

## ESTUDIO ANALITICO DE ESPECIES OXIGENADAS EN EL ACEITE DE TEOBROMA OZONIZADO

Maritza F. Díaz Gómez\*, Goitybell Martínez Téllez y Rosa Ibis Meneau Hernández

Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y 230, No. 1313, Apartado Postal 6412, Siboney, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba

Manuel Alaiz y Rafael Garcés

Instituto de la Grasa, CSIC, Sevilla, España

Recebido em 18/6/07; aceito em 24/8/07; publicado na web em 10/3/08

ANALYTICAL STUDY OF OXYGENATED SPECIES IN THE OZONIZED THEOBROMA OIL. Ozonization of theobroma oil at different applied ozone dosages was carried out with measurement of peroxide index values, oxygen percentage content and fatty acids composition. The comparison of peroxide values with percentage content of oxygen at different applied ozone dosages showed good correlation ( $r=0.9923$ ). Unsaturated fatty acids and triacylglycerols decrease with ozone applied dosage due to ozone reaction with double bonds. Small amounts of oleic acid were consumed with applied ozone dosage at 35 mg/g, which demonstrated that peroxide values and oxygen content were not principally increased by the ozone attack on the double bonds, but other mechanisms could be involved in the reaction system.

Keywords: ozonized theobroma oil; peroxides index; gas-liquid chromatography.

## INTRODUCCION

Durante años el aceite de teobroma ha sido utilizado en las industrias farmacéutica y alimenticia. Su punto de fusión (33-35 °C) es muy cercano al del cuerpo humano, lo que ha permitido su uso en la preparación de supositorios vaginales.<sup>1,2</sup>

Al reaccionar el ozono con el aceite de teobroma se forman una serie de productos oxigenados como peróxidos, ozónidos, aldehídos, ácidos carboxílicos entre otros.<sup>3</sup> Estas especies son responsables de la actividad microbiológica que presentan los aceites vegetales ozonizados.<sup>4,5</sup>

Las propiedades químico-físicas de los aceites vegetales refinados son de gran importancia para su caracterización siendo de particular importancia la determinación del índice de peróxidos, el cual puede ser considerado como un parámetro químico de calidad.<sup>6</sup>

El conocimiento de las cantidades de los diversos elementos presentes en un compuesto orgánico es imprescindible para poder determinar su fórmula empírica, paso previo para la determinación de su estructura. Esto puede ser realizado mediante análisis elemental<sup>7</sup> y es de particular importancia en los aceites vegetales ozonizados, debido a la información que ofrece sobre formación de especies oxigenadas durante la reacción con el ozono.

Otro método utilizado en la caracterización estructural de los aceites vegetales lo constituye la técnica de cromatografía gaseosa, para el análisis de mezclas de acilglicéridos (mono- di y triglicéridos), con una alta eficiencia de separación.<sup>8</sup>

Es objetivo de este trabajo el estudio de especies oxigenadas formadas en el aceite de teobroma ozonizado, mediante las técnicas de índice de peróxidos, análisis elemental y cromatografía gaseosa.

## PARTE EXPERIMENTAL

## Materiales

Se utilizó aceite de teobroma, obtenido de la Empresa de deri-

vados del cacao "Rubén David Suárez Abella", Baracoa, Cuba. Los reactivos ácido acético glacial, cloroformo, yoduro de potasio, almidón y tiosulfato de sodio son calidad puro para análisis de la firma Merck, Alemana.

## Procedimiento general de ozonización

El aceite de teobroma (150 g) fue introducido en un reactor de burbujeo a una temperatura de 41 °C. La reacción de ozonización se realizó a las siguientes dosis de ozono aplicadas: 20; 26; 29 y 35 mg/g.

## Generación de ozono

El ozono fue generado en un ozonizador Trailigaz (Labo, Francia) 12-02, mediante el paso del oxígeno a través de este a un flujo constante de 30 L/h y un voltaje de 170 V. La concentración inicial de ozono fue de 71 mg/L, determinada mediante un equipo medidor de ozono Ozomat de la firma Anseros, Alemania.

## Determinación del índice de peróxidos

Se pesaron 0,5 g de muestra y se mezclaron con una disolución de ácido acético glacial-cloroformo 3:2 v/v. Se añadió 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio. La mezcla se dejó reposar durante dos minutos, se añadieron 30 mL de agua destilada y se valoró lentamente con una disolución de tiosulfato de sodio 0,1 M, agitando de forma continua hasta la casi desaparición del color amarillo. Se añadió 5 mL de una disolución indicadora de almidón y se continuó la valoración hasta la desaparición del color azul.

El IP fue calculado de la expresión:<sup>1</sup>

$$IP=100 \text{ v/m}$$

donde v, es el volumen en mL y m es la masa en g de la muestra pesada. El IP se expresa en mmol-equivalente de oxígeno activo por kg de muestra.

Se realizaron 3 réplicas para cada una de las muestras.

\*e-mail: maritza.diaz@cnic.edu.cu

## Análisis elemental

Se utilizó un equipo de Leco CHNS-932 Corporation St Joseph MI USA, simultáneo para carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre con inyección automática. El sistema de detección tiene cuatro detectores individuales, tres de ellos de infrarrojo de estado sólido (C, H y S) y un cuarto de conductividad térmica diferencial para (N). Existe un sistema de dosificación de oxígeno mediante un controlador de flujo de masa con secuencia de dosificación programable para garantizar una completa combustión, con un horno de oxidación hasta 1 100 °C con precisión en el control de  $\pm 1$  °C y un horno de reducción hasta 950 °C (nominal 650 °C). Además, el sistema posee una balanza microanalítica con legibilidad de 0,001 mg e interconectada con el microanalizador para la transferencia automática de pesadas. El sistema incluye una prensa encapsuladora para muestras líquidas Leco modelo CP-100. Se pesó 1 mg de las muestras para el análisis. El tiempo del análisis fue menor de 180 segundos para la determinación de los cuatro elementos (C, H, N y S). El contenido de oxígeno fue determinado mediante el cálculo de la diferencia de la sumatoria de los valores de C, H, N y S con respecto al 100%.<sup>7</sup>

## Análisis por cromatografía gaseosa

Para la determinación del contenido de ácidos grasos se prepararon los ésteres metílicos en un tubo de ensayo que contenía 10  $\mu$ g de muestra en 0,9 mL de una mezcla formada por metanol-tolueno-dimetoxipropano-ácido sulfúrico (33:14:2:1 v/v) y 0,9 mL de heptano. Se le añadió 50  $\mu$ L de una disolución de triglicérido de ácido heptadecanoico en cloroformo de concentración 1 g/L y se taparon los tubos herméticamente. Posteriormente se colocaron los tubos en un baño de agua a 80 °C durante 1 h. Pasado ese tiempo los tubos se retiraron, se enfriaron y se retiró la fase orgánica, colocándola en los viales del auto-inyector de 1 mL de capacidad y se conservaron a -20 °C por no más de 48 h después de su preparación.<sup>9</sup>

Los ésteres metílicos se midieron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II, con un detector de cámara de ionización por llama FID y un autoinyector HP6890. Se utilizó una columna DB-17 HT de 15 m de longitud con 0,25 mm de diámetro interno y 0,15  $\mu$ m de tamaño de partícula. Las corridas se realizaron con una temperatura de columna de 100 °C a 8 °C/min hasta 200 °C, la temperatura del inyector y del detector fue de 280 °C. El flujo de gas portador ( $H_2$ ) fue de 1 mL/min a una presión de 50 kPas. Se utilizó un volumen de inyección de 5  $\mu$ L. Cada muestra se analizó por triplicado.

Para el análisis de los triglicéridos, en un vial de 1 mL se colocaron 10 mg de la muestra, 10  $\mu$ L de la disolución del patrón interno (trimargarina, 1 g/L) y 1 mL de cloroformo hasta disolución de la muestra.<sup>10</sup> Los análisis se realizaron 24 h posteriores a la preparación de las muestras.

Para la determinación se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II con detector de cámara de ionización FID y un autoinyector HP6890. Se utilizó una columna DB-17 HT de 15 m de longitud con 0,25 mm de diámetro interno y 0,15  $\mu$ m de tamaño de partícula. Las corridas se realizaron con una temperatura de columna de 340 °C (20 min), la temperatura del inyector fue de 370 °C y la del detector de 380 °C. El flujo de gas portador ( $H_2$ ) fue de 1,4 mL/min a una presión de 80 kPas. Se utilizó un volumen de inyección de 3  $\mu$ L. Se utilizaron triglicéridos patrones para la identificación. Cada muestra se analizó por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la ozonización del aceite de teobroma podemos observar que a medida que aumentan las dosis de ozono aplicadas y el

tiempo de ozonización, aumenta el índice de peróxidos, debido a la formación de compuestos oxigenados (Tabla 1). Esto coincide con lo reportado para la reacción del ozono con los ácidos grasos insaturados, en sustancias patrones como el oleato de metilo<sup>11</sup> y linoleato de metilo,<sup>12</sup> y en otros aceites vegetales ozonizados como girasol,<sup>13</sup> oliva<sup>14</sup> y coco.<sup>15</sup>

**Tabla 1.** Parámetros relacionados con la ozonización del aceite de teobroma y resultados de la determinación del Índice de Peróxidos

Muestras	Dosis de Ozono Aplicadas (mg/g)	Tiempo de ozonización (h)	Índice de Peróxidos (mmol-equiv/kg)
Aceite de teobroma virgen	0	0	0
Muestra ozonizada 1	20	1,33	476 $\pm$ 0,7
Muestra ozonizada 2	26	1,83	877 $\pm$ 11
Muestra ozonizada 3	29	2,08	1037 $\pm$ 7
Muestra ozonizada 4	35	2,50	1495 $\pm$ 10

X  $\pm$  DE: Media de tres valores  $\pm$  Desviación Estándar.

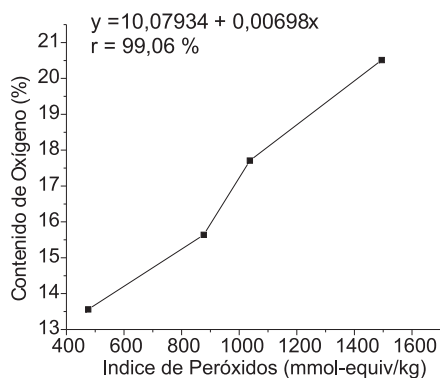
Como puede observarse en la Tabla 1, a medida que avanza el proceso de ozonización del aceite de teobroma, el aumento del índice de peróxidos con respecto a la dosis de ozono aplicada es directamente proporcional, desde la primera dosis de ozono de 20 hasta 35 mg/g. Se obtuvo un comportamiento lineal, dado por la ecuación ( $y = 11,7859 + 0,01586x$ ), con coeficientes de correlación ( $r = 99,46\%$ ) y determinación ( $r^2 = 98,93\%$ ) mayores de 99 y 98%, respectivamente, lo cual implica una buena correlación entre el índice de peróxidos y las dosis de ozono aplicadas.

La composición elemental del aceite de teobroma varía durante el proceso de ozonización (Tabla 2). Al aumentar la dosis de ozono aplicada, ocurre un incremento en el contenido de oxígeno en las estructuras de las diferentes muestras, obteniéndose el mayor valor (20,51%) para la muestra ozonizada 4, siendo este valor el doble del obtenido para el aceite de teobroma virgen (11,21%).

**Tabla 2.** Composición elemental del aceite de teobroma ozonizado. Los análisis presentan una precisión de 0,001% para el carbono; de 0,01% para el hidrógeno y el nitrógeno y de 0,02% para el azufre

Dosis de Ozono Aplicadas (mg/g)	Composición (%)				
	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno	Azufre	Oxígeno
0	76,4	11,8	0,544	0,04	11,21
20	74,4	11,5	0,492	0,03	13,56
26	73,0	10,9	0,438	0,02	15,64
29	70,8	11,2	0,237	0,05	17,71
35	68,5	10,8	0,174	0,02	20,51

Sin embargo, a partir de la dosis de ozono de 20 mg/g, el contenido de oxígeno comenzó a elevarse linealmente hasta alcanzar un valor de 20,51% al finalizar la reacción de ozonización, cuando se llega a una dosis de ozono aplicada de 35 mg/g. Este aumento lineal del contenido de oxígeno se encuentra en correspondencia con la dosis de ozono aplicada y con el índice de peróxidos. La correspondencia con la dosis de ozono aplicada se encuentra definida por la ecuación ( $y = 3,8735 + 0,47205x$ ), existiendo una adecuada correlación ( $r^2 = 98,67\% > 98\%$ ;  $r = 99,33\% > 99\%$ ) entre ambos parámetros y con el índice de peróxidos está expresada por la



**Figura 1.** Correlación lineal entre el índice de peróxidos y el contenido de oxígeno

ecuación ( $y = 10,0793 + 0,00698x$ ), con una correlación ( $r^2 = 98,47\% > 98\%$ ;  $r = 99,06\% > 99\%$ ) de estos parámetros en el rango especificado (Figura 1).

El mecanismo de Criegee, que describe el proceso de ozonización para los compuestos insaturados, plantea que durante esta reacción se forman especies peroxídicas, aldehídos, ozónidos, peróxido de hidrógeno e hidroxihidroperóxidos entre otros.<sup>3</sup> Estos diferentes productos oxigenados aumentan el índice de peróxidos y contribuyen al aumento del contenido de oxígeno en las muestras ozonizadas.

Las determinaciones del contenido de ácidos grasos insaturados realizadas al aceite de teobroma virgen (Tabla 3), mostraron resultados muy similares a los ya reportados en la literatura.<sup>16,17</sup>

Es importante señalar que el ácido graso insaturado que se encuentra en mayor proporción (35,7%) en el aceite de teobroma, es el ácido oleico, el cual tiene una sola insaturación en el C-9 para reaccionar con el ozono. A diferencia, otros aceites como el de girasol, presentan en mayor proporción al ácido linoleico con dos insaturaciones, una en el C-9 y otra en el C-12.<sup>18</sup>

Durante la ozonización del aceite de teobroma, el contenido de ácidos grasos insaturados fue disminuyendo con el aumento de la dosis de ozono aplicada, mostrando una diferencia apreciable de este parámetro en comparación con el aceite de teobroma virgen (Tabla 3).

El ácido linoleico que es el ácido graso insaturado que se encuentra en menor proporción en el aceite de teobroma, ya no es

detectado a partir de la dosis de ozono aplicada de 29 mg/g, correspondiente a un índice de peróxidos de 1037 mmol-equiv/kg, lo cual indica que todos los dobles enlaces del ácido linoleico han sido atacados por el ozono.

Sin embargo el ácido oleico, que es el ácido graso insaturado que se encuentra en mayor proporción, aunque disminuye progresivamente no llega a desaparecer totalmente y cuando se alcanza la dosis de ozono aplicada de 35 mg/g, aún queda 6,1% de ácido graso oleico, lo que indica que el aceite de teobroma no ha sido ozonizado completamente.

En la Tabla 4 se muestran los triglicéridos mayoritarios del aceite de teobroma virgen y su variación después de la ozonización. Los triglicéridos mayoritarios en el aceite de teobroma virgen son el POST y StOST, lo cual coincide con la literatura<sup>2</sup> y los mismos van disminuyendo a medida que aumenta la dosis de ozono aplicada. Se conoce que el ácido graso que se encuentra presente en la posición 2 del triglicérido coincide con el ácido graso de mayor contenido en el aceite.<sup>19</sup> Esto también es válido para el aceite de teobroma al encontrarse el ácido oleico en esta posición en los triglicéridos más abundantes.

Entre las dosis de ozono aplicadas de 29 y 35 mg/g ocurre un aumento de los índices de peróxidos de 458 mmol-equiv/kg (Tabla 1), lo cual se corresponde con un incremento de la concentración de oxígeno de 2,8% (Tabla 2). Sin embargo, se puede observar en la Tabla 3 que para las dosis de ozono aplicadas de 29 y 35 mg/g, se obtienen valores de ácido oleico de 8,7 y 6,1%, siendo consumidos el 2,6%, que no es más que la diferencia entre los valores porcentuales obtenidos para este ácido. Este resultado se corrobora en la Tabla 4 para estas mismas dosis de ozono aplicadas, los valores de POST se encuentran en 1,47 y 1,05% y de StOST en 1,01 y 0,96%, con diferencias entre estos valores de 0,42 y 0,05%, respectivamente. Estas diferencias que representan el consumo de dobles enlaces del oleico son menores que las obtenidas para las anteriores dosis de ozono aplicadas. Este resultado demuestra que ha reaccionado menos el ozono con los dobles enlaces del oleico a estas dosis de ozono aplicadas y que el incremento en los índices de peróxidos y del contenido de oxígeno, relacionados con la formación de los compuestos oxigenados durante la reacción de ozonización, pudieran también ser explicados producto de la hidrólisis de los triglicéridos, por la descomposición de las especies peroxídicas y/o por oxidación de los aldehídos dentro del sistema de reacción.<sup>20,21</sup>

**Tabla 3.** Composición en % de ácidos grasos insaturados del aceite de teobroma virgen y ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicadas, obtenido por cromatografía gaseosa.

Ácidos grasos	Dosis de Ozono aplicadas (mg/g)				
	0	20	26	29	35
Oleico (18:1)	35,6 ± 0,1	20,7 ± 0,04	16,4 ± 0,03	8,7 ± 0,002	6,1 ± 0,002
Linoleico (18:2)	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,002	1,5 ± 0,001	0 ± 0	0 ± 0

Cada punto representa la media de tres determinaciones ± la desviación estándar

**Tabla 4.** Composición en % de triglicéridos mayoritarios del aceite de teobroma virgen y ozonizado a diferentes dosis de ozono aplicadas, obtenido por cromatografía gaseosa.

Triglicéridos	Dosis de Ozono aplicadas (mg/g)				
	0	20	26	29	35
POST	31,24 ± 0,20	20,20 ± 0,15	15,92 ± 0,20	1,47 ± 0,16	1,05 ± 0,12
StOST	23,77 ± 0,20	8,54 ± 0,12	5,35 ± 0,13	1,01 ± 0,11	0,96 ± 0,10

POST: palmítico-oleico-esteárico, StOST: esteárico-oleico-esteárico. Cada punto representa la media de tres determinaciones ± la desviación estándar

## CONCLUSIONES

Durante el avance de la reacción de ozonización del aceite de teobroma, al aumentar la dosis de ozono aplicada, ocurre un aumento lineal del índice de peróxidos y de los compuestos oxigenados, siendo esto último demostrado mediante la técnica de Análisis Elemental. Por otro lado, se comprobó que la composición de ácidos grasos insaturados y triglicéridos determinada por CG, disminuye con el aumento de la dosis de ozono aplicada, fundamentalmente por el consumo del ácido oleico durante la reacción. Además, se demostró mediante la técnica analítica de Cromatografía Gaseosa, que para dosis de ozono aplicada de 35 mg/g el aumento del índice de peróxidos y de los compuestos oxigenados en el aceite de teobroma, no ocurre totalmente a través del ataque del ozono a los dobles enlaces del ácido oleico, por lo que pudieran estar actuando otros mecanismos que incrementan los valores de estos parámetros.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto CITMA-CSIC, el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

1. British Pharmacopoeia; *Peroxide value*, London, 2000, Appendix XF, IA, IB.
2. Gunstone, F.; Haewood, L.; Padley, B.; *The lipid handbook*, Chapman & Hall: London, 1994, p. 57.
3. Bailey, P.; *Ozonization in organic chemistry*, 1 y 2, Academic Press: New York, 1978, p. 9.
4. Contreras, R.; Gómez, M.; Menéndez, S.; Moleiro, J.; Roura, G.; Fernández, D.; Eng, L.; *Rev. CENIC C. Quím.* **1989**, 20, 121.
5. Lezcano, I.; García, G.; Martínez, G.; Moleiro, J.; Zamora, Z.; Fernández, C.; González, A.; Castañeda, D.; *Rev. CENIC C. Biol.* **1998**, 29, 209.
6. NC 85-04; *Aceites y grasas comestibles. Métodos de ensayo*, 1981, p. 1.
7. Pasto, D.; Jhonson, C.; *Determinación de estructuras orgánicas*, Pueblo y Educación Ed.: Ciudad de la Habana, 1980, p. 2.
8. Hardwood, I.; Aparicio, R.; *Handbook of olive oil. Analysis and properties*, Aspen publisher Inc. Ed.: Gaithersburg, 2000, p. 4.
9. Garcés, R.; Mancha, M.; *Anal. Biochem.* **1993**, 211, 139.
10. Fernández-Moya, V.; Martínez-Force, E.; Garcés, R.; *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, 48, 764.
11. Díaz, M.; Álvarez, I.; Vélez, H.; Hernández, F.; Ledea, O.; Molerio, J.; *Bol. Soc. Chil. Quím.* **1997**, 42, 349.
12. Díaz, M.; Hernández, F.; Ledea, O.; Molerio, J.; Sazatornil, J.; *Ozone Sci. Eng.* **2003**, 25, 121.
13. Díaz, M.; Gavín, J.; Ledea, O.; Hernández, F.; *Ozone Sci. Eng.* **2005**, 27, 247.
14. Díaz, M.; Hernández, R.; Martínez, G.; Vidal, G.; Gómez, M.; Fernández, H.; Garcés, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, 403.
15. Díaz, M.; Núñez, N.; Quincose, D.; Díaz, W.; *Ozone Sci. Eng.* **2005**, 27, 1.
16. Shukla, V.; *Lipid Technol.* **1995**, May, 54.
17. Van Malssen, K.; Peschar, R.; Schenk, H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, 73, 1217.
18. Firestone, D.; *Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes*, AOCS Press Ed.: US FDA, 1999, p. 98.
19. Chaiseri, S.; Dimick, P.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, 66, 1 771.
20. Mehlenbacher, V.; *Enciclopedia de la química industrial Tomo 6, Análisis de grasas y aceites*, Ediciones Urmo: Bilbao, 1970, p. 235.
21. Robards, K.; Kerr, A.; Patsalides, E.; *Analyst* **1988**, 113, 213.