DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

SECCIÓN DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

MÁSTER UNIVERSITARIO EN QUÍMICA AGRÍCOLA
Y NUEVOS ALIMENTOS

Estudio de la estabilidad oxidativa y microencapsulación de aceites de *Moringa oleifera y Linum usitatissium*

Por Estefanía Mata de las Heras

Directores:

Dr. Fco. Javier Señoráns Rodríguez

Dra. Mª. del Pilar Luna López

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS I

INDICE DE FIGURAS I

AGRADECIMIENTOS II

GLOSARIO DE ABREVIATURAS IV

ABSTRACT V

RESUMEN VI

METODOLOGÍA DE TRABAJO VII

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Consumo de aceites vegetales 1

1.2 La *Moringa oleifera* 3

1.2.1 Aplicaciones de la *Moringa oleifera* 4

1.2.2 Composición nutricional de *Moringa oleifera* 4

1.2.3 Aceite de *Moringa oleifera* 5

1.2.4 Productos elaborados a base de *Moringa oleifera* 6

1.3 Aceite de Linaza o Lino dorado 7

1.4 Estabilidad oxidativa en aceites 8

1.5 Microencapsulación 10

1.5.1 Atomización o Spray Dryer 11

1.5.2 Biodisponibilidad de aceites microencapsulados por atomización 11

2. OBJETIVOS 13

2.1 Objetivo general 13

2.2 Objetivos específicos 13

3. MATERIALES Y MÉTODOS 14

3.1 Materiales 14

3.2 Reactivos y disolventes 14

3.3 Extracción de aceite de semillas de Lino dorado y *Moringa oleifera* 14
3.3.1 MAE..... 15
3.3.2 UAE 15
3.4 Análisis de la estabilidad oxidativa 15
3.4.1 Totox 15
3.4.2 Índice de peróxidos (IP)..... 15
3.4.3 Índice de Anisidina (AV)..... 16
3.4.5 Rancimat 16
3.5 Caracterización de ácidos grasos por GC-MS 17
3.6 Microencapsulación con Atomización (SD)..... 18
3.6.1 Evaluación de la Microencapsulación 18
Extracción de aceite libre (AL) 18
Extracción de aceite total (AT) 18
Extracción de aceite microencapsulado 19
Eficiencia de microencapsulación (EE) 19
3.7 Simulación de digestión in vitro 19
3.8 Determinación capacidad antioxidante de hoja de Moringa..... 20
3.8.1 Extracción del antioxidante..... 20
3.8.2 Determinación actividad antioxidante (DPPH) 20
3.9 Determinación de la aplicabilidad en matriz alimentaria 21
3.9.1 Medida de la turbidez de la matriz alimentaria junto con las microcápsulas 21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 22
4.1 Extracción de aceite de semillas Lino dorado y *Moringa oleifera* 22
4.1.1 Rendimiento de extracción por UAE y MAE 22
4.1.2 Índices de peróxidos y anisidina de los aceites obtenidos 23
4.2 Composición de ácidos grasos del aceite de Lino y Moringa..... 24
4.2.1. Composición en ácidos grasos del Lino dorado 24

4.2.2 Composición en ácidos grasos de *Moringa oleifera* 25

4.3 Estudio de la estabilidad oxidativa 26

4.3.1 Estabilidad oxidativa del aceite de Lino dorado 27

4.3.2 Efecto de la luz a temperatura ambiente y con antioxidante 27

4.3.3 Efecto de la luz a temperatura ambiente y sin antioxidante..... 29

4.3.4 Comparación de las condiciones con antioxidante y sin antioxidante..... 30

4.3.5 Estudio acelerado a 55ºC con y sin antioxidante 30

4.3.6 Valores Totox aceite de Lino 32

4.3.7 Estabilidad oxidativa del aceite de *Moringa oleifera* 33

4.3.8 Efecto de las condiciones ambiente con antioxidante en aceite de *Moringa oleifera* 34

4.3.9 Efecto de las condiciones ambiente sin antioxidante con aceite de *Moringa oleifera* 35

4.3.10 Estudio acelerado de aceite de *Moringa oleifera* con y sin antioxidante 36

4.3.11 Valores Totox de aceite de *Moringa oleifera* 37

4.4. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de *Moringa oleifera* .. 38

4.5. Estudio de la estabilidad oxidativa con el método Rancimat 39

4.6 Microencapsulación por Atomización 41

4.6.1 Eficiencias de Microencapsulación (EM) 42

4.6.2 Estabilidad oxidativa de microcápsulas de moringa 43

4.6.3 Estudio de la aplicabilidad de las microcápsulas de moringa a una matriz alimentaria 44

4.6.3.1 Simulación de digestión gastrointestinal in vitro 44

4.6.3.2 Estudio de la dispersión de las microcápsulas en una matriz alimentaria 45

CONCLUSIONES 48

BIBLIOGRAFÍA 50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de *Moringa oleifera* 4
Tabla 2. Composición nutricional de micronutrientes de *Moringa oleifera* 5
Tabla 3. Productos elaborados y/o enriquecidos con polvo y/o aceite de Moringa consumidos a nivel mundial 6
Tabla 4. Composición lipídica del aceite de Lino dorado 8
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos del aceite de Lino dorado 8
Tabla 6. Características de los diferentes métodos utilizados para el análisis de oxidación de peróxidos 10
Tabla 7. Procesos de encapsulación. 10
Tabla 8. Contenido en ácidos grasos, tiempo de retención y en ácidos grasos del aceite analizado de *Moringa oleifera* 25
Tabla 9. Condiciones del estudio 27
Tabla 10. Valores IP, AV y Totox de Tiempo 0 de aceite de Linaza 27
Tabla 11. Comparación de los valores IP de las condiciones sin luz (B;C) y con luz (A;D) .. 30
Tabla 12. Resumen valores Totox del aceite de linaza 32
Tabla 13. Valores IP, AV y Totox a Tiempo 0 de aceite de *Moringa oleifera* 34
Tabla 14. Concentraciones de extracto y DPPH inhibido 39
Tabla 15. Índices de actividad antioxidante para el extracto de *Moringa oleifera* 41
Tabla 16. Características de pH y NTU de las matrices estudiadas 45
Tabla 17. Valores de pH y NTU de las combinaciones de matrices zumo/leche 46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparativa del consumo global de aceites vegetales 1
Figura 2: Toneladas de aceite vegetal exótico importado por zonas y aceite consumido en millones de dólares según país 2
Figura 3: Zonas de cultivo de *Moringa oleifera* y zonas de malnutrición 3
Figura 4: Árbol y frutos de *Moringa oleifera* 3
Figura 5: Planta, flor y semilla de Lino (*Linum usitatissimum*) 7
Figura 6. Microcápsulas de aceite de Moringa obtenidas con Atomización 11
Figura 7. Rendimientos extracción de UAE y MAE de semillas de Lino y Moringa 23

Figura 8. Índices de peróxidos y p-anisidina para métodos (MAE/UAE) en la extracción de aceite de semillas de Lino y Moringa 24
Figura 9. Perfil de ácidos grasos de aceite de Lino analizados por GC-MS 25
Figura 10. Perfil de ácidos grasos de aceite de *Moringa oleifera* analizados por GC-MS 26
Figura 11. Valores IP y AV para las condiciones A (luz) y B (oscuridad) 29
Figura 12. Valores IP y AV para las condiciones C (oscuridad) y D (luz) 29
Figura 13. Valores IP y AV para las condiciones a 55ºC sin antioxidante (E) y con antioxidante (F) 31
Figura 14. Resumen de la tendencia de valores Totox en el aceite de lino 33
Figura 15. Muestras de las condiciones (A-F) a Tiempo 8 de aceite de Lino 33
Figura 16. Valores IP y AV para las condiciones A (con luz) y B (sin luz) 35
Figura 17. Valores IP y AV para las condiciones C (sin luz) y D (con luz) 36
Figura 18. Valores IP y AV para las condiciones a 55ºC sin antioxidante (E) y con antioxidante (F) 37
Figura 19. Valores Totox para las condiciones (A,B,C,D,E,F) en aceite de Moringa 38
Figura 20. Extracto de hoja de *Moringa oleifera* 38
Figura 21. Tiempos de inducción obtenidos en el Estudio 1 de la capacidad antioxidante del extracto de *Moringa oleifera* 40
Figura 22. Muestras de aceites con extracto de Moringa 40
Figura 23. Tiempos de inducción (IT) en el Estudio 2 de Rancimat 41
Figura 24. Eficiencias de encapsulación 43
Figura 25. Valores de peróxidos y p-anisidina de las microcápsulas de moringa y moringa con extracto 43
Figura 26. Simulación de digestión de microcápsulas 45
Figura 27.Dispersión de microcápsulas en zumo de manzana y dispersión de microcápsulas con lecitina de soja 46
Figura 28. Signos de fermentación a las 48h de dispersar las microcápsulas en la matriz y muestra sin signos de fermentación a los 7 días 46

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al Ministerio de Educación y Cultura “MEC” por haberme concedido la beca General para el estudio del Máster universitario, y la beca de colaboración de investigación, ya que sin ellas no habría podido tener esta oportunidad.

A mi director de trabajo, Javier Señoráns por acercar el mundo de la investigación y enseñarme a tener una gran capacidad de autonomía.

Agradezco a Iñigo cada segundo que me ha dedicado y por ser mi pilar y mi compañero de este camino que es la vida.

A mis padres, que se volvieron a echar las manos a la cabeza cuando les dije que iba a “investigar” y que me han apoyado tanto y durante tantos años en mis variadas tropelías vitales.

A todos mis amigos, de todo el espectro del horóscopo. Porque vuestras pequeñas manías son lo que más me divierte contar cuando hablamos de signos.

También a mis vecinos, que me han permitido desarrollarme como ser humano, perfeccionándome en el estoicismo más radical generado por horas y horas de *reggeaton* ambiental.

A Madrid, mi ciudad de acogida, que me ha tratado tan bien y me ha acercado a la heroicidad de aguantar 40ºC escribiendo este trabajo.

A Aysha, por morderme los pies cada cuarto de hora para evitar que me durmiese delante de la pantalla.

Y sobre todo, a Leli, que confió en mí siempre, hiciera las tonterías que hiciera, como yo no rezo te dedico este trabajo, que tanto esfuerzo me ha costado.

"Contra cada padecimiento crece una planta."

Paracelso. Siglo XVI

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

IP: Índice de peróxidos

AV: Índice de p-Anisidina

meqO_2: miliequivalentes de oxígeno

AOCS: American Oil Chemists' Society

MAE: Extracción asistida por microondas

UAE: Extracción asistida por ultrasonidos

SD: Atomizador por Spray Dryer

GC-MS: Cromatografía de gases con espectrometría de masas

AGPI: Ácidos Grasos Poliinsaturados

EM: Eficiencia Microencapsulación

AL: Aceite Libre

AT: Aceite Total

DPPH: 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl

IT: Tiempo de Inducción

AI: Índice de Actividad Antioxidante

ABSTRACT

In this work we have evaluated the oxidative stability of oils *Linum usitatissimum* (Flaxseed) with high content of α-linolenic acid (56.8%), and *Moringa oleifera* with high oleic acid composition (78.4%), studying them into different storage conditions (light; without light; with α-tocopherol; no α-tocopherol; room temperature; oven at 55°C) for a period of 8 weeks. To determinate their oxidative stability, peroxide and p-anisidine values have been observed by the AOCS method. In the case of Flaxseed, high temperature conditions have shown higher Totox values (up to 1022.5). In this case, temperature was the most important variable for oxidative stability. Instead, for *Moringa oleifera* oil, that have been more stable at all conditions, light conditions produced greater oxidation, with Totox values up to 121. Both oils were characterized using GC-MS, with undetected products resulting from oxidative degradation in the entire period.

Given the importance of optimal oxidation conditions for the initial oils, it has been also evaluated the effect of advanced extraction techniques such as assisted microwave and ultrasonic extraction (MAE and UAE) have on the oxidative stability and providing greater oil yield. In both cases, UAE extraction showed higher yield (Flaxseed 26%, 23% *Moringa oleifera*), also with lower Totox values (Flaxseed 3.43; *Moringa oleifera* 2.31).

Other alternatives to improve the oxidative stability in oils were studied by adding natural antioxidant from Moringa leaves which are a source of antioxidants. To determine their antioxidant activity, dried leaves were extracted and the extract studied with DPPH * trial which compared to Trolox giving a Teac value (0.090 mM / g). Antioxidant capacity of the extract was tested in accelerated oxidation conditions with the Rancimat method, using different oils and extract concentrations. Promising results were obtained in *Moringa oleifera* oil with 500ppm extract concentration, improving the induction time by 24%. The results also showed an interesting improvement (200.8%) in the induction time for the mixture of flaxseed and Moringa oil.

Both oils were microencapsulated using Spray dryer technique, obtaining encapsulation efficiencies higher than 49% with a wall ratio of 1.5: 1. Furthermore, Flaxseed and Moringa oil microcapsules bioavailability was assessed by a simulation of gastric and intestinal digestion. Moringa microcapsules showed a greater release of oil in the digestion (86.7 % in total). Finally, the Moringa microcapsules were added to a food matrix in order to evaluate the stability of the suspension and possible future applicability.

Key Words: Oxidative Stability, *Moringa oleifera*, Flax seed oil, Spray Dryer microencapsulation, Moringa leaf antioxidant extract, Rancimat

RESUMEN

En el presente trabajo se ha evaluado la estabilidad oxidativa de los aceites de *Linum usitatissimum* (Lino dorado) con elevado contenido en α-Linolénico (56,8%), y de *Moringa oleifera* con una composición elevada en ácido oleico (78,4%), sometiéndolos a diferentes condiciones de almacenamiento (con luz; sin luz; con α-tocoferol; sin α-tocoferol; temperatura ambiente; en estufa a 55ºC) durante un período de 8 semanas. Para determinar su estabilidad se han determinado los valores de Índice de peróxidos y p-anisidina, siguiendo el método AOCS. En el caso del Lino dorado, las condiciones de estufa (55ºC) son las que presentan un Totox más elevado (de hasta 1022,5), siendo la temperatura la variable que más afecta a la oxidación en este caso. En cambio, para el aceite de *Moringa oleifera*, mucho más estable en todos los casos, las muestras en condiciones de luz fueron las menos estables en cuanto a oxidación, alcanzado valores de Totox de hasta 121. Ambos aceites se caracterizaron utilizando GC-MS, sin detectarse productos fruto de la degradación oxidativa en el período completo.

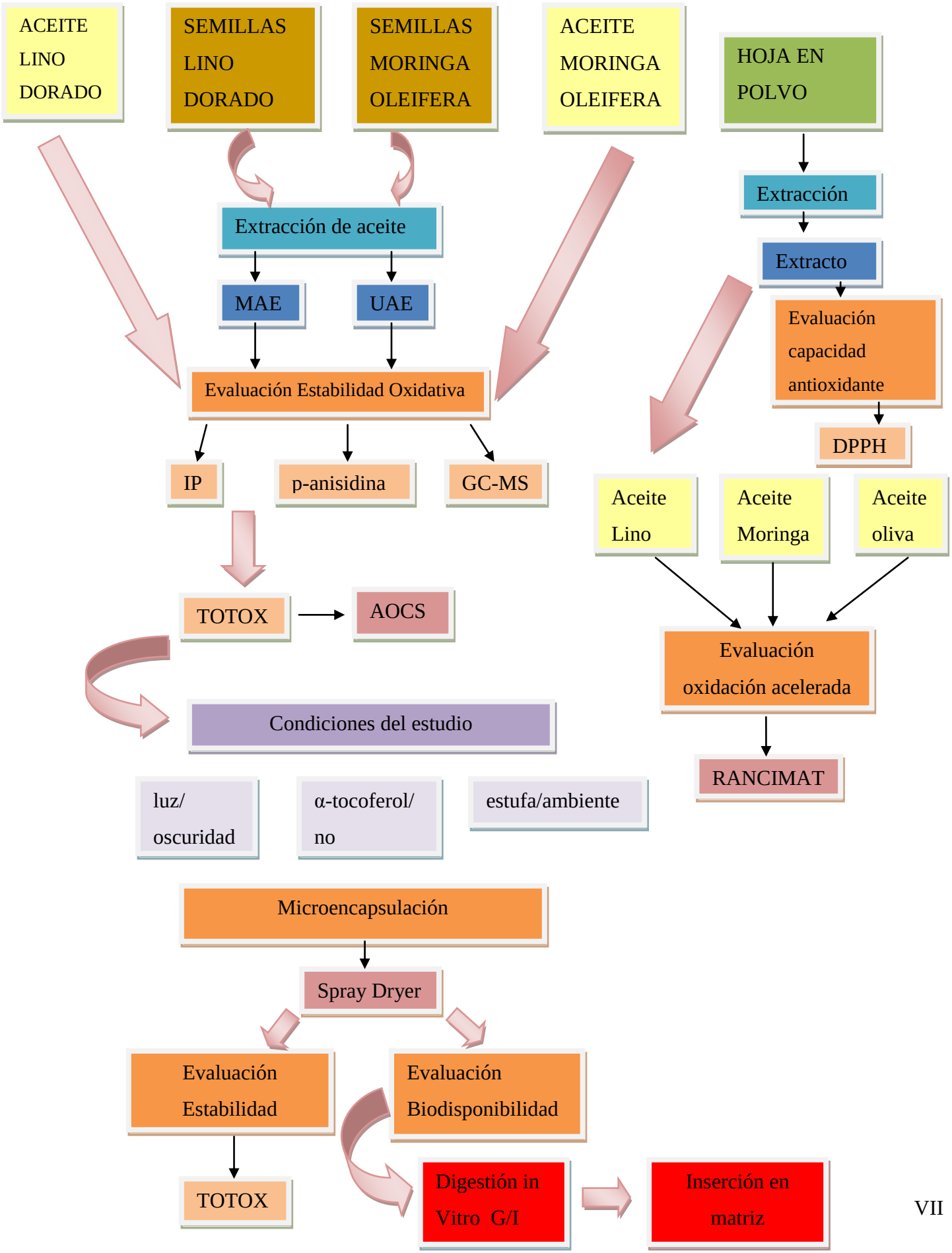
Dada la importancia de partir de un aceite en buenas condiciones de oxidación iniciales, se ha evaluado también el efecto de que técnicas de extracción avanzadas como la extracción asistida con microondas y ultrasonidos (MAE y UAE) tienen sobre la estabilidad oxidativa y cuál proporciona un mayor rendimiento del aceite. En ambos casos se observó un mayor rendimiento con extracción UAE (26% Lino dorado; 23% *Moringa oleifera*), que al mismo tiempo proporcionó menores valores Totox (3,43 Lino; 2,31 *Moringa oleifera*).

Finalmente se estudiaron alternativas para mejorar la estabilidad oxidativa de estos aceites: la adición de nuevos antioxidantes naturales procedentes también de Moringa, y la protección mediante microencapsulación. La hoja de *Moringa oleifera* es una fuente de antioxidantes novedosa; para comprobar su capacidad antioxidante se extrajo la hoja desecada, realizándose el ensayo DPPH* del extracto, que se comparó al Trolox dando un valor Teac (0,090 mM/g). Se probó la capacidad antioxidante del extracto en condiciones aceleradas de oxidación utilizando el método Rancimat en tres tipos de aceites a diferentes concentraciones de extracto. Se obtuvieron resultados prometedores en el aceite de *Moringa oleifera* con el extracto a 500ppm, mejorando el tiempo de inducción en un 24%. Los resultados también mostraron una mejora interesante (200,8%) en el tiempo de inducción en la mezcla de aceites de lino y moringa.

Ambos aceites fueron microencapsulados con la técnica de atomización con Spray Dryer obteniendo eficiencias de encapsulación superiores al 49% con un ratio de pared 1,5:1. Además se evaluó la posible biodisponibilidad de las microcápsulas realizando una simulación de digestión gástrica e intestinal, siendo las microcápsulas de aceite de moringa las que obtuvieron una mayor liberación de aceite (86,7%). Finalmente se añadieron las microcápsulas de Moringa a una matriz alimentaria con el fin de evaluar la estabilidad de la suspensión y su posible aplicabilidad futura.

Palabras clave: Estabilidad oxidativa, *Moringa oleifera*, aceite de Lino dorado, microencapsulación en Spray Dryer, antioxidante hoja de *Moringa oleifera*, Rancimat

METODOLOGÍA DE TRABAJO



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Consumo de aceites vegetales

El sector de los aceites vegetales ha sido uno de los más dinámicos en los últimos decenios, ha crecido casi dos veces más rápido que la agricultura mundial considerada en su conjunto. Abarca una amplia gama de cultivos que se utilizan no sólo como aceite, sino también para consumo directo, piensos y diversos usos industriales.

Tal como se aprecia en la FIGURA 1 el consumo de aceites a nivel mundial lo encabezan el aceite de palma, de soja, de girasol y de colza; que representaron casi las tres cuartas partes de la producción mundial de semillas oleaginosas, si bien los aceites de oliva, de cacahuete, de sésamo y de coco son también importantes. El rápido desarrollo de la producción ha supuesto que los cultivos oleaginosos representen una gran parte de la expansión de la tierra agrícola mundial, con un aumento neto de 75 millones de ha. (FAO).

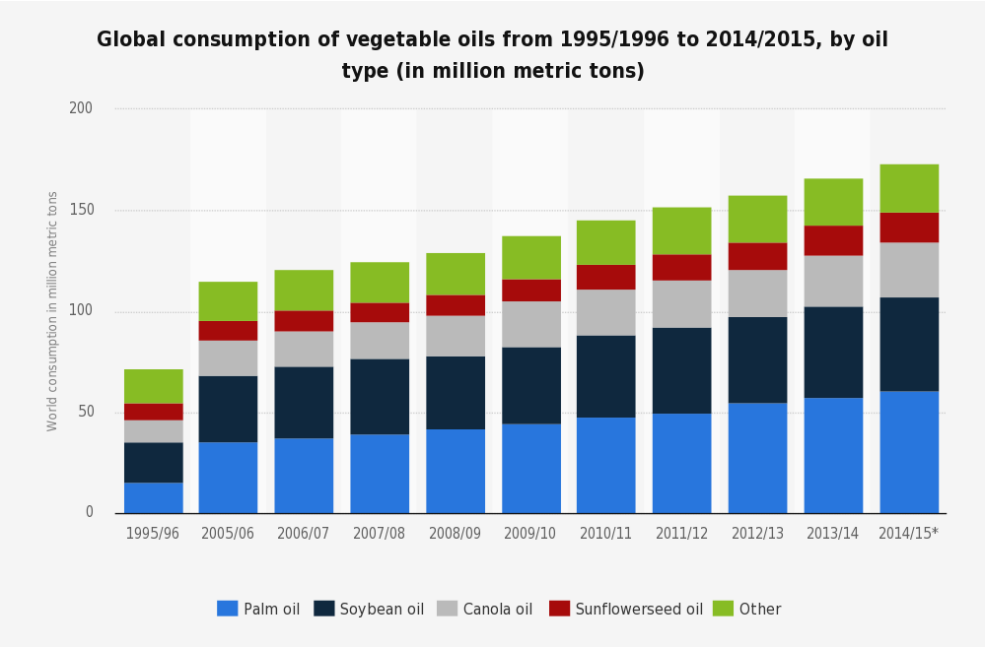


Figura 1: Comparativa del consumo global de aceites vegetales (US DEPT. AGRICULTURE)

Otra fuente de incertidumbre se refiere al cambio, por razones de salud, de las preferencias de los consumidores de los distintos aceites vegetales. Las investigaciones y el conocimiento de los consumidores acerca de las propiedades nutritivas y sanitarias de los distintos aceites han aumentado en los últimos años. Algunos gobiernos han modificado la legislación pertinente sobre el etiquetado de los productos, y otros están examinando la posibilidad de hacerlo. Como consecuencia, la demanda de

algunos aceites y productos derivados pueden sufrir cambios importantes y repentinos (FAO). Uno de los últimos cambios en relación a lo saludable ha sido el Reglamento 1169/2011 donde se obliga a declarar el origen vegetal específico de los aceites vegetales, facilitando al consumidor la información (AECOSAN, desarrollo del Reg. (UE) 1169/2011).

Tal y como se observa en la FIGURA 2, el mercado europeo es el mayor importador de aceites vegetales, es por ello que las tendencias que se generan repercuten a nivel global. En los últimos años, se ha revelado una nueva tendencia hacia la alimentación saludable, incluyendo aquellos aceites vegetales que tienen propiedades saludables.

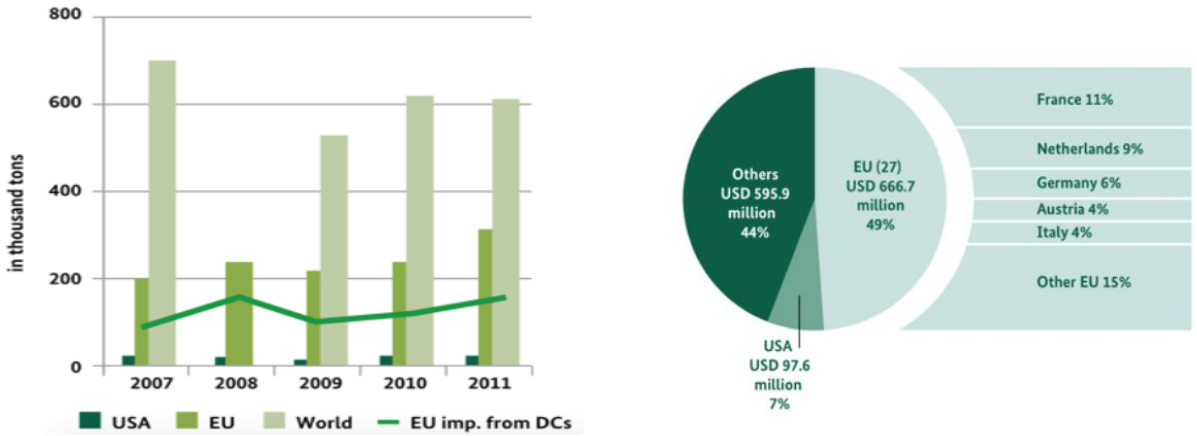


Figura 2: Toneladas de aceite vegetal exótico importado por zonas (izquierda) y aceite consumido en millones de dólares según país (derecha)

En esa línea, el aceite de oliva se encuentra ampliamente avalado por su papel cardiosaludable y eje de la dieta mediterránea, pero su distribución a nivel global como aceite vegetal de uso diario y no como producto gourmet se encuentra lejos de tener un impacto real e inmediato en las próximas décadas. Teniendo en cuenta que el aceite de *Moringa oleifera* posee un perfil de ácidos grasos que contiene un 70% de ácido oleico, en comparación del 40% que pueden tener otros, podría convertirse en una alternativa de calidad en las zonas donde no se produce aceite de oliva. Además, sus características de crecimiento hacen que se pueda cultivar en zonas áridas y suelos empobrecidos, es decir, en zonas con riesgo de malnutrición, como se observa en la FIGURA 3.

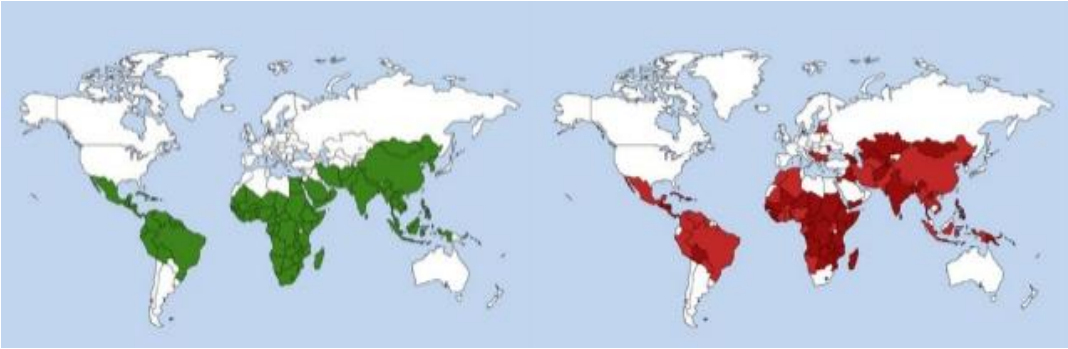


Figura 3: Zonas de cultivo de *Moringa oleifera* (izquierda) y zonas de malnutrición (derecha)

Por otra parte la actual regulación permite el uso de las hojas Moringa como suplemento alimenticio. El aceite, las vainas y semillas, no se especifican, solo reconoce En España se recoge dentro de la normativa Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. En la UE dentro del Reg.(CE) Nº1170/2009 por la que se modifican la Directiva 2002/46/CE. No se considera *Novel Food* según el Reg.(CE) nº258/97 acerca de nuevos alimentos. En cuanto a las alegaciones nutricionales y sobre propiedades saludables reconocidos por la EFSA, no existe ninguno aprobado. Asimismo, está en trámites el proceso para convertirlo en un ingrediente GRAS para su inclusión en la industria alimentaria.

1.2 La *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lam. (syn. pterygosperma Gaertn) también denominada Moringa o Marango (FIGURA 4), es la especie más conocida y extendida de las 14 especies de árboles pertenecientes a la familia *Moringaceae*. Apodada como "árbol de los milagros" (Fuglie, 2001, Farooq et al. 2005) es originaria del sub-Himalaya, así como del norte de India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán, pero ha proliferado de manera progresiva y hoy se puede encontrar en las regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo (Farooq et al., 2005).

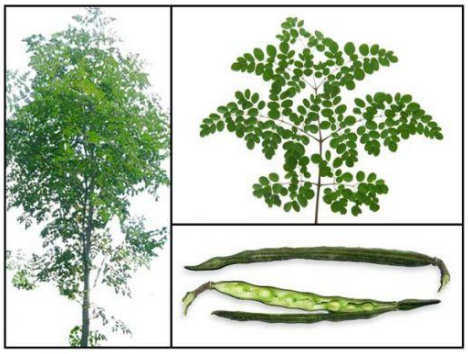


Figura 4: Árbol y frutos de *Moringa oleifera*

Entre las especies de *Moringa oleífera, M. y M. stenopetala* son las que más se cultivan. *M. oleifera* es la más cultivada en India, donde se han desarrollado dos nuevas cepas ('PKM-1,'PKM-2'), que presentan altos rendimientos en producción de las vainas (Radovich et al., 2009).

La Moringa presenta como características de crecimiento la resistencia, rapidez y su facilidad de propagación, crece hasta 4,5 metros en el primer año tras la siembra y en condiciones favorables alcanzando una altura de 6-15 metros. Es capaz de crecer en condición árida, con bajos requerimientos de nutrientes y agua, es por ello que se hace muy viable en suelos empobrecidos y marginales (Orwa et al., 2009).

1.2.1 Aplicaciones de la *Moringa oleifera*

Las partes utilizadas de la Moringa incluyen sus hojas, vainas, semillas, flores y raíces. De todas las diferentes partes del árbol, el uso de hojas de Moringa es probablemente uno de los más comúnmente conocido y mejor documentado (Foidl et al., 2001; Ghazali y Mohammed, 2011).

Presenta múltiples aplicaciones en distintos campos como los recientes estudios a nivel de su utilidad en diversas patologías, así como base en productos cosméticos por su excelente estabilidad oxidativa. Otra aplicación menos novedosa es como biocombustible, y también se ha propuesto su capacidad depurativa para el tratamiento de aguas no potables en zonas marginales (Yongbai, 2005) debido a su efecto antibacteriano (Fahey, 2005).

En el ámbito de la medicina, ha resaltado por su papel contra la tríada de la diabetes, por el papel hipoglucemiante, frente a la hipertensión arterial y dislipemia (Mbikay, 2012). En la dislipemia, se observó un descenso del colesterol plasmático gracias al b-sitosterol presente en las hojas de Moringa (Ghasi et al., 2000). La capacidad protectora frente al cáncer, concretamente se debe a la antiproliferación e inducción a la apoptosis de las células cancerosas (Sreelatha et al, 2011).

La *Moringa oleifera* es una fuente de antioxidantes presente en las hojas, vainas y semillas (Chumark et al., 2008; Singh et al., 2009; Faizal et al., 2014). Los principales compuestos bioactivos de compuestos fenólicos, tales como quercetina y kaempferol son responsable de la actividad antioxidante (Bajpai et al., 2005; Siddhuraju y Becker, 2003).

1.2.2 Composición nutricional de *Moringa oleifera*

A nivel nutricional, posee un abanico de aminoácidos esenciales deficiente en lisina, treonina y valina; pero excepcionalmente alto en meteonina y cisteína (Oliveira et al., 2004; FAO/WHO/UNU, 1985). Por otra parte, su elevado contenido en micronutrientes (TABLA 2): como potasio (37% de la IDR), magnesio (105% de la IDR), hierro (70% de la IDR en hombres), calcio (44% de la IDR en hombres) y vitamina A (B-caroteno). Su contenido en fibra (TABLA1) alcanza en el polvo de la hoja un máximo del 76% de la IDR para la población española adulta en 100g de producto (Carbajal, 2013).

Tabla 1. Composición nutricional de *Moringa oleifera*

	Vainas	Hojas
Energía	37 Kcal (2%)	64 Kcal (3%)
Carbohidratos	8.53 g (6.5%)	8.28% (6%)
Proteína	2.10 g (4%)	9.40 g (17%)
Grasa total	0.20 g (1%)	1.40% (7%)
Fibra	3.2 g (8%)	2.0 g (5%)

(Fuente: USDA National Nutrient data base)

Tabla 2. Composición nutricional de micronutrientes (vitaminas y minerales) de *Moringa oleifera*

Vitaminas	Vainas	Hojas	Minerales	Vainas	Hojas
Ácido fólico	44 µg (11%)	40 µg (10%)	Sodio	42 mg (3%)	9 mg (0.5%)
Niacina	0.680 mg (4%)	2.220 mg (14%)	Potasio	461 mg (10%)	337 mg (7%)
Piridoxina	0.120 mg (9%)	1.200 mg (92%)	Calcio	30 mg (3%)	185 mg (18.5%)
Riboflavina	0.074 mg (6%)	0.660 mg (51%)	Hierro	0.36 mg (4.5%)	4.00 mg (50%)
Tiamina	0.053mg (4.5%)	0.257 mg (21.5%)	Magnesio	45 mg (11%)	147 mg (37%)
Retinol Vit A	74 IU (2.5%)	7564 IU (252%)	Fósforo	50 mg (9%)	112 mg (20%)
Á. ascórbico Vit C	141mg (235%)	51.7 mg (86%)	Selenio	8.2 µg (15%)	0.9 µg (1.5%)
A-Tocoferol Vit E	-	113 mg	Zinc	0.45 mg (4%)	0.60 mg (5%)

1.2.3 Aceite de *Moringa oleifera*

El aceite de Moringa, también conocido como aceite de *Behen*, debido a sus altas proporciones de ácido Behénico. Proviene de las semillas secas cuyo contenido en aceite oscila entre un 35-42%. El aceite de presión en frío presenta las mejores características organolépticas, siendo inodoro, amarillo brillante y con un ligero sabor a nuez. Entre sus aplicaciones destaca sus usos en la industria cosmética así como crecientemente en la alimentaria. Sus cualidades físico-químicas hacen que tenga un bajo punto de fusión y que su estabilidad oxidativa sea alta, por lo tanto, su vida útil sea más larga, y por ello lo hace apto para ser usado como aceite de fritura, cocinado o aliño. Hay muchas variedades de aceite de Moringa, dependiendo de la variedad de árbol de Moringa de donde se extrae el aceite. Otras especies del género Moringa también se utilizan para hacer aceite, aunque solo el de *Moringa oleifera* presenta elevados contenidos en ácido Behénico.

En su composición nutricional, contiene aproximadamente 18% ácidos grasos saturados y un 82% ácidos grasos insaturados. De los saturados, los mayoritarios son el ácido behénico 5,1%, ácido palmítico 5,8% y ácido esteárico 3,9%. Del total de ácidos grasos, contiene aproximadamente un 70% de ácido oleico (Babatunde et al., 2014), y en pequeñas proporciones ácido lignocérico y ácido mirístico (Polprasid, 1994). Contiene el mismo perfil de ácidos grasos que el aceite de oliva, exceptuando su contenido en ácido Linoleico (Tsaknis et al., 1998).

El aceite de moringa posee cualidades como para poder ser incorporado en la industria alimentaria. Estudios sobre la mezcla de aceite moringa junto con otros aceites y grasas que se han llevado cabo, han dado resultados prometedores. En un estudio, se mezcló con aceite de soja y de girasol para evaluar su estabilidad oxidativa, que mejoró por cada 20% de aceite moringa añadido en los otros aceites. La mezcla entre aceites vegetales con alto contenido en α-linoleico y aceite de moringa, mostraría un perfil de ácidos grasos equilibrado a nivel nutricional, además de mejorar la estabilidad oxidativa frente condiciones de fritura (Farooq et al., 2007[a]). Otro estudió demostró las cualidades de estabilidad en fritura de la *Moringa oleifera* frente aceites de colza, soja y oleína de palma (Ghazali et al., 2014). Otra

aplicación es sin duda la de los lípidos estructurados: un estudio de interesterificación química entre mantequilla clarificada y aceite de *Moringa oleifera* se concluyó que un porcentaje del 50% e incluso superior se puede añadir a la mezcla con mantequilla clarificada, formando una grasa más estable a la oxidación y disminuyendo el porcentaje de colesterol (Nadeem et al., 2012).

1.2.4 Productos elaborados a base de *Moringa oleifera*

Existe una gran variedad de productos fabricados a partir de la *Moringa oleifera* y de sus distintas partes (hoja, semillas), que se han introducido en el mercado en los últimos tiempos.

En primer lugar, el producto más comercializado de la *Moringa oleifera* es sin duda los suplementos nutricionales en forma de cápsulas a base de polvo de la hoja. Además, se comercializa el aceite para su uso culinario, y también integrado en productos cosméticos. Recientemente, están apareciendo productos alimentarios a base de Moringa como puede observarse en la TABLA 3.

Tabla 3. Productos elaborados y/o enriquecidos con polvo y/o aceite de Moringa consumidos a nivel mundial

Empresa	Descripción	Producto	Foto
Moringa farm, Alemania	Productores y distribuidores de Moringa en Europa.	Moringa ecológica: Polvo de hojas (infusión, cápsulas, polvo, **especias de cocina**), **aceite** presión frío (labial, cocina), **semillas**	
Vitalmor, España	Productores y distribuidores de Moringa en Europa.	Moringa ecológica: Polvo de hojas (infusión, cápsulas, polvo, suplemento mascotas), aceite (**crema facial**), **cerveza**	

Moringa Delight, Nicaragua	Productores de Moringa, empresa con mayor extensión de hectáreas (72 ha)	Moringa ecológica: Polvo de hojas (infusión, cápsulas, polvo, especias de cocina), aceite presión, semillas, **Aceite esencial**	
Kuli Kuli, Nigeria	Productores de Moringa, establecidos en USA	Primera empresa en crear barritas de sabores con Moringa	
Nubian Heritage, USA	Comercializadores de productos 100% naturales para el baño	Primera línea de Moringa para el cuidado del cabello	

1.3 Aceite de Linaza o Lino dorado

El lino (*Linum usitatissimum*), es una planta herbácea de la familia de las liináceas (FIGURA 5). Su tallo se utiliza para confeccionar tejidos y su semilla, llamada linaza, se utiliza para extraer harina y aceite. Es cultivado en todo el mundo, y los terrenos arcillo-silíceos son los más convenientes para su cultivo. El aceite es usado en la industria cosmética, en la fabricación del linóleo y en la dilución para pintura de telas; así como para consumo humano (Fedenik et al., 1994).

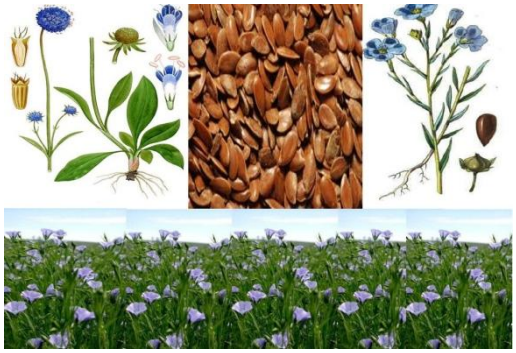


Figura 5: Planta, flor y semilla de Lino (*Linum usitatissimum*)

Por otra parte, la linaza, está emergiendo como un ingrediente funcional alimentario debido a su alto contenido de ácido linolénico, lignanos, y fibra. Entre los beneficios contrastados se encuentran la reducción de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis o la diabetes. Además de las enfermedades con origen inflamatorio como la artritis o enfermedades autoinmunes y trastornos neurológicos (Goyal et al, 2014).

La linaza tiene propiedades nutricionales interesantes y efectos potencialmente beneficiosos para la salud. Estas propiedades se deben a su composición química, como la gran cantidad de fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados (TABLA 4) y fitoquímicos como los lignanos. Un 25-30% de la semilla de linaza se compone de fibra dietética de la cual una tercera parte es fibra soluble y el resto fibra insoluble.

Tabla 4. Composición lipídica del aceite de Lino dorado

Energía (Kcal/kJ)	Grasas (g)	AGS (g)	AGM (g)	AGP (g)
492-699 / 2.059	34,0-47,8	3,2	6,9	22,4

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos del aceite de Lino dorado

AGS			AGM		AGPI	
mirístico	palmítico	esteárico	palmitoleico	oleico	Linoleico	α-linolénico
0	1,8-5,3	1,4-4,1	0	20,1-27,7	12,7-22,4	53,3-57,3

El aceite de Lino dorado tiene una composición en ácidos grasos poliinsaturados muy elevada, haciéndolo un alimento aplicable para su uso en trastornos cardiovasculares. Por otra parte, ese elevado contenido en AGPI (TABLA 5), hace que su aceite sea especialmente susceptible a la oxidación. Para mejorar esa condición, se ha probado la mezcla con otros aceites ricos en antioxidantes (Fatouh, 2012).

El aceite de girasol, contiene una cantidad elevada de ácido Linoleico; en un estudio junto con aceite de *Moringa oleifera* se determinó que la estabilidad oxidativa de esta mezcla mejoraba en 180 días en condiciones de almacenamiento normales (Farooq et al., 2007[a]).

1.4 Estabilidad oxidativa en aceites

El término estabilidad oxidativa hace referencia a la susceptibilidad de un aceite a su oxidación, de tal forma que cuanto más susceptible es un aceite a la oxidación, menor será su estabilidad oxidativa y menor la duración de su vida útil. El seguimiento de la evolución de los compuestos de oxidación a lo largo del tiempo permite establecer la estabilidad oxidativa de un aceite. Por el contrario, los índices de oxidación medidos en un momento puntual únicamente informan sobre el nivel de compuestos de oxidación que presenta un aceite en ese preciso momento. La primera reacción de degradación de las grasas y los aceites es la oxidación, también conocida como rancidez. El fenómeno de la auto-oxidación es conocido como uno de los principales factores que afectan a la vida útil de los mismos, capaz de producir sabores y olores indeseables. Es el proceso más común que conduce al deterioro oxidativo y se define como la reacción espontánea de oxígeno atmosférico con lípidos (Gordon et al., 2001). La estabilidad oxidativa es una prueba predictiva que mide dicha resistencia a la oxidación dando cierta indicación de su vida útil.

El resultado es la rancidez oxidativa que se debe a la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con formación de peróxidos o hidroperóxidos, denominados por ser los primeros en

degradarse, productos primarios de degradación. Posteriormente los peróxidos se polimerizan y descomponen dando origen a la formación de aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, volátiles ácidos orgánicos, y epoxi compuestos, denominados productos secundarios de degradación. (Shahidi y Zhong, 2005). Este proceso es acelerado en presencia de la luz, calor, humedad, otros ácidos grasos libres y ciertos catalizadores inorgánicos como las sales de hierro y cobre. Las grasas que han experimentado oxidación son de sabor y olor desagradable y parecen ser ligeramente tóxicas para algunos individuos. El enranciamiento oxidativo, además destruye las vitaminas liposolubles, particularmente las vitaminas A y E. Los compuestos derivados de la degradación, los primarios y secundarios, junto con los radicales libres, constituyen las bases para la medición de deterioro oxidativo de los lípidos alimenticios (Bailey, 2001).

En relación a los métodos analíticos utilizados para determinar la degradación oxidativa, se encuentran el índice de Peróxidos (IP) y el de p-Anisidina (AV). El IP determina la cantidad total de hidroperóxido contenido en muestra de aceite. Este es uno de los indicadores de calidad más comunes de grasas y aceites durante la producción y el almacenamiento. Durante la primera etapa de oxidación, se observa algunas veces como el IP se eleva, y a medida que los hidroperóxidos se descomponen, disminuye el IP (Stauffer, 1996). Existen diversos métodos para evaluar el IP como se muestra en la TABLA 6, teniendo todos sus pros y contras. Por otra parte, el valor de p-anisidina mide el contenido de aldehído generado durante la descomposición del hidroperóxido. Se basa en la reacción de color de p-metoxianilina (anisidina) y los compuestos aldehídicos, siendo un indicador de la oxidación secundaria. Por último, el valor Totox representa la medida de la oxidación total, incluyendo los productos de degradación primaria y secundaria, es decir, representa el valor resultante de la oxidación primaria y secundaria (Shahidi, Zhong, 2005).

Las normas de calidad de los aceites están resumidas en el Codex Alimentarius (Codex Stan 19, 1999). Se recoge en el punto 1.9 en relación a la calidad, el índice máximo permitido de peróxidos. El máximo permitido para aceites y grasas de presión en frío, 15 meqO_2/kg aceite; y para las demás 10 meqO_2/kg aceite. Asimismo, se recogen los tres métodos aceptados para esta determinación: UIQPA 2.501, AOCS Cd 8b-90 (97), ISO 3961: 1998. El método AOCS Cd 8b-90 con iso-octano relevó al antiguo AOCS Cd 8-53 que utilizaba cloroformo como disolvente por su consiguiente riesgo para la salud, aunque ambos están validados (Fiebig, 2003).

Existen diferentes métodos para la evaluación de la degradación oxidativa (TABLA 6). El volumétrico es el que se ha desarrollado amparado dentro del AOCS. Un estudio de la AOAC (Kamvissis et al., 2008) lo valida como método de análisis del aceite de oliva; el aceite de Moringa al tener una composición muy similar puede ser analizable también.

Tabla 6. Características de los diferentes métodos utilizados para el análisis de oxidación de peróxidos (Barriuso, Astiasarán y Ansorena, 2013)

Método	Preparación	Muestra	Sensibilidad	Coste	Limitación
Volumétrico	Media	1g	Media-baja	Bajo	Reactivos susceptibles a la oxidación Absorción por la AGPI
UV Espectroscopía	Media	500 mg	Media	Bajo	Alta cantidad de disolventes Gama baja concentración
Cromatografía	Larga	1-100 mg	Alta-muy alta	Alto	Variación por el colorante Insensible al ácido oleico
Luminiscencia	Corta	1-200 mg	Alta	Bajo	Procedimiento laborioso y procesamiento de datos
Fluorescencia	Muy corta	10-50 mm^2	Muy alta	Medio	Amplificadores de luz necesarios Variabilidad en longitudes de onda

1.5 Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica ampliamente utilizada, y cada vez más incorporada en la industria alimentaria. Permite incorporar componentes bioactivos en distintas matrices, lo cual vuelve más versátil un componente que de forma natural no podría mezclarse por su carácter hidrófobo o lipófobo. Además, para los aceites como el de Lino dorado y en menor medida de Moringa, con contenido en ácidos grasos poliinsaturados con alta susceptibilidad al ataque de agentes oxidantes, puede resultar una forma de mejorar su conservación dentro de otras matrices alimentarias. Los procesos de encapsulación empezaron a desarrollarse entre 1930 y 1940 por la National Cash Register (NCR), en Ohio, EEUU, para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante. (Yañez et al., 2002).

Para la producción de microcápsulas se han propuesto diversos métodos que se dividen en procesos físico o químicos tal y como se aprecia en la TABLA 7. La selección del método dependerá de diversos factores: del tamaño medio de la partícula requerida, de la carga de las cápsulas, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante así como de la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el coste (Zuidam y Nedovic, 2010).

Tabla 7. Procesos de encapsulación (Zuidam y Nedovic, 2010).

Tecnología	Proceso	Tamaño partícula (µm)	Carga de cápsulas (%)
Spray-Drying (secado por aspersión)	Físico	10-400	5-50
Freeze-Drying (secado por congelación)	Físico	20-5000	varios
Co-extrusión	Físico	150-8000	70-90
Recubrimiento en lecho fluidificado	Físico	5-5000	5-50

Coacervación	Químico	10-800	40-90
Liposomas	Químico	10-1000	5-50
Emulsificación	Químico	0,2-5000	1-100
Emulsiones multicapa	Químico	0,2-5000	1-90
Complejos de inclusión	Químico	0,001-0,01	5-15

1.5.1 Atomización o Spray Dryer

El proceso de secado por aspersión o atomización se ha utilizado durante décadas para encapsular ingredientes alimentarios, como sabores, lípidos y carotenoides. Durante este proceso, la evaporación del disolvente, que es muy a menudo el agua, es rápida y la encapsulación del compuesto ocurre de forma casi instantánea (Gharsallaoui, 2007).

El secado por aspersión es el más utilizado en la industria alimentaria debido a que se trata de un método económico y efectivo en la protección de materiales. Los almidones modificados, las maltodextrinas y las gomas son empleados como materiales pared.

El material a encapsular es homogeneizado con el portador. Posteriormente, la mezcla se seca por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco. Tras este proceso, se recogen las microcápsulas formadas listas para ser empleadas (FIGURA 6) (Yañez et al, 2002).

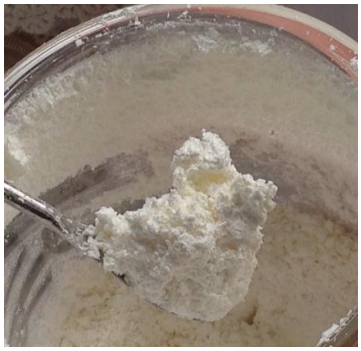


Figura 6. Microcápsulas de aceite de Moringa obtenidas con Atomización

Para el uso de lípidos el secado por aspersión posee varias ventajas sobre las otras tecnologías de microencapsulación, además de ser el más utilizado para microencapsular vitaminas liposolubles y ácidos grasos (Augustin et al, 2001). La microencapsulación protege a los lípidos frente a la hidrólisis enzimática. De esa forma, retarda la degradación oxidativa, mejorando así su estabilidad y la generación de de *off-flavours* propios de la rancidez (Krishnan et al., 2005).

1.5.2 Biodisponibilidad de aceites microencapsulados por atomización

La microencapsulación es una técnica muy útil como barrera protectora frente a la matriz alimentaria, de los aceites microencapsulados con SD y la ventaja de disminuir su degradación oxidativa (Augustin et al, 2003). Pero la efectividad de la microencapsulación se debe determinar además, si el compuesto bioactivo llega a la zona donde debe realizar su acción fisiológica. Se ha demostrado que los alimentos enriquecidos con aceite de pescado microencapsulado cumplen de igual forma con los requerimientos diarios de Omega 3, que la ingesta del mismo aceite en forma de cápsulas de suplemento (Wallace et al, 2000). El mayor reto para la microencapsulación por atomización de aceites es la elección del material

de pared, ya que influencia directamente en las propiedades de la emulsión y en la eficiencia de la encapsulación, además de ser necesario que el material sea capaz de traspasar la barrera gástrica para su posterior liberación en la zona diana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la estabilidad oxidativa de los aceites de las semillas de *Linum usitatissimum* y *Moringa oleifera* tras someterlos a diferentes condiciones de almacenamiento durante 8 semanas y valorar el efecto de diferentes alternativas como la adición de antioxidantes naturales y la microencapsulación para mejorar su estabilidad.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar el impacto sobre la estabilidad oxidativa y el rendimiento de aceite obtenido de distintos métodos de extracción modernos (MAE y UAE) utilizando las semillas de Lino y Moringa.
- Caracterizar los ácidos grasos de los aceites de Lino dorado y Moringa mediante cromatografía de GC-MS, para identificar los componentes de interés y su posible alteración.
- Evaluar la estabilidad oxidativa de los aceites de *Linum usitatissimum* y *Moringa oleifera* mediante el método AOCS Cd 8-53.
- Evaluar los diferentes efectos que produce la adición de antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa de los aceites en distintas condiciones.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto obtenido a partir de la hoja de *Moringa oleifera*.
- Valorar la mejora en estabilidad oxidativa de los aceites de Lino dorado y *Moringa oleifera* utilizando distintas proporciones de antioxidantes lipofílicos en condiciones de oxidación acelerada usando el método Rancimat.
- Microencapsular mediante la técnica de atomización (o Spray Dryer) los aceites de Lino dorado y Moringa, para evaluar el efecto de este método sobre la estabilidad oxidativa de dichos aceites.
- Simular la digestión gastrointestinal *in vitro* de las microcápsulas para la evaluación de su biodisponibilidad y estimar la estabilidad dentro de una matriz alimentaria para la potencial aplicabilidad en alimentos de microcápsulas con aceite de Moringa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Para realizar el presente estudio se emplearon muestras de las semillas de Lino dorado de la variedad *Linum usitatissimum* (Biográ, España), así como semillas de Moringa de la variedad *Moringa oleifera* (Vitalmor, Islas Canarias).

Asimismo, se utilizaron aceites de primera presión en frío en envases protectores contra la oxidación de Lino Dorado (Naturgreen, España), de *Moringa oleifera* (Vitalmor, Islas Canarias; Moringafarm, Alemania). Para el aceite de oliva virgen extra se utilizó aceite Carbonell, (España).

Por último, se elaboró el extracto a partir de hoja de *Moringa oleifera* desecada (Vitalmor, Islas Canarias).

3.2 Reactivos y disolventes

Para los distintos análisis acerca de la estabilidad oxidativa se utilizaron como disolventes de grado HPLC: hexano y cloroformo (Lab Scan, Polonia); así como el ácido acético y el ácido acético glacial (dato). El yoduro potásico, tiosulfato de sodio, solución de almidón al 1%, la p-anisidina (datos).

Para el proceso de formación de FAMEs el hidróxido de potasio 85% (KOH), metanol e hidrogeno sulfato sódico anhidro (Panreac, Barcelona).

En los distintos procesos de microencapsulación se usaron como agentes encapsulantes: caseinato cálcico, lactosa. Para la evaluación de la eficiencia de encapsulación los disolventes: ácido acético, 2-propanol y hexano (Lab Scan).

En el análisis de la capacidad antioxidante se utilizó como radical DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl) y como disolventes para este ensayo y para la extracción: etanol, metanol, hexano, 2-propanol.

3.3 Extracción de aceite de semillas de Lino dorado y *Moringa oleifera*

La extracción se llevo a cabo mediante dos técnicas distintas: microondas y ultrasonidos. Las extracciones se realizaron por duplicado y se determinó el contenido gravimétricamente en báscula de precisión (Sartorius, Extend).

-Preparación de las muestras:

Para la extracción de aceite de las semillas, se molieron con un triturador convencional (Moulinex, Francia) y se tamizaron en filtros de diámetro de un 1 mm.

3.3.1 MAE

La extracción asistida con microondas se llevó a cabo con un microondas convencional (Carrefour, España) a una potencia de 450 W durante 2,10 minutos, utilizando celdas abiertas de teflón, con hexano como disolvente. La proporción semilla/disolvente fueron 3 g de semilla por cada 30 mL de hexano. La muestra obtenida se filtró y el disolvente restante se eliminó en rotavapor (Heidolph, Alemania) a 40ºC y con corriente de nitrógeno 10 minutos junto al concentrador de muestra (Stuart SBH200/D) a 40ºC.

3.3.2 UAE

Para la extracción asistida con ultrasonidos, se utilizó el ultrasonidos Elmasonic S 40 H (Alemania). Se realizaron las extracciones utilizando hexano como disolvente 30 mL y 3 g de semillas, a 55ºC durante 15 minutos. El extracto obtenido se filtró y el disolvente restante se eliminó en rotavapor (Heidolph, Alemania) a 40ºC y con corriente de nitrógeno 10 minutos junto al concentrador de muestra (Stuart SBH200/D) a 40ºC.

3.4 Análisis de la estabilidad oxidativa

Para la evaluación de la estabilidad oxidativa del aceite de Lino y de Moringa, se han sometido a seis condiciones distintas: luz/oscuridad; tocoferol 200ppm/sin antioxidante; temperatura en estufa 55ºC/ Tª ambiente, durante 8 semanas. Se ha realizado a través del método validado por el Codex Alimentario, AOCS Cd 8-53.

3.4.1 Totox

Los análisis de estabilidad oxidativa (Totox) se realizaron conforme el método AOCS (American Oil Chemists' Society), y se compararon muestras de la semana 10 con el método Food Fat Lab.

Todas las muestras se dispusieron en frascos de vidrio transparente con un contenido de 2,5 g de aceite. Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente ecuación:

$$\textbf{Totox} = 2IP + AV$$

3.4.2 Índice de peróxidos (IP)

Para determinar el IP del aceite obtenido por MAE Y UAE de las semillas de Lino dorado y Moringa, así como del aceite de Lino dorado y Moringa bajo distintas condiciones de conservación, se utilizaron 0,5 g de aceite; se adicionaron 6,3 mL de la mezcla ácido acético:cloroformo (3:2) y se agitó en placa agitadora hasta conseguir la disolución de la muestra. Se agregó 125 µl de disolución de yoduro de

potasio saturado y se dejó reposar 5 minutos en la oscuridad. Se añadieron 17,5 mL de agua destilada y 250 µl de solución de almidón al 1% para valorar con tiosulfato de sodio al 0,002 N. Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente ecuación:

Donde:

$$IP= V*N*1000/W\ (meqO_2/kg\ aceite)$$

V: Volumen gastado en la valoración - volumen gastado en el blanco, en mililitros.

N: Normalidad del tiosulfato de sodio.

W: Peso en gramos del aceite.

3.4.3 Índice de Anisidina (AV)

Para determinar el índice p-anisidina (AV) del aceite obtenido por MAE y UAE de las semillas de Lino dorado y *Moringa oleifera*, así como del aceite de Lino dorado y *Moringa oleifera* bajo distintas condiciones de conservación, se utilizaron 0,5 g de aceite; se adicionaron 25 mL de hexano, se agitaron en placa agitadora (Velp scientifica) y se midió la absorbancia (ABS) de las disoluciones y la del blanco (hexano) a λ=350 nanómetros (Espectrofotómetro Boeco S-20, Germany).

Se adicionó 1 mL de la disolución de p-anisidina (0,25% (w/v en ácido acético glacial) a 5 mL de la disolución anterior (0,5 g + 25 mL hexano) y se agitaron en placa agitadora, dejándose 10 minutos para efectuar la reacción en oscuridad. Después se midió la absorbancia del blanco (p-anisidina) para cada una de las disoluciones con la p-anisidina a λ=350 nanómetros. Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente ecuación:

Donde:

$$AV= 25\ (1,2*(A_2-A_1))/\ peso\ muestra$$

A1= ABS muestra - ABS hexano

A2= ABS muestra anisidina - ABS anisidina

3.4.5 Rancimat

Para establecer la estabilidad oxidativa de los aceites de Lino dorado y Moringa bajo condiciones aceleradas de oxidación y teniendo distintas proporciones de extracto antioxidante de hoja de Moringa, se ha utilizado el método Rancimat (Metrohm AG, Swiss).

Para el análisis de las muestras se utilizaron 3 g de aceite para cada muestra, junto con 60 mL de agua destilada en las trampas de agua correspondientes. Se sometieron los aceites a una temperatura de 110ºC, y una corriente de aire de 20L/h. Se realizaron varios blancos y controles (Lino dorado, Moringa y Lino dorado:Moringa 1:1) y se probó también con 200 ppm de extracto antioxidante de hoja de Moringa (Lino dorado, Moringa, Lino dorado:Moringa 1:1); se comparó con el antioxidante alfa-tocoferol a 200 ppm (Lino dorado:Moringa 1:1); y se juntaron ambos antioxidantes para comprobar la sinergia (Lino dorado:Moringa 1:1).

Para comprobar la capacidad antioxidante del extracto de hoja de Moringa, se realizó una segunda tanda utilizando el extracto de Moringa en las muestras (Lino dorado, Moringa, oliva) en proporciones de 200, 500 y 1000 ppm. Se sometieron los aceites a una temperatura de 110ºC y a una corriente de aire de 20L/h.

Para calcular el Índice de actividad antioxidante (AI) se utilizó la siguiente expresión:

(AI) = IT en presencia del extracto / IT en ausencia del compuesto

3.5 Caracterización de ácidos grasos por GC-MS

La separación e identificación de los ácidos grasos procedentes de los aceites de Lino dorado y Moringa bajo distintas condiciones de conservación durante el período de 8 semanas, se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases-masas 5975 (Agilent Technologies, USA) equipado con un detector de espectrometría de masas, inyector automático y una columna capilar HP-88 de 100 m de longitud.

Previamente se realizó la derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos (FAME) en medio básico (KOH) de acuerdo con el método ISOTC34/SC 5. Para cada muestra se utilizaron 25 mg de aceite en disolución con 200 µl de hexano, que se mezclaron en vórtex (Velp Zx3, Italy) a las que se les adicionó 50 µl de KOH 2N en metanol, volviéndose a mezclar en vórtex 1 minuto y se dejaron 5 minutos de reacción; se les añadió 125 mg de $NaHSO_4.H_2O$ y se homogeneizaron en vórtex y se llevaron a centrifugar (Hettich Mikro120, Germany) 5 minutos a 50 rpm. Se recogió 100 µl de sobrenadante (FAME) sobre 400 µl de hexano y se inyectaron en GC-MS.

Para el GC-MS se empleó una relación de split 1:100. La temperatura del inyector fue de 250ºC y se empleó el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial de la columna fue de 175ºC que se mantuvo durante 10 minutos, incrementándose 3ºC/minuto hasta llegar a los 220ºC, en la que se mantuvo durante 20 minutos. Los ésteres metílicos fueron identificados con ayuda de la biblioteca del equipo.

3.6 Microencapsulación con Atomización (SD)

Para la realización de microcápsulas de aceite de Lino dorado por SD se utilizó una proporción de pared:aceite de (1,5:1). Para conseguir una estabilidad de la emulsión de la mitad de la pared (caseinato y agua), se emulsionaron 25 g de caseinato junto con 200 mL de agua con ultra-turrax (IKA T25, USA) a 15.000 rpm durante 20 minutos y se dejó reposar en la oscuridad 24 horas.

Para la atomización se mezclaron la pared de caseinato/agua junto con 33 g de aceite de Lino dorado en primer lugar; y con 25 g de lactosa después, hasta emulsionarse por completo con ultra-turrax a 15.000 rpm. La misma proporción se utilizó para atomizar 33 g de aceite de Lino dorado con 200 ppm de α-tocoferol. Para la atomización de aceite de Moringa, se utilizó también la misma proporción pared:aceite (1,5:1) y condiciones de atomización, pero en 20 g de aceite de Moringa y en 20 g de aceite con 200 ppm de extracto de hoja de Moringa.

Se introdujo la emulsión en el atomizador SD Büchi mini B-191 (Flawill, Suiza) con agitación constante con las siguientes condiciones:

Tª Inlet 160º
Tª Outlet 68-71ºC
Aspiración 60%
Flow control 500
Pump 15%
Aguja 4,2

3.6.1 Evaluación de la Microencapsulación

Extracción de aceite libre (AL)

Para determinar el aceite libre de las microcápsulas de Moringa y Lino dorado, se utilizaron 100 mg de microcápsulas, se mezclaron en un vórtex con 3 mL de hexano durante 2 minutos y se centrifugaron (Ortoalresa, España) 10 minutos a 4000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se evaporó el hexano con corriente de nitrógeno. La cantidad de aceite se determinó gravimétricamente (Klinkesorn et al., 2006).

Extracción de aceite total (AT)

Para determinar el aceite total de las microcápsulas de Moringa y Lino dorado, se utilizaron 100 mg de microcápsulas, se mezclaron en un vórtex con 2 mL de ácido acético al 1% durante 2 minutos. Se

extrajo la disolución con 3 mL de hexano:isopropanol, se agitó en vórtex durante 2 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 4000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se volvió a repetir la extracción. El disolvente se evaporó con corriente de nitrógeno. La cantidad de aceite se determinó gravimétricamente (Klinkesorn et al., 2006).

Extracción de aceite microencapsulado

El aceite microencapsulado se calculó a partir de la siguiente fórmula:

Aceite microencapsulado (AM) = aceite total - aceite libre

Eficiencia de microencapsulación (EE)

La EE se calculó con la siguiente fórmula:

$$EE = \frac{Aceite\ microencapsulado\ (\frac{mg}{100mg}\ microcápsulas)}{aceite\ total\ (\frac{mg}{100}\ mg\ de\ microcápsulas)}$$

3.7 Simulación de digestión in vitro

Para realizar la simulación de digestión in vitro gástrico de las microcápsulas de Moringa, aceite de Moringa con extracto de Moringa y Lino dorado, se utilizaron 150 mg de microcápsulas, a la que se le añadió 10 mL de jugo gástrico (9g/L NaCl, Ph = 2). La mezcla se introdujo en un baño a 37ºC durante 30 minutos con agitación constante. Se extrajo la disolución resultante con 3 mL de hexano, se agitó en vórtex durante 2 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 4000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se volvió a repetir la extracción. El disolvente se evaporó con corriente de nitrógeno. La cantidad de aceite se determinó gravimétricamente (Chavarri et al., 2010).

Para la digestión in vitro intestinal de las microcápsulas de Moringa, Moringa con extracto de Moringa y Lino dorado, se utilizaron 150 mg de microcápsulas, a la que se le añadió 10 mL de jugo intestinal (6,5g/L NaCl; 0,835 g/L KCl; 0,22g/L $CaCl_2$; 1,386 g/L $NaHCO_3$, pH = 7,5). La mezcla se introdujo en un baño a 37ºC durante 90 minutos con agitación constante. Se extrajo la disolución resultante con 3 mL de hexano, se agitó en vórtex durante 2 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 4000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se volvió a repetir la extracción. El disolvente se evaporó con corriente de nitrógeno. La cantidad de aceite se determinó gravimétricamente (Chavarri et al.2010).

3.8 Determinación capacidad antioxidante de hoja de Moringa

Para la determinar la capacidad antioxidante se realizaron las extracciones del extracto y la determinación de la actividad antioxidante con el ensayo DPPH.

3.8.1 Extracción del antioxidante

Se realizó el extracto a partir de polvo de hoja de moringa, utilizando 3 g de polvo de hoja por cada 30 mL de hexano. Se agitó en vórtex 2 minutos, repitiéndose dos veces. Se dejaron en maceración 24 horas y se filtraron con embudo Buchner. Cada muestra se lavó con 10 mL de hexano y posteriormente se evaporaron en rotavapor, eliminando los posibles restos de disolvente con corriente de nitrógeno.

3.8.2 Determinación actividad antioxidante (DPPH)

Para determinar la actividad antioxidante del extracto de hoja de Moringa se utilizó el reactivo DPPH. Se utilizó DPPH 50,7 µM; para ello se disolvió 0,0010 g en 50 mL de metanol y se dejó 4 horas en oscuridad y tapado con papel de aluminio. Se realizó una curva patrón a distintas concentraciones (mg/ml) de DPPH* para medir los niveles.

Para determinar la concentración de DPPH* se utilizó la siguiente fórmula:

$$X = \frac{Y\,(ABS) - 0{,}05}{0{,}0257} = [\text{DPPH*}]\ \text{mg/ml}$$

Se preparó una disolución del extracto en etanol (0,01 g / 2 mL) y se filtraron con un filtro de jeringa de 0,45 µm. En un eppendorf se añadieron 20 µl de muestra y 980 µl de reactivo DPPH. Se midió la absorbancia a 517 nm tras 60 minutos. Se midieron las absorbancias de las muestras; el autocero (metanol); el reactivo DPPH; y un blanco de cada de una de las muestras con 980 µl de etanol y 20 µl de muestra. Las muestras se realizaron por duplicado.

Para realizar los cálculos se realizó una curva de calibrado:

Para calcular el % de DPPH* obtenido y el inhibido se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\%\,\text{DPPH} = \frac{[\text{DPPH muestra}]}{[\text{DPPH control}]} \cdot 100$$

$$\%\,\text{DPPH inhibido} = 1 - \frac{[\text{DPPH muestra}]}{[\text{DPPH control}]} \cdot 100$$

Para obtener el valor de referencia TEAC para sustancias antioxidantes se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC} = \frac{TROLOX}{MORINGA}$$

3.9 Determinación de la aplicabilidad en matriz alimentaria

Para determinar la viabilidad de las microcápsulas obtenidas del aceite de Moringa y Moringa con extracto de Moringa, se valoraron la estabilidad de la dispersión en matriz líquida utilizando un turbidímetro y Ph metro. Se utilizaron matrices líquidas con diversas proporciones.

3.9.1 Medida de la turbidez de la matriz alimentaria junto con las microcápsulas

El método nefelométrico para determinar turbiedad, se basa en la comparación de la intensidad de la luz dispersada por la muestra en condiciones definidas con la luz dispersada por una solución patrón de referencia bajo las mismas condiciones. Cuanto mayor sea la intensidad de la luz dispersada, mayor es la turbidez.

Se añadieron microcápsulas (1,28g) correspondiendo al 10 % de ingesta calórica diaria y correspondiendo con el 10% de la aportación de Omega 3 (244,1 mg). Se disolvieron en las distintas matrices, midiendo el NTU y el Ph (Crison basic, España) de las muestras a distintas proporciones. Para determinar la dispersión de microcápsulas en la matriz se utilizó un turbidímetro (TN-100 Eutech Instruments, UK), comparando las muestras (zumo/leche) a proporciones (1:1; 3:1; 3,5:1) con microcápsulas, los blancos (zumo/leche) con las soluciones patrón 0,02;20;100;800 NTU. Se observó la estabilidad de las microcápsulas en la matriz durante una semana.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de aceite de semillas Lino dorado y *Moringa oleifera*

La extracción de aceite de semillas de Lino dorado y Moringa se realizó con dos técnicas rápidas diferentes: Extracción asistida por microondas (MAE) y Extracción asistida por ultrasonidos (UAE). Estas técnicas emplean energía localizada bien de microondas o de ultrasonidos para conseguir extracciones rápidas, y permitieron obtener los aceites con rendimientos aceptables en tiempos muy cortos de extracción, de solo unos minutos, y con un deterioro oxidativo reducido.

4.1.1 Rendimiento de extracción por UAE y MAE

Las extracciones realizadas con la técnica UAE y MAE generalmente funcionan mejor que los métodos convencionales como podría ser la técnica Soxhlet, ya que ahorra tiempo y volumen de disolvente, ofreciendo una eficiencia mayor y un menor impacto ambiental (Cravotto et al., 2008). Al realizarse las extracciones con dos técnicas rápidas no convencionales, las diferencias entre ellos son menores. Las principales diferencias se hallaron en términos de tiempos de extracción y los rendimientos.

Para ambos aceites las condiciones de extracción de las técnicas fueron iguales. En cuanto al uso de disolvente, ambas son técnicas que confrontadas con las convencionales, requieren menor uso de disolvente. En relación a los tiempos, las extracciones con MAE se realizaron en sólo 2,10 minutos, mientras que UAE requirió 15 minutos. Las temperaturas alcanzadas son mayores para MAE por el calentamiento que genera la técnica en la extracción de aceites; frente a la temperatura más suave alcanzada por UAE (± 55ºC). Así, los rendimientos (FIGURA 7) difieren entre las técnicas, obteniendo con UAE un 4,58% más de rendimiento frente a MAE; y entre los aceites, la técnica con mejor rendimiento es UAE, obteniendo un 12,38% mayor para el aceite de lino frente al de moringa.

El rendimiento de extracción de aceite de semillas de Lino dorado, fue mayor con UAE (26,50%) que MAE (24,46%). Para la extracción de aceite de semillas de Moringa, los rendimientos más elevados fueron nuevamente para UAE (23,22%) con respecto a MAE (22,98%). En comparación con técnicas de extracción clásicas como Soxhlet, que utiliza 8 horas para la extracción completa, el tiempo con MAE se redujo un 99,5% y con UAE un 96,8%. Sin mencionar que tanto MAE como UAE utilizan 10 veces menos volumen de disolvente (Cravotto et al., 2008).

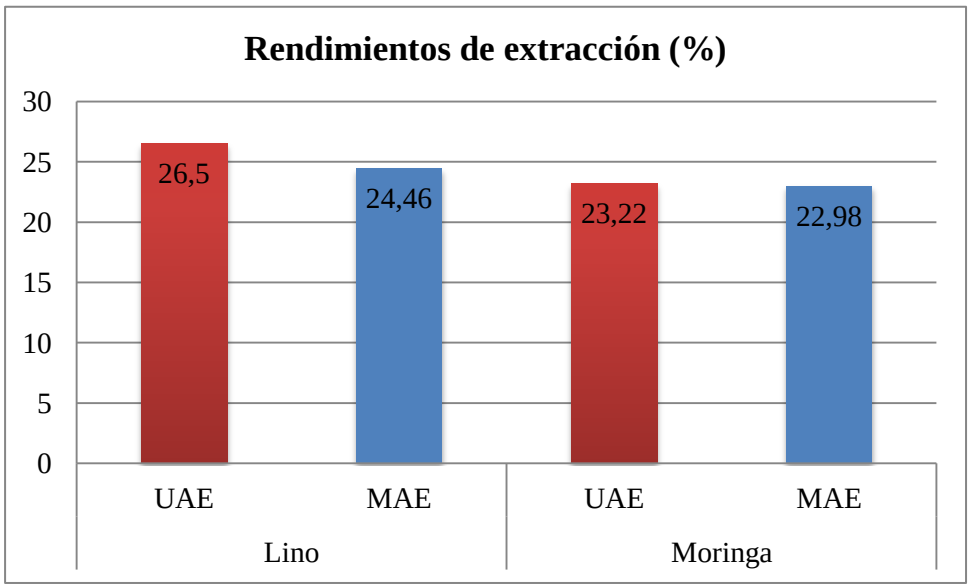


Figura 7. Rendimientos extracción (%) de UAE y MAE de semillas de Lino y Moringa

4.1.2 Índices de peróxidos y anisidina de los aceites obtenidos

A todos los aceites obtenidos se les midió el índice de peróxidos y de Anisidina, para evaluar el efecto de cada método de extracción sobre los índices de oxidación del aceite, y conocer cuál era el estado de partida de los posteriores estudios de estabilidad oxidativa en distintas condiciones de almacenamiento.

Respecto a los valores de peróxidos (IP) y p-anisidina (AV) se pueden observar en la FIGURA 8; el IP presentó variaciones dependiendo del método utilizado: UAE (3,46) y MAE (6,51); en cambio, el valor de AV en UAE y MAE fue de (0). El valor Totox de ambos métodos se encuentra dentro de los límites que indica la legislación europea (IP $\leq$ 15 meqO_2/ kg) establecido en el Reg. (CE) nº 702/2007 de la comisión del 21 de Junio de 2007 para aceites vegetales.

Para los valores IP y AV, UAE obtuvo un valor más bajo (1,78) frente a MAE (3,67). Se debe a que el IP de UAE (1,16) es menor que MAE (3,67); aunque UAE presenta un valor de p-anisidina (0,62) mayor que MAE (0). Ambos resultados se encuentran dentro de la legislación.

Los resultados usando el método de extracción MAE presentan IP más elevados debido a que utiliza una temperatura más elevada. Los valores de IP tanto para MAE como para UAE de Lino son más elevados debido a la composición en ácidos grasos más elevada en AGPI, más degradables frente a la oxidación, en relación a la composición más elevada en ácido oleico de la moringa, con mayor termoestabilidad a las altas temperaturas.

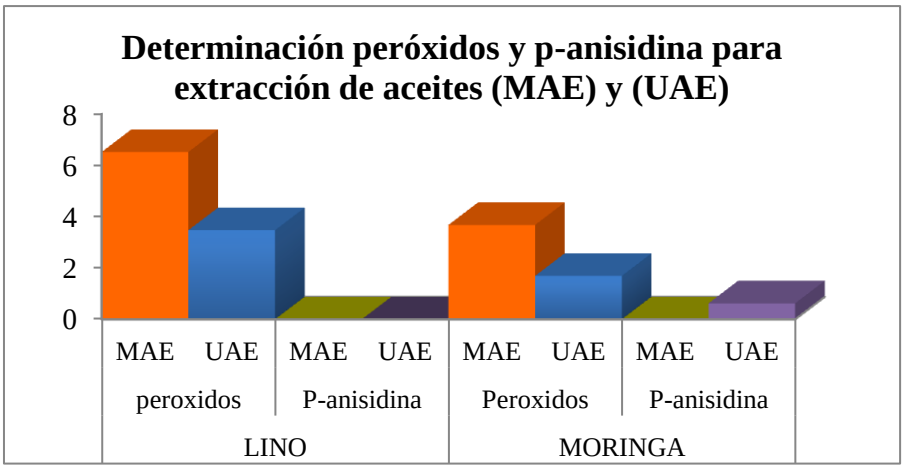


Figura 8. Índices de peróxidos y p-anisidina para métodos (MAE/UAE) en la extracción de aceite de semillas de Lino y Moringa

4.2 Composición de ácidos grasos del aceite de Lino y Moringa

Se determinó por GC-MS el perfil de ácidos grasos de aceite de semillas de Lino dorado y Moringa y se identificaron los ácidos por su espectro de masas y su tiempo de retención (tr). Así se determinó la composición (en % de ácidos grasos) de cada aceite. Posteriormente, se analizaron también las posibles variaciones en la composición de ácidos grasos de cada aceite bajo las distintas condiciones ambientales (luz/oscuridad; tocoferol/ no tocoferol; ambiente/estufa 55ºC) y tiempo (0;1;2;4;8 semanas) sometidos en este estudio.

4.2.1. Composición en ácidos grasos del Lino dorado

En el aceite de Lino dorado en tiempo 0 se determinó el perfil de ácidos grasos (%) y el tiempo de retención (tr) (FIGURA 9), mostrando resultados similares a otros estudios (Nitrayová et al., 2014; Dubois et al., 2007): ácido palmítico (tr 12,94 y 5,21%), ácido esteárico (tr 16,46 y 4,47%), ácido oleico (tr 17,60 y 20,49%), ácido Linoleico (tr 19,39 y 12,99%) y ácido α-linolénico (21,38 y 56, 82%). Salvo por el contenido en ácido oleico (C18:1), el cual mantiene una valor más alto que los anteriores estudios.

La composición de AG del aceite de Lino dorado analizadas en GC-MS no mostró ninguna variación tras haberse sido sometido a las condiciones ambientales y tras el período de 8 semanas. Estos resultados son similares a otros estudios, donde la composición en AG del aceite de lino cambió muy ligeramente tras un período de almacenamiento de 6 meses (Nykter et al., 2006).

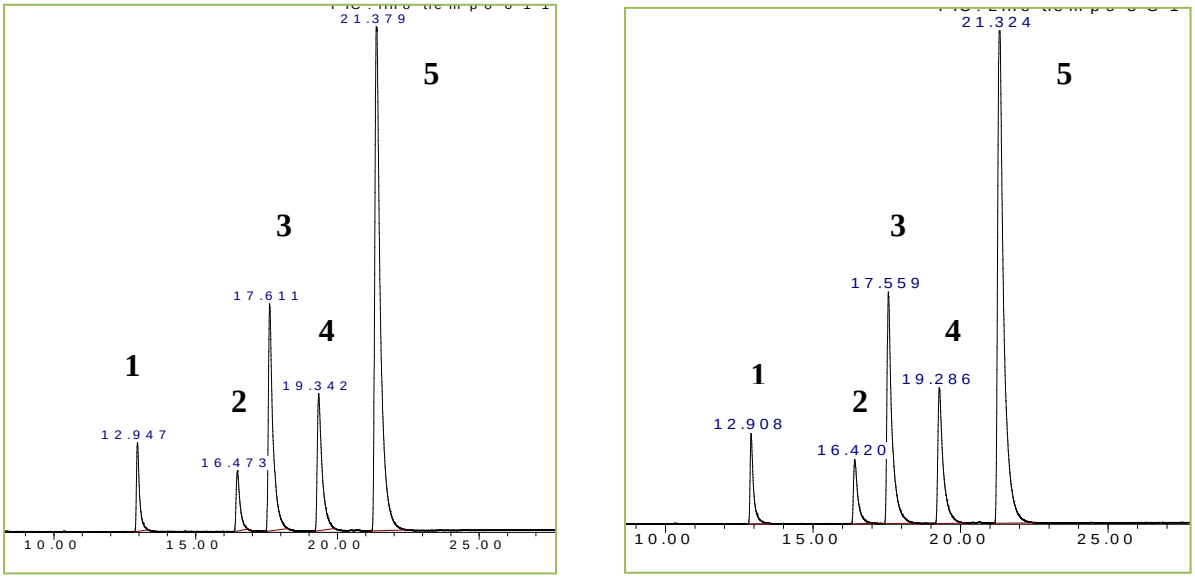


Figura 9. Perfil de ácidos grasos de aceite de Lino analizados por GC-MS, en tiempo 0 (**izquierda**) y tiempo 8 (**derecha**). **1**: ácido palmítico (16:0), **2**: ácido esteárico (18:0), **3**: ácido oleico (18:1), **4**: ácido linoleico (18:2), **5**: ácido linolénico (18:3)

4.2.2 Composición en ácidos grasos de *Moringa oleifera*

En cuanto al aceite de Moringa, también se analizó en las mismas condiciones que el aceite de Lino dorado. Su composición en ácidos grasos (TABLA 8) presenta algunas diferencias con estudios anteriores (Polprasid, 1994) en cuanto a la proporción de ácido oleico es más elevado (78%) frente a (65-75%). Asimismo, es menor en ácido behénico (4,98%) frente a (9%). Otros estudios (Farooq et al, 2005) diferencian entre variedades de *Moringa oleifera*, siendo la variedad proveniente de Pakistán muy parecida en (C16:0 6,20%; C16:1 0,87%; C18:0 4,9%); para el resto, el ácido oleico (74,8%) sigue siendo superior y el ácido behénico (6,1%) inferior. Se ha encontrado pequeñas cantidades de ácido lignocérico en casi todos los cromatogramas, aunque sólo en uno se detectó en la semana 4 (FIGURA 10), con un tiempo de retención (28,613 tr) y (0,61%). Aparte de este hecho, no se han producido cambios en las composiciones de ácidos grasos de la moringa a lo largo del tiempo de estudio.

Tabla 8. Contenido en ácidos grasos, tiempo de retención (tr) y (%) en ácidos grasos (AG) del aceite analizado de *Moringa oleifera*

Contenido	Tiempo de retención	% AG
Palmítico (C16:0)	12,96	6,21
Palmitoleico (C16:1/ω7)	14,06	0,87
Esteárico (C18:0)	16,49	4,91
Oleico (C18:1/ω9)	17,65	78,41
Araquídico (C20:0)	20,49	2,94
Behénico (C22:0)	21,65	1,64
Lignocérico (C24:0)	24,51	4,98

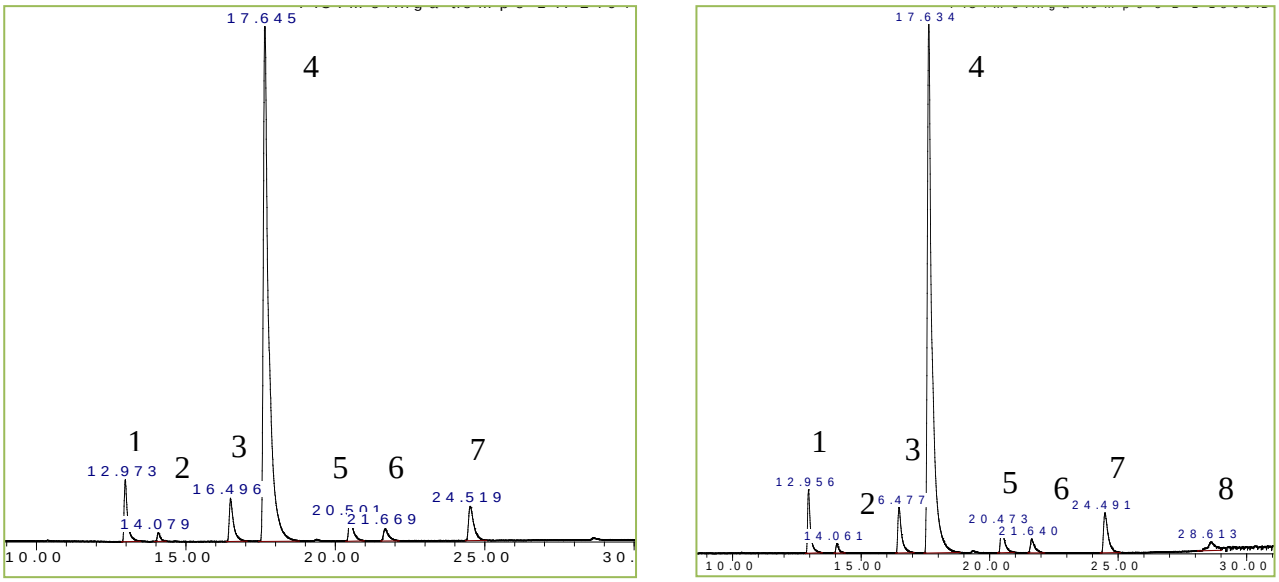


Figura 10. Perfil de ácidos grasos de aceite de moringa analizados por GC-MS, Tiempo 0 (izquierda) y Tiempo 4 (derecha). 1: ácido palmítico (16:0), 2: ácido palmitoleico (16:1), **3**: ácido esteárico (18:0), **4**: ácido oleico (18:1), **5**: ácido araquídico (20:0), **6**: ácido eicosenoico (20:1), 7: ácido behénico (22:0), 8: ácido lignocérico (24:0)

4.3 Estudio de la estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa de los aceites limita su vida útil y está relacionada con la rancidez o enranciamiento, ya que la degradación oxidativa presenta alteraciones en las características organolépticas de los aceites. El procesado del aceite, desde el tipo de extracción, la temperatura o el tipo de almacenaje utilizado, afecta directamente en la degradación oxidativa. Las características de cada aceite y de su composición, revelan una mayor o menor tendencia a la oxidación; por ello, los aceites con mayor índice de dobles enlaces (más insaturados), poseen mayor tendencia a la oxidación.

En este estudio se escogieron dos aceites para realizar un seguimiento comparativo de la estabilidad oxidativa bajo las mismas condiciones: Lino dorado más insaturado y más conocido; y Moringa, menos estudiado hasta la fecha. Ambos aceites se han sometido a seis variables, tal y como se puede ver en la TABLA 9, durante un tiempo de estudio de 0, 1, 2, 4 y 8 semanas. La temperatura de estufa fue de 55ºC y el antioxidante utilizado fue el α-tocoferol (200 ppm) . La concentración de α-tocoferol utilizada es habitual y se había referido ya en la literatura (Blekas et al., 1994) presentando una capacidad antioxidante mayor que otras concentraciones más elevadas.

Tabla 9. Condiciones del estudio

Cond	Luz	Oscuridad	Estufa	Ambiente	Antiox	No antiox
A	X			X	X	
B		X		X	X	
C		X		X		X
D	X			X		X
E		X	X			X
F		X	X		X	

4.3.1 Estabilidad oxidativa del aceite de Lino dorado

Para realizar el estudio de estabilidad oxidativa y observar sus posibles cambios en diferentes condiciones de almacenamiento, se analizó el aceite de Lino dorado a Tiempo 0 (TABLA 10). Los resultados fueron los esperables dado el tipo de extracción, presión en frío. El IP de inicio es una valor importante, ya que deja entrever si la extracción se ha realizado de forma correcta, y en este caso el valor aproximado de IP es de 3 (Nykter et al., 2006).

Tabla 10. Valores IP, AV y Totox de Tiempo 0 de aceite de Linaza

IP	AV	Totox
3,00 (±0,09)	0	6,01 (±0,19)

El aceite de lino presenta un contenido sustancial en tocoferol, conocidos por su efecto antioxidante. Uno de los propósitos del estudio fue determinar la diferencia en la degradación oxidativa entre el aceite de lino con su contenido natural en tocoferoles, y por otro lado añadiéndole 200 ppm de α-tocoferol. También, conociendo que ciertas condiciones de almacenamiento como la temperatura elevada degradan más rápidamente el aceite de lino, se comprobó los efectos de la adición de antioxidante α-tocoferol en estas condiciones.

A continuación, se presentan y discuten los resultados más destacables obtenidos en las distintas condiciones, comparando el efecto de las variables en los experimentos a distinta temperatura (ambiente/estufa); y también se comparan las cuatro condiciones a temperatura ambiente, que incluyen las condiciones de luz/oscuridad con antioxidante y por otro lado, de luz/oscuridad sin antioxidante.

4.3.2 Efecto de la luz a temperatura ambiente y con antioxidante

El α-tocoferol se ha añadido como antioxidante similar a los ya presentes de forma natural en las semillas de lino y aceite de lino. Dentro de los tocoferoles presentes en el lino (Aceite y semillas), el

tocoferol más abundante es el γ-tocoferol, presentando menores proporciones de α-tocoferol (0,59mg/kg) y δ-tocoferol (1,68mg/kg) (Bozan and Temelli; 2008). El contenido determinado de γ-tocoferol en aceite de lino es de 70,3mg/kg y 75,6mg/kg (van Ruth et al., 2001; Bozan and Temelli; 2008), en cambio otros autores (Li et al., 1996) encontraron hasta 860 mg/kg. Aunque el aceite de lino contenga un gran contenido en γ-tocoferol, no aumenta su estabilidad frente a la oxidación, debido a su alto contenido en AGPI. Además, del grupo de tocoferoles, el α-tocoferol es el que presenta mayor capacidad antioxidante del resto de tocoferoles, y el aceite de lino presenta un bajo contenido (Bozan and Temelli; 2008). Esta es una de las variables en el caso del aceite de lino en relación a su estabilidad oxidativa, ya que el almacenamiento está relacionado con la disminución del contenido de tocoferoles, y por ello influye directamente en su vida útil. En las condiciones (A,B) se añadieron 200 ppm de α-tocoferol para corroborar si existía sinergia entre los tocoferoles presentes de forma inherente en el aceite y los añadidos, o si no existía.

En este caso, los resultados encontrados fueron los esperables (FIGURA 11), ya que al confrontar las condiciones de luz (A) y oscuridad (B), se observa un claro aumento de la condición A frente a la B. Este hecho se debe al contenido en AGPI, más sensibles que los ácidos grasos monoinsaturados como el oleico a la degradación oxidativa. Al degradarse más rápido en presencia de luz, el contenido en tocoferoles disminuye y aumenta los valores de IP.

Así, en el T1, los valores de IP son similares entre ellos, aunque ya mayores en las muestras a la luz (con una diferencia de 6); ya en el T2 se observa un claro despunte de la condición A frente a la B (24,1 de diferencia). La mayor diferencia de valor IP se genera en el T4, donde la condición A alcanza su máximo valor de IP, y donde la diferencia entre ambos es de (45,9). En el T4 aparece por primera vez el valor AV de la condición A, fruto de la creación de productos de degradación secundarios. El T8 se ve marcado por un descenso pronunciado en el IP del aceite en la condición A y su aumento de valor de AV; en la condición B, los IP se mantienen estables frente al T4, apareciendo por primera vez un pequeño AV (0,18). La disminución en el Índice de peróxidos y el aumento del Valor de Anisidina en el caso de la condición A puede deberse a la aparición de productos de oxidación secundaria como aldehídos.

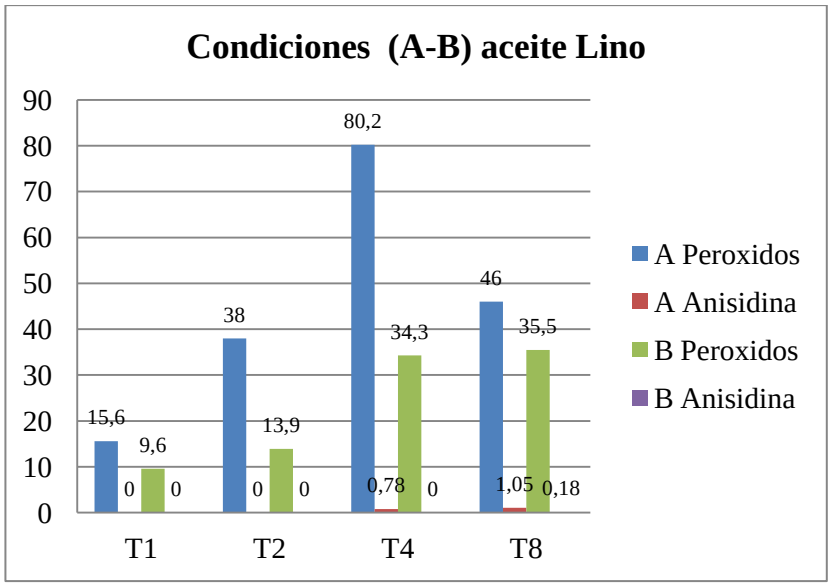


Figura 11. Valores IP y AV para las condiciones A (luz) y B (oscuridad) en los Tiempos (1,2,4,8)

4.3.3 Efecto de la luz a temperatura ambiente y sin antioxidante

En el caso de las condiciones sin antioxidante, se estudió el deterioro oxidativo frente al factor de degradación de luz (D) y de almacenamiento a oscuras (C). El objetivo era determinar si los tocoferoles presentes en el aceite de lino de forma natural protegían menos que las condiciones (A,B) en sinergia con el tocoferol añadido y cómo de grande era el efecto de degradación por la luz en este caso.

Los resultados entre condiciones son esperables (FIGURA 12), ya que la condición expuesta a la luz (D) muestra unos valores más altos de IP que la condición sin luz (C). Igual que las condiciones (A,B), en el T1 la diferencia inicial entre ambas condiciones es menor (5,7) en comparación con la que se observa en el T2 (13). Asimismo, en el T4 la diferencia entre ambas condiciones va aumentando (21,1), hasta llegar a su punto máximo en el T8 (37,3). Los valores de AV no se vieron incrementados hasta el T8 en la condición D, aunque remite a un valor muy bajo (0,06).

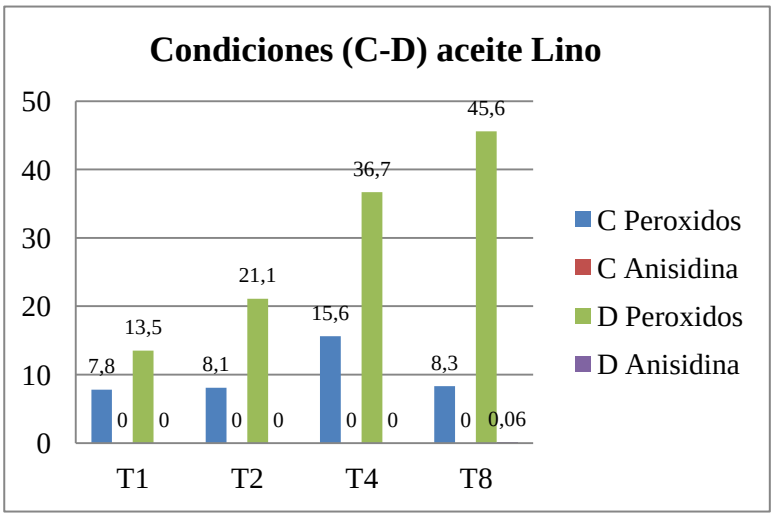


Figura 12. Valores IP y AV para las condiciones C (oscuridad) y D (luz) en los Tiempos (1,2,4,8)

4.3.4 Comparación de las condiciones con antioxidante y sin antioxidante

Los resultados obtenidos acerca de la protección del antioxidante tocoferol a temperatura ambiente con luz (A,D) y sin luz (B,C) fueron inesperados, ya que en el caso de las condiciones con antioxidante (A,B) los valores de IP fueron mayores que las que no tenían. Si comparamos los resultados de los valores de IP de las condiciones (A,B) con las (C,D), como se aprecia en la TABLA 11, los experimentos realizados en las condiciones con antioxidante (A,B) produjeron durante su almacenamiento más IP que (C,D) en las mismas condiciones. De la misma forma, en el T1 se observa menor diferencia entre condiciones.

En las condiciones A-D, se observa el mayor aumento de la diferencia entre ambas en el T4, debido al aumento de la degradación oxidativa de la condición A. Asimismo, en el T8 los resultados se acercan mucho, fruto de la degradación de la condición D. En cambio, en las condiciones de oscuridad B-C, la diferencia entre ambas condiciones, muestra un ascenso progresivo, terminando en una diferencia entre ambas en el T8 de 27,20. Estos resultados podrían explicarse por la capacidad pro-oxidante que puede tener el antioxidante tocoferol. Aunque el α-tocoferol parece presentar un efecto antioxidante mayor que otros tocoferoles (Bozan and Temelli; 2008), también presenta en determinadas concentraciones, un mayor efecto pro-oxidante que otras isoformas de tocoferoles por su alta reactividad química como neutralizador de radicales libres (Elisia et al.; 2013).

Tabla 11. Comparación de los valores IP en los tiempos (1,2,4,8) de las condiciones sin luz (B;C) y con luz (A;D)

Condiciones/ Tiempos	T1	T2	T4	T8
B-C (sin luz)	(B +1,80)	(B +6,00)	(B +18,70)	(B +27,20)
A-D (con luz)	(A +2,10)	(A +17,90)	(A +43,50)	(A +0,40)

4.3.5 Estudio acelerado a 55ºC con y sin antioxidante

Los resultados obtenidos en las condiciones sometidas a 55ºC (E-F) fueron los esperados, ya que el aumento de temperatura acelera la degradación oxidativa y provoca la auto-oxidación de los ácidos grasos, disminuyendo a su vez el contenido en tocoferoles del aceite de lino. Ya en estudios clásicos (El-Gharbawi et al., 1974) se constató el aumento del valor de peróxidos en el aceite de lino, al aumentar la temperatura a 58ºC. Por otra parte, la adición de antioxidantes sintéticos y naturales es un hecho extendido para aumentar la estabilidad de los aceites vegetales. Dentro de los antioxidantes propuestos en la literatura, el α-tocoferol posee mayor capacidad antioxidante. Se reportó la pérdida total (100%) de α-tocoferol en el aceite de lino sometido a 95ºC en el estudio de (Elisia et al., 2013), el cual se asoció a un aumento del efecto pro-oxidante del α-tocoferol en el aumento de productos de degradación primaria.

Los resultados obtenidos (FIGURA 13) muestran un efecto positivo en la condición F (con α-tocoferol). Se puede observar ya en el T1, que los valores de peróxidos entre la condición sin antioxidante (E) y la F distan de IP 159,1, siendo F el más bajo. Esta protección se muestra efectiva principalmente en el T1, ya que en el T2, la condición F aumenta en un IP de 249,2 con respecto al T1; mientras que la condición E aumenta de forma progresiva pero sin un ascenso tan pronunciado con un IP de 183,4 entre T1 y T2. Por otra parte, los valores de p-anisidina (AV), se muestran más elevados en el T1 para la condición E, que revela el paso de los compuestos de degradación primaria a secundaria, debido a que el contenido en tocoferol naturales ha disminuido y no protege de la degradación, como sí lo hace el antioxidante añadido de la condición F. El aumento drástico del IP de la condición F en el T2, se ve reflejado asimismo en el aumento de AV en el T2, que se equipara al de la condición E. El T4 revela como la degradación de compuestos primarios se sigue efectuando, al aumentar aún más los valores de IP de ambas condiciones, pero sin verse afectados apenas los AV que denotarían el paso a compuestos de degradación secundarios. Así, en el T8, el descenso de los valores de IP de la condición E son acordes con el aumento de los valores AV, y un aumento de los compuestos de degradación secundarios. La condición F, muestra un valor Totox más elevado (945,86) en el T8 frente a la condición E (559,15), pero en un análisis de los valores por separado de IP y AV (FIGURA 13), se puede observar como los valores de IP de la condición F son más elevados y los AV menores, justo al contrario de la condición E. Este hecho prueba el efecto protector del α-tocoferol en condiciones de alta temperatura.

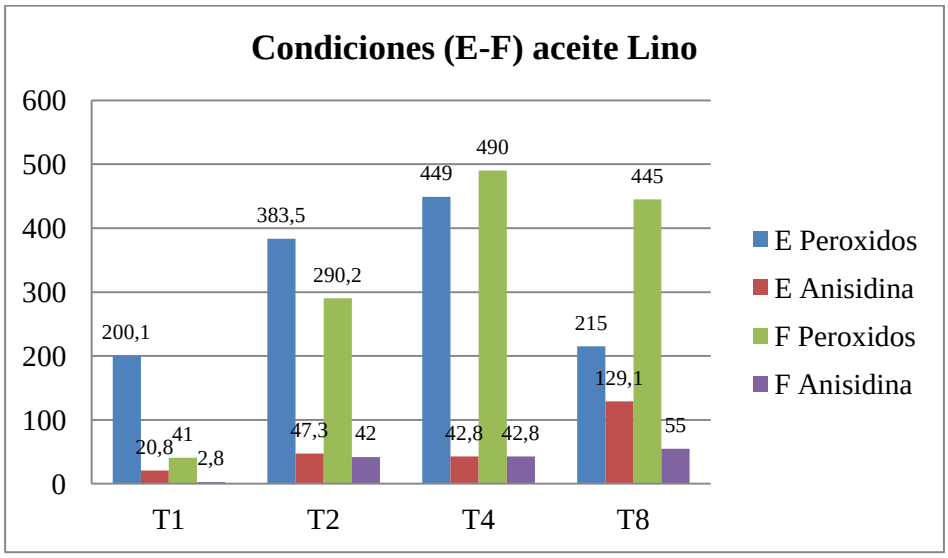


Figura 13. Valores IP y AV para las condiciones a 55ºC sin antioxidante (E) y con antioxidante (F) en los tiempos (1,2,4,8)

4.3.6 Valores Totox aceite de Lino

La degradación oxidativa en el aceite de Lino dorado presenta un aumento de los valores Totox particular en cada tipo de condición. Como era de esperar, el aceite de Lino se oxidó rápidamente, debido a su alto contenido en AGPI, mostrando valores altos de Totox desde el Tiempo 1 (TABLA 12). Los IP permitidos por el Codex Alimentarius, de 15 meqO_2/kg para aceites y grasas de presión en frío, fueron rebasados en el Tiempo 1 (T1), aunque la condición C la sobrepasase por muy poco (sólo 0,6).

El aumento de la degradación oxidativa desde el Tiempo 1 (T1) hasta el Tiempo 2 (T2) resultó en el doble del valor de T1, salvo para las condiciones C que tan sólo aumentó un (0,4) con respecto a T1; y la condición F que despuntó frente al tiempo anterior (537,2). En el T4 todos los valores Totox aumentan, aunque esta elevación no produce unos valores tan altos como podría esperarse si aumentasen de forma lineal como en el T2; salvo en la condición F, que produce el valor Totox más alto. En el T8 se produce un descenso esperable de los valores Totox, que indica que parte de los productos de degradación primaria se convierten en productos de degradación secundaria. De estos datos se deduce que la estabilidad oxidativa del aceite de Lino es baja proporcionándole una vida útil muy corta.

Tabla 12. Resumen valores Totox en las condiciones (A,B,C,D,E,F) en los tiempos (1,2,4,8)

	T1	T2	T4	T8
A	31,37	76,2	162	92,5
B	19,6	27,8	68,9	71,6
C	15,6	16	31,3	15,1
D	27	42,4	73,4	91,5
E	423	814	941	560
F	85,2	622,4	1022,5	945

En cuanto a las condiciones más oxidativas, fueron las esperables, relacionadas con la temperatura de estufa (condición E y F) alcanzando un Totox máximo de (1022,5) para la condición F. Se puede observar en la FIGURA 15 la degradación oxidativa a nivel visual, donde se aprecia la pérdida de color del aceite en las condiciones de estufa (E y F). Asimismo, a nivel organoléptico, se apreció el olor a rancidez producido por la degradación de los ácidos linoleico y ácido α-linolénico. En las condiciones de temperatura ambiente (A,B,C,D) (FIGURA 14), se puede observar como la adición de antioxidante α-tocoferol (A,B) frente a las que carecían de éste (C,D), no se obtuvieron los resultados esperados de protección contra la degradación producida por la luz (A,D), sobre todo si lo comparamos con las condiciones de estufa (E,F), donde sí se obtuvieron diferencias. Por otro lado, las condiciones más beneficiosas para la conservación del aceite de Lino dorado, fue la condición de ambiente en oscuridad y sin antioxidante (C). Un estudio realizado en condiciones de oscuridad durante 7 días (Wiesenborn et

al., 2004), ya determinó que las características del aceite de lino a nivel organoléptico, aroma a nuez y color amarillento, no tenían porque deberse a la generación de compuestos de degradación primaria (valores de peróxidos). La condición C (sin luz y sin antioxidante), fue la que mejor conservó el aceite de lino en los valores de Totox, así como a nivel organoléptico tal y como se aprecia en la FIGURA 15, en la que la condición C se muestra a T8 sin observarse cambios de color aparentes.

En resumen, los valores Totox del aceite de lino a lo largo de este estudio de estabilidad oxidativa en distintas condiciones, mostraron un aceite fotosensible, dada su degradación en las condiciones de luz (A/D). Sin embargo, el principal factor pro-oxidante fue la temperatura, mostrando un aceite muy termolábil, ya que las condiciones de mayor temperatura (en estufa, E/F) fueron las que mostraron mayores índices de degradación oxidativa.

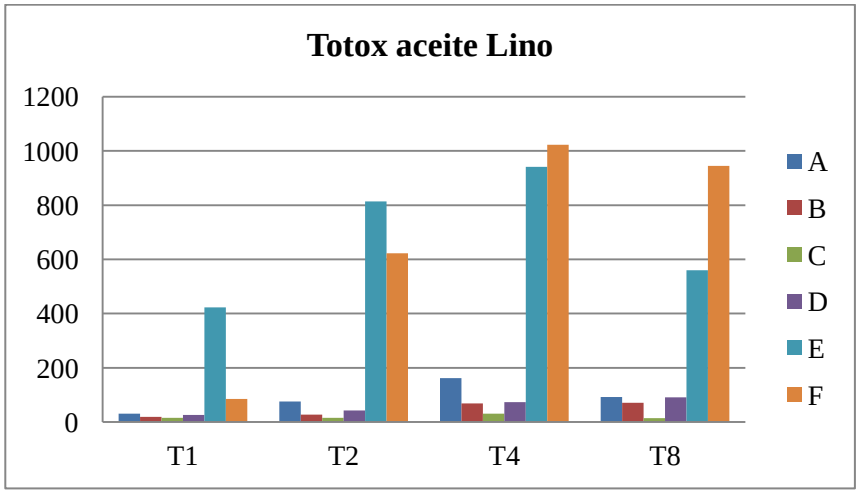


Figura 14. Resumen de la tendencia de valores Totox para las condiciones (A,B,C,D,E,F) en los tiempos (1,2,4,8) en el aceite de lino

Figura 15. Muestras de las condiciones (A-F) a Tiempo 8 de aceite de Lino

4.3.7 Estabilidad oxidativa del aceite de *Moringa oleifera*

Para realizar el estudio de estabilidad oxidativa y observar sus posibles cambios en diferentes condiciones de almacenamiento, se empezó analizando el aceite de *Moringa oleifera* a Tiempo 0 (TABLA 13). Los resultados fueron los esperables dado el tipo de extracción, presión en frío y la

muestra estudiada que no era reciente. Los valores de IP para una muestra de aceite de *Moringa oleifera* nueva suelen estar entre 1 y 2 (Farooq, Rashid; 2007[b]).

Tabla 13. Valores IP, AV y Totox a Tiempo 0 de aceite de *Moringa oleifera*

IP	AV	Totox
9,80 (±0,28)	0,17	19,68 (±0,44)

El aceite de *Moringa oleifera* posee una composición en ácidos grasos monoinsaturados elevada, principalmente el oleico y un contenido inferior que el lino en AGPI, por ello era de esperar que los valores y condiciones de degradación fueran distintas.

El aceite de *Moringa oleifera* presenta un elevado contenido en tocoferoles (α, γ, δ). El contenido encontrado en aceite de *Moringa oleifera* es de 140,50 mg/kg para el α-tocoferol; 63,18 para el γ-tocoferol; y 61,70 para el δ-tocoferol (Farooq, Rashid; 2007[b]). En los experimentos en los que se añadió 200 ppm de α-tocoferol se buscaba determinar si existía sinergia entre ambos tipos de antioxidante y si influía en la estabilidad oxidativa. Además, dado que el aceite de *Moringa oleifera* posee una composición en ácidos grasos similar al aceite de oliva, mucho más estudiado, se quería determinar qué condiciones afectaban más a su estabilidad oxidativa.

A continuación, se comentan los resultados más destacables de los experimentos en las distintas condiciones, comparando el efecto a distintas temperaturas, y entre las cuatro condiciones a temperatura ambiente a su vez, se han comparado las variables de luz/oscuridad con antioxidante y por otro lado, de luz/oscuridad sin antioxidante.

4.3.8 Efecto de las condiciones ambiente con antioxidante en aceite de *Moringa oleifera*

El α-tocoferol se añadió como antioxidante similar a los ya presentes de forma natural en las semillas de *Moringa oleifera* como los (α-δ-γ) tocoferol. En las condiciones (A,B) se añadieron 200 ppm de α-tocoferol para corroborar si existía o no sinergia entre los tocoferoles presentes de forma inherente en el aceite y los añadidos.

En este caso, los resultados en las distintas condiciones son esperables, ya que al comparar las condiciones de luz (A) y oscuridad (B), se observa un claro aumento de IP en la condición A frente a la B. Partiendo del valor IP a T0 (9,80), se puede observar que la condición de luz (A) es especialmente sensible a la degradación para el aceite de *Moringa oleifera*.

A lo largo de los distintos Tiempos del estudio, el IP en la condición B (sin luz), se mantiene bastante estable, alcanzando un valor IP máximo de 13, similar al de T0 (9,80), con una diferencia entre ambos de solo 3,20. Tal y como sucede en otras condiciones a lo largo de este estudio, en el T4 de la condición B, los valores de IP descienden (5,70), para dar lugar a compuestos secundarios de degradación (0,25). Para terminar en el T8 con un aumento de los valores AV (0,5), de forma esperable.

La condición A, tal y como se observa en la FIGURA 16, presenta unos valores elevados de IP desde el T1, lo cual determina la fotosensibilidad del aceite de *Moringa oleifera* que se degrada más rápidamente en condiciones de luz. Asimismo, los resultados observados, indican que el antioxidante añadido no ejerce un papel protector frente a la luz. Dado que el aceite de oliva presenta una composición en ácidos grasos similar a la *Moringa oleifera*, en un estudio anterior (Blekas et al., 1994) se hace referencia a un mayor contenido en hidroperóxidos en los primeros días de las muestras de aceite de oliva con α-tocoferol a 100ppm comparadas con el control sin antioxidante. En el T2, los valores de IP siguen aumentando, aunque no muestran los ascensos drásticos del aceite de Lino. En el T4 comienzan a aparecer los compuestos de degradación secundarios y por ello el valor IP desciende frente al T2. En el T8 aparece un resultado llamativo, los valores de IP aumentan de forma drástica (más del doble, hasta IP= 60,6) frente al T4, sin aparecer compuestos secundarios de degradación.

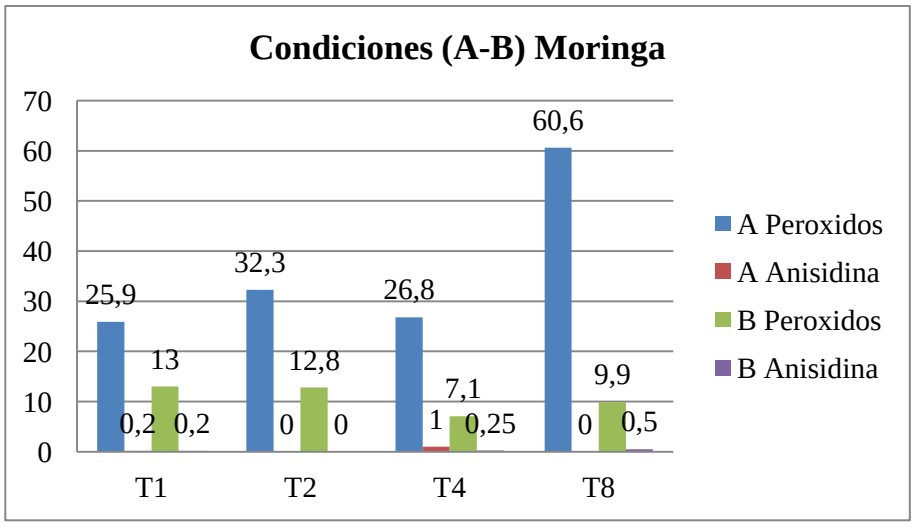


Figura 16. Valores IP y AV para las condiciones A (con luz) y B (sin luz) en los tiempos (1,2,4,8)

4.3.9 Efecto de las condiciones ambiente sin antioxidante con aceite de *Moringa oleifera*

Los resultados obtenidos en estas condiciones (FIGURA 17), sin luz (condición C) y con luz (condición D) sin antioxidante, muestra unos resultados muy similares a las condiciones ambiente con antioxidante (A, B). Resulta llamativo que los valores IP que resultan menos predecibles en las condición A en el T8

en el que el valor IP aumenta de forma drástica sin crear compuestos de degradación secundarios (AV) se repita en un valor tan similar y reproduciendo los mismos altibajos en la condición D. Este hecho, indica que la variable de antioxidante no influye en la degradación oxidativa frente a las condiciones de luz (A, D) para este aceite de moringa.

De igual forma, en las condiciones sin luz (B, C), se repiten unos patrones de valores IP muy similares, presentando la condición B (con antioxidante) una diferencia en los valores de IP de (0,70) a T1 frente a la condición sin antioxidante (C). Este hecho podría ser debido a una acción pro-oxidante del α-tocoferol añadido a temperatura ambiente, de igual forma que aparece en el aceite de lino en las condiciones ambiente sin luz (B,C), que la condición con antioxidante (B) presenta mayores valores IP que la que no contiene antioxidante (C).

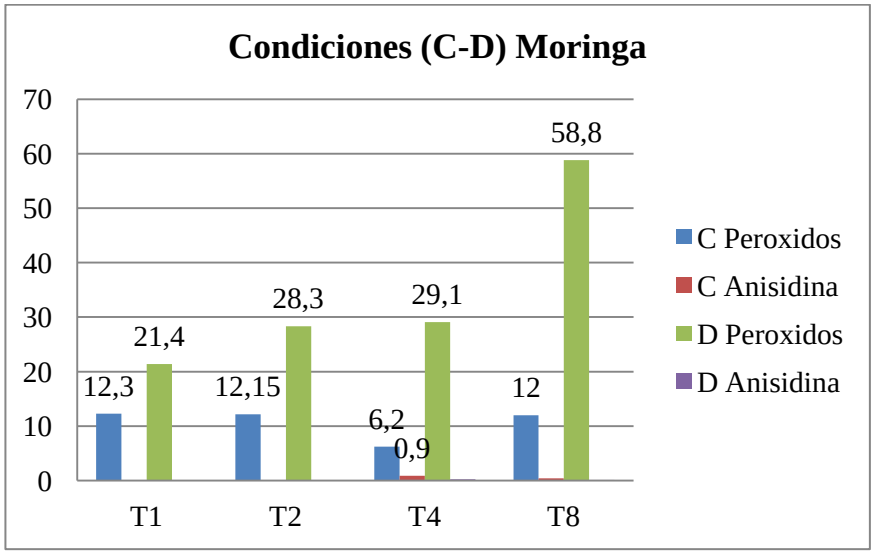


Figura 17. Valores IP y AV para las condiciones C (sin luz) y D (con luz) en los tiempos (1,2,4,8)

4.3.10 Estudio acelerado de aceite de *Moringa oleifera* a 55ºC con y sin antioxidante

En las condiciones de temperatura a 55ºC (FIGURA 18), sin antioxidante (E) y con antioxidante (F), y partiendo de unos valores de IP a T0 de 9,80, los valores a T1 y a T2 no aumentaron demasiado. A T1, se observa un ligero aumento en el IP (1,3) de la condición E (sin antioxidante) frente a la condición sin antioxidante (F). Este hecho sea probablemente debido al papel protector del α-tocoferol en condiciones de oxidación acelerada. En el T2 se observa de nuevo el papel protector del antioxidante, ya que en la condición E el valor de degradación secundaria (AV) aumenta, mientras que el IP de F es mayor debido a que no se han formado productos de degradación secundaria. Los valores de T4 resultan esperables, por la tendencia antes descrita del papel protector del α-tocoferol. Se observa un ascenso considerable en la condición E, así como el aumento de los productos de degradación secundarios propios del avance de la oxidación. En la condición F, los resultados son esperables, disminuye el valor IP (-7,2 unidades)

en relación al T4, para dar paso a los compuestos de degradación secundarias (+0,5). Por ello el T8, sigue reflejando esta hipótesis, mostrando la condición sin antioxidante (E) mayor valor de degradación secundaria (+1,05) con respecto a la condición con antioxidante (F).

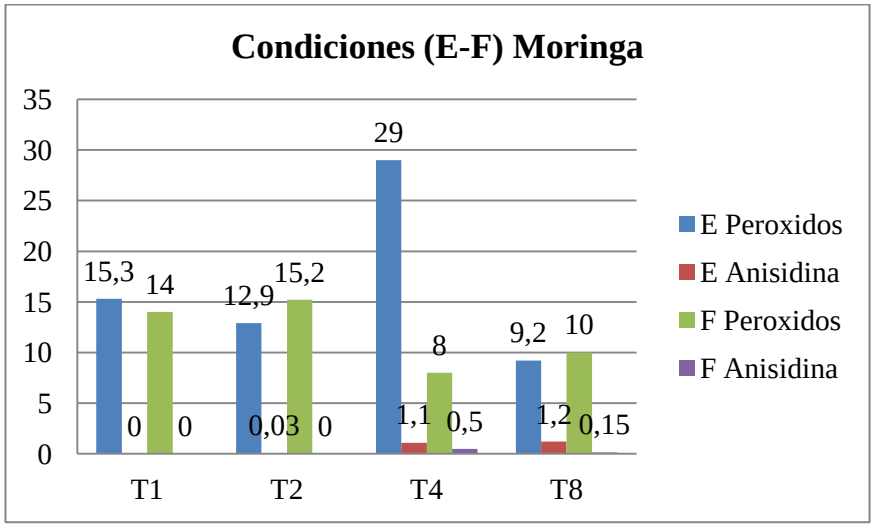


Figura 18. Valores IP y AV para las condiciones a 55ºC sin antioxidante (E) y con antioxidante (F)

4.3.11 Valores Totox de aceite de *Moringa oleifera*

La degradación oxidativa en el aceite de *Moringa oleifera* presenta un aumento de los valores Totox particular en cada tipo de condición. Estos valores se encuentran influenciados por las características del aceite de partida, pero aún así hubo condiciones en las que la degradación oxidativa fue mínima. Los IP permitidos por el Codex Alimentarius, de 15 meqO_2/kg para aceites y grasas de presión en frío, fueron rebasados en el Tiempo 1 (T1) en las condiciones de luz (A, D), mientras que el resto de condiciones (B, C, E , F) no los sobrepasaron en ningún punto del estudio, aun existiendo variaciones en los valores IP y aumentando los compuestos de degradación secundaria en algunos casos. Este hecho indica que la preservación del aceite de Moringa de la luz puede tener un efecto mayor que otros factores, como la adición de tocoferol, incluso en condiciones de mayor temperatura.

En el estudio de la estabilidad oxidativa del aceite de *Moringa oleifera*, las condiciones que presentaron una degradación oxidativa mayor fueron las relacionadas con la exposición a la luz (A y D) tal y como se puede observar en la FIGURA 19. Asimismo, se observa que el antioxidante α-tocoferol no es efectivo para esas condiciones. Por otro lado, en los experimentos en condiciones de oscuridad (B, C, E, F) incidieron muy levemente en la degradación oxidativa. Aunque los valores Totox, disminuyen en el T8 , es debido a que a partir del T4 se forman productos secundarios de oxidación, y disminuye la proporción de peróxidos, convirtiéndose en cetonas y aldehídos. Se observa que la condición E (estufa

sin antioxidante) es la que ha alcanzado mayor AV, pudiendo deducirse que el alfa-tocoferol ha ayudado a que la condición F no aumenten los productos secundarios de degradación.

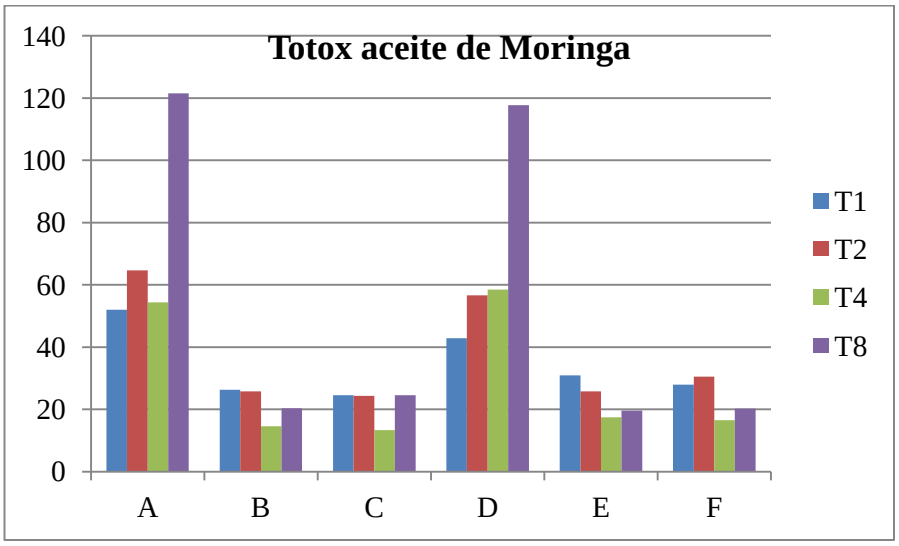


Figura 19. Valores Totox para las condiciones (A,B,C,D,E,F) en los tiempos (1,2,4,8)

4.4. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de hojas de *Moringa oleifera*

La capacidad antioxidante de la *Moringa oleifera* se ha descrito anteriormente (Vongsak et al., 2013; Siddhuraju et al., 2003; Farooq et al., 2005). Las hojas de la *Moringa oleifera* contienen de forma natural antioxidantes, como ácido ascórbico, compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides (Farooq et al., 2005). Por ese motivo, puede resultar un antioxidante útil para su utilización conjunta en la preservación de la vida útil de las grasas.

Uno de los objetivos de este estudio, era determinar si la capacidad antioxidante de las hojas de moringa descrita en trabajos previos (Vongsak et al., 2013) podría aplicarse añadiendo un extracto natural como antioxidante para conseguir una mejor estabilidad oxidativa del propio aceite de moringa o incluso otros pudiendo sustituir otros antioxidantes de síntesis (FIGURA 20).

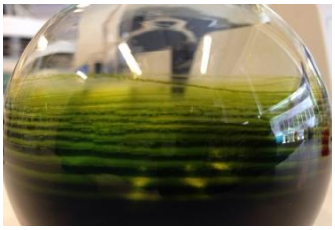


Figura 20. Extracto de hoja de moringa

En un primer estudio, se siguieron los parámetros de extracción utilizados por (Vongsak et al., 2013) en el que la hoja en polvo desecada de moringa obtuvo los mejores resultados frente a la fresca, utilizando como métodos de extracción la maceración con etanol al 70% durante 72 horas. Los resultados de este

método no fueron positivos y se cambiaron los métodos de extracción (vórtex; hexano; 24 horas en maceración).

Se estudió la capacidad antioxidante del extracto con el ensayo DPPH. Se preparó el extracto de tres muestras con cantidad más concentrada a menos de extracto 2 mL (3); 4 mL (2); 6 mL (1), y se observó el DPPH* inhibido por las muestras (TABLA 14). El valor TEAC obtenido del extracto fue 0,090 mM/g.

Tabla 14. Concentraciones de extracto (mg/ml) y DPPH inhibido (%)

Muestra	Concentración	ABS	DPPH* mg/ml	%DPPH*	% DPPH Inhibido
DPPH+ Met OH	Control	0,92	35,60	100	0
1	1,54 mg/ml	0,83	32,10	90,2	9,8
2	2,4 mg/ml	0,779	30,12	84,6	15,4
3	5,25 mg/ml	0,659	25,45	71,5	28,5

4.5. Estudio de la estabilidad oxidativa con el método Rancimat

El método Rancimat se encuentra ampliamente difundido para el estudio de la estabilidad oxidativa en aceites. En el aceite de *Moringa oleifera*, estudios anteriores (Farooq et al., 2007[a]) ya determinaron los Tiempos de Inducción (IT); así como la mezcla de otros aceites junto con aceite de *Moringa oleifera* para comprobar los cambios en la estabilidad oxidativa y la posibilidad de añadir extracto de hojas de *Moringa oleifera* en aceites con alto contenido en AGPI como el de girasol (Siddiq et al., 2005).

En este estudio, se quiso determinar la mejor proporción de extracto para el aceite de linaza, así como si el extracto de hojas de Moringa funcionaba en el aceite de oliva, ya que su uso en alimentación se encuentra más extendido que el de aceite de *Moringa oleifera*. Asimismo, se probaron diferentes mezclas de aceites y antioxidantes, para corroborar el efecto antioxidante del extracto de *Moringa oleifera*.

Además de determinar la capacidad antioxidante del extracto de la hoja de moringa, se realizaron dos estudios de su capacidad como antioxidante lipofílico frente a la oxidación de varios aceites utilizando el método Rancimat. En el primer estudio (FIGURA 21) se realizaron tres controles (Lino, Moringa, lino:moringa), frente a 200 ppm del extracto y se comparó con la misma proporción de alfa-tocoferol. Se sometieron a 110ºC ya que en el estudio anterior de estabilidad oxidativa se había sometido a 55ºC.

Para ampliar el estudio, se decidió mezclar los aceites de lino y moringa, para determinar si la moringa mejoraba la estabilidad oxidativa frente a altas temperaturas del lino. Tal y como se puede observar en la

FIGURA 21, la mezcla Lino:moringa mejoró en 2,14 h/IT (200,8%) frente al control de lino. En relación a la mezcla con los dos distintos antioxidantes, la adición de alfa-tocoferol provocó una disminución del tiempo de inducción del 9,9%, frente a la mejora del extracto de moringa del 1,7% con respecto al control. Se probó si existía sinergia entre ambos antioxidantes, resultando en un valor intermedio a ambos e inferior al control (3,38 h). En cuanto al aceite de *Moringa oleifera* obtuvo 87,9 h/IT y con el extracto de hoja de Moringa se obtuvo 103,3 h/IT, lo que supuso una incremento del IT en un 17,5%.

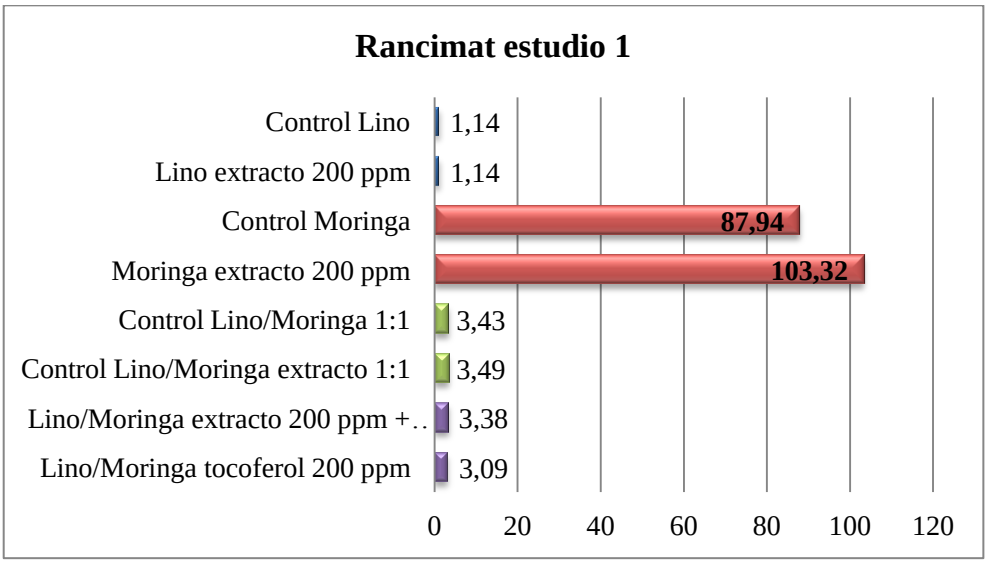


Figura 21. Tiempos de inducción obtenidos en el Estudio 1 de la capacidad antioxidante del extracto

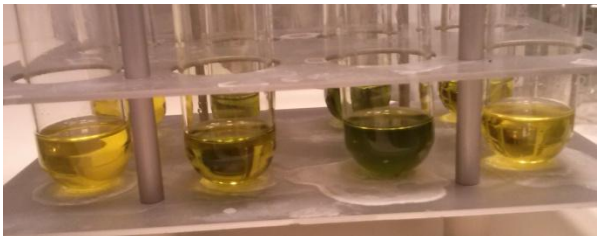


Figura 22. Muestras de aceites con extracto de moringa

Tras determinar la efectividad del extracto en el aceite de moringa del estudio 1, se estudiaron las proporciones (FIGURA 22) y como afectaban a los IT de los aceites. En el estudio 2 (FIGURA 23), se incluyó el aceite de oliva, para determinar si el extracto también tenía capacidad antioxidante en un aceite con similar composición y estabilidad térmica.

Tal y como se observa en la FIGURA 23, el lino por separado junto con las tres proporciones de extracto de moringa (200;500;1000 ppm) no resultó en ninguna mejora de su IT. En cambio, con el aceite de oliva, se obtuvieron unos resultados positivos empleando el extracto de moringa, que en proporción de 200 ppm incrementó el IT del control en un 41,3%. Este dato abre el camino para futuros

estudios de los cambios de IT de distintas proporciones de mezclas de aceite moringa:oliva, añadiendo distintas proporciones de extracto de moringa.

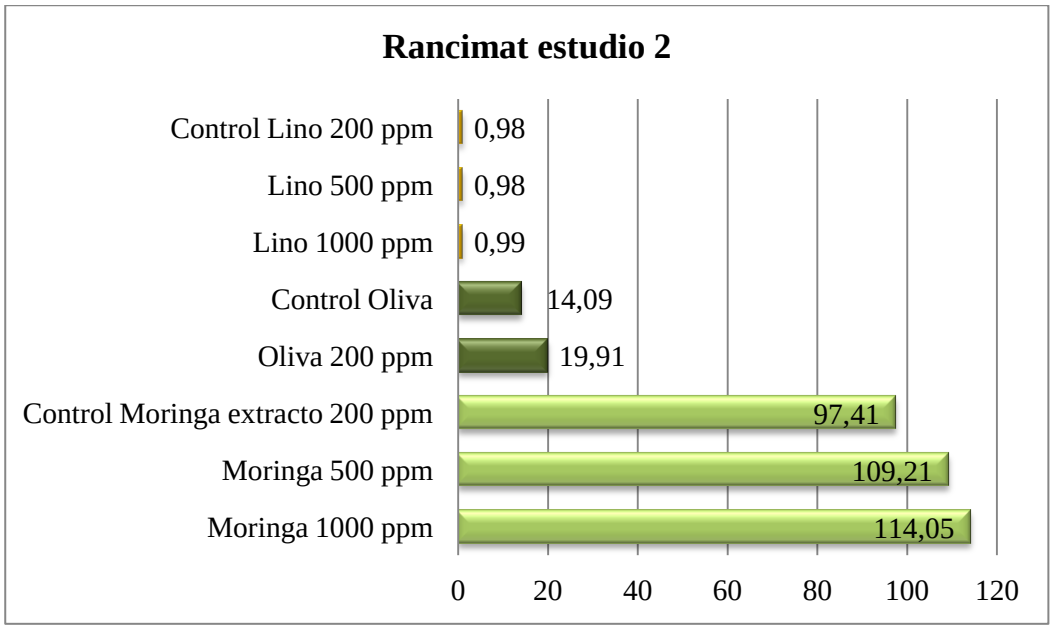


Figura 23. Tiempos de inducción (IT) en el Estudio 2 de Rancimat

En cuanto al aceite de moringa, los resultados revelaron que la inclusión de mayores proporciones de extracto de moringa mejoraba el IT. Se incrementaron con respecto al control de moringa del Estudio 1 (87,94 h TI) un 10,7% para la proporción de 200 ppm; un 24,2% para la de 500 ppm; y un 29,7% para la de 1000 ppm.

Se estudió también el Índice de actividad antioxidante (AI) del extracto de moringa sobre los tres aceites distintos probados (TABLA 15), resultando la proporción de 500 ppm la más efectiva en comparación con la proporción de 1000 ppm.

Tabla 15. Índices de actividad antioxidante (AI) para el extracto de Moringa

Extracto	Lino:Moringa	Moringa	Oliva
200 ppm	0,06	9,47	5,85
500 ppm	-	21,27	
1000 ppm	-	26,11	

4.6 Microencapsulación por Atomización

La técnica de atomización con Spray dryer se ha utilizado ampliamente en la microencapsulación de aceites y ácidos grasos (Gharsallaoui et al., 2007; Gouin, 2004). La microencapsulación realizada en

este trabajo tenía por objetivos estudiar que esta técnica no afecta a la estabilidad oxidativa del aceite microencapsulado además de demostrar que la encapsulación puede ser adecuada para añadir este ingrediente en una matriz alimentaria.

Para ello se han utilizado dos aceites con características de insaturación y por tanto de estabilidad distintas, el de Lino dorado con mayor índice de ácidos grasos poliinsaturados y por ello más propenso a la oxidación y degradación para actuar de control en relación de la EM; y el de Moringa más estable gracias a su composición más alta en monoinsaturados. Asimismo, se ha estudiado la microencapsulación del aceite de Moringa con extracto de moringa a 200 ppm. La microencapsulación con Spray Dryer obtuvo microcápsulas poco degradadas con los materiales de pared y relaciones probadas (1,5:1).

4.6.1 Eficiencias de Microencapsulación (EM)

Un aspecto importante de la microencapsulación es generar microcápsulas estables con elevadas cargas de aceite, es decir, con eficiencias (EM) lo más cercanas posibles al 100%. La EM (%) presentan diferencias según las técnicas, materiales de pared y relaciones utilizadas para elaborar las microcápsulas.

En un primer ensayo, se probó para la realización de las microcápsulas de aceite de Lino una proporción de aceite:pared de 1:4. Las eficiencias (EM) alcanzadas en este caso fueron bajas para la técnica de atomización utilizada (SD). No existe mucha información en la literatura sobre microencapsulación de aceite de linaza y la relación existente entre los materiales de pared y su posible influencia en la estabilidad oxidativa de este aceite. Por ello, se decidió optar por disminuir el agente encapsulante a relación aceite:pared 1:1,5, mejorando así su EM.

La mayor eficiencia de microencapsulación por SD fue para el aceite de Lino dorado con caseinato-lactosa (CS-LA) con relación aceite:pared (1:1,5) con un promedio de 56%. En otro estudio (Tonon et al., 2013), las eficiencias fueron más elevadas, influenciadas por los materiales de pared; siendo la mayor eficiencia de 96% para un material derivado del maíz (Hi-Cap 100) y la menor de 62,3% para la mezcla de maltodextrina junto con proteína sérica. Para el aceite de Moringa fue algo mayor aquella sin antioxidante de hoja de Moringa (51%) que la que contenía antioxidante (49%) (FIGURA 24).

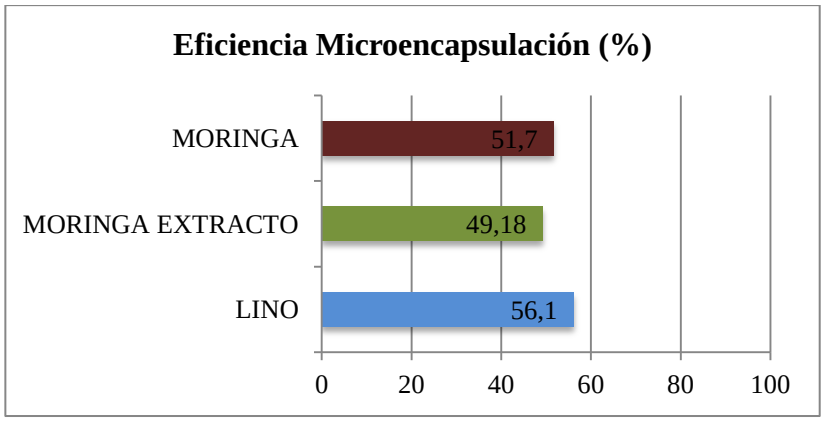


Figura 24. Eficiencias de encapsulación

4.6.2 Estabilidad oxidativa de microcápsulas de moringa

La estabilidad oxidativa de aceites microencapsulados, depende de gran parte en el tipo de material de pared utilizado. En un estudio de aceite de lino (Tonon et al., 2013) mostró peor eficiencia de encapsulación, pero mayor protección frente a la oxidación la mezcla de maltodextrina y proteína sérica. Por ello, es necesario que el material de pared posea un equilibrio entre la eficiencia a la hora de contener un compuesto lipídico y la capacidad de protegerlo frente a la rancidez.

Se realizaron análisis de la estabilidad oxidativa (Totox) de las microcápsulas de Moringa y Moringa con extracto de hoja de *Moringa oleifera*, para determinar el efecto del proceso de microencapsulación sobre la degradación oxidativa del aceite encapsulado. Para la microencapsulación de aceite de moringa se utilizó un nuevo aceite de moringa con valores Totox (1,1), peróxidos (0,55 meqO_2/kg aceite) y p-anisidina (0).

Tal y como se aprecia en la FIGURA 25, las microcápsulas de Moringa con extracto de hoja de Moringa mostraron valores más bajos de índice de peróxidos que las de aceite de Moringa.

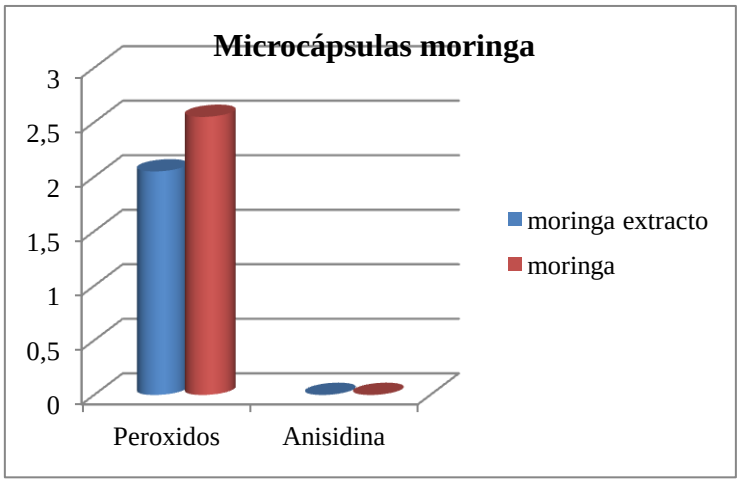


Figura 25. Valores de peróxidos y p-anisidina de las microcápsulas de moringa y moringa con extracto

Se puede comprobar, como anteriormente en el estudio de capacidad antioxidante del extracto de Moringa, que la proporción de 200 ppm en el aceite de moringa le otorga una protección contra la degración oxidativa. En este caso, el extracto disminuyó los peróxidos en un 20% frente a las microcápsulas de aceite de Moringa sin extracto.

4.6.3 Estudio de la aplicabilidad de las microcápsulas de moringa a una matriz alimentaria

Uno de los objetivos de este estudio era probar la aplicabilidad de microcápsulas dentro de una matriz alimentaria, estimando su biodisponibilidad y su capacidad de dispersión. Para determinarlo, se estudió si las microcápsulas de moringa con los agentes encapsulantes y proporción de aceite:pared eran digeridas en un modelo in vitro sencillo del tracto gastrointestinal y en qué lugar, estómago o intestino, se liberaba mayor proporción de aceite. Para ello se compararon con un control de microcápsulas de lino.

Tras corroborar su biodisponibilidad, se estudió la capacidad de dispersión de las microcápsulas en una matriz alimentaria líquida utilizando diversas matrices y proporciones.

4.6.3.1 Simulación de digestión gastrointestinal in vitro

La simulación de la digestión de las microcápsulas en las dos zonas, gástrica e intestinal, se muestra en la FIGURA 26. La digestión gástrica de las microcápsulas no es la deseable, ya que las enzimas que participan en la digestión lipídica se encuentran en el intestino delgado. El total de aceite liberado en el proceso de simulación de digestión de las microcápsulas fue de 86,7 mg para aceite de moringa, 79,7 mg para el aceite de moringa con extracto y 56,3 mg de aceite para el de lino.

Los mejores resultados de aceite liberado (%) en la simulación de digestión in vitro fueron para las microcápsulas de aceite de moringa sin extracto añadido.

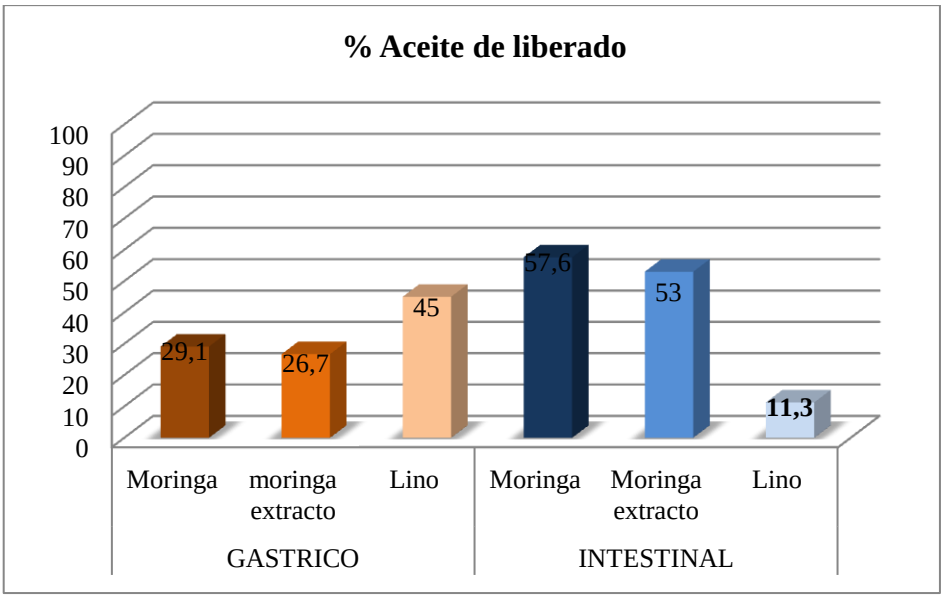


Figura 26. Simulación de digestión de microcápsulas

4.6.3.2 Estudio de la dispersión de las microcápsulas en una matriz alimentaria

La rancidez oxidativa de los aceites ocasiona cambios organolépticos (mal olor y sabor), por ello se estudió la microencapsulación como un método eficaz para proteger el aceite de moringa dentro de una matriz alimentaria, además de ayudar a dispersar aceites en matrices hidrofílicas. Para este estudio, se probaron como matrices alimentarias (zumo/leche) en proporciones (1:1; 3:1; 3,5:1) con una cantidad de microcápsulas (1,28g) correspondiendo al 10 % de ingesta calórica diaria y correspondiendo con el 10% de la aportación de Omega 3 (244,1 mg).

En una primera aproximación para determinar qué zumo reunía mejores características para ser evaluado como matriz alimentaria, se estudiaron los zumos de pomelo, manzana, pera y uva (TABLA 16). Se buscaba un pH lo más alejado al pH gástrico (pH=2), para disminuir la posibilidad de hidrólisis de las microcápsulas dentro de la matriz. Asimismo, se buscaba un grado de turbidez (NTU) no demasiado elevado para poder observar la dispersión de las microcápsulas una vez dispersadas dentro de la matriz. Por ese motivo, el zumo de pomelo se descartó.

Tabla 16. Características de pH y NTU de las matrices estudiadas

Zumo pomelo	**2,70 pH**	**748 NTU**
Zumo manzana	3,36 pH	2,55 NTU
Zumo pera	3,43 pH	OR
Zumo uva	3,69 pH	1,40 NTU

Las primeras pruebas con el zumo de manzana, resultaron en una baja dispersión de las microcápsulas, tal y como se aprecia en la FIGURA 27 (izquierda). Se procedió a emulsificar las microcápsulas en la matriz utilizando lecitina de soja (1,5 g/150 mL), y se obtuvo una dispersión estable (FIGURA 27, derecha). El pH junto con la lecitina de soja se elevó a 3,53 pH y la turbidez pasó a fuera de rango (OR). Para aumentar el pH se optó por mezclar el zumo de manzana y las microcápsulas dispersadas con lecitina de soja con distintas proporciones de leche desnatada (TABLA 17).

Figura 27. Dispersión de microcápsulas en zumo de manzana (izquierda) Dispersión de microcápsulas con lecitina de soja (derecha)

Tabla 17. Valores de pH y NTU de las combinaciones de matrices zumo/leche

1:1 zumo/ leche desnatada	**4,97 pH**	**323 NTU**
3:1 zumo/leche desnatada	4,27 pH	470 NTU
3,5:1 zumo/ leche desnatada	3,77 pH	868 NTU

Los resultados de la muestra obtenida de la emulsificación de las microcápsulas de moringa junto con lecitina de soja, zumo de manzana y leche desnatada a las 24 horas, presentaba una ligera fermentación, que se hacía visible en un cúmulo de burbujas en la base de la muestra. A las 48 horas, la fermentación resultaba aún más visible como se puede observar en la FIGURA 28 (izquierda).

Se probó también como matriz alimentaria zumo de pera, de uva y leche desnatada (1:1:2), obtuvo el pH más elevado (5,28 pH) y 388 NTU. Se dispersaron las microcápsulas de moringa con la ayuda de lecitina de soja y se observó su evolución durante 7 días. Los resultados fueron una matriz estable con microcápsulas visibles en el poso del vial pero sin signos visibles de fermentación (FIGURA 28 derecha).

Figura 28. Signos de fermentación a las 48h de dispersar las microcápsulas en la matriz (izquierda) y muestra sin signos de fermentación a los 7 días (derecha)

Se puede concluir que la matriz alimentaria propuesta podría resultar una opción a desarrollar en posteriores estudios para la inclusión de microcápsulas, aunque serían necesarios más estudios sobre la estabilidad oxidativa en un tiempo prolongado en estas condiciones.

CONCLUSIONES

1) Considerando las dos técnicas de extracción de aceite utilizadas en semillas de lino y *Moringa oleifera*, la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción asistida con microondas (MAE), se puede concluir que UAE es la mejor, debido a que su rendimiento de extracción fue superior para ambas semillas (26,5% lino; 23,98% Moringa) y además originó un índice de peróxidos más bajo que la técnica de extracción MAE.

2) En relación a la estabilidad oxidativa del aceite de lino, en las condiciones y período observados, se puede concluir que el aceite de Lino se oxidó más rápidamente en presencia de luz que en oscuridad, como era de esperar debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados. No obstante, el principal factor pro-oxidante fue la temperatura, mostrando valores muy altos de oxidación total (índice Totox) desde la primera semana (Tiempo 1) en condiciones de temperatura a 55ºC y llegando a valores de Totox> 900 en solo cuatro semanas (condiciones E y F), por lo que se puede concluir que el aceite de lino es muy termolábil, siendo un factor clave para aumentar su vida útil y retrasar la autoxidación su conservación a baja temperatura.

3) En el caso del aceite de *Moringa oleifera*, la variable que más afectó a su estabilidad oxidativa fue la luz, siendo la oxidación mayor en estas condiciones, tanto con antioxidante (A) como sin él (D). En cambio, en el resto de condiciones sin luz, tanto a temperatura ambiente como a temperatura de 55ºC, y con o sin antioxidante añadido (condiciones B,C,E,F) la oxidación total observada (índice Totox) se mantuvo estable o incluso disminuyó a lo largo del estudio en todas las muestras en oscuridad, por lo que se puede concluir que el aceite de Moringa tiene una gran estabilidad oxidativa si se protege de la luz adecuadamente.

4) El extracto procedente de polvo de hoja desecada de *Moringa oleifera* mostró capacidad antioxidante, presentando resultados muy positivos en cuanto a la mejora del tiempo de inducción (TI) en el método Rancimat cuando se añadió el extracto de moringa a los aceites de *Moringa oleifera* y de oliva. La concentración de extracto que alcanzó un mayor incremento en el tiempo de inducción fue de 500 ppm extracto en aceite de *Moringa oleifera* (aumento del 24,2%). Los resultados también mostraron una mejora importante (200,8%) en el tiempo de inducción en la mezcla de aceites de lino y *Moringa oleifera*.

5) La microencapsulación de aceite de lino y moringa con atomizador Spray dryer resultó en eficiencias de microencapsulación superiores al 49%. Además, el método de microencapsulación

tuvo un impacto muy bajo en cuanto a la generación de peróxidos (solo 2,55 meqO_2/kg aceite para el aceite de moringa y 2,05 meqO_2/kg aceite para el aceite de moringa con extracto de moringa), por lo que es una alternativa válida para la incorporación de estos aceites en alimentos.

6) En la simulación *in vitro* de digestión de microcápsulas, los mejores resultados se obtuvieron con las microcápsulas de Moringa sin extracto añadido, con una liberación del contenido del 86,7% del total, con un porcentaje de aceite liberado del 57,6% en la zona intestinal.

7) Finalmente, en los estudios preliminares sobre una posible matriz alimentaria para la dispersión homogénea de microcápsulas de Moringa se identificó la combinación de zumo de pera; zumo de uva; leche desnatada (1:1:2) como una matriz adecuada. No obstante, se requieren estudios acerca de la estabilidad oxidativa de las microcápsulas dentro la matriz propuesta en un período superior para validar la vida útil e integridad de las microcápsulas.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Oil Chemists's Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist Society. AOCS Press; 1997.
2. American Public Health Association, American Water Works Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Nephelometric Method 2130 B. 21st. ed: New York; 2005.
3. Augustina MA, Abeywardenaa MY, Pattena G, Heada R, Locketta T. Effects of microencapsulation on the gastrointestinal transit and tissue distribution of a bioactive mixture of fish oil, tributyrin and resveratrol. J Funct Food. 2011;3: 25-37.
4. Babatunde S, Ogunsina A, Indira A, Bhatnagar S, Radha C, Debnath D, Gopala AG. Quality characteristics and stability of Moringa oleifera seed oil of Indian origin. J Food Sci Technol. 2014;51(3):503–510
5. Bajpai M, Pande A, Tewari SK, Prakash D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. Int. J.Food Sci Nutr. 2005;56:287-291.
6. Barriuso B, Astiasarán I, Ansorena D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challeging task. Eur Food Res Technol. 2013;236:1-15.
7. Blekas G, Tsimidou M, Boskou D. Contribution of α-tocopherol to olive oil stability. Food Chem. 1995;52(3): 289-294.
8. Bozan B, Temelli F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. Bioresource Technol. 2008; 99(14): 6354-6359.
9. Champagne C, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. J Biotech. 2007;18:184-190.
10. Chávarri M, Marañón I, Raquel Ares R, Ibáñez F , Marzo F , Villarán MC Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. J Int Food Micr. 2010;142:185–189.
11. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchirasilp S, Morales NP, Phivthong-Ngam L, Ratanachamnong P, Srisawat P, Pongrapeeporn KU. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of Moringa oleifera Lam. leaves. J Ethnopharm. 2008;116:439-446.
12. Costa-Lotufo LV, MTH Khan, A Ather, DV Wilke, PC Jimenez, C Pessoa. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. J Eth Pharm. 2005; 99:21-30.
13. Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, Perego P, Avogadro M, Cintas P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. Ultrason Sonochem, 2008; 15(5): 898-902.
14. Dubois V, Breton S, Lindera M, Fannia J, Parmentiera M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. Eur J Lipid Sci Technol. 2007;109:710-732.
15. Elisia I, Young JW, Yuan YV, Kitts DD. Association between tocopherol isoform composition and lipid oxidation in selected multiple edible oils. Food Res Int. 2013. 52(2); 508-514.
16. Fahey J W. Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1.Trees Life J. 2005;1(5):24-27.

17. FAO/WHO/UNU. Expert Consultation Report. Energy and Protein Requirements. Technical Report Series 724. Ginebra: OMS; 1985.
18. Farooq A, Ashraf M, Muhammad IB. Interprovenance variation in the composition of Moringa Oilseeds from Pakistan. J AOCS. 2005;82:45-52.
19. Farooq A, Abdullah IH, Shahid J, Muhammad IB. Enhancement of the oxidative stability of some vegetable oils by blending with Moringa oleifera oil. Food Chem. 2007;103:1181-1191. (a)
20. Farooq A, Rashid U. Physico-chemical characteristics of moringa Oleifera seeds and seed oil from a wild Provenance of pakistan. Pak J Bot. 2007;39(5): 1443-1453. (b)
21. Farooq A, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. Phytother Res. 2007; 21:17-25. (c)
22. Farooq F, Meenu R, Tiwari A, Khan A, Farooq S. Medicinal properties of Moringa oleifera: An overview of promising healer. JMPR. 2012;6(27):4368-4374.
23. Faizi S, Siddiqui BS, Saleem R, Aftab K, Shaheen F, Gilani AH. Hypotensive constituents from the pods of Moringa oleifera. Plant Med. 1998; 64:225-228.
24. Fatouh H, Ahmed G. Enhancement of oxidation stability of flax seed oil by blending with stable vegetable oils. J App Sci Res. 2012; 8(10): 5039-5048.
25. Fiebig HJ. Peroxide value determination. AOCS Inf. 2003; 14(10): 651-652.
26. Fuglie LJ. The Miracle Tree, the Multiple Attributes of Moringa. 1ªed. Dakar: CTA; 2001.
27. Gallardo G, Guida L, Martinez V, López MC, Bernhardt D, Blasco R, Hermida LG. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. Food Res Int. 2013; 52(2): 473-482.
28. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Res Int. 2007;40:1107-112.
29. Ghasi S, Nwobodo E, Ofili JO. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of Moringa oleifera Lam in high-fat diet fed wistar rats. J Ethnopharmacol. 2000;69:21-25
30. Ghazali HM, Abdulkarim H, Long K, Lai OM, Muhammad SKS. Frying quality and stability of high-oleic Moringa oleifera seed oil in comparison with other vegetable oils. Food Chem. 2007;105: 1382-1389.
31. Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Food Sc Tech. 2004;15:330-347.
32. Goyal A, Sharma V, Upadhyay B, Gill S, Sihag M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. J Food Sci Technol. 2014;51(9):1633-1653
33. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry; Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Blackwell Scientific. London; 1987.
34. Kamvissis V, Barbounis E, Megoulas N, Koupparis M. A novel photometric method for evaluation of the oxidative stability of virgin olive oils. JAOAC. 2008;2:1-5.
35. Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker E, McClements J. Characterisation of Spray-dried tuna oil emulsified in two layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer by layer deposition. Food Res Int. 2006; 39(4): 449-457.

36. Mbikay M. Therapeutic potential of Moringa oleifera leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. Front Pharmacol. 2012; 3(24): 1-12.
37. Metrohm. Oxidative stability of oils and fats, Rancimat method. Metrohm application bulletin 204. Switzerland: Metrohm; 1993.
38. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. 16ª ed. Madrid: Pirámide; 2013.
39. Nadeem M, Abdullah M, Javid A, Muhammad A, Mahmood T. Evaluation of Functional Fat from Interesterified Blends of Butter Oil and Moringa oleifera Oil. Pak J Nutr. 2012;11(9): 725-729.
40. Nitrayová S, Brestenský M, Heger J, Patráš P, Rafay J, Sirotkin A. Amino acids and fatty acids profile of chia (salvia hispanica l.) And flax (linum usitatissimum l.) Seed. Sci J Food Ind. 2014;8(1):72-76.
41. Nykter M, Kymäläinen HR, Gates F. Quality characteristics of edible linseed oil. Agr Food Sci, 2008;15:402-413.
42. Oliveira J, Silveira S, Vasconcelos I, Cavada B, Moreira R. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree Moringa oleifera Lamarck. J Sci Food Agric. 1999;79:815-820.
43. Organización Mundial de la Salud. Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 24.ª reunión del comité del Codex sobre grasas y aceites. Melaka, Malasia; 9 - 13 de febrero de 2015.
44. Ogbunugafor HA, Eneh FU, Ozumba A, Igwo-Ezikpe MN, Okpuzor J, Igwilo IO, Onyekwelu OA. Physico-chemical and antioxidant properties of Moringa oleifera seed oil. Pakistan J Nutr. 2011; 10(5): 409-414.
45. Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadess R, Anthony S. A tree reference and selection guide. Agroforestree Database: Version 4.0. Agroforestry Centre, Kenya; 2009.
46. Polprasid P. Moringa oleifera Lamk. Plant Resources South-East Asia. 1994;8: 213-215.
47. Razis AFA, Ibrahim MD, Kntayya SB. Health benefits of Moringa oleifera. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(20): 8571-8576.
48. Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation: measurament methods. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6ªed. John Wiley & Sons, Inc; 2005.
49. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (Moringa oleifera Lam.) leaves. J Agric Food Chem. 2003; 51:2144-2155.
50. Siddiq A, Anwar F, Manzoor M, Fatima A. Antioxidant activity of different solvent extracts of Moringa oleifera leaves under accelerated storage of sunflower oil. Asian J Plant Sci. 2005;4(6): 630-635.
51. Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by Moringa oleifera leaf extract on human cancer cells. Food Chem Toxicol. 2011; 49(6): 1270-1275.
52. Tonon, RV, Carneiro HC, Grosso CR, Hubinger MD. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. J Food Eng. 2013;115(4), 443-451.
53. Tsaknis J, Lalas S. Stability during frying of Moringa oleifera seed oil variety "Periyakulam 1". J Food Comp Anal. 2002; 15(1), 79-101.
54. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Bioactive contents and free radical scavenging activity of Moringa oleifera leaf extract under different storage conditions. Industrial Crops and Products. 2013;49: 419-421.(a)

55. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method Industrial Crops and Products. 2013;44:566-571.(b)
56. Yáñez J, Salazar JA, Chaires L, Jiménez J, Márquez R, Ramos EG. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avan Persp. 2002; 21:313-19.
57. Zuidam J, Nedovic V. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. ISBN 978-1-4419-1008-0. 2010.