

ALFA TOCOFEROL Y SU EFECTO SINÉRGICO SOBRE LA OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA PIEL DE SARDINA

ALPHA TOCOPHEROL AND ITS SYNERGIC EFFECT ON THE OXIDATION OF THE LIPIDS OF SARDINE SKIN

Rodolfo Vicetti, Takasuke Ishitani, Alberto Salas, María E. Ayala

Dirección de Investigaciones. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú.

Carretera a Ventanilla km. 5,2 Callao. asalas@itp.org.pe

RESUMEN

VICETTI R, ISHITANI T, SALAS A y AYALA M E. 2003. *Alfa Tocoferol y su efecto sinérgico sobre la oxidación de los lípidos de la piel de sardina*. Bol. Inv. Ins. Tec. Pes. Perú 5: 47-52.- Se determinó la efectividad de alfa-Tocoferol (T) en concentraciones de 0,01 %, 0,1 %, 1,0 % y 10 %; combinado con la acción sinérgica de Lecitina (L) y Ácido Ascórbico (AA). Las evaluaciones se llevaron a cabo en un sistema modelo de lípidos extraídos de piel de sardina (*Sardinops melanosticta*). El curso de la oxidación fue evaluado midiendo la absorción de oxígeno (mmol de O₂/kg lípidos), las muestras se incubaron a 40 °C en recipientes cerrados y protegidos de la luz. La combinación más efectiva fue 0,01 % T + 0,5 % L + 0,05 % AA, tratamiento que prolongó la fase de inducción durante 14 días. Altas concentraciones de T favorecieron la oxidación. La adición de 5 % L fue efectiva en retardar la oxidación, pero afectó drásticamente el color de las muestras. La aplicación de 0,01 % T, sólo prolongó el periodo de inducción por 4 días, resultado similar al obtenido con otros antioxidantes comerciales (erisorbato de sodio, BHA y TBHQ). Esto sugiere que la combinación de estos antioxidantes con los sinérgicos, L y AA, podría prolongar el periodo de inducción.

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes, sinérgicos, tocoferol, lecitina, ácido ascórbico, lípidos, sardina.

ABSTRACT

VICETTI R, ISHITANI T, SALAS A and AYALA M E. 2003. *Alpha Tocopherol and its synergic effect on the oxidation of the lipids of sardine skin*. Bol. Inv. Ins. Tec. Pes. Perú 5: 47-52.- Alpha tocopherol (T) effectiveness was assayed at 0,01 %, 0,1 %, 1,0 % y 10 % concentrations, combined with lecithin (L) and ascorbic acid (AA). Tests were carried out in a sardine (*Sardinops melanosticta*) skin lipids model system. Oxidation was evaluated by oxygen absorption measure (mmol O₂/ kg lipid), samples were incubated at 40 °C in closed and light protected recipients. The most effective concentration was 0,01 % T + 0,5 % L + 0,05 % AA treatment that prolonged the induction phase for 14 days. Higher T concentrations favoured oxidation. 5 % L adding was effective at retarding oxidation but affected drastically the color of the samples; 0,01 % T just extended the induction period for 4 days, which was also observed when using other commercial antioxidants such as sodium erithorbate, BHA and TBHQ. This suggests that a longer induction period could be obtained by combining T with the synergists used.

KEYWORDS: Antioxidants, synergists, tocopherol, lecithin, ascorbic acid, lipids, sardine

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los lípidos de la piel de la sardina son más susceptibles a

la oxidación^{19, 20}, lo cual también es característico en otras especies de peces marinos grasos; una de las causas es el alto contenido de ácidos grasos poliinsatura-

dos, y además el bajo contenido de fosfolípidos ^{9, 21}.

La fase de propagación de la oxidación involucra reacciones en cadena de los radicales libres. Para reducir la velocidad de oxidación, es muy común el uso de antioxidantes, cuya función es capturar los radicales libres reduciendo de esta forma la oxidación. La efectividad de un antioxidante está relacionada a su capacidad de capturar radicales libres, así como su solubilidad en el sistema lipídico. Su actividad puede ser incrementada a través de algunas sustancias denominadas sinérgicas. Algunas de ellas son capaces de regenerar el antioxidante a su estado original; y otras pueden unirse a los elementos metálicos, evitando de esta forma que actúen como catalizadores de la oxidación.

Entre los antioxidantes liposolubles considerados más efectivos tenemos al butil hidroxianisol (BHA) y al ter-butilhidroquinona (TBHQ) ²¹. Al haberse registrado algunos efectos adversos del BHA, la tendencia para explorar antioxidantes naturales se incrementó, y el alfa Tocoferol resultó ser el más estudiado. La efectividad del alfa Tocoferol, antioxidante natural, ha sido demostrada en sistemas modelos ⁴, y presenta sinergismo con la vitamina C en soluciones homogéneas, después de disolver esta vitamina en propilenglicol o por medio de miscelas reversas ²¹. También se ha observado que los fosfolípidos muestran sinergismo siendo la fosfatidil-etanol-amina más efectiva que la fosfatidil-colina⁷; sin embargo, la última es más asequible comercialmente.

La principal razón de añadir antioxidantes a los lípidos es para prevenir la acumulación de radicales libres. El mecanismo de los antioxidantes fenólicos ⁶ y del alfa-Tocoferol ⁴, así como también su efectividad para estabilizar materiales lipídicos es bien conocido. La inestabilidad de los lípidos marinos altamente insaturados es debido, en parte, a la escasez de bloqueadores de radicales libres, como es el caso de la vitamina E y fosfolípidos ^{7, 4}. Esta inestabilidad hace a los lípidos marinos un material apropiado para evaluar la efectividad de diferentes antioxidantes.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de alfa-Tocoferol solo y combinado con sustancias sinérgicas, sobre el grado de oxidación de los lípidos de la piel de sardina como un sistema modelo.

Además, se comparó el efecto del antioxidante en mención con antioxidantes comerciales (BHA y TBHQ).

Se espera que los resultados obtenidos sean útiles para el diseño de un sistema antioxidante aplicado especialmente en aceites o pulpa de pescado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de lípidos

Especímenes de sardinas *Sardinops melanosticta* en condición *pre-rigor mortis*, fueron utilizados en el presente estudio. Los lípidos fueron extraídos del tejido subcutáneo, utilizando el método BLIGH ². La fase orgánica fue concentrada y, después de saturarla con nitrógeno, fue almacenada a -20 °C en tubos de prueba cubiertos con papel aluminio. En las muestras, el solvente fue eliminado por evaporación al vacío, utilizando un desecador colocado en una estufa a 50 °C durante seis horas.

Preparación de las muestras

El alfa Tocoferol (T) fue añadido a las muestras y se evaluó en dos formas: (1) sin sinérgicos, una solución al 10 % fue preparada y luego diluida hasta obtener diluciones decimales de 1 %; 0,1 % y 0,01 %; (2) con sinérgicos, diluyendo T en cloroformo junto con Lecitina (L) y ácido ascórbico (AA), este último fue disuelto previamente en propilenglicol.

BHA y TBHQ fueron disueltos en cloroformo. El erisorbato de sodio (E) utilizado fue previamente disuelto en propilenglicol.

Para asegurar la uniformidad de las muestras, los antioxidantes fueron disueltos utilizando un baño ultrasónico por cinco minutos. El solvente fue eliminado por medio de un desecador al vacío.

Diseño del experimento

El antioxidante T fue evaluado en cuatro concentraciones: 0,01 %; 0,1 %, 1 % y 10 %, con la finalidad de encontrar el nivel más apropiado para prolongar la etapa de inducción en la oxidación de las muestras.

Posteriormente, esta concentración fue comparada con otros antioxidantes comerciales: 0,02 % butilhidroxianisól (BHA); 0,02 % ter-butilhidroxiquinona (TBHQ) y 0,01 % erisorbato de sodio (E).

Las sustancias sinérgicas a ser combinadas con T fueron evaluadas previamente en forma individual, en las siguientes concentraciones: 0,5 % L; 5 % L; 0,01 % AA; 0,05 % AA.

El efecto sinérgico de 0,5 % L + 0,05 % AA fue evaluado en combinación con 0,01 %, 0,1 %, 1 % y 10 % T.

Todas las pruebas se efectuaron por duplicado, en ausencia de luz y a 40 °C de temperatura. Una muestra en blanco fue llevada a cabo para todos los casos.

Método de evaluación

La oxidación fue medida por medio de la absorción de oxígeno. Se colocaron 0,5 gramos de muestra de aceite dentro de un cilindro de 47 mm de diámetro interno con un volumen total de aproximadamente 150 mL. La temperatura de incubación fue de 40 °C en oscuridad.

El contenido de oxígeno fue medido tomando una muestra de 0,2 mL de los cilindros bajo condiciones de agitación. Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Hitachi 163 con detector de conductancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición de los ácidos grasos de los lípidos de la piel en la sardina fue 37,7 % de saturados; 28,7 % de monoinsaturados y 35,6 % de poliinsaturados. El 22,8 % del contenido total de ácidos grasos estuvo representado por C20:5 y C22:6 y es menor comparado con el músculo de la sardina peruana (*Sardinops sagax sagax*)¹⁸.

Valores de oxígeno menores a 200 mmoles O₂/kg fueron considerados dentro del período de inducción de la oxidación. El incremento de la absorción de oxígeno por encima del valor mencionado, refleja el desarrollo de la oxidación.

Efecto del alfa Tocoferol

Se observó una relación directa entre la concentración del antioxidante y la estabilidad de los lípidos. A 0,1 % T, el período de inducción se duplicó comparado con el tratamiento a 0,01 % T, el cual mantuvo las muestras sin mayor cambio hasta los 4 días, y se considera el más apropiado (Figura 1).

Es interesante mencionar el comportamiento a concentraciones de 1 % T y 10 % T. Aun cuando los valores de oxidación de las muestras no aumentaron drásticamente, se produjo un incremento lento y progresivo, posiblemente debido a un efecto prooxidante. Un fenómeno similar ha sido registrado cuando se añade 1 % T en metil linoleato¹⁶.

Aunque el mecanismo exacto no se conoce, ha sido sugerido que después de la reacción de T con un radical libre, la parte funcional de este antioxidante se transforma en un compuesto radical llamado "cromanoxi", el cual puede tomar un átomo de hidrógeno proveniente de un grupo metilénico activo de una molécula no oxidada¹⁶. De esta manera T podría volver a su forma original, pero se iniciaría la oxidación, una reacción cíclica, por medio de los radicales de tocoferoles, resultando en una formación continua de hidroperóxidos.

Para prevenir el efecto prooxidante de T, se ha recomendado la adición de pequeñas cantidades de ácido ascórbico como agente reductor^{14, 17}. Adicionalmente se ha registrado el efecto sinérgico de los fosfolípidos con T^{7, 11, 8}. En el caso de los fosfolípidos, no se ha establecido el mecanismo sinérgico con T; se ha sugerido que las cadenas de ácidos grasos no participan, debido a que moléculas de fosfolípidos, con diferentes residuos de ácidos grasos tienen el mismo efecto¹.

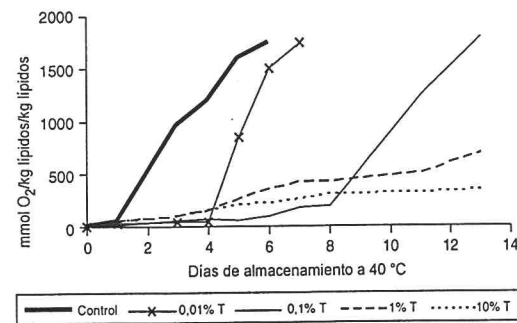


Figura 1. Absorción del oxígeno en los lípidos de la piel de sardina tratadas con tocoferol

Se ha determinado que los fosfolípidos son responsables de la descomposición de hidroperóxidos con la formación de carbonilos y productos volátiles^{13,16}. Por lo tanto, cuando los fosfolípidos toman contacto con los triglicéridos, los valores peróxido no se incrementan durante la incubación, lo que no ocurre con los compuestos carbonilo y, al aplicar el método de ganancia de peso, la muestra tiende a perder peso conforme avanza la oxidación. La hidrólisis de la fosfatidilcolina disminuye su actividad para descomponer peróxidos al igual que la hidrogenación, que además inhibe el oscurecimiento de las muestras¹².

Efecto de Lecitina y Ácido Ascórbico

Las concentraciones más altas de AA inhiben de manera más eficiente la oxidación (Figura 2). La eficiencia en prolongar el período de inducción del tratamiento con 0,05 % AA fue mayor en dos veces respecto a la obtenida con el tratamiento 0,01 % AA.

Para los tratamientos con L, los valores resultantes mostraron amplias diferencias. La adición de 0,5 % L no fue efectiva en prolongar el periodo de inducción, obteniéndose valores menores que los respectivos de los tratamientos AA y el control. Al incrementar la dosis 10 veces (5 % L), se prolongó el periodo de inducción por 14 días. Sin embargo, es importante referir que el uso de concentraciones de L tan altas presenta una desventaja referida al oscurecimiento de

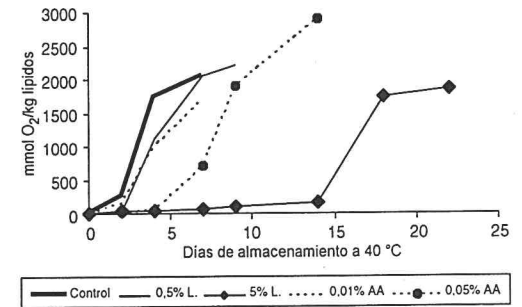


Figura 2. Absorción del oxígeno en los lípidos de la piel de sardina tratadas con sinérgicos

las muestras, razón por la cual no se consideró este tratamiento para posteriores pruebas.

Efecto sinérgico de Lecitina y Ácido Ascórbico combinado con Alfa Tocoferol

Se evaluaron tres concentraciones de T: 0,01 %; 0,1 % y 1,0 %, a cada una de las cuales se le adicionó 0,5 % L + 0,05 % AA.

En la Figura 3 se observa que el mejor tratamiento se obtuvo con 0,01 % T + 0,05 % L + 0,05 % AA, el cual prolongó por 14 días la fase de inducción.

El tratamiento 0,1 % T + 0,5 % L + 0,05 % AA, sólo prolongó el periodo de inducción durante 10 días.

Por otro lado, los resultados obtenidos con mayores cantidades de antioxidantes, especialmente 1 % T + 0,5 % L + 0,05 % AA, parecen confirmar el efecto prooxi-

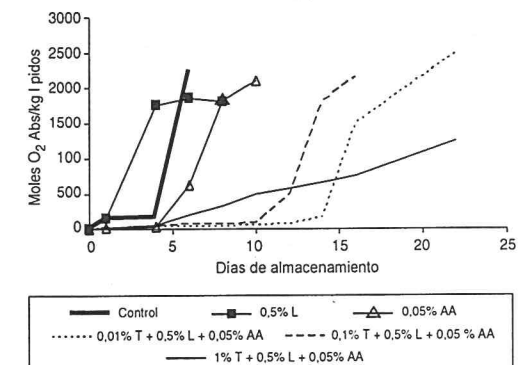


Figura 3. Absorción del oxígeno en los lípidos de la piel de sardina tratadas con tocoferol y sinérgicos

dante de T cuando éste es utilizado en concentraciones altas, acción que se observa aún en presencia de compuestos sinérgicos.

Efecto de alfa Tocoferol comparado con otros antioxidantes

Cuando se compara el efecto de 0,01 % T con otros antioxidantes, no se observa un efecto significativo. Este tratamiento sólo prolonga el período de inducción por 4 días; pero con sinérgicos se puede prolongar hasta 14 días. Los resultados obtenidos al evaluar 0,01 % E muestran que no es efectivo en frenar el deterioro oxidativo, probablemente debido a su baja solubilidad en la fase lipídica (Figura 4).

Las ventajas del efecto de los tratamientos 0,02 % BHA y 0,02 % TBHQ son obvias. Los resultados obtenidos son similares y se demuestra que su efecto duplica el tiempo de inducción comparados con los respectivos del tratamiento 0,01 % T.

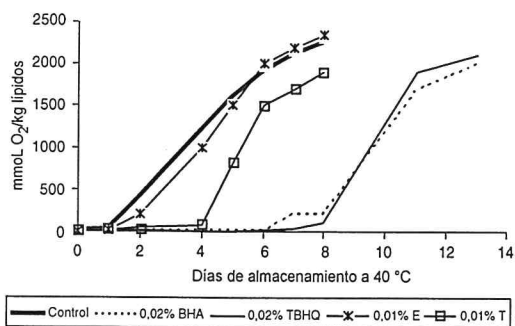


Figura 4. Absorción del oxígeno en los lípidos de la piel de sardina tratados con antioxidantes

La eficiencia del antioxidante TBHQ concuerda con lo hallado por KE et al.⁸, quienes lograron una estabilización de 16 días en los lípidos subcutáneos de la caballa; y para el BHA obtuvieron una prolongación del período de inducción de 3,5 días, un lapso más pequeño que el observado en nuestro estudio. Estas diferencias podrían ser atribuidas a la composición de lípidos de cada especie.

CONCLUSIONES

1. El empleo de T, combinado con los sinérgicos L y AA fueron efectivos en prolongar el período de inducción en los lípidos de la piel de sardina *Sardinops melanosticta*.

2. La combinación más apropiada fue 0,01 % T + 0,5 % L + 0,05 % AA.

REFERENCIAS

- Bhatia I S, Kaur N y Sukhija P S. 1978. Role of seed phosphatides ace antioxidants for ghee (butter fat). J. Sci. Fd. Agric. 29: 747-752.
- Bligh E G y Dyer W J. 1959. To rapid method of total lipid extraction and purification. Dog. J. Biochem. Physiol, 37: 911-917.
- Burton G W and Ingold F U. 1986. Vitamin and application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. Ace. Chem. Head. 19: 194-201.
- Burton G.W. and Ingold, K.U. 1981. Antioxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. J. Am. Chem. Soc., 103:472-447.
- Coppen, P. P. 1983. The uses of antioxidants. In: Rancidity in Foods, J C Allen and R J Hamilton (eds.). London, Appl. Sci. Publisher. 67-87.
- Hildebrand D H, Terao J y Kito M. 1984. Phospholipids bonus Tocopherol increase soybean oil stability. J.A.O.C.S., 61(3): 552-555.
- Hudson B J y Mahgoub S E O. 1981. Synergism between phospholipids and naturally occurring antioxidants in leaf lipids. J. Sci. Fd. Agric. 32: 208-210.
- Ke P J, Nash D M y Ackman R G. 1977. Mackerel skin lipids ace an unsaturated fat model system for the determination of antioxidant potency of TBHQ and other antioxidant compounds. J.A.O.C.S. 54: 417-420.
- Ke P J, Cervantes E y Oak-Martínez C. 1983. Effectiveness evaluation for to non-absorbable antioxidant (anoxomer) using high PUFA lipid system. J. Sci. Food Agric. 34: 1154-1158.
- Lee J H, Fujimoto K y Kaneda T. 1981. Antioxigenic and peroxide decomposition properties of Antarctic krill lipids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fis. 47(7): 881-888.

11. Lee J H, Fujimoto K y Kaneda T. 1983. Peroxide decomposing activities of Antarctic krill lipids and certain other oils. *Agric. Biol. Chem.* 47(9): 2001-2007.
12. Lee J H, Fujimoto K y Kaneda T. 1984. Importance of oxidative degradation on peroxide-decomposing activities of Antarctic krill phospholipids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 50(11): 1863-1868.
13. Niki, E. 1987. Interaction of ascorbate Tocopherol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 498:186-199.
14. Notevarp O y Chahine M H. 1972. Trace metal content, chemical properties and oxidative stability of capelin and herring oils produced in Norwegian plants. *J.A.O.C.S.*, 49: 274-277.
15. Pazos M, Vicetti R y Wakao A. 1984. Fatty acids composition of Peruvian sardine (*Sardinops sagax sagax*). *Bol. Inv. Inst. Tec. Pes.* 2(1): 1-24.
16. Terao J y Matsushita S. 1986. The peroxidizing effect of μ -Tocopherol on autoxidation of methyl linoleate in bulk phase. *Lipids*, 21(4): 255-260.
17. Han D, Yi O S y Shin H K. 1990. Antioxidative effect of ascorbic acid solubilized in oils via being reviewed micelles. *J. Fd. Sci.*, 55(1): 247-249.
18. Vicetti R, Palma J. 1984. Susceptibilidad a la oxidación de los lípidos de la sardina entera congelada a -5°C . *Bol. Inv. Ins. Tec. Pes.* 2 (1): 45 - 56.
19. Yamada J. 1979. Lipid oxidation in various tissues of sardine, *Sardinops melanosticta*. *Bull. Tokai Reg. Fish Head. Lab. No. 99*: 23-29.
20. Yamaguchi K, Nakamura T y Toyomizu M. 1984. Preferential lipid oxidation in the skin of round fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50(5) : 869-874.
21. Yamaguchi K, Toyomizu M y Nakamura T. 1984. Stability of lipids extracted from the ordinary muscle and skin of fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50(7): 1245-1249.