peróxidos por kg de aceite (meqO₂/Kg).

4.4. Evaluación del Efecto Protector de los Antioxidantes Sobre el Aceite

Se evaluaron tres antioxidantes de origen natural y un antioxidante sintético, conocido por su potente actividad (Azizkhani y Zandi, 2009; Khan y Shahidi, 2001). En la primera fase del experimento los antioxidantes naturales se evaluaron a diferentes concentraciones, determinando el grado de oxidación del aceite de raya *Rhinoptera bonasus* y eligiendo de esta manera la concentración que mayor protección antioxidante presente. En la segunda fase se evaluó la vida útil del aceite de raya *Rinoptera bonasus*, esto para los cuatro antioxidantes, a la concentración que mayor protección le brindó al aceite.

Los antioxidantes a evaluar fueron: terbutilhidroquinona (TBHQ), ácido cafeico (AC), extracto de romero (Rom) y tocoferol (Toc). TBHQ, Rom y Toc: los cuales se obtuvieron de Dresen Química, México; AC fue obtenido de Sigma (St. Louis). Las concentraciones a evaluar fueron: 0.02% (p/p) para TBHQ; 0.02, 0.03, 0.06 y 0.1% (p/p) para AC; Rom a 0.02, 1.0, 2.5 y 5.0% (p/p); y Toc a 0.02, 0.3, 0.5 y 0.8% (p/p).

Para la adición de los antioxidantes al aceite, fue necesario preparar una solución patrón para cada uno de los antioxidantes, disolviendo 500 mg de TBHQ, ácido cafeico, Rom y Toc en 5 ml de etanol, respectivamente. A partir de la solución patrón se tomó la concentración requerida y se adicionó al aceite, mezclándolo uniformemente utilizando un *Vortex 3* IKA, para terminar de mezclarlos mediante burbujeo con nitrógeno (Kulas y Ackman, 2001).

4.4.1. Estabilidad del aceite mediante oxidación acelerada por calentamiento

La estabilidad del aceite se determinó mediante la técnica utilizada por Bhale y colaboradores (2007), cuantificando el ácido eicosapentaenoico (EPA) y del ácido docosahexaenoico (DHA) por cromatografía de gases (CG), por medio de una oxidación acelerada por calentamiento, a 150°C durante 30 min., modificando en el presente trabajo el tiempo de 30 min. a 180 min. Se pesaron 0.5 g de aceite en viales de vidrio de 5 ml, al cual se le añadió el antioxidante a su respectiva concentración fueron colocados en una placa de calentamiento VWR Analog. Heatblock, a las condiciones mencionadas anteriormente. Este experimento se realizó para los cuatro antioxidantes a cuatro concentraciones El porcentaje de retención de DHA y EPA se obtuvo dividiendo la concentración de EPA y DHA obtenida después del calentamiento entre la concentración inicial (día 0) del control, multiplicándolo por 100. Determinando de esta forma la concentración del antioxidante que presentó menor deterioro del EPA y DHA.

4.4.2. Determinación de la actividad antioxidante por el Método de Schaal

Reducir el tiempo requerido para determinar la vida útil de un aceite es de importancia primordial para la industria, ya que generalmente estos procesos son tardados. Uno de los

métodos actualmente utilizados para acelerar estos estudios es la prueba del horno de Schaal, extrapolando los resultados obtenidos; ya que está establecido en la literatura que 24 horas a 60°C equivalen a un mes de almacenamiento a temperatura ambiente (Siriwardhana et al 2004; Evans, 1973). Esto ha sido comprobado en estudios realizados a temperatura ambiente por Hawrysh et al. (1988); resultados que también concuerdan con un informe de Evans et al. (1973) en donde los resultados obtenidos durante 4 días a 60°C fueron equivalentes a los obtenidos a cuatro meses a temperatura ambiente para aceite de soja (Malcolmson, et al.,1994).

Se pesaron 26 g de aceite con 0.02% (p/p) de TBHQ; 0.06% (p/p) de ácido cafeico; 2.5% (p/p) de extracto de romero; 0.5% (p/p) de α -tocoferol, en recipientes de vidrio, los cuales se colocaron en una estufa a $60\pm 2^\circ\text{C}$ durante 35 días: con mediciones periódicas a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días; determinando el valor de peróxido y los compuestos volátiles generados, con el fin de monitorear el proceso de oxidación. Como control se utilizó el aceite sin antioxidantes.

4.4.3. Determinación de compuestos volátiles por SPME

La composición de compuestos volátiles es una cualidad importante y un indicador de la estabilidad de los aceites de pescado, contribuyendo a los cambios de olor y sabor; por lo que con su determinación es posible evaluar su deterioro (Ólafsdóttir, 2005)

Para este estudio los compuestos volátiles fueron determinados mediante la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (SPME, por sus siglas en ingles); se tomaron 10 g de la muestra de aceite fueron colocados en viales de 30 ml (por duplicado) y con agitación constante a la temperatura de 65°C durante 30 minutos, posteriormente los vapores se pusieron en contacto con una fibra de carboxeno/divilbenceno/PDMS, ésta se mantuvo en agitación a la misma temperatura durante 30 minutos mas; posteriormente se retiró el material adsorbente, y la fibra se inyectó en el cromatógrafo de gases donde se mantuvo en el inyector durante 5 minutos, en donde los analitos y el material adsorbido se

desorben (Tesis Doctorado, Navarro-García). La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se obtuvo por cromatografía gaseosa capilar en un cromatógrafo de gases (Varian Inc., Walnut Creek, CA) modelo CP-3800; equipado con un detector de ionización de flama y utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 0.6 ml min^{-1} ; provisto de una columna capilar CP-Sil 8 CB de 15 m. x 0.25mm ID. El programa de temperatura inició a 35°C por 3 minutos, se incrementó a 5°C/min. hasta 100°C , incrementándose 10°C/min. hasta 280°C . La temperatura del detector e inyector fueron de 250°C respectivamente. Los componentes individuales se identificaron comparando los tiempos de retención con los estándares utilizados; 3-hexanal, hexanal, 2-hexenal, heptaldehído, 2,4-hexadienal, 2-heptenal, 1-octen-3-ol, 2-pentilfuran, octilaldehído, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 1-octanal, nonilaldehído, decanal, ethilvinilcetona, 2-decenal, 2,4-decadienal y 1-penten-3-ol, obtenidos de Supelco-Sigma, Aldrich Química, México. Para la cuantificación, se realizó una curva de calibración de cinco puntos, con dos réplicas, par cada compuesto; con su respectivo coeficiente de correlación. La solución de la mezcla patrón se preparó pesando $0.01 \pm 0.005\text{gr.}$ en 1 ml de hexano; de forma individual para cada estándar; tomándose 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 μl

4.5. Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar, empleándose 2 réplicas. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de Tukey ($p=0.05$). Por otra parte se realizó un análisis de regresión lineal entre el valor de peróxido y la concentración de los compuestos volátiles para determinar la relación existente entre estos dos indicadores. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico de computación Statistical Package for the Social Sciences (SPSS17) para Windows.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Caracterización del Aceite

5.1.1. Perfil de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos en el aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus* (Tabla 1), mostró que los ácidos grasos insaturados fueron la mayor fracción, presentando un nivel de insaturación total de 45.6%, con un contenido de EPA de 3.8 ± 0.64 y $19.8 \pm 1.44\%$ de DHA (Tabla 1). Valores superiores a los reportados para *Rhinoptera bonasus* y *Aetobatus narinari*, con un nivel de insaturación alrededor del 35%, con un 13% de EPA y 8% de DHA; y para *Gymnura marmota* y *Dasyatis brevis* con un contenido de EPA + DHA respecto al total de ácidos grasos de 18 y 16% respectivamente (Navarro y col. 2004; 2010). Resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura para aceites de pescado (Bergé et al., 2005), donde se hace referencia al alto contenido de DHA y EPA, de 14% al 19% y 5-8%, respectivamente. Esto implica que este aceite es muy sensible a la reacción de oxidación.

Tradicionalmente el aceite de hígado de bacalao ha sido utilizado como fuente de ácidos grasos ω -3, con un contenido de EPA y DHA de 16% (Méndez et al., 1996), encontrándose en nuestro aceite un valor superior (23.6%); razón por la cual el aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus* podría también utilizarse como una fuente alternativa de ω -3; dada su capacidad de almacenar grasa en el hígado confiriéndole dicha propiedad (Frankel, 1996).

En cuanto a los ácidos grasos saturados, éstos representaron el 29.3%, donde el ácido palmítico (16:0) se encontró presente en mayor concentración, seguido por el esteárico (18:0); con un 16.5 ± 1.18 y $8.3 \pm 0.42\%$ respectivamente. Característica que se aprecia también en *Rhinoptera steindechneri* con un 15.4%; *Aetobatus narinari*, 23% y *Rhinoptera bonasus*, 22% (Navarro et al., 2004 a,b; Pal et al, 1998; Val Ould El Kebir, 2003).

Tabla 1

Perfil de ácidos grasos del aceite de raya *Rhinoptera bonasus*

Ácidos grasos	Concentración (g/100 g de aceite)
C14:0	4.51 ± 0.29
C14:1	0.91 ± 0.08
C16:0	16.47 ± 1.18
C16:1	11.31 ± 1.02
C18:0	8.28 ± 0.42
C18:1	11.07 ± 1.46
C18:2	1.51 ± 0.12
C20:4	2.30 ± 0.27
C20:5	3.78 ± 0.64
C22:5	5.95 ± 0.29
C22:6	19.84 ± 1.44
Monoinsaturados	29.3
Saturados	23.3
Polinsaturados	33.4
EPA + DHA	23.6

Todos los valores son las medias de 2 réplicas ± desviación estándar

5.1.2. Tocoferoles

El α -tocoferol fue el único isómero detectado en el aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus*, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Parazo et al. 1998), el cual es almacenado en el hígado de peces mayoritariamente. Razón por la cual en dicho estudio solo se detectó la presencia de este isómero, a una concentración de 16.7 mg/100g (Tabla 2), valor superior al reportado para *Gymnura marmota* con 2.8 mg/100g (Navarro y col., 2004); pero inferior respecto a las reportadas para *Dasyatis brevis*, *Rhinoptera bonasus*, *Aetobatus narinari* y *Dasyatis americana*, con 25.3, 48.7, 46.7 y 13mg/100g de aceite, respectivamente (Navarro y col., 2009 y 2010). Esta variación en el contenido de tocoferoles ha sido reportada en la literatura en aceite de hígado de diferentes especies. Para aceite de Manhaden se ha reportado una concentración de 4.7mg/100g (Kulas y Ackman, 2001); 18.0 y 8.3 mg/100g en aceite de hígado de tiburón *Mustelus antarcticus* y *Galeorhinus galeus*, respectivamente (Nicholls et al., 1998); 25 mg/100g de aceite de hígado de *Squalus acanthias*. (Navarro et. al, 2004a).

5.1.3. Valor de peróxidos

Existen parámetros físico-químicos que permiten valorar la calidad de un aceite, evaluando el comportamiento del proceso oxidativo en base a los productos primarios de oxidación; el cual es el resultado de la reacción de los ácidos grasos presentes en el aceite con el oxígeno; dicho indicador es el valor de peróxido el cual permite definir el estado de oxidación del aceite. Para el aceite crudo, recién extraído de *Rhinoptera bonasus* el valor de peróxidos obtenido fue de 2.02 ± 0.002 meqO₂/Kg (Tabla 2); valor similar al reportado para aceite crudo de jurel, 2.19 meqO₂/Kg (Adeniyi y Bawa, 2006). Aunque menor al reportado para aceite sin refinar de Menhaden donde se obtuvo un valor de peróxido de 5.70 meqO₂/Kg (Yin y Sathivel, 2010); otros autores para este mismo aceite reportan un valor de 3.05 meqO₂/Kg (Wanasundara et al., 1998), lo cual puede explicarse a la concentración de α -tocoferol que se presenta nuestro aceite en estudio.

Tabla 2.
Caracterización del aceite de raya *Rhinoptera bonasus*

Parámetros	
Valor de Peróxidos (meqO ₂ /kg)	2.02 ± 0.002
Tocoferoles (mg/100g)	16.7 ± 1.63

Todos los valores son las medias de 2 réplicas \pm desviación estándar

5.2. Evaluación del Efecto Protector de los Antioxidantes Sobre el Aceite

5.2.1. Estabilidad del aceite mediante oxidación acelerada por calentamiento

El TBHQ fue utilizado debido a su potente actividad antioxidante reportada. Su adición, como era de esperarse, proporcionó una buena protección del EPA y DHA frente a la oxidación, como se observa en la Tabla 2; presentando diferencias significativas frente al aceite oxidado, con un porcentaje de retención de EPA y DHA de 97.2 y 82.8%, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3.
Actividad antioxidante del TBHQ en el aceite e raya *Rhinoptera bonasus*

TBHQ				
TRATAMIENTO	EPA	% Retención	DHA	% Retención
Oxidado	2.32a ± 0.21	61.39	10.68a ± 0.12	53.91
0.02%	3.68b ± 0.28	97.26	16.41b ± 0.72	82.87
Control	3.78b ± 0.64		19.80c ± 1.45	

Todos los valores son las medias de 2 réplicas ± desviación estándar

Letras iguales en las columnas indica que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Oxidado = aceite R. bonasus oxidado sin antioxidantes

Control = aceite crudo recién extraído

Por otro lado, la adición de ácido cafeico evidenció su efectividad al retardar la oxidación del aceite. En los resultados obtenidos a las cuatro concentraciones evaluadas (Tabla 4), se observaron diferencias significativas entre el aceite oxidado y la concentración de 0.06 y 0.10% (p/p) para el EPA; mientras que para el DHA estas diferencias significativas se presentaron a las cuatro concentraciones. En base a los resultados obtenidos el ácido cafeico la concentración de 0.06% (p/p) brinda una mayor protección frente al deterioro de estos ácidos grasos particularmente, con un nivel de retención de 86.6% para el EPA y 79% para el DHA; así mismo a concentraciones mayores la actividad antioxidante disminuye.

De Leonardis y Macciola (2003) evaluaron y compararon la actividad del ácido cafeico contra un antioxidante sintético en aceite de hígado de bacalao, brindando una mayor estabilidad el ácido cafeico; reportando 0.06% (p/p) como la óptima concentración para una mayor estabilidad. Esto implica que el ácido cafeico es un buen antioxidante para aceites marinos, los cuales se caracterizan por ser altamente insaturados.

La actividad antioxidante del α -tocoferol en aceites, como sucede con todos los antioxidantes, es dependiente de la concentración (Evans et al., 2002; Kulas y Ackman, 2001). Huang y Frankel, (1997) reportan que a 0.01% (p/p) el α -tocoferol ejerce una óptima actividad antioxidante en el aceite de maíz. Sin embargo, a concentraciones mayores de 0.025% (p/p) muestra efectos pro-oxidantes (Silva et al. 2010).

Tabla 4.

Actividad antioxidante del ácido cafeico en el aceite de raya *Rhinoptera bonasus*

ACIDO CAFEICO				
TRATAMIENTO	EPA	% Retención	DHA	% Retención
Oxidado	2.32a ± 0.21	61.39	10.68a ± 0.12	53.91
0.02%	2.68ab ± 0.13	70.98	14.76b ± 0.62	74.53
0.03%	2.83ab ± 0.40	74.97	14.10b ± 0.93	71.17
0.06%	3.27bc ± 0.16	86.63	15.65b ± 0.31	79.03
0.10%	3.11abc ± 0.01	82.24	15.57b ± 0.25	78.6
Control	3.78c ± 0.64		19.80c ± 1.45	

Todos los valores son las medias de 2 réplicas ± desviación estándar

Letras iguales en las columnas indica que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Oxidado = aceite *R. bonasus* oxidado sin antioxidantes

Control = aceite crudo recién extraído

En el presente estudio se puede observar que a concentraciones mayores de 0.8% (p/p) la actividad antioxidante del α -tocoferol disminuyó de un 3.21 a 2.81 para el EPA y de 16.98 a 13.27 en el caso de DHA (Tabla 5). La concentración que mostró mayor actividad antioxidante obtenida para el tocoferol fue de 0.5% (p/p), con un por ciento de retención de 85% para ambos ácidos grasos; encontrándose diferencias significativas entre esta concentración y el aceite oxidado. Estos resultados muestran que el tocoferol tiene la capacidad de retardar la oxidación del aceite de *Rhinoptera bonasus*, mostrando un adecuado efecto antioxidante. Frankel (1996) reporta que la actividad del α -tocoferol es dependiente, entre varios factores, del sistema donde se evalúe; por lo cual es explicable que en nuestro aceite la concentración de α -tocoferol sea mayor que la utilizada en aceites de origen vegetal, ya que se trata de un aceite altamente insaturado.

Por otra parte el romero, una de los pocos compuestos fitoquímicos utilizados de manera comercial, se caracteriza por presentar actividad antioxidante; dicha actividad ha sido relacionada a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales permiten la donación de un átomo de hidrógeno (O'Sullivan, 2005).

Tabla 5.
Actividad antioxidante del tocoferol en el aceite de raya *Rhinoptera bonasus*

TOCOFEROL				
TRATAMIENTO	EPA	% Retención	DHA	% Retención
Oxidado	2.32a ± 0.21	61.39	10.68a ± 0.12	53.91
0.02%	1.99a ± 0.17	52.75	10.59a ± 1.02	53.48
0.30%	2.58ab ± 0.24	68.39	13.74b ± 0.86	69.38
0.50%	3.21bc ± 0.11	85.05	16.98c ± 0.44	85.73
0.80%	2.81ab ± 0.19	74.23	13.27b ± 0.80	66.99
Control	3.78c ± 0.64		19.80d ± 1.45	

Todos los valores son las medias de 2 réplicas ± desviación estándar

Letras iguales en las columnas indica que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Oxidado = aceite *R. bonasus* oxidado sin antioxidantes

Control = aceite crudo recién extraído

En este estudio en base a la concentración de EPA y DHA, se observó que la actividad antioxidante del extracto de romero disminuyó su efectividad conforme aumentó su concentración para 5.0% (p/p) de inclusión el contenido de EPA fue 3.42 ± 0.19 y 18.86 ± 0.39 para DHA, frente a 2.32 ± 0.21 y 10.68 ± 0.12 del control oxidado. Esto puede deberse a la compleja composición del extracto de romero, donde sus compuestos pueden actuar como pro-oxidantes a niveles mayores, donde una alta temperatura puede afectar significativamente su estabilidad (Tabla 6).

Respecto a la cantidad original de EPA y DHA se encontraron diferencias significativas en todas las concentraciones respecto al control oxidado, a excepción de 0.02% (p/p). Sin la adición de antioxidantes el aceite presentó un por ciento de retención de EPA y DHA de 61.4 y 53.9%, respectivamente; mientras que a la concentración de 2.5% (p/p) su estabilidad se vio aumentada alrededor de 1.6 veces más (Tabla 5). Resultados similares se observaron en un estudio con aceite de menhaden adicionado a las mismas concentraciones, reportando 2.5% (p/p) como la concentración que brindó mayor estabilidad con una retención alrededor del 60% para EPA y DHA (Bhale, et al., 2007). Estas similitudes se deben a la alta insaturación que presentan ambos aceites evaluados; ya que en un estudio en aceite vegetal se evaluó la actividad del antioxidante, encontrando 0.1% (p/p) como la mejor concentración para dicho aceite. Cada aceite tiene una determinada estabilidad oxidativa, la cual dependerá,

entre otros factores, de la composición de ácidos grasos y del contenido de antioxidantes naturales que posea. (Tabee et al., 2008).

Tabla 6.

Actividad antioxidante del extracto de romero en el aceite de raya *Rhinoptera bonasus*

ROMERO				
TRATAMIENTO	EPA	% Retención	DHA	% Retención
Oxidado	2.32a ± 0.21	61.39	10.68a ± 0.12	53.91
0.02%	2.38ab ± 0.16	62.95	12.37a ± 0.59	62.45
1.00%	3.11bc ± 0.04	84.02	17.72b ± 0.14	89.48
2.50%	3.80c ± 0.18	100	19.91c ± 0.65	100
5.00%	3.42c ± 0.19	90.5	18.86bc ± 0.39	95.24
Control	3.78c ± 0.64		19.80c ± 1.45	

Todos los valores son las medias de 2 réplicas ± desviación estándar

Letras iguales en las columnas indica que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Oxidado = aceite *R. bonasus* oxidado sin antioxidantes

Control = aceite crudo recién extraído

Después del calentamiento a 150°C durante 3 horas, los tres antioxidantes naturales mostraron una capacidad significativa para retardar la oxidación del EPA y DHA durante el calentamiento.

En la Figura 15 se muestran las concentraciones de EPA y DHA para cada uno de los antioxidantes evaluados a su óptima concentración, donde el extracto de romero mostró una mayor actividad antioxidante, respecto al resto de los antioxidantes evaluados. Esto podría deberse a la complejidad del extracto de romero, el cual posee varios compuestos fitoquímicos que le proporcionan dicha capacidad. Por el contrario, el tocoferol fue el compuesto que presentó una menor actividad con un 85% de retención para EPA y DHA.

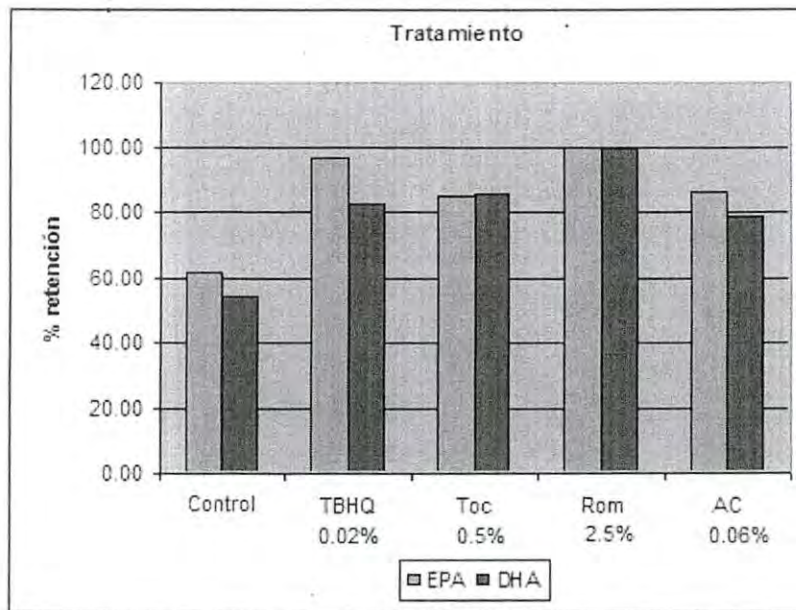


Figura 14. Estabilidad oxidativa de *Rhinoptera bonasus* en los cinco tratamientos; (Control, TBHQ: terbutilhidroquinona; Toc: tocoferol; Rom: extracto de romero; AC: ácido cafeico.)

5.2.2. Determinación de la actividad antioxidante por el Método de Schaal

En la estabilidad del aceite medida por el valor de peróxidos, utilizando el método de Schaal (Tabla 7), se observaron pocos cambios en el aceite de *Rhinoptera bonasus* sin antioxidantes en el valor de peróxido (Figura 16), con un incremento aproximado de 2 a 4 meqO₂/kg durante los primeros 14 días del almacenamiento. Para los 21 días hubo un notable incremento en el valor del peróxido alcanzando los 12 meqO₂/kg. El límite de aceptación para el valor de peróxidos en aceites crudos es de 7-8 meqO₂/kg (Huss, 1988), valor que alcanza a los 17 días aproximadamente. Durante las siguientes determinaciones el valor de peróxido siguió aumentando hasta llegar casi a los 19 meqO₂/kg a los 35 días. Transcurridos los primeros 7 días no se observaron diferencias significativas, sino hasta el día 14, donde a partir de esto se presentaron diferencias significativas entre las determinaciones a los 21, 28 y 35 días respecto al tiempo cero. En un estudio de aceite de pescado se observó una mayor estabilidad oxidativa; durante 25 días aproximadamente se mantuvo un promedio de peróxidos de 2 a 4.5 meqO₂/kg, llegando a 8 meqO₂/kg a los 35 días de almacenamiento, con valores máximos de 14 meqO₂/kg a los 42 días (Chol, 2005).

Durante los primeros 14 días el aceite tratado con TBHQ a 0.02% (p/p) no mostró diferencias significativas, alcanzando casi los 3 meqO₂/kg; valor que siguió aumentando; a los 21 días su valor alcanza casi los 7 meqO₂/kg y sigue aumentando hasta sobrepasar los 11 meqO₂/kg a los 28 días alcanzando su valor máximo, con una diferencia significativa entre éste y el control. Pasando los 28 días se observa una disminución aproximada de 2 meqO₂/kg (Figura 17).

El aceite tratado con ácido cafeico a 0.06% presentó similitudes con el TBHQ, al igual durante los primeros 14 días, no mostró diferencias significativas, alcanzando 3.6 meqO₂/kg; después de los 21 días el aceite alcanza 6 meqO₂/kg, llegando a su punto máximo también a los 28 días superando los 15 meqO₂/kg con una diferencia significativa entre ésta y el control. Y no fue hasta los 35 días que se observa una caída del valor de peróxido (Figura 18).

Los cambios en el valor de peróxido en el aceite de *Rhinoptera bonasus* con la adición de 2.5% (p/p) de extracto de Romero se muestra en la Figura 19. Durante los primeros 21 días el valor de peróxidos no mostró cambios significativos, manteniéndose en un promedio de 2.3 meqO₂/kg. A los 28 días, se presentó un incremento drástico, alcanzando casi los 7 meqO₂/kg; y sobrepasando los 10 meqO₂/kg a los 35 días, en ambos casos se presentaron diferencias significativas entre ellos y el valor de peróxido al tiempo cero. Un estudio realizado en aceite de Menhaden con extracto de romero, se detectaron valores de peróxido desde el inicio superiores a los 5 meqO₂/kg; sobrepasando el límite máximo permisible después de 8 días de almacenamiento, valor que siguió aumentando hasta llegar a su punto máximo a los 16 días (14.5 meqO₂/kg) Tsimidou et al., (1995) reportaron resultados similares usando 0.5% (p/p) de extracto de romero en aceite de caballa. Hay que mencionar que estos altos valores son razonables ya que la concentración que ahí se maneja fue muy inferior a la del presente estudio (0.5% (p/p) de extracto de romero); pero dentro de las recomendaciones que hacen es la de buscar la óptima concentración para maximizar su efecto antioxidante (O'Sullivan, et al., 2005).

Los cambios en el valor de peróxido en el aceite de *Rhinoptera bonasus* con la adición de 0.5% (p/p) de tocoferol se muestra en la Figura 20. Durante los primeros 14 días el valor de

peróxidos no mostró cambios significativos, manteniéndose en un promedio de 3 meqO₂/kg. Para el día 21 se presentó un incremento alcanzando casi los 6 meqO₂/kg, valor que siguió aumentando hasta el día 35 llegando a superar los 15 meqO₂/kg, para las últimas tres determinaciones se observaron diferencias significativas entre ellos y el valor de peróxido al tiempo cero. O'Sullivan y colaboradores (2005) adicionaron tocoferol a la misma concentración (0.5% (p/p)) en aceite de Menhaden, reportando valores de peróxido inicial de 3 meqO₂/kg; a los 6 días se presentó un incremento drástico sobrepasando los 21 meqO₂/kg, valor que siguió aumentando hasta los 14 días (44 meqO₂/kg). En aceite de hígado de *Pollachius pollachius*, el valor inicial fue de 2.5 meqO₂/kg, pero para el día dos se incrementó hasta 11; su valor máximo fue alcanzado a los 12 días de almacenamiento con un valor de 50 meqO₂/kg. Estos altos valores de peróxidos los atribuyen a lo citado en la literatura donde argumentan que el aceite crudo se oxida con mayor rapidez que el refinado; esto debido a la presencia de menores componentes que los protejan contra el proceso oxidativo (Kulas y Ackman, 2001).

Tabla 7.

Valor de peróxido* en el aceite de raya *Rhinoptera bonasus* almacenado a 60°C durante 35 días

Días	Control	TBHQ	AC	Rom	Toc
0	2.06a ± 0.31	2.06a ± 0.31	2.06a ± 0.31	2.06a ± 0.31	2.06a ± 0.31
7	2.59a ± 0.18	2.07a ± 0.11	2.12a ± 0.30	2.13a ± 0.11	3.20a ± 0.87
14	3.55b ± 0.17	2.79a ± 0.20	3.59a ± 1.15	2.18a ± 0.17	3.45a ± 0.29
21	12.34c ± 0.44	6.65b ± 0.07	6.16b ± 0.06	2.75a ± 0.18	5.93b ± 1.13
28	15.32d ± 0.18	11.54c ± 0.84	15.50c ± 0.50	6.91b ± 0.50	9.60c ± 0.26
35	18.52e ± 0.42	10.65c ± 0.73	13.70c ± 1.22	10.65c ± 0.45	15.86d ± 1.50

Control = aceite sin antioxidantes; AC= ácido cafeico; Rom= extracto de romero; Toc= tocoferol

Todos los valores son los valores de 2 réplicas ± desviación estándar

Letras iguales en las columnas indica que hay diferencias significativas (p=0.05)

* valor de peróxido expresado en meqO₂/kg de aceite

En la Figura 21 se muestra el comportamiento del aceite sin antioxidante y adicionado con los antioxidantes evaluados. Hasta el día 14 se observa un ligero aumento del valor de peróxido en todos los tratamientos que va de 2 a 4 meqO₂/kg; a excepción del tratamiento de extracto de romero que mantuvo este nivel hasta los 21 días. El aceite adicionado con ácido

cafeico presentó un comportamiento similar al TBHQ alcanzando su valor máximo a los 28 días. El aceite que no fue tratado con ningún antioxidante alcanzó un valor de peróxido superior a los 18 meqO₂/kg. De los 3 antioxidantes evaluados en el aceite de *Rhinoptera bonasus*, el adicionado con extracto de romero fue el que presentó valores de peróxidos mas bajos, superando incluso al TBHQ antioxidante reconocido por su potente actividad antioxidante.

El período de inducción es muy útil para estudiar la estabilidad oxidativa de los aceites (Coppin y Pike, 2001), y éste varía de acuerdo al criterio de diferentes autores; desde el punto de vista sensorial algunos investigadores (Robards et al, 1989; Schnepf et al, 1991) consideran inaceptable los aceites comestibles cuando alcanzan un valor de peróxido de 7.5 meqO₂/kg; 7-8 meqO₂/kg en aceites crudos (Huss, 1988); 8 meqO₂/kg (Boran et al. 2006), criterio que fue utilizado para este estudio. Por lo tanto en este estudio nuestro aceite control alcanzó los 8 meqO₂/kg a los 17; el aceite evaluado con TBHQ al igual que el ácido cafeico a los 21 días, seguido por el tocoferol a los 24 días y finalmente el aceite con extracto de romero e alcanzó dicho valor hasta los 28 días de tratamiento. Si estos resultados los extrapolamos a lo citado por la literatura (Siriwardhana et al 2004; Evans, 1973; Malcolmson et al.,1992) que establecido que 24 horas a 60°C equivalen a un mes de almacenamiento a temperatura ambiente se traduce a un tiempo de vida útil de 17 meses para el aceite sin ningún tipo de protección; 21 meses para el aceite adicionado con TBHQ a 0.02% (p/p) y 0.06% (p/p) de ácido cafeico; 24 meses utilizando Tocoferol a 0.5% (p/p) y 28 meses con 2.5% (p/p) de extracto de romero.

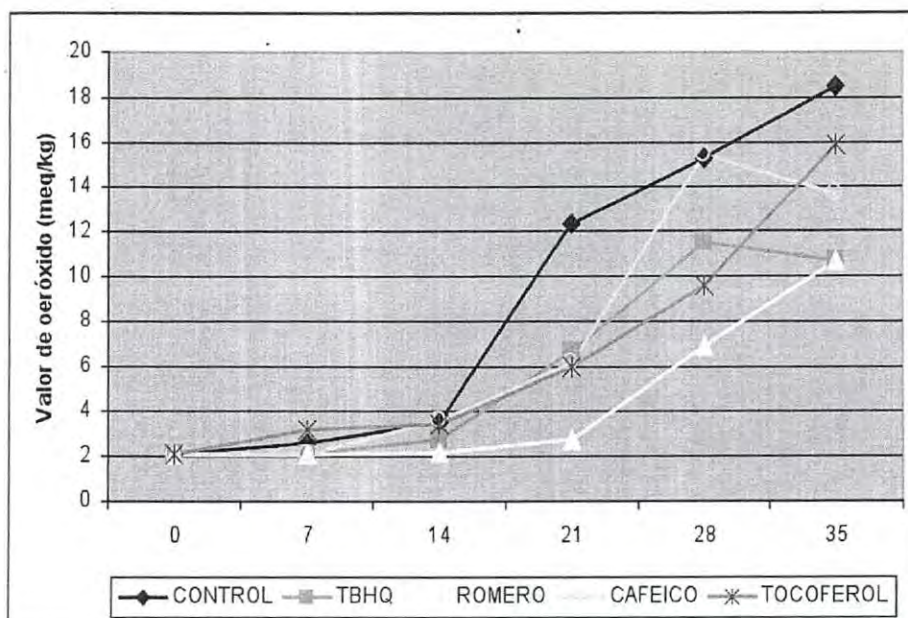


Figura 15. Valor de peróxido del aceite de *Rhinoptera bonasus* con antioxidantes durante el almacenamiento a 60°C.

5.2.3. Determinación de compuestos volátiles por SPME

Los compuestos volátiles que se utilizaron como estándares fueron: 3-hexanal, hexanal, 2-hexenal, heptaldehído, 2,4-hexadienal, 2-heptenal, 1-octen-3-ol, 2-pentilfurano, octilaldehído, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 1-octanal, nonilaldehído, decanal, etilvinilcetona, 2-decenal, 2,4-decadienal y 1-penteno-3-ol. Al igual que en estudios realizados por diversos investigadores, en nuestro aceite de *Rhinoptera bonasus*, no se detectó el 3-hexanal, lo que se asume a ser un producto temprano de la actividad de la enzima 15-lipoxigenasa (Josephson y Lindsay, 1986; Grn et al. 1996). En la Tabla 6 se enlistan todos compuestos volátiles detectados en el aceite crudo de *Rhinoptera bonasus*; de estos 16 compuestos, solamente 9 fueron detectados en los 5 tratamientos, durante los 35 días de almacenamiento: hexanal, 2-heptenal, 2-pentilfurano, octilaldehído, 2-octenal, decanal, 2-decenal, 2,4-decadienal y 1-penteno-3-ol.

Durante el tratamiento, el tiempo que tomo para que cada compuesto volátil alcanzara su máximo nivel fue variado; la mayoría de los compuestos detectados alcanzaron su máximo nivel entre los días 14 y 28. El heptaldehído fue el único compuesto que presentó un comportamiento diferente en comparación al resto de los volátiles, durante el tiempo de almacenamiento, ya que a partir de su concentración inicial se detectó una disminución en las

siguientes determinaciones, para los 5 tratamientos. Por otra parte, el 2-heptenal y 2-octenal fueron los únicos volátiles que incrementaron su concentración durante el periodo de la oxidación acelerada.

En el aceite adicionado con 0.02% (p/p) de TBHQ los 16 compuestos fueron detectados durante todo el tratamiento, a excepción del 2-hexenal y etilvinilcetona los cuales a los 35 días ya no fueron detectados (Tabla 7). Mientras que en el aceite adicionado con 2.5% (p/p) de extracto de romero, hubo variaciones durante todo el tratamiento, los compuestos volátiles que se detectaron durante todo el almacenamiento fueron el hexanal, 2-heptenal, 2-pentilfurano, octilaldehído, 2-octenal, decanal, 2-decenal, 2,4-decadienal y 1-penteno-3-ol (Tabla 8). En el caso del tocoferol al 0.5% (p/p) solamente el etilvinilcetona no fue detectado durante el almacenamiento (Tabla 10). Comportamiento similar se observó en el aceite con 0.06% (p/p) de ácido cafeico, donde dicho compuesto se detectó después de los 7 días (Tabla 9).

Los compuestos volátiles que se detectaron en nuestro aceite en mayores cantidades fueron el 2,4-decadienal y 1-penteno-3-ol; mismos que fueron reportados como mayoritarios en un estudio de aceite de pescado adicionado con tocoferol (Kulas, et al., 2002). Mientras, que en menor concentración se detectaron en nuestro aceite el heptaldehído, octilaldehído y el nonilaldehído. La concentración del 1-penten-3-ol se mantuvo durante los primeros 21 días del almacenamiento, posteriormente su valor se duplicó a los 28 días; alcanzando su valor máximo a los 35 días, aumentando casi tres veces su valor. Este comportamiento fue similar para los cuatro antioxidantes evaluados, con excepción del control que presentó desde el inicio una concentración superior a 1.0, alcanzando a los 21 días su punto máximo, triplicando su valor inicial, para posteriormente ir disminuyendo hasta el término del almacenamiento. Resultados similares se encontraron en el aceite de Menhaden donde el 1-pentel-3-ol fue uno de los compuestos mayoritariamente presentes en dicho aceite (Grn et al., 1996). Por otra parte el 2,4-decadienal alcanzó concentraciones máximas a los 14 días para el aceite tratado con TBHQ, tocoferol y ácido cafeico; y a los 21 días para el control y 28 para el extracto de romero, hasta alcanzar valores menores a 0.7. Tanto el 2,4-heptadienal, como el 1-penten-3-ol han sido identificados en aceite de pescado por varios autores (Crawford, 1976; Horiuchi,

1998; Hsieh, 1989; Cruz-Núñez, 2007), dichos compuestos han sido asociados al proceso de oxidación, contribuyendo a la rancidez, proporcionándole un sabor y olor indeseable al aceite. Además de ser reportado por Noble y Nawar (1971; 1975) como un compuesto volátil generado a partir de la oxidación del metil éster de DHA (Lee, et al., 2003); por lo tanto, al ser nuestro aceite rico en este ácido graso en particular, es de esperar que la concentración de éstos volátiles que se genere sea mayoritaria.

Los compuestos volátiles 2-heptenal, 1-penten-3-ol, 2-decenal, 1-octanal, 2-octenal y 2,4-heptadienal, fueron los únicos que se detectaron en el aceite de *Rhinoptera bonasus* con un incremento durante el tiempo de almacenamiento. A medida que los peróxidos aumentan lo hace la concentración de los volátiles, lo que es de esperarse, ya que los compuestos volátiles son productos secundarios generados de la descomposición de los hidroperóxidos (alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos).

Se han reportado en la literatura trabajos donde analizan la relación entre el valor de peróxidos y la concentración de los productos secundarios de oxidación. Richards y col. (2005) determinaron los compuestos volátiles en el aceite de canola, encontrando una $R^2=0.73$ para hexanal y 2,4-heptadienal; donde en base a esto sugieren dichos compuestos como una forma de medir la oxidación lipídica en el aceite de canola. Por lo cual, en nuestro trabajo se buscaron correlaciones entre el VP y la concentración de los compuestos volátiles identificados durante la oxidación del aceite de *Rhinoptera bonasus*. Encontrándose correlaciones para el 1-penten-3-ol, 2-decenal y 2-octenal; con una $R^2= 0.91$; $R^2= 0.92$ y $R^2= 0.89$, respectivamente. Lo cual nos hace pensar, que dichos compuestos podrían ser utilizados como indicadores adecuados para medir el avance de la rancidez oxidativa en el aceite de raya *Rhinoptera bonasus*. Esto, ya que a medida que los peróxidos aumentan, lo hace la concentración de los volátiles; lo que es de esperarse, ya que los compuestos volátiles son productos secundarios generados de la descomposición de los hidroperóxidos (alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos).

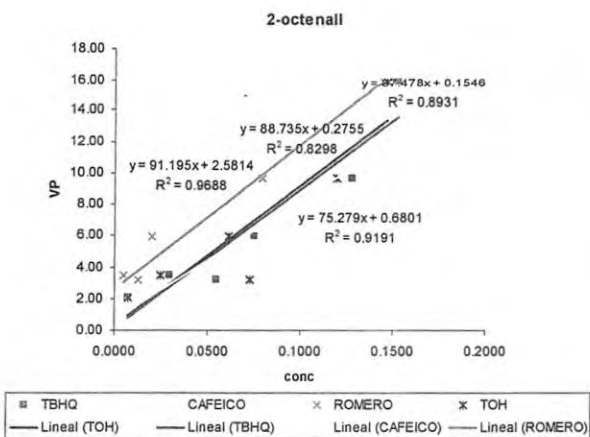
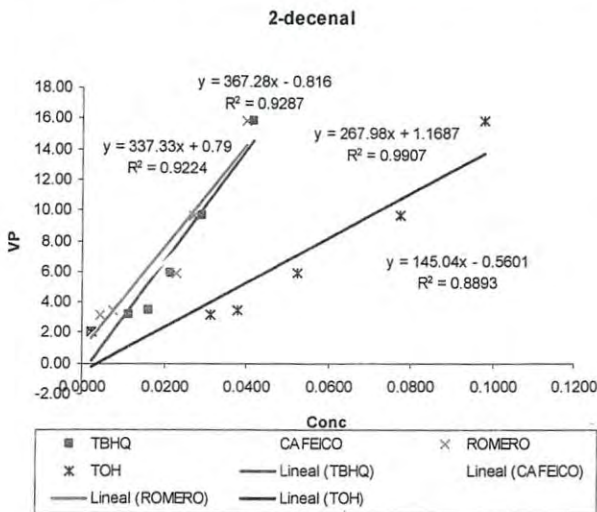
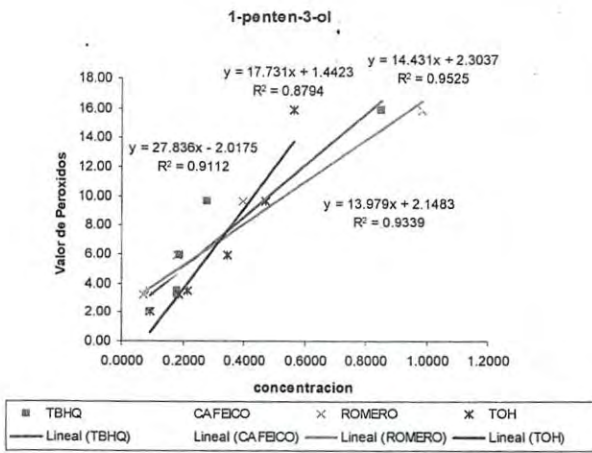


Figura 16. Correlación entre el valor de peróxidos y compuestos volátiles para 1-penten-3-ol, 2-decenal y 2-octenal.

Tabla 8. Compuestos volátiles identificados en aceite de raya *Rhinoptera bonasus* sin antioxidantes.

Compuesto	Concentración durante el tiempo de almacenamiento a 60°C (días)					
	0	7	14	21	28	35
hexanal	0.041 ± 0.002	0.103 ± 0.003	0.068 ± 0.012	0.096 ± 0.006	0.058 ± 0.001	0.056 ± 0.024
2-hexenal	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.014 ± 0.000	0.046 ± 0.005	0.026 ± 0.022
heptaldehído	0.023 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.013 ± 0.000
2-heptenal	0.008 ± 0.005	0.032 ± 0.005	0.061 ± 0.005	0.131 ± 0.004	0.127 ± 0.006	0.088 ± 0.050
1-octen-3-ol	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.018 ± 0.000	0.014 ± 0.000	0.075 ± 0.097
2-pentylfurano	0.005 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.013 ± 0.012	0.047 ± 0.000	0.027 ± 0.001	0.019 ± 0.001
octilaldehído	0.003 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.011 ± 0.001	0.034 ± 0.002	0.030 ± 0.001	0.022 ± 0.009
2,4-heptadienal	nd	0.010 ± 0.007	0.009 ± 0.000	0.023 ± 0.000	0.025 ± 0.002	0.020 ± 0.000
2-octenal	0.007 ± 0.001	0.032 ± 0.005	0.044 ± 0.003	0.144 ± 0.003	0.167 ± 0.002	0.111 ± 0.061
1-octanal	nd	0.011 ± 0.013	0.013 ± 0.000	0.043 ± 0.000	0.046 ± 0.000	0.026 ± 0.014
nonilaldehído	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.031 ± 0.000	0.025 ± 0.000	0.019 ± 0.011
decanal	0.008 ± 0.000	0.032 ± 0.004	0.031 ± 0.005	0.080 ± 0.000	0.093 ± 0.001	0.059 ± 0.049
ethylvinil cetona	0.078 ± 0.004	0.040 ± 0.001	0.064 ± 0.008	0.176 ± 0.006	0.152 ± 0.003	0.130 ± 0.043
2-decenal	0.003 ± 0.000	0.008 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.029 ± 0.000	0.037 ± 0.000	0.025 ± 0.012
2,4-decadienal	0.540 ± 0.020	0.062 ± 0.007	0.112 ± 0.014	0.261 ± 0.005	0.233 ± 0.001	0.069 ± 0.037
1-penten-3-ol	0.094 ± 0.011	1.073 ± 0.006	1.487 ± 0.127	3.260 ± 0.084	2.886 ± 0.056	0.837 ± 0.521

nd, no detectado

Tabla 9. Compuestos volátiles identificados en aceite de raya *Rhinoptera bonasus* adicionado con 0.02% de TBHQ.

Compuesto	Concentración durante el tiempo de almacenamiento a 60°C (días)					
	0	7	14	21	28	35
hexanal	0.041 ± 0.002	0.090 ± 0.002	0.060 ± 0.010	0.051 ± 0.011	0.044 ± 0.002	0.016 ± 0.000
2-hexenal	0.005 ± 0.001	0.008 ± 0.000	0.015 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.008 ± 0.000	nd
heptaldehído	0.023 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.014 ± 0.003	0.009 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.009 ± 0.000
2-heptenal	0.008 ± 0.005	0.017 ± 0.000	0.016 ± 0.002	0.032 ± 0.010	0.052 ± 0.002	0.056 ± 0.003
1-octen-3-ol	0.004 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.008 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.000	0.004 ± 0.000
2-pentylfuran	0.005 ± 0.000	0.015 ± 0.000	0.034 ± 0.003	0.040 ± 0.004	0.048 ± 0.001	0.033 ± 0.001
octilaldehído	0.003 ± 0.000	0.012 ± 0.000	0.014 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.032 ± 0.000	0.015 ± 0.000
2,4-heptadienal	nd	0.007 ± 0.000	0.021 ± 0.003	0.026 ± 0.003	0.037 ± 0.002	0.020 ± 0.000
2-octenal	0.007 ± 0.001	0.055 ± 0.003	0.029 ± 0.000	0.075 ± 0.010	0.129 ± 0.000	0.153 ± 0.000
1-octanal	nd	0.009 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.025 ± 0.002	0.038 ± 0.000	0.030 ± 0.000
nonilaldehído	0.004 ± 0.001	0.008 ± 0.000	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.000	0.013 ± 0.000	0.007 ± 0.000
decanal	0.008 ± 0.000	0.260 ± 0.010	0.094 ± 0.023	0.121 ± 0.020	0.150 ± 0.011	0.090 ± 0.001
ethilvinil cetona	0.078 ± 0.004	0.068 ± 0.003	0.082 ± 0.000	0.064 ± 0.004	0.052 ± 0.003	nd
2-decenal	0.003 ± 0.000	0.011 ± 0.000	0.016 ± 0.000	0.021 ± 0.004	0.029 ± 0.000	0.042 ± 0.001
2,4-decadienal	0.540 ± 0.020	1.203 ± 0.062	1.904 ± 0.082	1.661 ± 0.314	1.313 ± 0.045	0.664 ± 0.006
1-penten-3-ol	0.094 ± 0.011	0.182 ± 0.015	0.179 ± 0.003	0.190 ± 0.062	0.279 ± 0.000	0.849 ± 0.016

nd, no detectado

Tabla 10. Compuestos volátiles identificados en aceite de raya *Rhinoptera bonasus* adicionado con 0.06% de ácido cafeico.
Compuesto **Concentración durante el tiempo de almacenamiento a 60°C (días)**

	0	7	14	21	28	35
hexanal	0.041 ± 0.002	0.037 ± 0.001	0.070 ± 0.001	0.053 ± 0.003	0.035 ± 0.000	0.018 ± 0.000
2-hexenal	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.023 ± 0.000	0.016 ± 0.001	0.024 ± 0.003	0.034 ± 0.002
heptaldehído	0.023 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.014 ± 0.000	0.010 ± 0.001	0.012 ± 0.000	0.007 ± 0.002
2-heptenal	0.008 ± 0.005	0.009 ± 0.000	0.017 ± 0.000	0.023 ± 0.000	0.052 ± 0.002	0.061 ± 0.000
1-octen-3-ol	0.004 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.013 ± 0.000	0.013 ± 0.001	0.012 ± 0.000	0.005 ± 0.000
2-pentylfuran	0.005 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.035 ± 0.002	0.039 ± 0.000	0.051 ± 0.001	0.041 ± 0.001
octilaldehído	0.003 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.017 ± 0.000	0.021 ± 0.002	0.032 ± 0.001	0.016 ± 0.000
2,4-heptadienal	nd	0.005 ± 0.000	0.023 ± 0.001	0.028 ± 0.001	0.041 ± 0.001	0.029 ± 0.001
2-octenal	0.007 ± 0.001	0.032 ± 0.001	0.039 ± 0.001	0.081 ± 0.003	0.147 ± 0.002	0.172 ± 0.002
1-octanal	nd	0.005 ± 0.000	0.016 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.035 ± 0.007	0.033 ± 0.001
nonilaldehído	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.000	0.015 ± 0.000	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.000	0.012 ± 0.001
decanal	0.008 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.020 ± 0.000	0.017 ± 0.001	0.013 ± 0.000	0.015 ± 0.000
ethylvinilcetona	0.078 ± 0.004	nd	0.158 ± 0.001	0.126 ± 0.010	0.092 ± 0.000	0.102 ± 0.006
2-decenal	0.003 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.008 ± 0.012	0.019 ± 0.001	0.034 ± 0.001	0.053 ± 0.001
2,4-decadienal	0.540 ± 0.020	0.540 ± 0.020	1.922 ± 0.041	1.754 ± 0.063	1.548 ± 0.010	0.685 ± 0.049
1-penten-3-ol	0.094 ± 0.011	0.120 ± 0.007	0.148 ± 0.002	0.139 ± 0.068	0.422 ± 0.024	1.022 ± 0.011

nd, no detectado

T-160173

Tabla 1-1. Compuestos volátiles identificados en aceite de raya *Rhinoptera bonasus* adicionado con 2.5% de extracto de romero.
Concentración durante el tiempo de almacenamiento a 60°C (días)

Compuesto	0	7	14	21	28	35
hexanal	0.041 ± 0.002	0.014 ± 0.000	0.532 ± 0.033	0.015 ± 0.000	0.025 ± 0.002	0.034 ± 0.002
2-hexenal	0.005 ± 0.001	nd	0.020 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.006 ± 0.000	0.050 ± 0.002
heptaldehído	0.023 ± 0.001	nd	Nd	0.008 ± 0.000	0.005 ± 0.000	nd
2-heptenal	0.008 ± 0.005	0.016 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.060 ± 0.001	0.102 ± 0.002	0.120 ± 0.003
1-octen-3-ol	0.004 ± 0.000	nd	Nd	nd	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.000
2-pentylfuran	0.005 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.021 ± 0.000	0.033 ± 0.000	0.011 ± 0.000
octilaldehído	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000	0.015 ± 0.001	0.007 ± 0.000	0.015 ± 0.001	0.010 ± 0.000
2,4-heptadienal	nd	nd	Nd	0.021 ± 0.001	0.026 ± 0.000	0.015 ± 0.000
2-octenal	0.007 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.020 ± 0.000	0.080 ± 0.003	0.145 ± 0.004
1-octanal	nd	nd	Nd	0.008 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.015 ± 0.000
nonilaldehído	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.013 ± 0.001	nd
decanal	0.008 ± 0.000	0.041 ± 0.000	0.058 ± 0.000	0.075 ± 0.001	0.103 ± 0.011	0.054 ± 0.002
ethi lvinil cetona	0.078 ± 0.004	0.023 ± 0.000	0.028 ± 0.001	0.044 ± 0.001	0.061 ± 0.007	nd
2-decenal	0.003 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.008 ± 0.000	0.023 ± 0.002	0.027 ± 0.001	0.040 ± 0.001
2,4-decadienal	0.540 ± 0.020	0.359 ± 0.002	0.594 ± 0.012	0.756 ± 0.022	0.808 ± 0.104	0.400 ± 0.006
1-penten-3-ol	0.094 ± 0.011	0.072 ± 0.004	0.093 ± 0.000	0.180 ± 0.007	0.398 ± 0.103	0.984 ± 0.029

nd, no detectado

Tabla 12. Compuestos volátiles identificados en aceite de raya *Rhinoptera bonasus* adicionado con 0.5% de tocoferol.

Compuesto	Concentración durante el tiempo de almacenamiento a 60°C (días)					
	0	7	14	21	28	35
hexanal	0.041 ± 0.002	0.184 ± 0.000	0.080 ± 0.004	0.060 ± 0.001	0.038 ± 0.000	0.022 ± 0.003
2-hexenal	0.005 ± 0.001	0.033 ± 0.000	0.063 ± 0.004	0.015 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.036 ± 0.001
heptaldehído	0.023 ± 0.001	0.011 ± 0.000	0.014 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.005 ± 0.000
2-heptenal	0.008 ± 0.005	0.069 ± 0.001	0.018 ± 0.002	0.057 ± 0.003	0.087 ± 0.003	0.106 ± 0.000
1-octen-3-ol	0.004 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.004 ± 0.000
2-pentylfuran	0.005 ± 0.000	0.030 ± 0.001	0.094 ± 0.014	0.099 ± 0.001	0.087 ± 0.002	0.039 ± 0.022
octaldehído	0.003 ± 0.000	0.013 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.017 ± 0.002	0.015 ± 0.000	0.007 ± 0.004
2,4-heptadienal	nd	0.010 ± 0	0.035 ± 0.002	0.037 ± 0.003	0.027 ± 0.000	0.019 ± 0.004
2-octenal	0.007 ± 0.001	0.073 ± 0.000	0.025 ± 0.000	0.061 ± 0.001	0.120 ± 0.002	0.147 ± 0.001
1-octanal	nd	0.018 ± 0.002	0.014 ± 0.000	0.022 ± 0.000	0.033 ± 0.000	0.028 ± 0.000
nonilaldehído	0.004 ± 0.001	0.014 ± 0.000	0.032 ± 0.000	0.032 ± 0.000	0.022 ± 0.000	0.008 ± 0.000
decanal	0.008 ± 0.000	0.032 ± 0.000	0.032 ± 0.001	0.028 ± 0.001	0.035 ± 0.000	0.054 ± 0.003
etilvinil cetona	0.078 ± 0.004	nd	Nd	nd	nd	nd
2-decenal	0.003 ± 0.000	0.031 ± 0.000	0.038 ± 0.000	0.053 ± 0.001	0.077 ± 0.002	0.098 ± 0.004
2,4-decadienal	0.540 ± 0.020	0.640 ± 0.000	1.126 ± 0.020	1.073 ± 0.029	0.920 ± 0.000	0.404 ± 0.007
1-penten-3-ol	0.094 ± 0.011	0.187 ± 0.001	0.217 ± 0.000	0.344 ± 0.019	0.472 ± 0.000	0.563 ± 0.038

nd, no detectado

VI. CONCLUSIONES

En conclusión la adición de extracto de romero, tocoferol y ácido cafeico al aceite de hígado de raya *Rhinoptera bonasus*, muestra un efecto positivo en la estabilidad oxidativa de dicho aceite, por lo cual pueden ser recomendados como una alternativa para la conservación de dicho aceite.

La actividad antioxidante del extracto de romero, tocoferol y ácido cafeico no aumentó proporcionalmente a su concentración, ya que en todos se observó un efecto pro-oxidante a las concentraciones máximas evaluadas. Los ácidos grasos insaturados EPA y DHA del aceite de raya *Rhinoptera bonasus* fueron significativamente protegidos del deterioro oxidativo con la adición de 2.5% (p/p) para el extracto de romero, 0.5% (p/p) para el tocoferol y 0.06% (p/p) para el ácido cafeico; siendo el extracto de romero el que brindó una mayor protección.

En base a los resultados obtenidos por el método de Schaal, el aceite adicionado con 2.5% (p/p) de extracto de romero tiene un tiempo de vida útil de 2 años y 4 meses, seguido por el tocoferol a 0.5% (p/p) con 2 años y 1 año nueve meses con 0.06% (p/p) de ácido cafeico.

Es posible utilizar la evaluación de compuestos volátiles, utilizando como marcadores para monitorear el proceso oxidativo del aceite, el 2-decenal, 1-penten3-ol y el 2-octanal, donde el deterioro es proporcional a la oxidación.

VII. RECOMENDACIONES

Partiendo de los niveles del extracto de romero, ácido cafeico, y tocoferol que brindaron una mejor protección al aceite de la raya *Rhinoptera bonasus*, investigar cuales serían las concentraciones óptimas para cada uno de dichos antioxidantes.

Levar a cabo un estudio de vida de anaquel, en conjunto con el método de Schaal y de esta forma comparar los resultados obtenidos.

Evaluar concentraciones menores a 2.5% para el extracto de romero, realizando pruebas sensoriales para determinar la concentración que brinde protección al aceite sin provocar cambios sensoriales.

- Adeniyi, O.D. y Bawa, A.A. 2006. Mackerel (*Scomber Scrombrus*) Oil extraction and evaluation as raw materials for industrial utilization. Leonardo Journal of Sciences, Issue 8, January-June, 33-42.
- Alder, J. y Pauly, D. 2008. A comparative assessment of biodiversity, fisheries and aquaculture in 53 countries' Exclusive Economic Zones. Fisheries Centre Research Reports 16(7) 2008.
- Allen, J.C. y Hamilton, R. J. 1999. Rancidity in Foods. Aspen Publisher. Nueva York, EU. 288p.
- Anwar, F. Jamil, A., Iqbal, S. y Sheikh, M.A. 2006. Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunflower oil. Grasas y Aceites, 57: 189-197.
- AOCS. 1998. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. AOCS Press, Champaign, IL.
- Avello, M. y Suwalsky, M. 2006. Radicales Libres, Antioxidantes Naturales y Mecanismos de Protección. Atenea (Concepc.), 494: 161-172.
- Azizkhani, M. y Parvin, Z. 2009. Effects of some natural antioxidants mixtures on margarine stability. World Academy of Science, Engineering and Technology, 49: 93-96.
- Badui-Dergal, S. 2006. Lípidos. p. 211-278. En: Prentice Hall, Madrid, España. Química de los Alimentos.
- Bartee, S.D., Kim, H.J. y Min, D.B. 2007. Effects of antioxidants on the oxidative stability of oils containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic. Journal American Oil Chemistry Society, 84: 363-368.
- Baydar, N.G., Ozkan, G. y Cetin, E.S. 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. Grasas y Aceites, 58: 29-33.
- Belitz H.D. y Grosch W. 1997. Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza, España. 1087p.
- Bera, D., Lahiri, D. y Nag, A. 2006. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. Journal of Food Engineering, 74: 542-545.
- Bergé, J.P. y Barnathan, G. 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. Adv Biochem Engin/Biotechnol, 96, 49-125.

- Bhale, S. D., Xu, Z., Prinyawiwatkul, W., King, J.M. y Godber, J.S. 2007. Oregano and rosemary extracts inhibit oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhaden oil. *Food Chemistry and Toxicology Science*, 72, 9: 504-508.
- Boran, G., Karaçam, H. y Boran, M. 2006. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food Chemistry*, 98: 693-698.
- Burdge, G.C. y Calder, 2005. Alpha-linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age of conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal Lipid Science Technology*, 107: 426- 439.
- Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M., Tamargo, J. y Delpón, E. 2006. Farmacología de los ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología*, 6: 3-19.
- Carelli, A. A., Franco, I. C. y Crapiste, G. H. 2005. Effectiveness of added natural antioxidants in sunflower oil. *Grasas y Aceites*, 56: 303-310.
- Carreras-Ferrer I., 2004. Influencia de la suplementación de antioxidantes y de la administración de enrofloxacin en la calidad y seguridad de la carne de ave. Universidad de Girona . Departamento de Química. 304p.
- Chol, S. P. 2005. Stability and Quality of Fish Oil During Typical Domestic Application. Wonsan university of Fisheries, Korea.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2009. Mazatlán, México. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2009.
- Concha-Moya, G. C. y Vivanco-Lovazzano, J. P. 2006. Evolución de la Rancidez Oxidativa y la Frescura del Músculo del Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) alimentado con dietas adicionadas de Antioxidantes Naturales y Conservado al Estado Congelado (-18°C). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Coppin, E.A. y Pike, O.A. 2001. Oil Stability Index Correlated with Sensory Determination of Oxidative Stability in Light-Exposed Soybean Oil, *Ibid.* 78:13–18.
- Crawford, L., Kretsch, M. J., Guadagni, D. 1976. Identification of volatiles from extracted commercial tuna oil with a high docosahexaenoic acid content. *Journal of Science Food and Agriculture*, 27, 6, 531–5.
- Cruz-Núñez. 2007. Quality and stability of Cuban shark liver oil: comparison with Icelandic cod liver oil. Centro de Investigaciones Pesqueras. Universidad de La Habana Cuba.
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. 2002. Antioxidantes. P 79-114. En: Mundi Prensa. Aditivos alimentarios.
- De Leonardis, A., Macciola, V. 2003. Effectiveness of caffeic acid as an anti-oxidant for cod liver oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 475 – 480.

- Din, J. N., Newby, D. E. y Flapan, A. D. 2004. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *British Medical Journal*, 328: 30-35. Disponible en: http://www.fisheries.ubc.ca/publications/reports/report16_7.php
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., y Merillon, J.M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57: 1768–1774.
- Evans, J. C., Kodali, D. R. y Addis, P. B. 2002. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 47-51.
- Evans, J. C., List, G. R., Moser, H. A. y Cowan, J. C. 1973. Long term storage of soybean and cottonseed salad oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Junio, Vol. 50, 218-222.
- Farag, R.S, Mahmoud, E.A. y Basuny, A.M. 2007. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 107–115.
- Fennema, O.R. 2000. Lipidos. p. 269-382. En: *Acribia, Química de los Alimentos*.
- Fomuso, L. D., Corredig, M. y Akoh, C. C. 2002. Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2957 – 2961.
- Frankel, E. N. 1980. Lipid oxidation. *Pray. Lipid Res. VoL 19*, 1-22.
- Frankel, E. N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality *Food Chemistry*, Vol. 57, No. 1, pp. 51-55.
- Frisenfeldt-Horn, A., Skall-Nielsen, N. y Jacobsen, C. 2008. Additions of caffeic acid, ascorbyl palmitate or -tocopherol to fish oil-enriched energy bars affect lipid oxidation differently. *Food Chemistry*, 112, 412-420.
- Gámez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J. A., Leyva-Carrillo, L., Ortega-García, J., Bringas-Alvarado, L., García, H. S. y Medina-Juárez L.A. 2009. Antioxidant activity comparison of thompson grape pomace extract, rosemary and tocopherols in soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33: 110–120.
- Gámez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Medina-Juárez, L.A., Ortega-García, J., Cázarez-Casanova, R. y Angulo-Guerrero, O. 1999. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76: 1445–1447.

- Girard, B. y Nakai, S. 1993. Species differentiation by multivariate analysis of headspace volatile patterns from canned pacific salmon. *Journal of Aquatic, Food, Production and Technology*, 2, 51-67.
- Gokturk-Baydar, N., Ozkan, G. y Sema-Cetin, E. 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites*, 58: 29-33.
- Gonzalez-Aguilar, G., Gardea, A. A. y Cuamea-Navarro, F. 2005. Uso de antioxidantes para mantener la calidad y prolongar la vida de anaquel. En: Logiprint Digital. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados.
- Graciani-Constante, E., 2006. *Los Aceites y Grasas: Composición y Propiedades*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Grn, I.U., Barbeau, W. E. y Crowther, J. B. 1996. Changes in Headspace Volatiles and Peroxide Values of Undeodorized Menhaden Oil over 20 Weeks of Storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 5, 1190-1194.
- Guadayon J. M., Baquero T. y Caixach J. 1997. Aplicación de las Técnicas de Espacio de Cabeza a la Extracción de los Compuestos Orgánicos Volátiles de la Oleorresina de Pimentón. *Grasas y Aceites Vol. 48. Fase. 1, 1-5*.
- Gunstone, F. D. 2004. *The Chemistry of Oils and Fats- Sources, Composition, Properties and Uses*. CRC Press. 288p.
- Hawrysh, Z.J., Shand, P.J., Tokarska, B. y Lin, C. 1988. *Can. International Journal of Food Science and Technology*, 22, 40.
- Horiuchi, M., Umamo, K. y Shibamoto, T. 1998. Analysis of Volatile Compounds Formed from Fish Oil Heated with Cysteine and Trimethylamine Oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5232-5237.
- Hsieh, T.C.Y., Williams, S.S. , Vejaphan, W. y Meyers, S. P. 1989. Characterization of volatile components of menhaden fish (*Brevoortia tyrannus*) oil. *Journal American Oil Chemistry Society*, 66, 1, 114-117.
- Huang, S. y Frankel, E. 1997. Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3033-3038.
- Huss, H. H. (1998) *Fresh fish quality and quality changes*. Roma, Italia: FAO.
- Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Golay, P.A., Cotting, C., Lardeau, A., y Keely, B.J. 2008. Antioxidant activity of oregano, parsley, and olive mill wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 7151-7159.

- Josephson, D. B.; Lindsay, R. C. 1986. Enzymic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. In *Biogenesis of Aromas*; ACS Symposium Series 317; Parliment, T. H., Croteau, R., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC.
- Kang, S.J., Timmins, M.C.A. y Ackman, R.G. 1998. Similarities in the lipid class profiles of oils from Atlantic and Pacific dogfish livers. *JAOCS*. 75:1667-1672.
- Kanner, J., Rosenthal, I. 1992. An assessment of lipid oxidation in foods. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 64, 12: 1959 – 1964.
- Khan, M.A. y Shahidi, F. 2001. Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry* 75: 431–437.
- Kulås, E. y Ackman, R. G. 2001. Protection of α -tocopherol in nonpurified and purified fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:197-203.
- Kulås, E., Olsen, E. y Ackman, R.G. 2002. Effect of α -, γ -, and δ -tocopherol on the distribution of volatile secondary oxidation products in fish oil. *European Journal Lipid Science Technology*, 104: 520–529.
- Laguerre, M., Lecomte, J. y Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46: 244–282.
- Le Guen, S., Prost, C. y Demaymai, M. 2000. Critical comparison of the three olfactometric methods for the identification of the most potent odorants in cooked mussels (*Mytilus edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1307-1373.
- Le Néchet, S., Dubois, N., Gouygou, J.P. y Bergé, J.P. 2007. Lipid composition of the liver oil of the ray, *Himantura bleekeri*. *Food Chemistry*, 104: 559-564.
- Lee, H., Kizito, S. A., Weese, S. J., Craig-Schmidt, M. C, Lee, Y., Wei, C. I. y An, H. 2003. Analysis of headspace volatiles and oxidized volatiles compounds in DHA-enriched fish oil on accelerated oxidative storage. *Food Chemistry and Toxicology*, Vol. 68, No. 7, 2169-2177.
- Let, M.B., Jacobsen, C., Meyer, A.S. 2007. Ascorbyl palmitate, α -tocopherol and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Food Chemistry*, 55: 2369-2375.
- Lilon, I. Merrill A., Pike O. A., Ogden, L. V. y Dunn, M. L. Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. *Journal American Oil Chemistry Society*, 85: 771–776.

- Lusas, E.W. y Rooney, L.W. 2001. Oils and industrial frying. p. 137-204. En: Crc Press. Snack Foods Processing.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. y Salunke, D.K. 1995. Food Antioxidants. Technological and health perspectives. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. E.U. 479 p.
- Mahan, L. K., Escott-Stump, S. 2001. Nutrición y Dietoterapia de Krause. McGraw-Hill. 1274 p.
- Malcolmson, L.J., Vaisey-Genser, M., Przybylski, R. y Eskin, N.A.M.. 1992. Sensory stability of canola oil: present status of shelf life studies. Journal American Oil Chemistry Society, Vol. 71, No. 4, 435-440.
- Martínez-De la Cuesta, P.J., Rus-Martínez, E. y Galdeano-Chaparro, M. 1995. Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales en presencia de alfa-tocoferol. Grasas y Aceites, 46: 349-353.
- Matthaus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oil seeds. Journal of Agricultural Food Chemistry, 50: 3444-3452.
- Medina, I., González, M. J., Lois, S., Iglesias, J., Maestre, R. y Pazos M. 2008. Antioxidant mechanisms involved in the activity of natural procyanidins in seafood products. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 7 (8): 3315-3319.
- Medina, I., González, M. J., Pazos, M., Medaglia, D. D., Sacchi, R. y Gallardo J. M. 2003. Activity of plant extracts for preserving functional food containing *n*-3-PUFA. European Food Research and Technology. DOI 10.1007/s00217-003-0745-9.
- Medina-Juárez, L. A., Gámez-Meza, N., Ortega-García, J., Noriega-Rodríguez, J. A. y Angulo-Guerrero, O. 2000. Trans fatty acid composition and tocopherol content in vegetable oils produced in México. Journal of the American Oil Chemistry Society, 77, 721-724.
- Méndez, E., Gonzalez, R. M., Inocente, G., Giudice, H., and Grompone, M. A. 1996. Lipid content and fatty acid composition of fillets of six fishes from the Rio de la Plata. Journal of Food Composition and Analysis, 9, 163-170.
- Merrill, L. I., Pike, O. A., Orden, L. V. y Dunn, M.L. 2008. Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. Journal American Oil Chemistry Society, 85: 771-776.
- Mette, B. L., Charlotte, J. y Meyer, A. S. 2005. Sensory stability and oxidation of fish oil enriched milk is affected by milk storage temperature and oil quality. International Dairy Journal, 15: 173-182.

- Miller, D. D., Sangines-Franchini, M. C., Covadonga-Torre, M. 2003. Aceites y Grasas. p. 22-32. En: Editorial de la Universidad de Costa Rica. Química de los Alimentos: manual de laboratorio.
- Moon, J. K. y Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57: 1655–1666.
- Morales, M. T., Rios, J. J. y Aparicio, R. 1997. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2666-2673.
- Moreno-Álvarez, M. J., Guarán, C. Y., Belén-Camacho, D. R., García-Pantaleón, D. y Medina-Martínez, C. A. 2007. Estabilidad del aceite de soja acondicionados con extractos orgánicos de grapefruit (*Citrus paradisis*). *Rev. Fac. Agron*, 24: 709-724.
- Morris, D. H. 2005. Linaza, una recopilación sobre sus efectos en la salud y nutrición. Flax Council of Canada. Disponible en: <http://www.flaxcouncil.ca>
- Murray, R. K, Mayes, P. A., Granner, D.K., y Rodwell, V. 2004. Harper Bioquímica Ilustrada. Manual Moderno. 740 p.
- Navarro-García, G., Bringas-Alvarado, L., Pacheco-Aguilar, R y Ortega-García, J. 2004b. Oxidative resistance, carotenes, tocopherols and lipid profile of liver oil of the ray *Rhinoptera steindachnery*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 699-706.
- Navarro-García, G., Pacheco-Aguilar, R, Bringas-Alvarado, L. y Ortega-García, J. 2004a. Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oil of *Dasyatis brevis* and *Gymnura marmorata* rays. *Food Chemistry*, 87: 89-96.
- Navarro-García, G., Ramírez-Suárez, J. C., Cota-Quñonez, E., Márquez-Farías, F. y Bringas-Alvarado, L. 2010 Storage stability of liver oil from two ray (*Rhinoptera bonasus* y *Aetobatus narinari*) species from the gulf of Mexico. *Food Chemistry*, 119: 1578-1583.
- Navarro-García, G., Ramirez-Suarez, J. C., Ortega-García, J., García-Camarena, R., Márquez-Farías, F., Santos-Valencia, J. y Bringas-Alvarado, L. 2009. Lipid composition, natural antioxidants and physicochemical characteristics in liver oil from rajiforms from the gulf of Mexico. *Journal American Oil Chemistry Society*, 86: 323–328.
- Nawar, W. 1993. Lípidos. Química de los Alimentos, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Nichols, P. D., Bakes, M. J. y Elliott, N. G. 1998. Oils rich in docosahexaenoic acid in livers of fish from temperate Australian waters. *Marine Freshwater Research*, 49, 763-767.
- Noble, A. C. y Nawar, W. W. 1971. The autoxidation of highly unsaturated fatty acids: methyl 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 12, 800–803.

- Noble, A. C. y Nawar, W. W. 1975. Identification of decomposition product from autoxidation of methyl 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52, 3, 92-95.
- Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-029-PESC-2004, Pesca responsable de tiburones y rayas. *Diario Oficial de la Federación*, 29 de Octubre 2004.
- O'Brien, R. D. 2003. Fats and oils analysis. p. 196-199. En: CRC Press. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*.
- O'Sullivan, A., Mayr, A., Shaw, N. B., Murphy, S. C. y Kerry, J. P. 2005. Use of natural antioxidants to stabilize fish oil systems. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 14(3): 75-94.
- Olafsdottir, G., Jonsdottir, R., Lauzon, H. L., Lutén, J. y Kristbergsson, K. 2005. Characterization of Volatile Compounds in Chilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets by Gas Chromatography and Detection of Quality Indicators by an Electronic Nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 26, 10140-10147.
- Olsen, E., Vogt, G., Saarem, K., Greibrokk, T. y Nilsson, A. 2005. Autoxidation of cod liver oil with tocopherol and ascorbyl palmitate. *Journal of American Oil Chemists Society*, 82: 97-103.
- Pal, D., Banerjee, D., Patra, T.K. Patra, A. y Ghosh, A. 1998. Liver lipids and fatty acids of the sting ray *Dasyatis bleekeri*, *Journal of American Oil Chemists Society*, 75, 1373-1378.
- Parazo, M.P.M., Lall, S.P., Castell, J.D. y Ackman, R.G. 1998. Distribution of alpha and gamma tocopherols in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues. *Lipids*, 33:697-704.
- Pazos, M., Alonso, A., Fernandez-Bolan, J., Torres, J. I. y Medina S. 2006. Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil byproducts and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 366-373.
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I. y Medina, I. 2008. Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 3334-3340.
- Pita-Rodríguez, G. 1997. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 11,1,46-57.
- Ramalho, V.C. y Jorge, N. 2008. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas y Aceites*, 59: 128-131.
- Ranken, M. D. 1993. *Manual de Industrias de los Alimentos.*, Acribia S.A., España.

- Richards, A., Wijesundera, C. y Salisbury, P. 2005. Evaluation of oxidative stability of canola oils by headspace analysis. *Journal of American Oil Chemists Society*, 82, 869-874.
- Riziner-Hrasi, A., Hadolin, M., Knez, Z. y Bauman, D. 2000 Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71: 229-233.
- Robards, K., Kerr, A. F., Patsalides, E. 1988. Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods: a review. *Analyst*, 113, 213-224.
- Sayazo, A., Marín, M. I., Aparicio, R. y Morales, M.T. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58: 74-86.
- Schnepf, M.; Spencer, G.; Carlat, J. 1991. Chemical and sensory characteristics of stored menhaden oil/soybean oil blends. *JAOCS*, 68, 281-284.
- Shahidi, F. 1997. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity 379-397. En: AOCS Press. *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*.
- Silva, L., Pinto, J., Carrola, J. y Paiva-Martins, F. 2010. Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry* 121, 1177-1187.
- Siriwardhana, N., Lee, K. W., Kim, S. H., Ha, J. H., Park, G. T. y Jeon, Y. J. 2004. Lipid peroxidation inhibitory effects of *Hizikia fusiformis* methanolic extract on fish oil and linoleic acid. *Food Sci Tech Int*; 10(2): 65-72.
- Steele, R. 2004. *Understanding and Measuring the shelf-life of Food*, CRC Press 2004.
- Stefanovits-Bányai, E., Tulok, M. H., Hegedűs, A., Renner, C. y Szöllősi-Varga, L. 2003. Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biol Szeged*, 47: 111-113.
- Torres-Faran, L. R. 2004. Efecto de la adición de palmitato de ascorbilo en la estabilidad oxidativa de hojuelas de papas, elaboradas con aceite de colza *var.* canola (*Brassica spp*). Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Chile. Tesis Licenciatura.
- Tres-Oliver. 2009. Incorporación de aceites poliinsaturados, alfa tocoferol y minerales en pienso: efectos sobre la composición y oxidación lipídica de plasma, hígado y carne de conejo. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
- Tsimidou, T., Papavergou, E. y Boskou, D. 1995. Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. *Food Research International*, Vol. 28, No. 4, 431-433.
- Val Ould-El Kebir, M., Barnathan, G., Siau, I., Miralles, J. y Gaydou, E. M. 2003. Fatty acid distribution in muscle, liver, and gonad of rays (*Dasyatis marmorata*, *Rhinobatos*

- cemiculus*, and *Rhinoptera marginata*) from the East Tropical Atlantic Ocean. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 1942-1947.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J. y Nieto, S. 2003a. Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention. *Biol Res*, 36: 291-302.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J. y Nieto, S. 2003b. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y Aceites*, 54: 295-303.
- Valenzuela, B. A. y Nieto, M. S. 2001. Docosahexanoic acid (DHA) in fetal development and infant nutrition. *Revista Médica de Chile*, 129, 10: 1203-1211.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F. y Amarowicz R. 1998. Effect of processing on constituents and oxidative stability of marine oils. *Journal of Food Lipids*, 5, 29-41.
- Widlak, N. 2000. High Stability oils: What are they? How are They made? Why do we need them?. p 238- 248. En: AOCS press. *Physical properties of fats oils and emulsifiers*.
- Williams, C. M. y Burdge, G. 2006. Long-chain n-3 PUFA: plant vs. marine sources. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65: 42-50.
- Yin, H., Sathivel, S. 2010. Physical properties and oxidation rates of unrefined menhaden oil (*Brevoortia patronus*). *Journal of Food Science*, 75, 163-168.