

ESTABILIZACIÓN TÉRMICA: ESTABILIZACIÓN DEL SALVADO DE ARROZ COLOMBIANO MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO PARA EVALUAR LA CONSERVACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS Y ANTIOXIDANTES (TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOS)

Para evitar la pérdida de ácidos grasos insaturados y antioxidantes se propone aplicar el tratamiento de calor húmedo evaluado a tres temperaturas (80, 100 y 120 °C) y a tres diferentes tiempos de exposición (3, 5 y 10 minutos), esto con el fin de inactivar las enzimas que promueven el rápido deterioro, como las lipasas (hidrólisis) y las peroxidases (oxidación). Se evaluó la estabilización y los antioxidantes de acuerdo a la liberación de ácidos grasos libres insaturados (AGLI) (suma de omegas: ω -3: Linolénico, ω -6: Linoléico, ω -9: Oléico), y la concentración de los tocoferoles (suma de α -T, β -T, γ -T y δ -T) y tocotrienoles (suma de α -T3, β -T3, γ -T3 y δ -T3) en el transcurso del tiempo (0, 15 y 30 días).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evitar la pérdida de ácidos grasos insaturados y antioxidantes se propone aplicar el tratamiento de calor húmedo evaluado en tres temperaturas (80, 100 y 120 °C) y en tres tiempos de exposición (3, 5 y 10 minutos), con el fin de inactivar las enzimas que promueven el rápido deterioro, como las lipasas (hidrólisis) y las peroxidases (oxidación).

Se consideró como estable las muestras que no presentaron liberación de ácidos grasos libres insaturados (AGLI) (suma de omegas: ω -3: linolénico, ω -6: linoléico, ω -9: oleico), y la conservación de antioxidantes tocoferoles (suma de α -T, β -T, γ -T y δ -T) y tocotrienoles (suma de suma de α -T3, β -T3, γ -T3 y δ -T3) en el transcurso del tiempo (0, 15 y 30 días).

Características del salvado de arroz

El SA utilizado fue identificado como mezcla de los pulidos de planta (pulido 1+ pulido 2 + pulido 3) con un tamaño de partícula de 450 μ m, donado por el molino Arroz del Llano, proveniente de Villavicencio, Colombia.

Una vez recolectadas en los molinos, las muestras de salvado fueron conservadas en empaque individual a baja temperatura (-20 °C) y selladas al vacío (ElectroluxR, H 420).

Estabilización del salvado

Estabilización a 120 °C

Se precalentó la autoclave eléctrica (All-americanR) hasta generar vapor saturado. Después, se introdujo en esta una bandeja circular de aluminio que contenía 150 g de SA con una humedad del 10 al 11%, verificando que tuviera un espesor de 3 cm. Se

cerró el autoclave y se dejó calentar por 27 minutos. Pasado este tiempo, y observando que la temperatura de la autoclave alcanzara los 120 °C, se sometió la muestra a los tiempos de estabilización deseados: 3, 5 y 10 minutos. La temperatura del sistema fue controlada manualmente en 120 °C, utilizando la válvula de alivio como elemento de control (gráfica 27).

Se retiró la bandeja con el salvado (humedad 17-18%), se transfirió a papel aluminio y se llevó a un secador de convección forzada (MLWR) a 40 °C. Se dejó por 18 minutos para obtener el salvado final con una humedad de entre 8 y 10%.

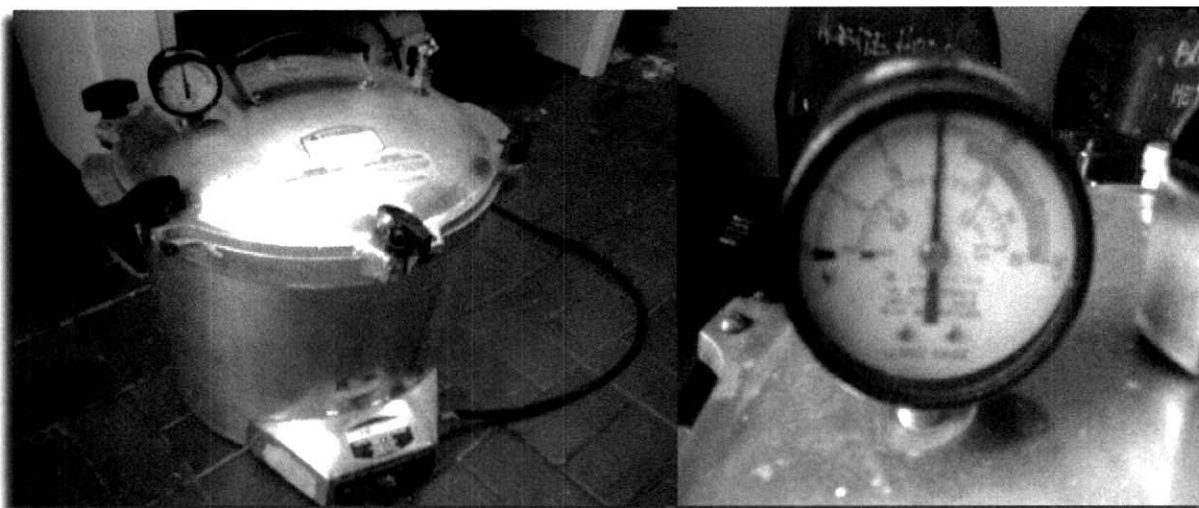


Figura 27. Montaje experimental para estabilización de 120 °C

Estabilización a 100 °C

El desarrollo de la experimentación es el mismo que el de 120 °C, el cambio es el tiempo de calentamiento de la muestra, que fue hasta el momento de la ebullición del agua de la autoclave. En este caso, la válvula de alivio de la autoclave permaneció totalmente abierta para asegurar los 100 °C. El tiempo de secado fue de 12 minutos (de 10 a 11% de humedad), ya que el salvado salió de la estabilización con una humedad de 14-15%, que es menor que para la anterior condición.

Estabilización a 80 °C

En la estufa de gas (Josearraga®), se dispusieron dos recipientes metálicos, de forma que permitiera el flujo de vapor del agua en ebullición a la matriz vegetal (gráfica 28).



Gráfica 28. Montaje experimental para estabilización de 80 °C

Se introdujo la bandeja de aluminio con el salvado, con un espesor de 3 cm y humedad del 10 al 11%. Una bandeja de icopor se posicionó en la parte superior de la olla permitiendo el ingreso de aire y la liberación de presión para mantener los 80 °C. El control de la temperatura se llevó a cabo mediante tres termocuplas situadas así: una en el fondo de la bandeja de salvado, otra en el medio de la bandeja y otra en el ambiente dentro de la olla. Posteriormente se retiró la bandeja con el salvado con una humedad de 14-15%, se transfirió a papel aluminio y se llevó a un secador de convección forzada (MLW®) a 40 °C. Se secó por 12 minutos para obtener el salvado con una humedad final entre el rango del 8 al 10 %.

Análisis de muestras

Extracción de aceite del salvado de arroz estabilizado

La extracción de aceite crudo de SA se llevó a cabo como se describe en el capítulo 1, gráfica 2.

Separación y cuantificación de ácidos grasos insaturados libres del aceite extraído del salvado de arroz estabilizado

La metodología para la separación de ácidos grasos insaturados libres se explica en la metodología expuesta en el capítulo 1, gráfica 5.

La cuantificación de los de ácidos grasos insaturados libres (oléico, linoléico y linolénico) por HPLC se realizó bajo las condiciones descritas en el capítulo 1 expuestas en "Condiciones cromatográficas II para cuantificación de ácidos grasos insaturados (oléico, linoléico y linolénico) libres y totales".

Separación y cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles del aceite extraído del salvado de arroz estabilizado

La metodología para la separación de tocoferoles y tocotrienoles se explica en la metodología expuesta en el capítulo 1, gráfica 3.

La cuantificación de los de tocoferoles y tocotrienoles por HPLC se realizaron bajo las condiciones descritas en el capítulo 1 expuestas en “Condiciones cromatográficas II para cuantificación de tocoferoles, tocotrienoles y γ -orizanól”.

Cálculo de las concentraciones de los componentes funcionales

Para la cuantificación de los componentes funcionales se utilizó una curva de calibración especificada por área (mV min) vs Concentración ($\mu\text{g/ml}$), ésta arrojó una ecuación de la curva que permitió el cálculo de la concentración del compuesto de interés por interpolación del área arrojada por el cromatograma.

Posteriormente se empleó la Ecuación (5) para hallar la concentración del componente de interés en 100 gramos de SA (bs):

$$X \mu\text{g} * 1 \text{ ml} * \text{g aceite salvado} * 10^{-6} * 100 = \text{g componente} \quad (5)$$

$$\text{ml gaceite (13 g - \%H) } 1\mu\text{g} \quad 100 \text{ g de SA (bs)}$$

Siendo,

X = dato obtenido mediante la interpolación por la ecuación de la curva ($\mu\text{g/ml}$).

g_{aceite} = gramos de aceite de SA tomados para la prueba (g).

$g_{\text{aceite salvado}}$ = contenido de aceite extraído del SA (g).

%H = humedad del SA (%).

Nota. Los resultados para el Gamma Oryzanól no se tuvieron en cuenta, puesto que las cantidades obtenidas a través del tiempo para todas las muestras no mostraron una tendencia lógica con la cual se pudiera dar un análisis acertado.

Análisis estadístico

Los factores utilizados en esta experimentación fueron temperatura, tiempo de exposición al calor húmedo (tiempo de estabilización) y tiempo de muestreo. Los niveles que se usaron fueron la temperaturas de 80, 100 y 120 °C; tiempo de exposición de 3, 5, 10 minutos; el tiempo de muestreo fue en los días 0, 15 y 30.

Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de normalidad, y después se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA MULTIFACTOR), la comparación se efectuó con la prueba de rangos múltiples de Duncan, para una probabilidad de $P \leq 0.05$, empleando el paquete estadístico Statgraphics® Plus 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

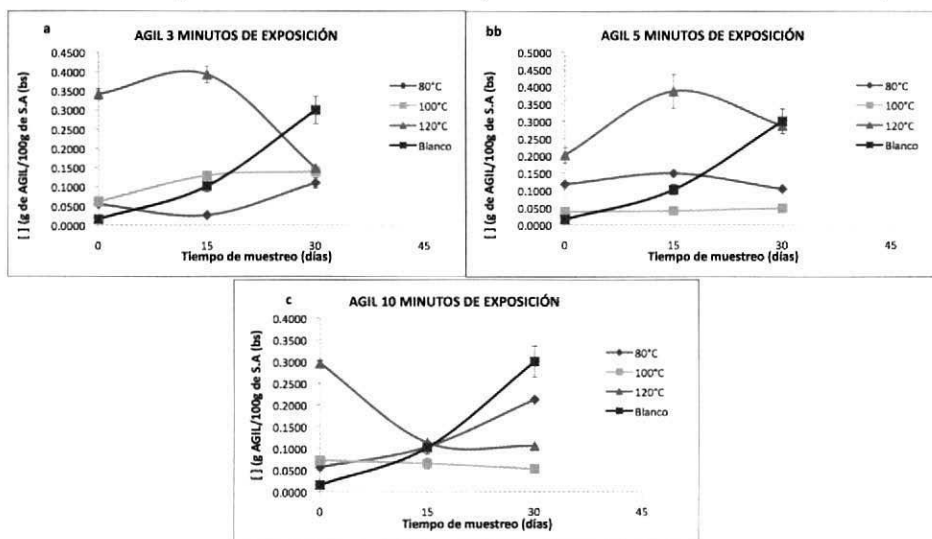
Análisis de ácidos grasos insaturados libres (AGIL)

El aceite del SA sufre diferentes transformaciones, debido a que el enlace éster de los acilgliceroles es susceptible a la hidrólisis química y enzimática; a su vez, los ácidos grasos insaturados se degradan por reacciones oxidativas, y producen compuestos volátiles que generan olores y sabores desagradables (Pérez, 2008).

Por lo tanto, una manera indirecta de medir la estabilidad en el SA fue la cuantificación de ácidos grasos libres insaturados (suma de omegas: ω -3: oleico, ω -6: linoléico, ω -9: linolénico), que proporcionan una calidad funcional a este subproducto de la industria arrocera. El muestreo de los ácidos grasos insaturados libres se llevó a cabo durante los días 0, 15 y 30.

Análisis del tratamiento térmico a 120 °C

La gráfica 29 (a, b y c) muestra los resultados del estudio para las variables de tratamiento (tiempo de exposición al calor húmedo y temperatura del tratamiento) y los tiempos de muestreo, con respecto a las concentraciones de ácidos grasos insaturados libres. Se puede notar que la concentración de AGIL en el SA tratado a 120 °C en el tiempo inicial, es aproximadamente veinte veces mayor que la del blanco. Éste fenómeno puede atribuirse a la temperatura, a la acidez formada (AGIL) y a las condiciones de humedad propias del tratamiento térmico evaluado, ya que estas condiciones favorecen las reacciones de hidrólisis química (Barber *et al.*, 1987; Perez, 2008). Estos factores generan una ruptura del enlace éster de los triglicéridos, y liberan glicerol y ácidos grasos insaturados, debido al aumento en la humedad de la matriz de SA, de 6 a 7 puntos de humedad más que para los otros tratamientos (humedad inicial: 11%, humedad final: de 17 a 18%).



Gráfica 29. Comportamiento de las muestras expuestas a diferentes temperaturas y a diferentes tiempos de exposición para los AGIL. a) SA expuesto a 3 minutos de estabilización; b) SA expuesto a 5 minutos de estabilización; c) SA expuesto a 10 minutos de estabilización.

El análisis de varianza arrojó diferencias significativas para las temperaturas de los tratamientos, mientras que los tiempos de exposición y de muestreo no presentaron diferencias tan radicales. Mediante la prueba de Duncan para la temperatura de tratamiento, se encontró que el experimento realizado a 120 °C presentó diferencias con respecto a los de 80 y 100 °C (tabla 39).

Es importante apreciar que para todos los blancos (sin tratamiento de estabilización) los AGIL aumenta continuamente con el tiempo de muestreo (pendiente creciente), lo que no ocurre para la mayoría de las muestras tratadas con calor (proceso de estabilización).

Tabla 39. Tabla del análisis de varianza para los ácidos grasos insaturados libres y diferencias significativas entre las temperaturas.

ANÁLISIS DE VARIANZA		DUNCAN	
Factores	Valor de P	Temperatura (°C)	Diferencia
Temperatura (°C)	*0,0000	80 – 100	0,0317803
Tiempo de exposición (minutos)	0,1414	80 – 120	&-0,148888
Tiempo de muestreo (días)	0,4969	100 - 120	&-0,180668

* Indica diferencias significativas a nivel de $p \leq 0.05$; & denota diferencia significativa entre niveles.

A diferencia de los otros, en este tratamiento se observó una disminución en la concentración de AGIL a los treinta días de muestreo. Es posible que dicho efecto se deba a la oxidación de los enlaces insaturados presentes en los AGIL; mientras que la auto-oxidación se explique por la presencia de luz y por el O_2 presente en el aire, debido a que la adición de este componente al enlace doble de la cadena del ácido graso insaturado forma peróxidos o hidroperóxidos, compuestos inestables que se descomponen en hidrocarburos, como aldehídos y cetonas (Alton, 1984).

Otros factores que afectan la concentración de los AGIL con respecto al tiempo son las enzimas presentes en el SA como la peroxidasa, ya que al ser termorresistente, tiende a recuperar su actividad catalítica después de inactivarse por el calor a 120 °C. Esta regeneración se evidencia cuando el medio ofrece factores favorables como la humedad, pues cuanto menor es la cantidad de agua, mayor estabilidad al calor presenta, por lo tanto es posible que la humedad de 11 a 17% no fuera suficiente para la desnaturalización de este biocatalizador. Para humedades entre 20 y 35% y a la misma temperatura se ha comprobado la desnaturalización de esta enzima (Barber et al., 1987).

Análisis del tratamiento térmico a 100 °C

Con respecto al tiempo inicial para el tratamiento a 100 °C, la concentración de los AGIL fue, aproximadamente, cuatro veces mayor, comparada con el blanco. Este fenómeno fue más leve que el del ensayo a 120 °C, y puede ser atribuido a la menor temperatura y humedad de la muestra evaluada.

En el tiempo de muestreo 15 y 30 días, los AGIL permanecieron casi constantes (acercándose a una pendiente de cero). Esto se confirmó mediante el análisis estadístico ANOVA para los diferentes tiempos de muestreo, que reveló que no existen diferencias significativas con respecto a la liberación de AGIL ($p=0,4969$; $\alpha=0,05$).

Para el tiempo de exposición al calor húmedo, se evidenció un $p=0,1414$ ($\alpha=0,05$), lo que permite asegurar que el efecto del tiempo de exposición (3, 5 y 10 min) no fue estadísticamente significativo ($p>0,05$); por lo tanto, se recomienda la estabilización a tres minutos de exposición con tratamiento térmico, ya que requiere menos tiempo y vapor, y esto se traduce en beneficios económicos.

El grado de estabilidad del SA generado a la condición de 100°C puede ser atribuido a la desnaturalización de las enzimas (lipasas I y II, lipoxigenasas), ya que a temperaturas mayores a 80°C las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria sufren efectos de ruptura de enlaces generados por los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes salinos (Barber *et al.*, 1987).

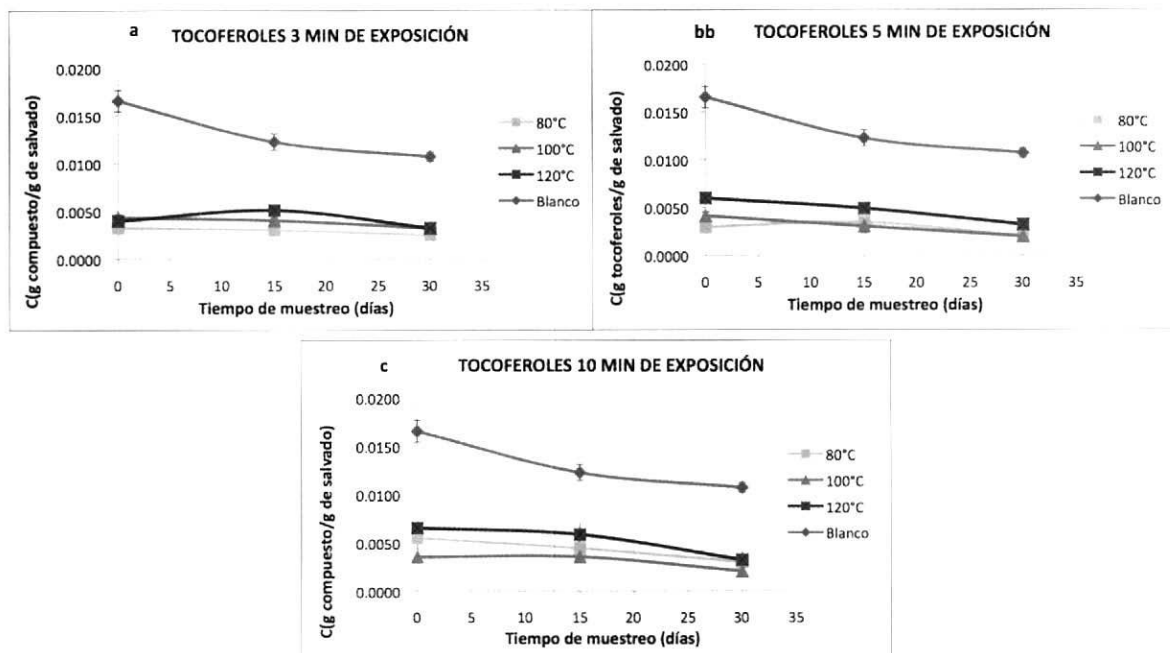
Análisis del Tratamiento Térmico a 80 °C

El comportamiento del SA tratado a 80 °C fue inestable desde el punto de vista de AGIL. La concentración de AGIL a través del tiempo de muestreo se incrementó (aumento de la pendiente), pero en menor proporción que el blanco, por lo tanto, no se efectuó una estabilización eficiente bajo estas condiciones.

Esta inestabilidad puede atribuirse a la regeneración o recuperación de las enzimas lipasas (I y II) y lipoxigenasas después del tratamiento, ya que su desnaturalización se da a temperaturas mayores de 80 °C, lo que permite el reacomodamiento de la estructura proteica del biocatalizador, por lo tanto, con el tiempo, puede recuperar parte de su estructura activa (Barber *et al.*, 1987).

Análisis de tocoferoles y tocotrienoles

En la gráfica 30 (a, b y c) se muestran los resultados para las variables de tratamiento (tiempo de exposición al calor húmedo y temperatura del tratamiento) y los tiempos de muestreo con respecto a las concentraciones de tocoferoles.



Gráfica 30. Comportamiento de las muestras expuestas a diferentes temperaturas y a diferentes tiempos de exposición para los tocoferoles. a) SA expuesto a 3 minutos de estabilización; b) SA expuesto a 5 minutos de estabilización; c) SA expuesto a 10 minutos de estabilización.

Los aceites y grasas naturales contienen sustancias antioxidantes capaces de capturar los radicales para evitar la oxidación de los ácidos grasos insaturados libres, la preservación de dichos compuestos determina un efecto de estabilidad en las muestras, además de conservar la funcionalidad en el SA

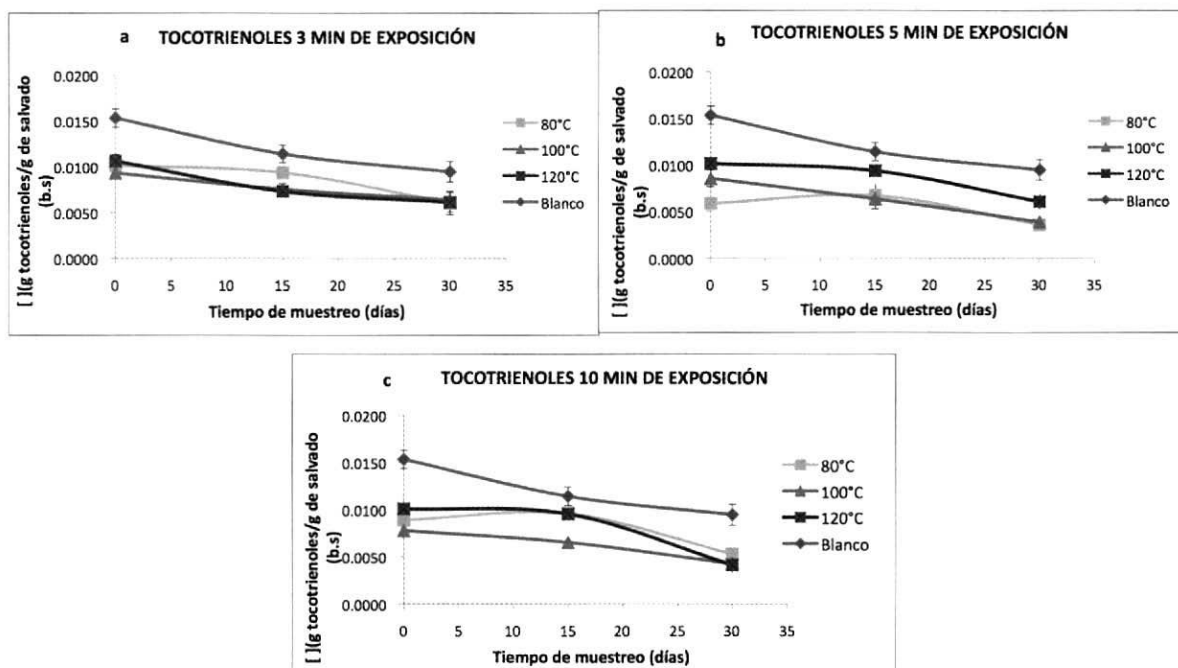
Al observar la gráfica 30 (a, b y c) se observan pérdidas en la concentración inicial de tocoferoles en los tratamientos con respecto al blanco, estas oscilan entre el 60 y el 80%, para todos los tiempos de exposición evaluados. Esto puede deberse a que los tocoferoles presentes en el SA posiblemente son sensibles a altas temperaturas, según Eitenmiller & Lee (2004) estos compuestos sufren degradación de un 28 a un 60% cuando son expuestos por encima de 60 °C. La luz y el oxígeno son factores que afectan también este fenómeno (Navarro *et al.*, 2004), lo que ocasiona una pérdida de la capacidad antioxidante debido a la apertura del heterociclo convirtiéndose posiblemente en tocoquinonas (Alton, 1984).

El análisis ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas en la relación concentración de tocoferoles, temperatura de los tratamientos y tiempo de muestreo (días). Esto se evidencia en la degradación de los tocoferoles presentes en el SA en el tiempo de 0 y 30 días, en el intervalo de muestreo de 0 y 15 días no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de dichos compuestos, por lo tanto se infiere que la muestra es estable en tiempos (tabla 40). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con respecto a los tiempos de exposición.

Tabla 40. Tabla del análisis de varianza para los tocoferoles y diferencias significativas entre la temperatura y el tiempo de muestreo.

ANÁLISIS DE VARIANZA		DUNCAN		DUNCAN	
Factores	Valor de P	Temperatura (°C)	Diferencia	Tiempo de muestreo (días)	Diferencia
Temperatura (°C)	*0,0252	80 – 100	-0.000152	0 – 15	0,0007259
Tiempo de exposición (minutos)	0,0625	80 – 120	&-0.001107	0 – 30	&-0,001790
Tiempo de muestreo (días)	*0,0004	100 - 120	&-0.000955	15 - 30	&-0,001066

* Indica diferencias significativas a nivel de $p \leq 0.05$.; & denota diferencias significativas entre niveles.



Gráfica 31. Comportamiento de las muestras expuestas a diferentes temperaturas y a diferentes tiempos de exposición para tocotrienoles. a) SA expuesto a 3 minutos de estabilización; b) SA expuesto a 5 minutos de estabilización; c) SA expuesto a 10 minutos de estabilización.

En la gráfica 31 (a, b y c) se observan pérdidas en la concentración inicial de tocotrienoles en las muestras con relación al blanco, estas oscilan entre el 30 y el 60% para todos los tiempos de exposición evaluados. Una explicación para esto puede ser que, como en el caso de los tocoferoles, los tocotrienoles son sensibles a las temperaturas mayores a 60 °C (Eitenmiller & Lee, 2004), luz y el oxígeno (Navarro *et al.*, 2004), de modo que se convierten en tocotrienolquinonas por apertura del heterociclo, y así pierden su capacidad antioxidante (Baldenius *et al.*, 2004).

Los factores que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) sobre la conservación de los tocotrienoles fueron el tiempo de exposición (minutos) y el tiempo de muestreo (días), como se observa en la tabla 36. La temperatura del tratamiento del SA no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre estos. Con respecto al tiempo de muestreo, los tocotrienoles disminuyen su concentración en el transcurso de los 30 días, aunque en el lapso de 0 a 15 días se evidenció una conservación de este componente.

En la tabla 41 se muestra el análisis de varianza para los tocotrienoles y diferencias significativas entre el tiempo de exposición y el tiempo de muestreo.

Tabla 41. Tabla del análisis de varianza para los tocotrienoles y diferencias significativas entre el tiempo de exposición y el tiempo de muestreo.

ANÁLISIS DE VARIANZA		DUNCAN		DUNCAN	
Factores	Valor de P	Tiempo de exposición (minutos)	Diferencia	Tiempo de muestreo (días)	Diferencia
Temperatura (°C)	0.0695	3 – 5	&0.001821	0 – 15	0.000678
Tiempo de exposición (minutos)	*0,0082	3 – 10	&0.002508	0 – 30	&-0.002894
Tiempo de muestreo (días)	*0.0016	5 – 10	0.000687	15 - 30	&-0.002215

* Indica diferencias significativas a nivel de $p \leq 0.05$.; & denota diferencias significativas entre niveles

Los tocoferoles y tocotrienoles se estabilizaron entre el día 0 y 15, por lo tanto, la conservación de los componentes antioxidantes es factible para dicho intervalo.

CONCLUSIONES

La concentración de tocoferoles fue casi constante para los tiempos de muestreo de 0 a 15 días, e independientes de los tiempos de exposición evaluados (3, 5 y 10 minutos). En la mayoría de los casos, la concentración de tocotrienoles fue casi constante para estos tiempos, e independiente de la temperatura del tratamiento (80, 100 y 120 °C).

El SA evaluado a 120°C y a las condiciones experimentales de este estudio no fue efectivo debido a la alta liberación de AGIL tras el proceso de estabilización (tiempo inicial).

Referencias bibliográficas

- Alton, E. 1984. Aceites y grasas industriales. Editorial Reverté SA España. pp.41-43.
- Aizono, Y.; Funatsu, M.; Hayashi, K.; Inamasu, M.; Yamaguchi, M. 1971. Biochemical studies of rice bran lipase. Part II. Chemical properties, *Agricultural Biological Chemistry*, 35,1973-1979.
- Amarasinghe, B.; Gangodavilage, N. 2004. Rice Bran Oil Extraction In Sri Lanka Data for Process Equipmnet Desing, *Institution of Chemical Engineers*, 82, 54-59.
- Baldenius, K.; Scköder, H.; Klämer, K.; Schein, K.; Strümer, R. 2004. Productos de ciclizado de tocotrienolquinona con acción antihipercolesterol. Patente N° 2 218 448. España.
- Barber, S.; Benedito, B. 1987. El SA una materia prima subutilizada. Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos. España. pp 60-80
- Chen, M.; Bergman, C.J. 2005. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol y gamma-Orizanol contents, *Journal of Food Composition and Analysis*. 18. pp 319-331.
- Devlin, T. M. 2004. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas, Reverte, Cuarta Edición, España.
- Eitenmiller, R.; Lee, J. 2004. Vitamin E: Food chemistry, composition and analysis. Marcel Dekker Inc. USA. pp. 121;250.
- Frankel, E.N. 1984. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance, *Journal of American Oil Chemists Society*. 61. 1908-1916.
- Hu, W.; Wells, J.H.; Shin, T.S.; Godber, J.S. 1996. Comparision of Isopropanol and hexane for extraction of vitamin and Oryzanols from stabilized rice bran, *Journal of the American Oil Chemists Society*. 73. 1653-1656.
- Malekian. F.; Ramu, M.; Prinyawiwatkul, W.; Marshall, W.; Windhauser, M.; Ahmedna, M. 2000. Lipase and Lipoygenase Activity, Functionality, and nutrient Losses in Rice Bran during storage, *Bulletin Number 870*, pp 1-69.
- Navarro. G; Bringas. A; Pacheco. A. 2004. Nueva herramienta para el desarrollo de la oxidación de los ácidos grasos, una de las causas fundamentales de la pérdida de calidad de los alimentos para la acuicultura. *Avances de nutrición acuícola VII*. México. pp 480-503.
- Parrado, J.; Miramontes, E.; Jover, M.; Gutiérrez, J.F.; Teran, L.C.; Bautista, J. 2006. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potencial use as fuctional food, *Food Chemistry*, 98, 742-748.
- Pérez. J. 2008. Lípidos en los alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores. España. pp 2-5.
- Pestana, V.; Zambiasi, R.; Mendonça, C.; Bruscatto, M.H.; Ramis-Ramos, G. 2009. Influencia del procesado industrial sobre las características químico-físicas y contenido en lípidos y antioxidantes del SA, *Grasas y aceites*, 60, 184-193.