

Determinación preliminar de productos de degradación formados por auto-oxidación del extracto lipídico de *Roystonea regia*

Roxana Vicente-Murillo, Eduardo A. Rodríguez-Leyes, David Marrero-Delange, Víctor L. González-Canavaciolo, Roxana de la C. Sierra-Pérez y Carmen L. Morales-Rico.

Centro de Productos Naturales del Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ave 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apdo. Postal: 6414, La Habana, Cuba e-mail: roxana.vicente@cnic.edu.cu

Recibido: 13 de noviembre de 2015. Aceptado: 9 de marzo de 2016.

Palabras clave: extracto lipídico, productos de degradación, ácidos grasos, *Roystonea regia*.
Key words: lipid extract, degradation products, fatty acids, *Roystonea regia*.

RESUMEN. Los ácidos grasos (AG) insaturados se degradan generando un sinnúmero de compuestos, de ahí que el estudio de este fenómeno resulte de elevada complejidad. De los frutos de la palma real cubana, se obtiene un extracto lipídico compuesto principalmente por una mezcla de AG libres entre 8 y 18 átomos de carbono, con posibles aplicaciones como nutracéutico y medicamento. En esta mezcla, la presencia de AG insaturados como oleico y linoleico, pudiera provocar procesos de auto-oxidación que afecten su eficacia y seguridad. Teniendo en cuenta que hasta el presente se desconocen los productos de la auto-oxidación del extracto lipídico de *R. regia*, en el presente trabajo se determinaron sus productos de degradación formados por oxidación, fotólisis y termólisis. Se determinaron las características organolépticas, índices de peróxido (IP) y de ácido tiobarbitúrico (IATB), y contenidos de dienos conjugados (DC) y AG a muestras del extracto sometidas a oxidación (peróxido de hidrógeno), fotólisis (luz UV) y termólisis (80 °C y 185 °C), y sus resultados se compararon con los de una muestra sin degradar. Se determinó que la oxidación fue la que provocó la mayor degradación de los AG insaturados, así como los mayores IP, mientras que la termólisis fue la que conllevó a mayores contenidos de IATB y DC. Lo anterior evidencia que las condiciones de estrés impuestas lograron la degradación del extracto, de manera similar a lo que ocurre en los aceites vegetales con bajos contenidos de AG poliinsaturados, determinándose de manera preliminar, los principales grupos de compuestos generados a partir de la degradación forzada del extracto lipídico de *Roystonea regia*.

ABSTRACT. The unsaturated fatty acids (FA) are degraded generating a high number of compounds, hence the study of this phenomenon resulting from high complexity. From the Cuban royal palm fruits, a lipid extract mainly compound by a mixture of free FA between 8 and 18 carbon atoms, with possible applications as nutraceutical and/or medicine is obtained. In this mixture, the presence of unsaturated FA like oleic and linoleic, could provoke autoxidation processes that affect their efficacy and safety. Taking to account that autoxidation products from *R. regia* lipid extract are unknown until now, in this paper its degradation products formed by oxidation, photolysis and thermolysis were determined. The organoleptic characteristics, peroxide (PV) and tiobarbituric acid values (TBAV), and contents of conjugated dienes (CD) and FA contents were determined in samples of the extract subjected to oxidation (hydrogen peroxide), photolysis (UV light) and thermolysis (80 °C and 185 °C), and their results were compared with those of a sample without degradation. It was determined that the oxidation was the one that caused the biggest degradation in the unsaturated FA, as well as the biggest PV, while the thermolysis went the one that bore to bigger contents of TBAV and CD. The above-mentioned evidences that the imposed stress conditions achieved the degradation of the extract, in a similar way that its happens in the vegetable oils with low contents of polyunsaturated FA, achieving preliminarily determine, so the main groups of compounds generated from the forced degradation of *Roystonea regia* lipid extract.

INTRODUCCIÓN

Los aceites sufren cambios en la composición química que afectan su valor nutritivo y sus propiedades organolépticas, además de provocar efectos adversos sobre la salud. Dentro de estos cambios se encuentra la auto-oxidación, la cual es responsable en gran medida del efecto conocido como rancidez.¹⁻⁴ La auto-oxidación depende

del tipo y contenido de ácidos grasos (AG) insaturados presentes en los aceites; así como de otros factores tales como la concentración de oxígeno, la temperatura, la presencia de metales de transición y la luz.^{1,2} En la auto-oxidación, los AG insaturados se degradan generando un sinnúmero de compuestos, de ahí que el estudio de este fenómeno resulte de elevada complejidad.¹⁻⁵

Muchos métodos han sido desarrollados para determinar el grado de auto-oxidación en los aceites. Entre las determinaciones más utilizadas se encuentran las de los índices de peróxidos (IP) y de ácido tiobarbitúrico (IATB); así como, las de dienos conjugados (DC) y AG.¹⁻⁵ Cada método presenta sus ventajas y desventajas, por lo que es importante seleccionar el más adecuado en función de la matriz investigada y de su grado de oxidación.¹⁻³

De los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia* [Kunth] O. F. Cook), se obtiene un extracto lipídico compuesto principalmente por una mezcla de AG libres entre 8 y 18 átomos de carbono,⁶ con posibles aplicaciones como nutracéutico y medicamento.^{7,8} En esta mezcla, la presencia de AG insaturados como palmitoleico, oleico y linoleico, pudiera propiciar la ocurrencia de procesos de auto-oxidación que afecten su eficacia y seguridad. Teniendo en cuenta que hasta el presente se desconocen los productos de la auto-oxidación de este extracto lipídico, en el presente trabajo se determinaron los principales grupos de compuestos generados a partir de la degradación forzada del extracto lipídico de *Roystonea regia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó el lote E-0115 de extracto lipídico (86,4 % de AG totales), obtenido a escala piloto en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba. En los análisis se emplearon reactivos y disolventes (Merck, Alemania y Sigma-Aldrich, EE. UU.), puros para análisis.

Degradación de las muestras

Oxidación: Se añadieron 20 mL de extracto y 50 mL de peróxido de hidrógeno al 30% en tres frascos de vidrio. Se cerraron y se agitaron vigorosamente. Los frascos se envolvieron en papel de aluminio y se guardaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente por siete días, durante los cuales se agitaron diariamente en zaranda por 4 h. Transcurrido este tiempo, los contenidos de los frascos se trasvasaron a embudos separadores con 30 mL de hexano, se agitaron vigorosamente durante 5 min y se separaron las fases. Se recolectaron las fracciones orgánicas y las acuosas se volvieron a extraer con 30 mL de hexano. Esta operación se repitió dos veces. Finalmente, las fases acuosas se desecharon y a las orgánicas se les adicionó sulfato de sodio anhidro, se agitaron, se dejaron en reposo hasta el día siguiente, se filtraron hacia balones y se les eliminó el disolvente a 55 °C con presión reducida. Las muestras se conservaron para su análisis posterior.

Fotólisis: Se añadieron 50 mL de extracto en dos frascos de vidrio y se cerraron herméticamente. Se expusieron a la luz solar directa durante siete días. Transcurrido este tiempo las muestras se analizaron.

Termólisis: Se añadieron 50 mL de extracto en cuatro frascos de vidrio y se cerraron herméticamente. Se colocaron dos frascos en una estufa a 80 °C y los otros dos en otra estufa a 185 °C, durante siete días. Transcurrido este tiempo las muestras se analizaron.

Evaluación de las características organolépticas

Se evaluaron las características organolépticas de las muestras degradadas y sin degradar atendiendo a su apariencia, color y olor.

Determinación del contenido de ácidos grasos

Se determinó para muestras degradadas y sin degradar, por cromatografía de gases, según metodología descrita por Sierra y col.⁹

Determinación del índice de peróxido

Se determinó para muestras degradadas y sin degradar, a partir de 5 g de muestra, según metodología descrita por Loyola y col.¹⁰

Determinación de dienos conjugados

Se pesaron aproximadamente 25 mg de la muestra degradada por termólisis a 80 °C en un matraz de 50 mL, y en otro la misma cantidad de muestra sin degradar. Ambas muestras, se disolvieron con 10 mL de metanol, se agitaron de manera circular y se enrasaron con el mismo disolvente. Se determinó para cada muestra el espectro de absorción ultravioleta (UV) en un espectrofotómetro UV-Visible *Genesys 10*, desde 200 nm hasta 310 nm. Se repitió la experiencia anterior empleando hexano y ciclohexano como disolventes del extracto lipídico.

Se prepararon todas las muestras degradadas y sin degradar de la manera descrita anteriormente, empleando hexano como disolvente y se midieron las absorbancias a 232 nm. Los análisis se realizaron por triplicado y el contenido de DC (%) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$DC = 0,84 \times \left(\frac{A}{c} - K_0 \right)$$

Donde:

DC. contenido de dienos conjugados (%), A: absorbancia de la muestra a 232 nm, c: concentración de la muestra (g/L), K_0 . absortividad correspondiente al enlace ácido (0,03).

Determinación del índice del ácido tiobarbitúrico

Se determinó para muestras degradadas y sin degradar, a partir de 200 mg de muestra, según método 2.531 de la *International Union of Pure and Applied Chemistry*.¹¹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características organolépticas

Las muestras sometidas a fotólisis y termólisis a 80 °C presentaron un color pardo similar al del extracto lipídico de *R. regia* sin degradar, mientras que las sometidas a oxidación y termólisis a 185 °C cambiaron a amarillo y pardo oscuro, respectivamente (Fig. 1). Además, se pudo observar que las muestras sometidas a termólisis no eran translúcidas como el resto sino opacas, sobre todo la expuesta a mayor temperatura. Por otra parte, el olor de las muestras oxidadas y las calentadas a 80 °C fue similar al del extracto lipídico, pero menos intenso, mientras que las sometidas a fotólisis y termólisis a 185 °C presentaron un olor rancio, sobre todo esta última. La percepción de un olor rancio y el oscurecimiento, tal y como ocurrió con la muestra sometida a 185 °C, son cambios que caracterizan los procesos de degradación de los aceites expuestos a elevadas temperaturas.^{2,4} En resumen, en todas las muestras sometidas a condiciones de estrés variaron las características organolépticas del extracto, lo que evidencia la ocurrencia de reacciones químicas.

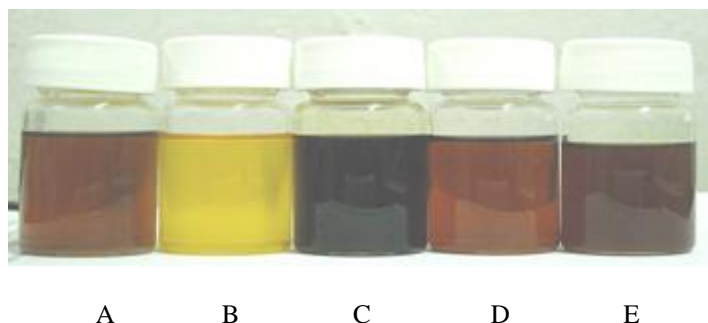


Fig. 1. Coloración tomada por las muestras de extracto lipídico de *R. regia* sin degradar (A) y degradadas mediante oxidación (B), termólisis a 185 °C (C), fotólisis (D) y termólisis a 80 °C (E).

Contenido de ácidos grasos

El contenido de AG (86,4 %) se afectó más en las muestras degradadas por la oxidación, con una disminución del 12 %, seguido de la fotólisis y la termólisis a 185 °C, con 6 %. En la termólisis a 80 °C, el contenido de AG sufrió una ligera afectación inferior al 3 % (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con los de investigaciones previas realizadas con este extracto lipídico, bajo condiciones de estrés, en las que la oxidación fue el proceso de degradación que más afectó el contenido de AG.¹² A su vez, en el presente estudio la fotólisis mostró mayor efecto de degradación que en experiencias previas,¹² debido probablemente a que las muestras estuvieron siete días expuestas a los rayos del sol, lo cual también provocó un aumento de su temperatura.

Las afectaciones encontradas estuvieron dadas por disminuciones en el contenido de los AG insaturados. De estos, el linoleico fue el que más se afectó, con una disminución en su contenido de alrededor de un 40 % en las muestras sometidas a oxidación, seguido del oleico con alrededor de un 20 %. Este comportamiento concuerda con lo planteado por otros autores, quienes han planteado que los AG con mayor número de insaturaciones son los más susceptibles a experimentar procesos de auto-oxidación, por lo que, a mayor contenido de AG poliinsaturados, mayores probabilidades de que se degrade el aceite.¹⁻⁵

La disminución observada en el contenido de AG insaturados de las muestras sometidas a degradación, confirmó la suposición hecha a partir de los cambios observados en las características organolépticas, sobre la auto-oxidación del extracto.

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos (%) en muestras del extracto lipídico de *R. regia* sin degradar y degradadas.

Ácidos	Sin degradar	Degradadas			
		Fotólisis	Oxidación	Termólisis a 80°C	Termólisis a 185°C
C8:0	1,8	1,8	1,7	1,8	1,8
C10:0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
C12:0	25,7	25,2	25,0	25,7	25,4
C14:0	11,7	11,2	11,2	11,5	11,3
C16:0	10,3	10,1	10,0	9,9	9,8
C16:1	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3
C18:0	2,3	2,2	2,2	2,2	2,2
C18:1	26,5	23,2	21,5	24,6	23,8
C18:2	6,8	5,9	4,3	6,3	5,5
Total	86,4	80,9	77,0	83,2	81,0

Índice de peróxido

El extracto sin degradar presentó un IP de 9,7 mEq de O₂ activo/kg, mientras que el de las muestras degradadas fue inferior, con excepción de la muestra oxidada, cuyo índice fue muy superior (Tabla 2). El índice del extracto sin degradar superó el límite establecido para el aceite refinado de la pulpa del fruto de la palma *E. guineensis* (5 mEq de O₂ activo/Kg);¹³ pero a su vez, no sobrepasó el establecido para el aceite refinado obtenido de la semilla de esta especie (10 mEq de O₂ activo/Kg).¹³ Lo anterior no resulta contradictorio pues cada aceite presenta su propio IP, y en el caso que nos ocupa, es la primera vez que se determina el IP del extracto lipídico obtenido de los frutos maduros de *R. regia*.

La diferencia entre los IP de las muestras degradadas y el de la muestra sin degradar confirma que ocurrió la auto-oxidación del extracto lipídico en las condiciones de estrés aplicadas. Los bajos índices determinados en las muestras sometidas a termólisis y fotólisis indican la descomposición de los hidroperóxidos en otros compuestos, por lo que la reacción se encuentra en una fase más avanzada.¹⁻³ Por su parte, el elevado IP encontrado en la muestra oxidada es indicativo de una alta presencia de peróxidos e hidroperóxidos, por lo que en este caso la reacción se encuentra en la etapa inicial de la auto-oxidación.¹⁻³ Un comportamiento similar se ha observado en investigaciones realizadas con aceite de girasol, el cual ha presentado elevados IP luego de sufrir procesos de auto-oxidación.¹⁴

Tabla 2. Índice de peróxido (mEq de oxígeno activo/kg) en muestras del extracto lipídico de *R. regia* sin degradar y degradadas.

Muestras	IP	DE
Extracto lipídico	9,7	0,15
Fotólisis	2,7	0,07
Oxidación	112,4	0,09
Termólisis a 80 °C	0,4	0,01
Termólisis a 185 °C	0,8	0,13

Dienos conjugados

El disolvente empleado en esta determinación depende en gran medida de la matriz a analizar,² por lo que en el análisis de esta nueva matriz se realizó un primer experimento con tres de los disolventes más usados (metanol, hexano y ciclohexano), y se procedió a evaluar los máximos de absorción como criterio de selección. Al evaluar los espectros obtenidos con los diferentes disolventes (Fig. 2), se pudo apreciar que solamente en la muestra preparada con hexano apareció claramente un máximo de absorción a los 232 nm (longitud de onda a la que absorben los dienos conjugados), por lo que se empleó este disolvente para preparar las demás muestras del extracto lipídico de *R. regia*.

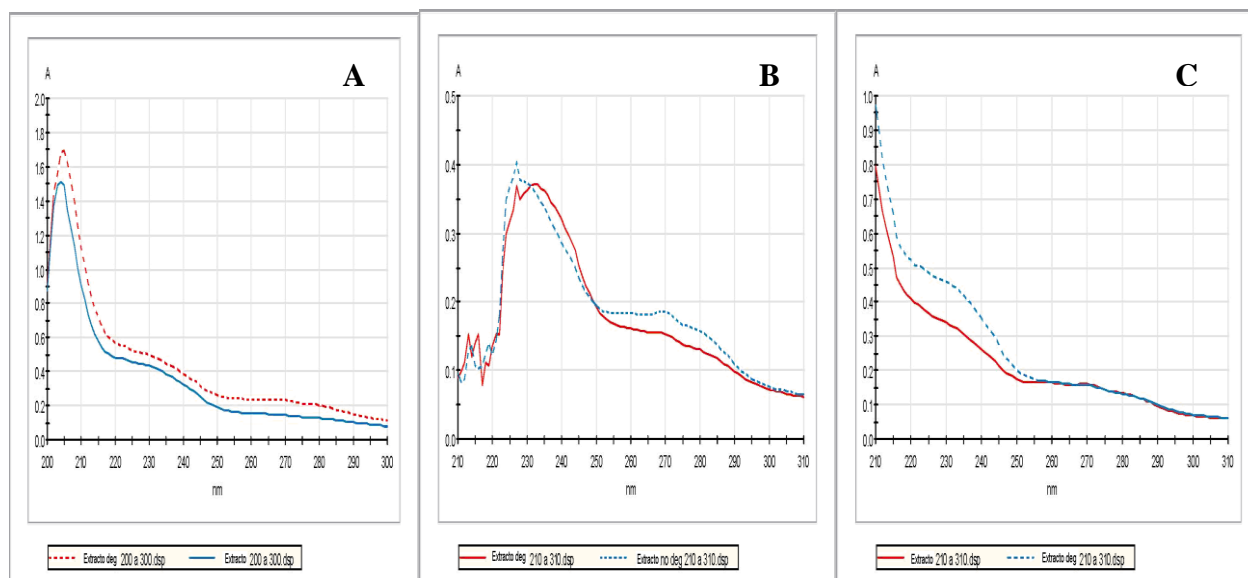


Fig. 2. Espectros del extracto lipídico de *R. regia* disuelto en metanol (A), hexano (B) y ciclohexano (C).

Al aplicar esta determinación a las muestras, se pudo observar que el porcentaje de dienos conjugados del extracto lipídico aumentó después de aplicar diferentes condiciones estrés (Tabla 3). El aumento del contenido de DC, compuestos formados por la descomposición de los AG insaturados, confirmó la auto-oxidación del extracto lipídico. Este resultado concuerda con lo observado en otras matrices lipídicas, las cuales han presentado un incremento en la absorbancia a 232 nm, luego de haberse auto-oxidado. Es por ello que esta determinación es muy utilizada para medir los cambios sufridos por los aceites cuando se calientan.¹⁻⁵

Tabla 3. Dienos conjugados (%) en muestras de extracto lipídico de *R. regia* sin degradar y degradadas.

Muestra	DC (%)	DE
Extracto lipídico	0,5	0,011
Fotólisis	1,3	0,063
Oxidación	1,1	0,003
Termólisis a 80°C	1,2	0,004
Termólisis a 185°C	1,3	0,270

Índice del ácido tiobarbitúrico

Al realizar este ensayo se pudo determinar que la muestra sin degradar presentó un IATB de 0,012 mg⁻¹. Este resultado fue muy similar al encontrado en las muestras degradadas por fotólisis y termólisis a 80 °C, no ocurriendo lo mismo en la sometida a termólisis a 185 °C, la cual presentó el mayor índice, seguido del de la muestra oxidada (Tabla 4). A pesar de que los índices obtenidos pueden considerarse bajos, hubo un ligero incremento con relación a la muestra sin degradar. Este incremento, de manera más marcada, se ha observado en investigaciones realizadas con mayonesas enriquecidas con aceite de pescado, cuyos IATB, de 0,025 mg⁻¹ a tiempo cero, aumentaron hasta 0,47 mg⁻¹ después de 30 d de almacenaje a 30 °C.¹⁵ El comportamiento observado para el IATB en esta nueva matriz, confirma que su determinación no es un parámetro suficientemente sensible para evaluar el grado de degradación del extracto lipídico de *R. regia*, debido a su bajo contenido de AG poliinsaturados.

Tabla 4. Índice de ácido tiobarbitúrico (mg⁻¹) en muestras de extracto lipídico de *R. regia* sin degradar y degradadas.

Muestra	IATB	DE
Extracto lipídico	0,012	0,000 5
Fotólisis	0,013	0,000 3
Oxidación	0,015	0,000 5
Termólisis a 80°C	0,013	0,000 3
Termólisis a 185°C	0,028	0,001 2

Discusión general

Las condiciones de estrés impuestas al extracto lipídico de *R. regia* provocaron su degradación. Lo anterior se pudo constatar por la disminución del contenido de AG insaturados, así como por la determinación de hidroperóxidos, dienos conjugados y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, compuestos formados usualmente por la oxidación primaria y secundaria de los lípidos. Estos resultados fueron lógicos y consecuentes con las condiciones de estrés empleadas, estando en concordancia con lo informado en la literatura para aceites degradados con bajos contenidos de AG poliinsaturados.^{1,2} Por otra parte, la presencia de hidroperóxidos, dienos conjugados y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en el extracto lipídico sin degradar, fue similar al encontrado en los aceites vegetales recién obtenidos.^{1-5,14}

De las condiciones de estrés aplicadas, la oxidación fue la que provocó la mayor degradación del extracto lipídico de *R. regia*, debido a que se obtuvieron los menores contenidos de AG insaturados, así como los mayores IP; seguido de la termólisis a 185 °C la cual conllevó a los mayores contenidos de IATB y DC. Estos resultados confirman la complejidad de la auto-oxidación de los AG, proceso ampliamente discutido por varios autores, algunos de los cuales plantean una relación directa entre los aumentos de IP y del porcentaje de DC,^{2,14} mientras otros aseguran que no existe proporcionalidad entre los aumentos de ambos parámetros en el transcurso del tiempo,⁵ por lo que no siempre resulta posible correlacionar estas determinaciones.

CONCLUSIONES

Se determinaron, de manera preliminar, los principales grupos de compuestos generados a partir de la degradación forzada del extracto lipídico de *Roystonea regia*, a través de la determinación de los contenidos de AG y dienos conjugados; así como, de los índices de peróxido y ácido tiobarbitúrico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. Copyright # 2005 John Wiley & Sons, Inc.
2. Navas JA. Optimización y control de la calidad y estabilidad de aceites y productos de fritura [Tesis doctoral] Universidad de Barcelona; 2005.
3. Morales MT. Toxicología alimentaria. Grasas y aceites alimentarios. Ediciones Díaz Santos. ISBN 978-84-9969-208-1. Disponible en URL: www.diazdesantos.com.es o edicciones@diazdesantos.es. Accedido marzo 2015.
4. Frankel EN 1998a. Lipid oxidation. The Oily Press Ltd., Glasgow, UK, pp. 79-98.
5. Massons L, Robert P, Romero N, Izaurieta M, Valenzuela S, Ortiz J *et al.* Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. Grasas y Aceites. 1997; Vol. 48. Fase. 5: 273-81.
6. González VL, Rodríguez EA, Sierra RC, Marrero D, Vicente R. Estudios de estabilidad preformulación del ingrediente activo D-004. Revista CENIC Ciencias Químicas. 2010; 41(No. Especial).
7. Guzmán R, Illnait J, Mas R, Pérez Y, Fernández L, Mendoza S, *et al.* Comparative effects of *Roystonea regia* (D-004) and *Saw palmetto* lipid extracts on blood oxidative variables in men with benign prostate hyperplasia (BPH). IOSR PHR. 2013;3(7):1-8.
8. Guzmán R, Fragas R, Illnait J, Mas R, Fernández L, Pedroso M, *et al.* Effects of *Roystonea regia* (D-004) and *Saw palmetto* lipid extracts in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. IOSR PHR. 2013; 3(6):7-14.
9. Sierra R, Rodríguez EA, Marrero D, González V, Vicente R. Revalidación de la metodología de determinación de los ácidos grasos que componen el D004 ingrediente activo con columna capilar polar. Rev. CENIC Ciencias Químicas. 2010;41(No especial).
10. International Union of Pure and Applied Chemistry Applied Chemistry Division Commission on Oils, Fats and Derivatives. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 1st Supplement to the 7th Edition. Blackwell. SCIENTIFIC PUBLICATIONS. Oxford, 1987.
11. Loyola N, López R, Acuña C. Evaluación sensorial y analítica de la calidad de aceite de oliva extravirgen. IDESIA. 2008;26(2):27-44.
12. Rodríguez EA, Marrero D, González V, Sierra R, Adames Y. Validación de un método por Cromatografía de Gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo. Rev. CENIC Ciencias Químicas. 2009;40(1):17-22.
13. USP35: United States Pharmacopoeia 35 and National Formulary 30, Supplement 1 (Monograph on CD-ROM). The United States Pharmacopeial Convention, Inc. USA, 2012.
14. Marmesat S, Morales A, Velasco J, Ruiz-Méndez MV, Dobarganes MC. Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. Grasas y Aceites. 2009;60(2):155-160.

15. Tananuwong K, Tewaruth W. Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. *LWT - Food Science and Technology*. 2010;43:476–81.