

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis*) DE LA AMAZONIA COLOMBIANA**

VICTORIA A. BELTRÁN GÓMEZ



UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

POPAYÁN

2014

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis*) DE LA AMAZONIA COLOMBIANA**

Trabajo de grado presentado comorequisito parcial para optar al título de Químico

VICTORIA A. BELTRÁN GÓMEZ

Director:

JAIME MARTIN FRANCO Ph.D.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Asesor:

RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ, Ph.D.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)

Departamento de Química

Universidad del Cauca

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

POPAYÁN

2014

Nota de aceptación:

Director de Trabajo de Grado _____

Ph.D. JAIME MARTIN FRANCO

Jurado **Dr. Luis Alberto Lenis**

Jurado **Dr. Juan Carlos Argoti Burbano**

Popayán, 27 de octubre de 2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitir instruirme como persona y como profesional, dedicando mi tiempo a estudiar una ciencia cautivadora como la química y bendecirme contando con la presencia de personas especiales en mi vida.

A mi abuela, a mi madre y en especial a toda mi familia por su gran amor, acompañados de consejos y apoyo incondicional.

A mi director de trabajo de grado: Ph.D. Jaime Martin y a mi asesor el Ph.D Ricardo Benítez, por depositar su confianza en mí, por su paciencia, sus enseñanzas y su tiempo.

A todos los profesores del Departamento de Química por contribuir a mi formación académica y personal, especialmente al grupo de investigación, Química de Productos Naturales.

A mis amigos y compañeros de Química: Marcela, Leidy alvira, jeyson, Carito, Lele, Evelyn, Edier y Leydi Herrera; por su gran amistad, por sus palabras de aliento, risas, lágrimas y un sin número de momentos gratos que quedarán por siempre en mi mente y en mi corazón.

A Gloria Piamba, amiga desde mi niñez y que a pesar de la distancia siempre estamos unidas.

A Industrias ECHZ por proporcionar la materia prima para éste estudio.

A QPN y a Ingredión Colombia S.A. por prestar sus instalaciones y proporcionar el material necesario para llevar a cabo éste estudio.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 GENERAL	20
2.2 ESPECÍFICOS	20
3 MARCO TEÓRICO.....	21
3.1 SACHA INCHI.....	21
3.2 ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES.....	29
3.3 ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	38
3.4 ÍNDICE DE ESTABILIDAD OXIDATIVA MÉTODO DE (MÉTODO RANCIMAT)	39
4 ANTIOXIDANTES	40
4.1 CÚRCUMA (<i>CÚRCUMA LONGA L.</i>).....	43
4.2 CURCUMINA	44
4.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.....	45
4.4 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS CURCUMINOIDES.....	46
5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
5.1 SUPUESTOS.....	48
6 METODOLOGÍA	49
6.1 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	49
6.2 OBTENCIÓN DEL RIZOMA.....	50
6.3 ORIGEN DEL ACEITE DE SI	51
6.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE	54
6.5 ANÁLISIS DEL ACEITE	55
6.6 ANÁLISIS DE DIENOS CONJUGADOS POR ESPECTROMETRÍA UV	56

7	ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	57
7.2	DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	57
8	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA (MÉTODO RANCIMAT).	59
9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
10	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
10.1	CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE CÚRCUMA	61
10.2	EXTRACCIÓN DE CURCUMINOIDES	62
10.3	ANÁLISIS DEL ACEITE	64
10.3.6	ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	87
10.4	DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE INDUCCIÓN POR EL MÉTODO RANCIMAT	90
11	CONCLUSIONES	93
12	BIBLIOGRAFÍA	96
	ANEXOS	104
	ANEXO 1. PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS PARA VERIFICAR EL ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN LAS MUESTRAS DE ACEITE	104

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Comparación de la composición proximal de la almendra de sachá inchi con semillas de otras oleaginosas	24
Tabla 2.	Perfil de ácidos grasos del aceite de sachá inchi comparado con aceites de otras semillas oleaginosas	25
Tabla 3.	Comparación de la composición química de diferentes muestras de aceite de sachá inchi	26
Tabla 4.	Contenido de tocoferoles y vitamina A en el aceite crudo de sachá inchi	27
Tabla 5.	Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno	30
Tabla 6.	Parámetros fisicoquímicos de los rizomas de la Cúrcuma.	59
Tabla 7.	Índice de peróxidos en aceite de SI reciente sin antioxidantes y aceite del 2010.	64
Tabla 8.	Índice de peróxidos aceite de SI con TBHQ y con curcuminoides	65
Tabla 9.	Índice de acidez aceite de SI reciente sin antioxidantes y aceite del 2010	69
Tabla 10.	Índice acidez aceite de SI con TBHQ y con curcuminoides.	70
Tabla 11.	Estadístico de la curva de calibración para el intervalo de linealidad de dienos y trienos conjugados.	74
Tabla 12.	Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI reciente sin antioxidantes.	77
Tabla 13.	Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI con TBHQ.	78
Tabla 14.	Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI con curcuminoides.	79
Tabla 15.	Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI del año 2010.	80
Tabla 16.	Prueba de normalidad índice de peróxidos.	104
Tabla 17.	Prueba de Kruskal-Wallis índice de peróxidos para las muestras de aceite de SI.	104
Tabla 18.	Pruebad de Kruskal-Wallis índice de peróxidos para los días de análisis.	104
Tabla 19.	Prueba no paramétrica U de Man-Withney índice de peróxidos para las muestras de aceite.	104
Tabla 20.	Prueba no paramétrica U de Man-Withney índice de peróxidos para los días de análisis.	104
Tabla 21.	Correlación de Spearman para índice de peróxidos.	105
Tabla 22.	Prueba de Kruskal- Wallis índice de acidez para las muestras de aceite.	105
Tabla 23.	Prueba de Krukal - Walllis índice de acidez para los días de análisis.	105
Tabla 24.	Prueba U de Man- Withney índice de acidez para las muestras de	106

	aceite.	
Tabla 25.	Prueba de normalidad trienos conjugados.	106
Tabla 26.	Prueba de Kruskal- Wallis trienos conjugados para las muestras de aceite.	107
Tabla 27.	Prueba de Kruskal-Wallis trienos conjugados para los días de análisis.	107
Tabla 28.	Prueba U de Man-Withney trienos conjugados entre los aceites reciente sin antioxidantes y aceite del 2010.	107
Tabla 29.	Prueba U de Man-Withney dienos conjugados para aceite reciente sin antioxidantes y con curcuminoides.	107
Tabla 30.	Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite reciente sin antioxidantes y con TBHQ.	108
Tabla 31.	Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite con TBHQ y curcuminoides.	108
Tabla 32.	Prueba U de Man - Withney dienos conjugados aceite reciente sin antioxidantes y aceite del 2010.	108
Tabla 33.	Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite con TBHQ y aceite del 2010.	108
Tabla 34.	Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite con curcuminoides y aceite del 2010.	109

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Fruto maduro de y semillas de sacha inchi	21
Figura 2. Almendras de SI tostadas, aceite de SI	28
Figura 3. Estructura química del: a) ácido linoleico y b) ácido ω -linolénico	29
Figura 4. Determinación de los hidroperóxidos lipídicos	34
Figura 5. Estapas de la oxidación lipídica	36
Figura 6. Tiempo de inducción determinado por el método Rancimat	39
Figura 7. Antioxidantes de Tipo I Compuestos fenólicos sintéticos	40
Figura 8. Antioxidantes de Tipo II Quelantes o secuestrantes de metales	40
Figura 9. Oxidación de lípidos y la interacción de los antioxidantes	41
Figura 10. Cultivo y flor de la cúrcuma	42
Figura 11. Estructura de los principales polifenoles de la cúrcuma	44
Figura 12. Mecanismo general de acción de los antioxidantes aromáticos	46
Figura 13 a. Rizoma de la cúrcuma fresco	49
Figura 13 b. Rizoma de la cúrcuma lavado	49
Figura 13 c. Rizoma de la cúrcuma cortada en rodajas	49
Figura 14. Rizoma de la cúrcuma seco	50
Figura 15. Harina de la cúrcuma obtenida a partir del rizoma seco	50
Figura 16 a. Extracción de grasa por el método Soxhlet	51
Figura 16 b. Extracción de curcuminoides por el método soxhlet	51
Figura 17 a. Concentración del extracto mediante presión reducida	52
Figura 17 b. Extracto seco de curcuminoides	52
Figura 18 a. Homogenización de la sílice con los curcuminoides	53
Figura 18 b. Separación de la curcumina por cromatografía en columna	53
Figura 19. Muestras de aceite de SI en el horno	54
Figura 20. Equipo 679 rancimat	58
Figura 21. Separación por capa delgada de los cristales de curcuminoides	60
Figura 22 a. Cristalización de la fracción recolectada por cromatografía en columna.	61
Figura 22 b. Recristalización de la fracción recolectada	61
Figura 23. Espectro UV de los cristales de la curcumina recristalizada	61
Figura 24. Espectro IR de los curcuminoides	62
Figura 25. Espectro IR de la curcumina	63
Figura 26. Estimación curvilínea del IP para los aceites	67

Figura 27. Estimación curvilínea del IA para los aceites	72
Figura 28. Diagrama de cajas de la mediana del IA para los aceites	73
Figura 29. Estimación curvilínea de TC para los aceites	82
Figura 30. Estimación curvilínea de DC para los aceites	85
Figura 31. Diagrama de cajas de la mediana de DC para los aceites	86
Figura 32. Espectro de 0.9 ppm de TEP	88
Figura 33. Fase baño maría	88
Figura 34. Barrido 200-800nm de 0.42 μ M	90
Figura 35. Espectro de absorción de 2.2×10^{-3} μ M AB-MDA-AB	90
Figura 36. Curvas Ramcimat de las muestras de aceite	91

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO 1. Pruebas no paramétricas para Verificar el índice de peróxidos en las muestras de aceite.	104
ANEXO 2. Pruebas no paramétricas para Verificar el índice de acidez en las muestras de aceite.	106
ANEXO 3. Pruebas no paramétricas para verificar la concentración de trienos conjugados en las muestras de aceite.	108
ANEXO 4. Pruebas no paramétricas para verificar la concentración de dienos conjugados en las muestras de aceite.	109

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AB	Ácido barbiturico
BDMC	Bisdemetoxicurcumina
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Terbutil hidroxitolueno
C	Curcumina
C 14:0	Ácido láurico
C 14:1	Ácido miristoleico
C 15:0	Ácido pentadecanoico
C 16:0	Ácido palmítico
C 16:1	Ácido palmitoleico
C 18:0	Ácido esteárico
C 18:1 <i>Cis</i>	Ácido oleico
C 18:1 <i>Cis</i>	Ácido <i>cis</i> – vaccénico
C 18:1 <i>Trans</i>	Ácido <i>trans</i> – vaccénico
C 18:2 <i>ct</i>	Ácido ruménico
C 18:2 n6 <i>Cis</i>	Ácido linoleico
DMC	Demetoxicurcumina
DHA	Ácido docosohexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HUFA	Acidos grasos altamente insaturados

IA	Índice de acidez
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas
IP	índice de peróxidos
MDA	Malonaldehído
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
O	Ácido oleico
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PGE	Prostaglandina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SI	Sacha inchi
TAG	Triacilglicerol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBA-MDA	Complejo ácido tiobarbitúrico malonaldehído
TBHQ	Terbutil hidroquinona
TC	Trienos conjugados
TEP	1,1,3,3- Tetraetoxipropano
t /ha	Toneladas por hectárea
WHO	World Health Organization

RESUMEN

En este estudio se evaluó la estabilidad oxidativa del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*), proveniente del Departamento del Putumayo, Colombia y a su vez se midió, el índice de peróxidos, índice de acidez y se cuantificaron dienos y trienos conjugados. Se trabajó con el aceite natural solo y aceite adicionado con los antioxidantes terbutil hidroquinona (TBHQ), curcumina purificada por cromatografía de columna y curcuminoides; ambos, extraídos por el método Soxhlet, del rizoma de la cúrcuma proveniente del Departamento del Putumayo.

En la prueba de horno el aceite de sachá inchi (SI) fue sometido al calentamiento durante 40 días, a 63 ± 1 °C de temperatura. La mayor estabilidad oxidativa del aceite correspondió a un índice de peróxidos de 260-270 meqO₂/kg, índice de acidez 2,6-2,7 mg KOH /g de aceite con TBHQ y 2,4-2,6 mg KOH /g de aceite con curcuminoides, sin experimentar variaciones significativas en el rango comprendido entre el décimo y trigésimo día de almacenamiento.

En la cuantificación de dienos y trienos conjugados, realizada mediante curva de calibración con r^2 (0.9969-0.999). La mayor estabilidad es coherente con el índice de peróxidos para los dienos, en concentraciones estables entre el 10 al 30 día, para el aceite puro y con curcuminoides, los cuales no presentaron una diferencia significativa con significancia estadística (p-valor de 0,112 >0,05). El aceite con TBHQ no presentó una estimación curvilínea similar al índice de peróxidos, pero sí presentó la mediana más baja 190 ppm para el aceite puro reciente, 160 ppm y 170 ppm con curcuminoides, y 130 ppm para el aceite puro del 2010. La cuantificación de trienos conjugados reveló mayor estabilidad para el aceite con 20 ppm de TBHQ, del día 10 al 30, coincidente con la mayor estabilidad oxidativa determinada con el mismo antioxidante, por el método Rancimat con periodo de inducción de (3,22h- 12.0h); mientras que con la presencia de curcuminoides, fue (1,83h-3,50h).

La identificación de las propiedades químicas del aceite puro de sachá inchi y con aditivo antioxidante, permitió reconocer la incidencia de factores como la temperatura y el tiempo

en la estabilidad del aceite. El resultado de esta investigación determinó las condiciones para el almacenamiento adecuado del aceite de SI, teniendo en cuenta su alta susceptibilidad a la rancidez oxidativa, confirmada con este trabajo.

Los datos obtenidos en esta investigación sobre las propiedades del aceite de SI, se procesaron con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), demostrando la coherencia y confiabilidad de las metodologías empleadas.

Palabras clave: Sacha inchi, *Plukenetia volubilis*, Estabilidad oxidativa, Antioxidantes, índice de acidez, índice de peróxidos, dienos y trienos conjugados.

INTRODUCCIÓN

La planta denominada comúnmente sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), es una leguminosa semileñosa y perenne, perteneciente a la familia Euphorbiaceae. Su semilla es empleada para la obtención de aceite y productos derivados, con fines alimenticios, medicinales y cosméticos [1,2]. Su aceite contiene el 84 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados, que es el más alto, si se compara con las semillas oleaginosas más comunes a nivel mundial. De este contenido, el 57% en peso es ácido linolénico (ω -3), constituyéndose en el ácido graso insaturado más abundante del aceite de SI. La almendra de la semilla posee todos los aminoácidos esenciales y según la FAO [3,4], cumple con los requerimientos diarios de aminoácidos, de las personas adultas.

Los cultivos de palma, soya, girasol y colza representan casi el 75% de la producción mundial de semillas oleaginosas, ubicándose entre los más extendidos en los últimos decenios, en razón a la función fundamental de los aceites vegetales como alimentos energéticos [5] en los países en desarrollo, en el sector de los biocombustibles y en el de los alimentos funcionales[6].

Los ácidos grasos poliinsaturados ω -linolénico (ω -3) y linoleico (ω -6), son esenciales e imprescindibles para garantizar el funcionamiento correcto del ser humano, que no puede sintetizarlos; son especialmente útiles en la prevención de diversas enfermedades. Varios estudios epidemiológicos demuestran que el consumo habitual de estas sustancias, puede reducir el riesgo cardiovascular en un 30%, puesto que previene la aparición de arritmias, mejora el perfil lipídico y reduce la presión arterial [7]. Los ácidos grasos ω -linolénico y linoleico se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados y en algunas fuentes vegetales como las semillas de lino, nueces, mostaza, calabaza, soya, hortalizas de hoja verde y cereales.

En ninguna de las fuentes de ácidos ω -linolénico y linoleico, el porcentaje es tan alto como en las semillas de SI [6]; de ahí que en su mayor parte se hayan destinado a la producción de aceite para el uso doméstico. Sin embargo, en Colombia el mercado de los productos de esta planta y sus derivados, aún se está iniciando y es poco conocida, tanto a nivel industrial como a nivel científico.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas los aceites vegetales han conseguido una relevancia especial en la nutrición humana; en especial, por los avances en el conocimiento de los beneficios y riesgos asociados al contenido de las grasas en la dieta. Los alimentos enriquecidos con ácidos grasos tipo omega, son considerados esenciales para el crecimiento y desarrollo normal del individuo, puesto que pueden desempeñar un papel importante en la prevención y el tratamiento de las enfermedades coronarias, renales, inflamatorias, autoinmunes y el cáncer.

Los ácidos grasos omega son metabolizados hasta prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, moléculas de mayor peso reguladoras de las funciones celulares [6]. Estas sustancias, refuerzan la importancia nutricional y terapéutica del consumo de ácidos grasos, para el funcionamiento del cerebro y del sistema cardiovascular; lo mismo que para la prevención de las enfermedades originadas por los radicales libres [7,8].

Una fuente rica en ácidos grasos insaturados tipo omega, es el aceite que se extrae de la semilla de SI (*Plukenetia volubilis*), ampliamente distribuida desde América Central hasta Bolivia. El aceite es una fuente sumamente importante de ácidos grasos insaturados (3, 6, y 9), vitamina E y aminoácidos esenciales, en proporción considerablemente mayor respecto a las semillas de otras oleaginosas, tales como maní, soya, algodón y girasol [9 - 12].

El aceite de SI es muy comercializado en el Perú, Estados Unidos, Europa y Japón [13]. En Colombia, solamente se cultiva en la región amazónica y pacífica [9], principalmente en el departamento del Putumayo, en el que es comercializado por empresas regionales. Una de ellas, distinguida con el nombre comercial INDUSTRIAS ECHZ, ha mostrado gran interés en lograr una proyección internacional, mediante el cumplimiento de los requisitos fitosanitarios necesarios para garantizar el nivel de protección normativo. Sin embargo, el aceite es muy susceptible al proceso de rancidez oxidativa, que altera su sabor y la calidad nutricional, tornándolo inaceptable para el consumo humano.

En este sentido, el aceite de SI producido por industrias ECHZ necesita estudios para establecer la influencia de los factores que determinan su rancidez oxidativa, al igual que los cambios químicos y físicos causados por el calor para determinar la proporción de antioxidantes que deberían usarse con el fin de atenuar dicho efecto, cómo se plantea en este trabajo, para obtener información sobre las mejores condiciones de almacenamiento a nivel industrial, en diferentes sectores y conocer su tiempo de vida útil para ser consumido, sin generar efectos adversos a la salud. La industria mencionada adoptará medidas especiales para reducir o prevenir la oxidación, mediante la adición de antioxidantes que contrarresten efectivamente el deterioro [13].

2 OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Determinar las condiciones de estabilidad oxidativa del aceite de SI (*Plukenetia volubilis*).

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar el tiempo óptimo para el consumo humano del aceite de SI y las condiciones adecuadas de almacenamiento.

- Evaluar el efecto del calor en la estabilidad del aceite de SI, con base en el índice de acidez, índice de peróxidos, valor de TBA, y el análisis cualitativo y cuantitativo de dienos y trienos conjugados.

- Determinar por espectroscopía de UV/Vis la presencia de dienos y trienos conjugados en el aceite de SI.

- Determinar mediante la evaluación del índice de acidez, índice de peróxidos, valor de TBA, y el análisis cualitativo y cuantitativo de dienos y trienos conjugados, el efecto de la adición de curcuminoides, terbuti lhidroquinona (TBHQ) en la estabilidad oxidativa en el aceite de SI crudo.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 SACHA INCHI

3.1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

El sachá inchi (*Plukenetia volubilis*), también conocida como sachá maní, maní del monte, maní del inca, supua, sachá yuchi, amui-o, sachá yuchiqui, sampannankii, suwaa e inca peanut; es una planta trepadora silvestre cuyas semillas presentan un alto valor proteico y el contenido de ácidos grasos insaturados más alto en comparación a todas las semillas oleaginosas utilizadas en el mundo. El sachá inchi, constituye uno de los recursos más prometedores del Perú ya que, con su alto contenido de grasa y proteínas, posee enorme potencial como fuente de aceite y complemento de la alimentación humana y animal. El sachá inchi es una planta silvestre conocida por las antiguas tribus chancas de la zona de Tarapoto. Actualmente los agricultores lo siembran como planta de huerto, cobertura de cercos vivos y alambrados, y sus semillas son consumidas tostadas y/o cocidas. Las ventajas de su cultivo incluye su resistencia a condiciones adversas de suelo, su rápido crecimiento y productividad continua. Así, dependiendo de las características y variedades en cuanto a contenido y calidad de grasa y proteína, el sachá inchi constituye un cultivo nativo con posibilidades de industrialización y potencial de rendimiento económico para reemplazar en alguna medida al cultivo de la coca.

3.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El área de distribución del sachá inchi se extiende desde las Antillas menores, Surinam y el sector noroeste de la cuenca amazónica en Venezuela y Colombia hasta Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. En Colombia se encuentra en los departamentos del Chocó y, principalmente, Putumayo [8]. Cabe mencionar que en Colombia no hay una fuente de semilla certificada (al menos en el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, no se han registrado plantaciones para producción de semilla certificada o seleccionada hasta la fecha) debido a que existen más de 50 ecotipos de sachá inchi, los cuales presentan diferencias que pueden llegar a ser considerables en términos de tolerancia a enfermedades y al ataque de ciertas plagas, contenido de aceite y composición porcentual de ácidos grasos esenciales, la base de su valor comercial; además, las actuales plantaciones se propagaron a partir de semillas nativas e introducidas del Perú

[13,14]. El cultivo de sacha inchi que está siendo implementado en el Departamento del Putumayo, es amigable con el medio ambiente, pues no se emplean agroquímicos en la producción de las almendras utilizadas para la extracción del aceite; además, el sistema de siembra (policultivo), donde se establece sacha inchi, cacao, plátano, árboles maderables, leguminosas, cúrcuma, pimienta, acai y árboles frutales, permite lograr un buen desarrollo de las plantas y conservar el ecosistema amazónico.

3.1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), fue descrito por Linneo en 1753, clasificándolo dentro de la familia Euphorbiaceae. La familia Euphorbiaceae comprende plantas anuales, de importancia ornamental, medicinal, alimenticia e industrial, que se caracterizan principalmente por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos tricapsulares. Esta familia incluye unas 8000 especies de distribución tropical en su mayoría, aunque hay representantes de la familia en todo el mundo, salvo las regiones polares y montañosas [15,16].

En 1951 McBride realizó la clasificación botánica del sacha inchi de la siguiente manera:

Reino: Vegetal, División: Spermatophyta, Subdivisión: Angiospermae, Clase: Dicotiledónea, Orden: Euphorbiales, Familia: Euphorbiaceae, Género: *Plukenetia*, Especie: *volubilis*

3.1.4 MORFOLOGÍA GENERAL DEL CULTIVO

P. volubilis es una planta trepadora, voluble, semileñosa, de altura indeterminada. Sus hojas son alternas, de color verde oscuro, oval - elípticas, aserradas y pinninervadas, de 9 a 16 cm de largo y 6 a 10 cm de ancho. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi arriñonada. Esta especie es hermafrodita con flores masculinas y pistiladas; las primeras son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos, las otras se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores [14]. Las cápsulas son tetra o pentámeras, glabras, algunos ecotipos presentan cápsulas con 5 a 7 lóbulos. En la Figura 1 se muestran las semillas, las cuales son lenticulares, comprimidas lateralmente y de color marrón, con manchas irregulares más oscuras, 1,5–2 x 0,7–0,8 cm [16].



Figura 1. Fruto maduro y semilla de sachá inchi.

3.1.5 ECOLOGÍA DEL CULTIVO

El crecimiento de SI es favorecido en un rango de temperatura entre 10 y 36°C. Las temperaturas muy altas son desfavorables ya que aumenta la reproducción de nematodos, ocasionando una mayor infestación y la caída de flores y frutos pequeños, principalmente los recién formados. En forma silvestre se reporta que crece desde los 100 m.s.n.m en la selva baja, hasta los 2000 m.s.n.m en la selva alta; en Colombia, se desarrolla entre los 100 y 700 m.s.n.m. A bajas intensidades de luz, la planta necesita de mayor número de días para completar su ciclo vegetativo; cuando la sombra es muy intensa la floración disminuye y por lo tanto la producción es menor. A diferencia de otras especies de oleaginosas, tiene una actividad de crecimiento vegetativo y fructificación continuada durante todo el año [13,14].

Es una planta que requiere de disponibilidad permanente de agua, para tener un crecimiento sostenido; siendo mejor si las lluvias se distribuyen en forma uniforme durante los 12 meses (850 a 1000 mm). El riego es indispensable en los meses secos. Periodos relativamente prolongados de sequía o de baja de temperatura (<10°C), causan un crecimiento lento y dificultoso. El exceso de agua ocasiona daño a las plantas e incrementa los daños por enfermedades [16].

Este cultivo tiene una amplia adaptación a diferentes tipos de suelo, siendo mejores los de textura media (franco-arcillo-arenosa, franco-arcillosa y franco-arenosa) y menos apropiados los muy arcillosos o muy arenosos. Es una planta de poca exigencia nutricional, crece en suelos ácidos (pH 3.5 - 5.0) y con alta concentración de aluminio. Para un mejor desarrollo y producción, se necesitan terrenos con drenaje adecuado, que

eliminen el exceso de agua tanto a nivel superficial como profundo; lo cual está relacionado con la textura del suelo, importante para el desarrollo del cultivo.

3.1.6 FENOLOGÍA O PERIODO VEGETATIVO

El periodo vegetativo del cultivo de Sacha Inchi, bajo la modalidad de siembra indirecta y directa, se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Período vegetativo del cultivo de SI (modalidad de siembra indirecta y directa).

SIEMBRA INDIRECTA		SIEMBRA DIRECTA
En almácigo	Después del trasplante	
germinación: 11 – 14 días		germinación: 14 – 16 días
emergencia de hojas verdaderas: 1er. Par: de 16 a 20 días 2do. Par: de 28 a 42 días 3er. Par: de 45 a 59 días	Emisión de guía: 20 a 41 días	emisión de guía: 48 – 50 días
	Inicio de floración: 86 a 139 días	inicio de la floración: 88 – 135 días
	Inicio de Fructificación: 119 a 182 días	inicio de la fructificación: 122 – 168 días
	Inicio de cosecha: 202 a 249 días	inicio de la cosecha: 180 – 220 días

Fuente: Manco 2006. [8]

3.1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE SI

Los primeros análisis preliminares realizados con el sachá inchi, fueron efectuados en 1980 por Hazen y Stowesand en el Instituto de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Cornell (USA) y por Duclos en Florida, demostrando que las semillas de sachá inchi tienen alto contenido de proteínas (33.3%) y aceite (48.7%) comparado con semillas de otras oleaginosas como soya, maní, algodón y girasol. En 1990 se estudiaron aminogramas y perfiles nutricionales efectuados por Hamaker en Arkansas (USA). Los resultados de estos estudios se registran en la Tabla 1 [6] [9].

Tabla 1. Análisis proximal (%) de la almendra de SI, comparación con otras semillas^a

	SACHA INCHI	SOYA	MANÍ	ALGODÓN	GIRASOL
Humedad	4.2	11.7	7.3	8.1	4.8
Proteína	33.3	28.2	23.3	32.9	24.0
Grasa	48.7	18.9	45.3	16.1	47.5
Carbohidratos	9.5	35.7	19.5	36.7	3.8
Fibra	1.6	4.6	2.1	4.8	11.1
Ceniza	2.7	5.6	2.4	6.2	4.0
Energía (Kcal)	562.0	401.0	539.0	398.0	495.0

^a Valores tomados de Hazen & Stowesand 1980 y Duclos 1980. Fuente: Juárez, 2007.[12]

En la Tabla 2, se muestra la variabilidad en los estudios concernientes al perfil de ácidos grasos, lo cual se explica por algunas variaciones en la metodología aplicada, el procedimiento para extraer el aceite de la semilla de SI, y principalmente, por la diferencia del lugar y tiempo de recolección de la semilla y probablemente ecotipos [9] [11].

Tabla 2. Composición química de diferentes muestras de aceite de sachá inchi^c

	Gutiérrez (2011) ^{a,b}	Pascual (2000)	Bondioli (2006)	Follegatti-Romero (2009)
Ácidos grasos (%)				
Ácido Linolénico	50.8±0.03 ^a	43.75	50.73	50.41
Ácido Linoleico	33.4±0.04 ^a	36.99	33.67	34.08
Ácido Oleico	9.1±0.01 ^a	9.60	8.77	8.41
Ácido Palmítico	4.4±0.02 ^a	5.61	3.79	4.24
Ácido Esteárico	2.4±0.02 ^a	2.23	2.65	2.5
Métodos para ácidos grasos	-----	Cromatografía de gas. Método AOAC 90956 - 04	grasos: ISO 5508:1990	Dióxido de carbono supercrítico (SC-CO ₂)
Lugar de recolección de la semilla	Florencia caqueta	Región Uycali (INIA- Pucallpa)	Región Lima	Región Huanuco (Tingo Maria)

^a Los valores presentados son los promedios ± la desviación estándar (n=3).

^b Los promedios en la misma fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba LSD. Fuente: Tabla elaborada por la autora basada en Gutiérrez 2011.[13]

^cLos valores fueron tomados de: Hamaker 1992, Pascual 2000, Bondioli 2006, Essalud - SGS del Perú 2008 – 2009, Merino 2009, Follegatti-Romero 2009[10] Fuente: Aranda 2009.[17]

La Tabla 3 señala que el contenido de aceite en el SI es más alto en relación a las otras semillas oleaginosas (>50%); también muestra una diferencia significativa entre el perfil de ácidos grasos del aceite de sachá inchi y el de soya, maní, algodón y girasol, pues el primero, según las investigaciones efectuadas hasta ahora, presenta un elevado nivel de ácido linolénico (-3), siendo éste la causa de enranciamiento por oxidación, produciendo olores o sabores desagradables; sin embargo estudios preliminares en el Perú han demostrado que el aceite de SI no refinado parece ser satisfactoriamente estable, debido a la presencia de antioxidantes (tocoferoles y vitamina A, Tabla 4) [15] [17]. En la Tabla

4, se ve La variabilidad en los estudios concernientes al perfil de ácidos grasos y tocoferoles.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos del aceite de sacha inchi comparado con aceites de otras semillas oleaginosas ^a

ACIDOS GRASOS	SACHA INCHI				Soya	Maní	Algodón	Girasol
	Hamaker (1992)	FAO (1992)	Aitzetmuller (2001)	Follegatti (2009)				
Aceite total	54	60		54.3	19	45	16	48
Saturados								
C14:0, Mirístico	0.0	0.0	0.0	---	0.0	0.0	0.0	0.0
C16:0, Palmítico	4.5	4.4	3.8	4.24	10.5	12.0	18.7	7.5
C18:0, Esteárico	3.2	3.2	2.9	2.50	3.2	2.2	2.4	5.3
Insaturados								
C16:1, Palmitoleico	0.0	0.0	0.1	---	0.0	0.3	0.6	0.0
C18:1, Oleico (ω9)	9.6	9.6	8.6	8.41	22.3	41.3	18.7	29.3
C18:2, Linoleico (ω6)	36.8	36.8	33.6	34.08	54.5	36.8	57.5	57.9
C18:3, Linolénico (ω3)	45.2	45.1	48.8	50.41	8.3	0.0	0.5	0.0
C20:1, Gadoleico	0.0	0.0	0.4	0.16	0.0	1.1	0.0	0.0

^aTodos los valores mostrados son porcentajes. Los valores para la soya, maní, algodón y girasol fueron tomados de Bodwel and Hopkins 1985. Los valores para el sacha inchi fueron tomados de Hamaker 1992, FAO Agricultur Services Bulletin N°94 1992, Aitzetmuller – Bruhl 2001 (no publicado), Follegatti-Romero 2009[10].

Fuente: Juárez 2007; Follegatti-Romero 2009.

Tabla 4. Contenido de tocoferoles y vitamina A en la semilla de sachá inchi ^a

	Hamaker (1992)	Bondioli (2006)	Essalud - SGS del Perú (2008 - 2009)	Follegatti (2009)
Tocoferoles				
α-tocoferol	3.8 – 6.3 mg/100g	143 mg/100g	26mg/100g	0.00
β-tocoferol		1 mg/100 mg/100g	---	114 mg/100g
γ-tocoferol	---	Trazas	---	125mg/100g
Vitamina A				
Caroteno	0,08 mg/100 g	---	---	---

^aLos valores fueron tomados de: Hamaker 1992, Bondioli 2006, Essalud - SGS del Perú 2008 – 2009, Follegatti-Romero 2009.

Fuente: Tabla elaborada por la autora basada en Aranda 2009 [17].

3.1.8 PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DEL SACHA INCHI

Entre estos se encuentran los consumidores directos y los industriales. Los consumidores directos son los que utilizan el producto en forma de aceite o artesanalmente en las zonas donde se cosecha, ya que es un producto muy popular entre la población nativa y mestiza de las áreas rurales de la selva. Actualmente la semilla se consume tostada, cocida con sal, en confituras (turrón), como mantequilla o ingrediente de diversos platos típicos como inchi cucho (ají con maní), lechona api (mazamorra de plátano con maní), inchi capi (sopa de gallina con maní o sopa de res con maní), en los cuales reemplaza al maní [18].

Actualmente, se conocen los diversos usos y aplicaciones del SI en diferentes sectores, entre los más comunes se encuentran el alimenticio, el cosmético y el farmacéutico, debido a que su semilla supera, en mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados y en menor porcentaje de grasas saturadas, a todas las semillas oleaginosas utilizadas en el mundo; además posee proteína de alta calidad y antioxidantes. Es empleado como aceite de mesa, neutracéutico, antiarrugas, humectante, para el cuidado capilar y la piel sensible; para el dolor muscular y reumatismo [16]. En Colombia, empresas regionales, como INDUSTRIAS ECHZ del Putumayo lo comercializan, sin proyección internacional porque no cumplen los requisitos fitosanitarios necesarios para garantizar el cumplimiento normativo. Para incursionar en este mercado, es necesario alcanzar los requerimientos técnicos, sanitarios y comerciales.



Figura 2. Almendras de SI tostadas, aceite de SI

3.1.10. IMPORTANCIA EN LA SALUD Y NUTRICIÓN

Los ácidos grasos esenciales presentes en el aceite extraído de la semilla de sacha inchi, aportan numerosos beneficios a nuestro organismo, ya que este posee un alta composición de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 a los cuales se les atribuye diversos efectos, tales como disminuir el riesgo de arritmias, efectos antitrombóticos, mejoría de la función endotelial, antiinflamatorio, disminución de la presión arterial, disminución de la concentración de triglicéridos y antiateroesclerótico [19]. La disminución de los triglicéridos es uno de sus mayores efectos, pero no disminuyen el colesterol LDL en la misma proporción, lo que lleva a considerar que el aceite de sacha inchi tiene acciones diferentes al aceite de pescado, al de otros vegetales y a la administración de preparados farmacéuticos que sólo contienen ácidos grasos poliinsaturados ω -3.

3.2 ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

Los ácidos grasos esenciales tienen muchos efectos benéficos en el organismo e influyen en la producción hormonal y en la salud inmunitaria y cardiovascular. Deficiencias en varios de estos ácidos grasos se han asociado con desequilibrios hormonales y enfermedades degenerativas. Los ácidos grasos mantienen la estructura y la función de la membrana celular y las membranas subcelulares. Los ácidos linoleico y α -linolénico (Figura 4) son esenciales, debido a que el ser humano no puede sintetizarlos por la carencia de enzimas (desaturasas Δ^6 y Δ^5) responsables de la introducción de enlaces dobles en las posiciones Δ^6 y Δ^3 . Por tal motivo, deben incorporarse al organismo a través de los alimentos [20].

Las prostaglandinas (grupo 1 y 2: prostaglandina E1, prostaglandina E2, tromboxano A1 y tromboxano A2), son sustancias parecidas a las hormonas, promueven la contracción de

la musculatura lisa, reducen la presión arterial y regulan las secreciones gástricas además de ejercer cierta influencia sobre otras hormonas. Las prostaglandinas son influidas por ácidos ω 3 y ω 6 a través de la enzima “Desaturasa”, los elonga convirtiendo la cadena del ácido linoleico, de 18 átomos de carbono con dos dobles enlaces, a 20 átomos de carbono con 5 dobles enlaces para producir el ácido eicosapentaenoico EPA; la cadena del ω -linolénico la elonga de 18 átomos de carbono con 3 dobles enlaces a 22 átomos de carbono con 6 dobles enlaces para formar el ácido docosahexaenoico DHA; estos ácidos grasos son denominados ω 3 [20].

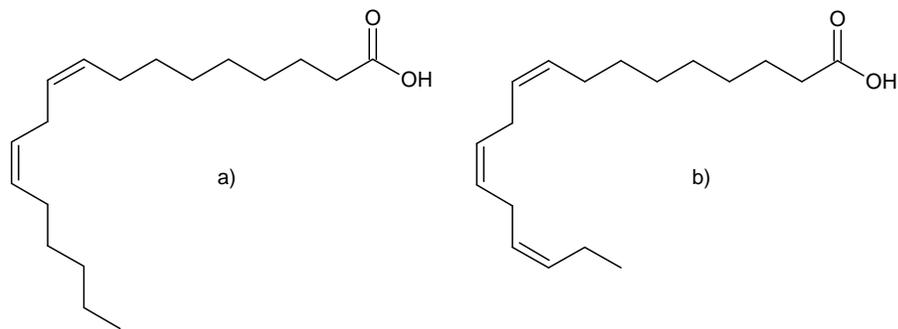


Figura 3. Estructura química del: a) ácido linoleico (C18:2 ω 6) y b) ácido ω -linolénico (C18:3 ω 3)

Los ácidos grasos de cada familia no pueden convertirse entre sí. Por lo tanto, la síntesis de los diferentes ácidos grasos poliinsaturados, EPA y DHA, depende directamente de la concentración de los respectivos precursores y es de fundamental importancia un aporte correctamente balanceado [20].

Teniendo en cuenta que hoy en día la mayoría de personas son conscientes de la importancia del ω 3 y ω 6, se destaca la importancia de incluir el sachu inchi en la dieta humana, ya que éste representa una de las mejores alternativas para mantener una relación apropiada de estos ácidos grasos y suplir deficiencia de ω 3 [17].

3.3 OXIDACIÓN LIPÍDICA DE ACEITES VEGETALES

Los lípidos se encuentran de forma natural en los alimentos o son añadidos en los mismos por procesamiento; juegan un papel importante en la nutrición y en el sabor de los alimentos. La oxidación de los lípidos es la causa principal del deterioro y calidad de los

alimentos, y ha sido un reto para la industria y científicos por igual. Los lípidos son susceptibles a los procesos de oxidación en presencia de factores tales como: la luz, el calor, enzimas, metales, metaloproteínas, y microorganismos, dando lugar al desarrollo de sabores y olores desagradables y a la pérdida de aminoácidos esenciales, vitaminas liposolubles y otros compuestos bioactivos. Los lípidos pueden sufrir auto oxidación, foto-oxidación, oxidación térmica y enzimática bajo condiciones diferentes, la mayoría de las cuales implican radicales libres o especies reactivas de oxígeno [14].

3.3.1 Especies reactivas del oxígeno ROs

El daño oxidativo es atribuido a la interacción química con especies reactivas del oxígeno, que incluyen a los radicales libres, caracterizados por su gran inestabilidad y elevada reactividad, por la presencia de un electrón desapareado, con o sin carga eléctrica efectiva [21]. También interactúan con otras especies no radicalarias que son oxidantes y pueden convertirse en radicales libres [22]. En la Tabla 5 se muestran los diferentes radicales y no radicales que intervienen en estos procesos.

Tabla 5 . Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno

Radical		No radical	
Radical hidróxilo	$\cdot\text{OH}$	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}\cdot$	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
Superóxido	$\text{O}_2\cdot$	Ácido hipocloroso	HClO
Peróxilo	$\text{ROO}\cdot$	Ácido nitroso	HNO_2
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$	Catión nitrilo	NO_2^+
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$	Peroxinitrito	$\text{ONOO}\cdot$
		Ácido Peroxinitroso	ONOOH
		Alquil peroxinitrito	ROONO
		Ozono	O_3
		Ácidohipobromoso	HBrO

Fuente: Díaz, 2002 . [22]

Estos radicales tienen una vida media corta; para estabilizarse, actúan cerca al sitio en que se forman, reaccionando con las moléculas adyacentes, mediante transformaciones de oxidación y reducción con biomoléculas críticas como las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos [21,22], produciendo enfermedades crónicas, procesos de envejecimiento, obstrucción arterial conducentes a enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras [23,24]

La autooxidación es el proceso más común que conlleva al deterioro oxidativo y en este caso se define como la reacción espontánea de oxígeno atmosférico con lípidos. En el caso de los aceites éste proceso puede ser acelerado a temperaturas más altas, tales como las experimentadas durante la fritura, que se llama oxidación térmica, con aumento en el contenido de ácidos grasos libres y compuestos polares. Los ácidos grasos insaturados son los más susceptibles a dichos procesos. Se ha aceptado que tanto la auto oxidación térmica y la oxidación de ácidos grasos insaturados se produce a través de una reacción en cadena de radicales libres que procede a través de tres etapas, la de iniciación, propagación y la de terminación (Esquema 1). A continuación se muestra el mecanismo general de auto oxidación.

Esquema 1. Representación del mecanismo general de autooxidación

Iniciación	$RH \rightarrow R^{\cdot} + H^{\cdot}$
Propagación	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ $ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$
Derivación	$ROOH \rightarrow RO^{\cdot} + OH^{\cdot}$ $RO^{\cdot} + RH + O_2 \rightarrow ROH + ROO^{\cdot}$ $\cdot OH + RH + O_2 \rightarrow H_2O + ROO^{\cdot}$
Terminación	$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$ $ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow ROOR$ $R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow R - R$
Descomposición	$ROOH \rightarrow$ compuestos de bajo peso molecular
Polimerización	$ROOH \rightarrow$ compuestos de alto peso molecular

R: cadena carbonada con dobles enlaces tipo alílicos.

Fuente: Fox, et al., 2007 [25]

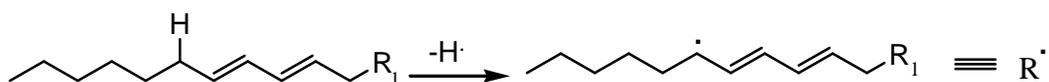
En la iniciación un radical libre ataca a un grupo metileno ubicado en posición alfa a un doble enlace en la cadena carbonada del ácido graso, extrayendo un átomo de hidrógeno, lo que da lugar a un nuevo radical libre alílico.

En los ácidos grasos altamente insaturados, esta reacción se ve favorecida debido a la alta reactividad de los grupos metilenos adyacentes a los dobles enlaces. Los radicales libres lipídicos tienden a estabilizarse mediante un reordenamiento interno dando lugar a los dienos conjugados.

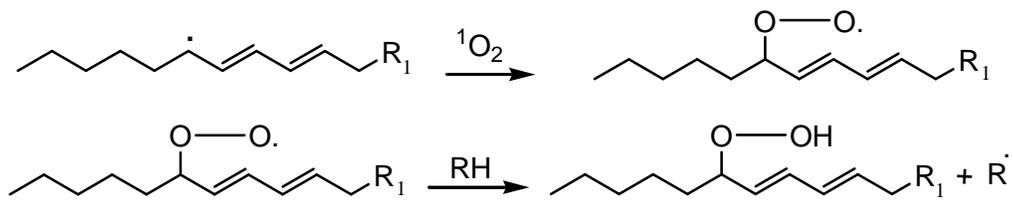
En la Propagación el radical R^\bullet producido en la fase de iniciación, forma con el oxígeno singlete activado, un radical lipídico peroxilo ROO^\bullet que reacciona posteriormente para dar un hidroperóxido $ROOH$. En la segunda reacción dentro de la fase de propagación, se produce un nuevo radical libre R^\bullet , lo que renueva el proceso [26].

Terminación. La reacción puede detenerse mediante la interacción de dos radicales o a través de la incorporación de un antioxidante que actúa atrapando los radicales libres, hasta culminar la fase de propagación. El electrón no apareado del radical proveniente del antioxidante se deslocaliza dentro de su estructura insaturada, consiguiendo estabilizarse. Cuando el radical libre alquílico del lípido R^\bullet reacciona con un radical libre lipídico peroxilo ROO^\bullet da lugar a una especie relativamente estable, no-iniciadora y no-propagadora. De forma similar dos radicales libres alquílicos R^\bullet pueden unirse también como se presenta a continuación:

Iniciación



Propagación



Terminación



3.4 Caracterización fisicoquímica del aceite de SI

Los ácidos grasos son moléculas orgánicas que se encuentran presentes tanto en el tejido animal como en el vegetal. Estos se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas. Teniendo en cuenta estas propiedades es posible establecer los beneficios que pueden aportar los lípidos al organismo. A continuación se hará una breve descripción de los métodos más utilizados por la industria de alimentos para medir la estabilidad oxidativa de las grasas y aceites.

3.4. Determinación del Índice de Peróxidos (IP)

Este índice es expresado como la cantidad determinable de oxígeno activo, Medido en meq, contenida en 1 kg de grasa o aceite [27]. En las primeras fases de oxidación (periodo de oxidación) la formación de peróxidos es lenta variando desde unas semanas a unos meses, de acuerdo a la clase de aceite a las condiciones de almacenamiento, al tipo y contenido de antioxidantes [28].

El método tradicional, se basa en la capacidad de los peróxidos, para oxidar el ion yoduro y producir yodo que se valora con una solución estandarizada de $Na_2S_2O_3$. El volumen consumido de esta solución es proporcional a la concentración de peróxidos en la

muestra. En la Figura 4 se muestran las ecuaciones de los cambios químicos que ocurren en la determinación del índice de peróxidos [29].

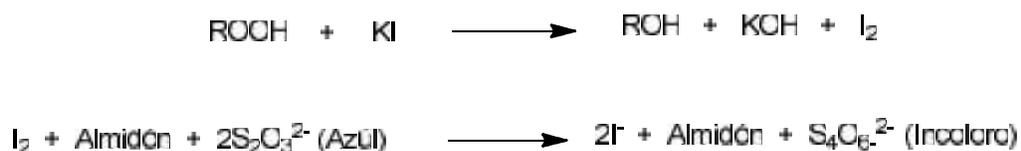


Figura 4 . Determinación de los hidroperóxidos lipídicos

El índice es una medida de la cantidad de oxígeno unido a la grasa o al aceite, mediante un enlace peróxido. Prioritariamente se forman hidroperóxidos como productos de oxidación primarios y en pocas cantidades se forman otro tipo de peróxidos como consecuencia de los procesos oxidativos. Por tal motivo, el índice de valor peróxido suministra información acerca del grado de oxidación que le ha ocurrido a la muestra [30].

Esta información es de gran importancia en el análisis físicoquímico de cualquier grasa o aceite, ya que permite hacer estimaciones de hasta qué punto la parte lipídica ha sido alterada. Si la oxidación está muy avanzada, se producirá un aumento progresivo de la degradación de los peróxidos por lo que el índice descenderá [31].

3.5 Determinación índice de acidez (IA)

El índice de acidez se define como los miligramos de KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1 gramo de aceite o grasa, por titulación no acuosa [32]; en los aceites vegetales se expresa como si todos los ácidos libres fueran ácido oleico ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$), pero hay casos excepcionales; dependiendo de la procedencia de la grasa o aceite se expresa como si los ácidos grasos libres fueran ácido palmítico ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$), ácido láurico ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$), u otros [33]. Constituye una medida del grado de hidrólisis (descomposición) de una grasa o aceite por acción de las lipasas o por alguna otra causa; la descomposición se acelera por la luz y el calor.

Todos los aceites y las grasas tienen ácidos grasos libres y algunos los tienen en grandes cantidades. La causa de la existencia de ácidos grasos libres es la actividad enzimática de las lipasas, causando rancidez. Todas las semillas y los frutos oleaginosos tienen presentes algunas de estas enzimas lipolíticas que se encuentran tanto en el embrión como en el mesocarpio del fruto. Los aceites que tienen ácidos grasos de cadena corta son muy sensibles a estas enzimas hidrolíticas. Los aceites extraídos de semillas descompuestas tienen acidez alta, al igual que los aceites almacenados durante mucho tiempo [34].

El IA se considera usualmente como uno de los principales parámetros para reflejar la calidad del aceite, el grado de refinación, así como la calidad durante el almacenamiento. Aceites con IA mayor de 3 mg /g de aceite, deben ser refinados, de lo contrario no pueden ser comestibles [35].

La determinación se realiza por titulación con solución etanólica estándar de hidróxido de potasio (KOH). Es recomendable utilizar un sistema potenciométrico para la determinación del punto final, ya que la coloración propia de muchas de las materias grasas puede dar lugar a errores en la utilización de los indicadores visuales y proporciona resultados comparables con los obtenidos al emplear los métodos colorimétricos [34].

Los índices descritos pueden estar relacionados con las etapas del proceso de oxidación lipídica, como se muestra en la Figura 5 [36].

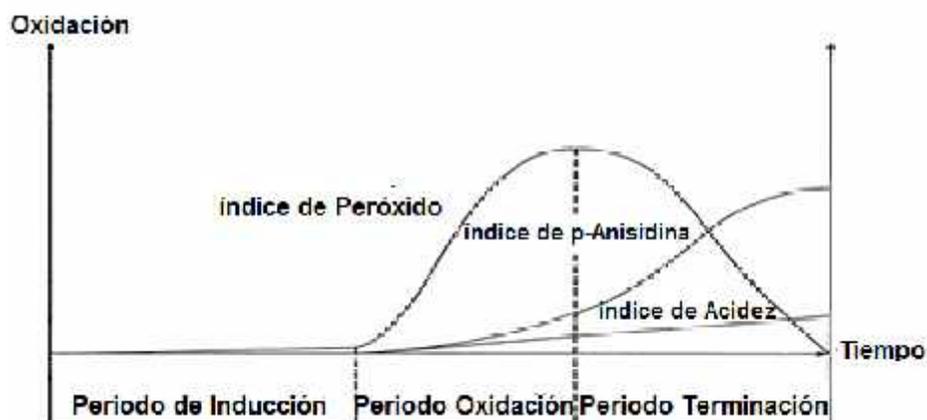


Figura 5. Etapas de la oxidación lipídica

3.6 Estabilidad oxidativa

La estabilidad de una grasa o aceite, es decir su resistencia a la autooxidación, es una cualidad apreciada que supone la capacidad para mantener su calidad organoléptica durante el almacenamiento y el tiempo de vida útil, depende de su composición en ácidos grasos insaturados, temperatura y exposición a la luz, durante el almacenamiento, metales de transición durante la extracción, peróxidos, pigmentos, presencia de componentes menores, y de sus propiedades antioxidantes [37]. Factores de los que depende que los aceites sean menos aceptados por los consumidores o sean considerado para usos industriales Las diferencias entre unos aceites y otros son muy grandes y pueden estudiarse viendo las variaciones en los índices de calidad, los cuales pueden definir el grado de conservación y pureza del aceite, después de su extracción y procesos de refinación; basándose en las normas establecidas para aceites de consumo o de aplicación industrial, así como determinar si éste se encuentra alterado. Estos índices son un punto de partida para los demás análisis de estabilidad. De otro lado, está la determinación de productos iniciales de peroxidación como dienos conjugados, peróxidos y la determinación de compuestos finales, como volátiles, TBARs (especies reactivas del ácido tiobarbitúrico) [38]. También es usado en el seguimiento de reacciones de oxidación, de sustratos específicos, como ácidos grasos saturados e insaturados.

3.7 Dienes y Trienos Conjugados

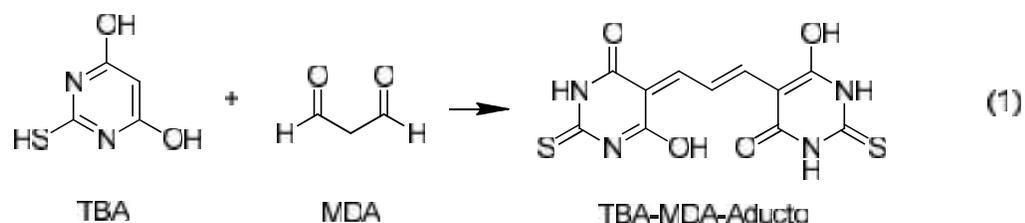
El método se basa en la detección de dienos y trienos por espectroscopía UV, los cuales se generan de los ácidos grasos insaturados, como consecuencia de cambios en las posiciones de los dobles enlaces y a partir del proceso oxidativo. Durante la primera etapa del proceso de oxidación lipídica de los ácidos grasos, se da la producción de peróxidos, muy inestables, con tendencia a descomponerse fácilmente [38]. Posteriormente se lleva a cabo el reordenamiento de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados (C=C-C-C=C), dando lugar a la aparición de dienos (C=C-C=C) y trienos conjugados.

La determinación de estos compuestos se fundamenta en que absorben la radiación ultravioleta en la longitud de 232 nm los dienos y 276 nm los trienos. Para efectuar la medición, las muestras se disuelven en un solvente orgánico como el isooctano y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis. A medida que la reacción avanza, la absorbancia disminuye, ocasionado por el paso de los dienos Conjugados a productos secundarios de oxidación, los que presentan una baja absorción a 232 nm [36][40].

3.3 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

La prueba de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ecuación 1) entre el 2-ácido tiobarbitúrico (TBA) y malonaldehído (MDA), es una de las técnicas más utilizadas para medir el incremento de productos secundarios de oxidación. El TBA se considera una técnica relativamente simple y presenta una elevada correlación con los resultados de la evaluación sensorial. El malonaldehído puede ser liberado por hidrólisis ácida, usando como precursor el 1,1,3,3-Tetraetoxipropano. Este método se basa en la reacción de una molécula de malonaldehído con 2 moléculas de TBA para formar un complejo coloreado malonaldehído-TBA, que puede ser cuantificado por ultravioleta a una longitud de onda de 532 nm. Las limitaciones que se han señalado a esta técnica son que es poco sensible a bajas concentraciones de malonaldehído, además otras sustancias pueden reaccionar (sustancias reactivas al TBA) como sacáridos y otros aldehídos lo que puede interferir con la reacción malonaldehído-TBA. De igual forma el malonaldehído puede reaccionar con las proteínas encontrándose menores niveles que los reales, correspondientes a la oxidación. Esta técnica se considera especialmente útil cuando se requiere determinar el

incremento de la oxidación en el tiempo [41].



3.4 Índice de estabilidad oxidativa método de (método Rancimat)

El índice de estabilidad oxidativa de los aceites u oxidación inducida, también conocida como el método Rancimat, permite determinar la estabilidad oxidativa bajo condiciones de temperatura y tiempo estandarizadas [42]. Fue desarrollado por Hadorn y Zurcher, se fundamenta en el hecho de que el ácido fórmico es el compuesto volátil mayoritario, de bajo peso molecular, formado en la descomposición de los hidroperóxidos [43].

A las temperaturas del ensayo, el ácido fórmico es arrastrado por una corriente de aire y se disuelve en agua fría, provocando un aumento de la conductividad en la misma [39], utilizado para definir el periodo de inducción del aceite analizado (Figura 6).

En este ensayo se tiene un periodo o tiempo de inducción en el cual prácticamente, no se forman productos secundarios y la fase de oxidación es rápida, con consumo de oxígeno y de peróxidos muy elevados. En esta fase comienzan a detectarse los productos volátiles. Si se sigue este proceso por los cambios que experimenta la conductividad, se obtiene una curva característica que representa una variación brusca de la pendiente entre los dos periodos.

El periodo de inducción se define como el tiempo necesario para llegar al punto de inflexión de la gráfica que representa la conductividad en función del tiempo, definido como el punto de intersección de las tangentes de la dos ramas de la gráfica [39]. Se establece que la mejor estabilidad para una muestra de aceite, está relacionada con el periodo de inducción más largo.

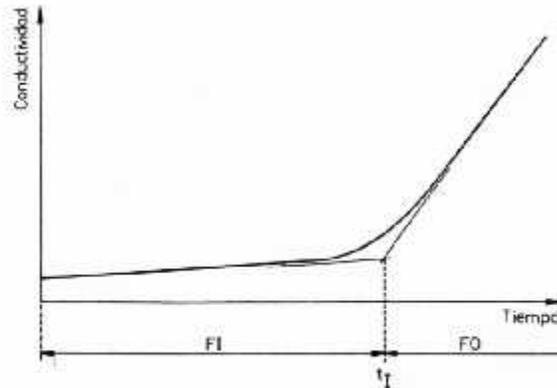


Figura 6. Tiempo de inducción determinado por el rancimat

FI: fase de inducción, **FO:** fase de oxidación, **t_I :** tiempo de inducción

4 ANTIOXIDANTES

Los aceites comestibles naturales tienen en su composición antioxidantes tales como tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, compuestos fenólicos y esteroides. Cuando se carece de ellos o están en baja concentración, son adicionados para darle una mejor estabilidad oxidativa al aceite.

Los antioxidantes son sustancias que bloquean la etapa de iniciación en la oxidación, minimizan la velocidad de oxidación, inactivan los radicales libres, controlan los metales de transición, eliminan al oxígeno singlete (1O_2), inactivan la sensibilidad a la luz. Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno al radical libre y convertirlo en un producto no radical más estable. Es decir alargan el tiempo de vida del producto, reducen el desperdicio de materias primas, reducen la pérdida nutricional y amplían el tiempo de uso del producto [44]. En general son compuestos polifenólicos, más o menos liposolubles, que no deben ser tóxicos ni comunicar sabores extraños a los alimentos [37]. Pueden clasificarse de acuerdo con su mecanismo de acción como antioxidantes primarios o tipo I y antioxidantes secundarios. Hay antioxidantes que exhiben más de un mecanismo de acción y se conocen como antioxidantes múltiples. Los métodos utilizados

se clasifican en tres categorías, de acuerdo a las sustancias utilizadas como antioxidantes:

-Tipo I: Se trata de sustancias capaces de interrumpir la propagación en cadena de radicales libres actuando como donores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres. Los principales antioxidantes de Tipo I utilizados en los alimentos son los fenoles mono o polihidroxilados con varias sustituciones en el anillo aromático. En la Figura 7 se muestran los siguientes ejemplos: éster del ácido gálico, butilhidroxianisol (BHA), terbutil hidroxitolueno (BHT) y terbutil hidroquinona (TBHQ).

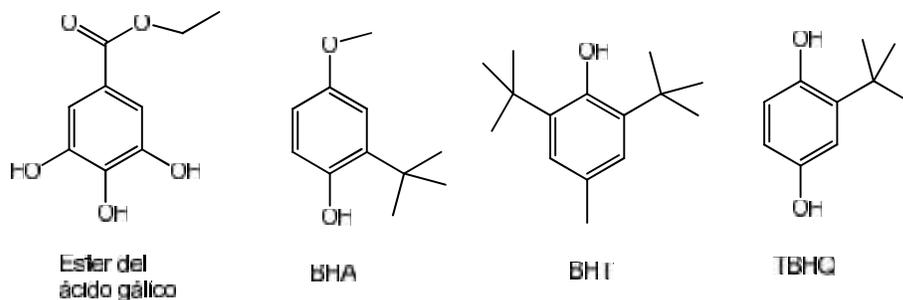


Figura 7. Antioxidantes de Tipo I Compuestos fenólicos sintéticos

-Tipo II: Los antioxidantes de esta categoría son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres. Los más utilizados son los agentes que acomplejan los metales. Muchos de los agentes quelantes utilizados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como los ácidos policarboxílicos (cítrico, málico, succínico, etc., Figura 8) y macromoléculas (porfirinas y proteínas).

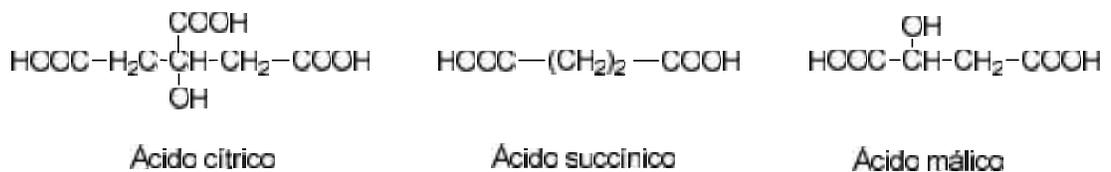


Figura 8. Antioxidantes de Tipo II Quelantes o secuestrantes de metales

-Tipo III: Se clasifican en esta categoría los procedimientos de protección contra la oxidación, que consisten en establecer condiciones físicas o físico-químicas (contenido de oxígeno en el embalaje, humedad, temperatura, iluminación, pH, etc.) convenientemente escogidas. La Figura 9 muestra una visión general de la oxidación de los lípidos y la interacción de los antioxidantes [37].

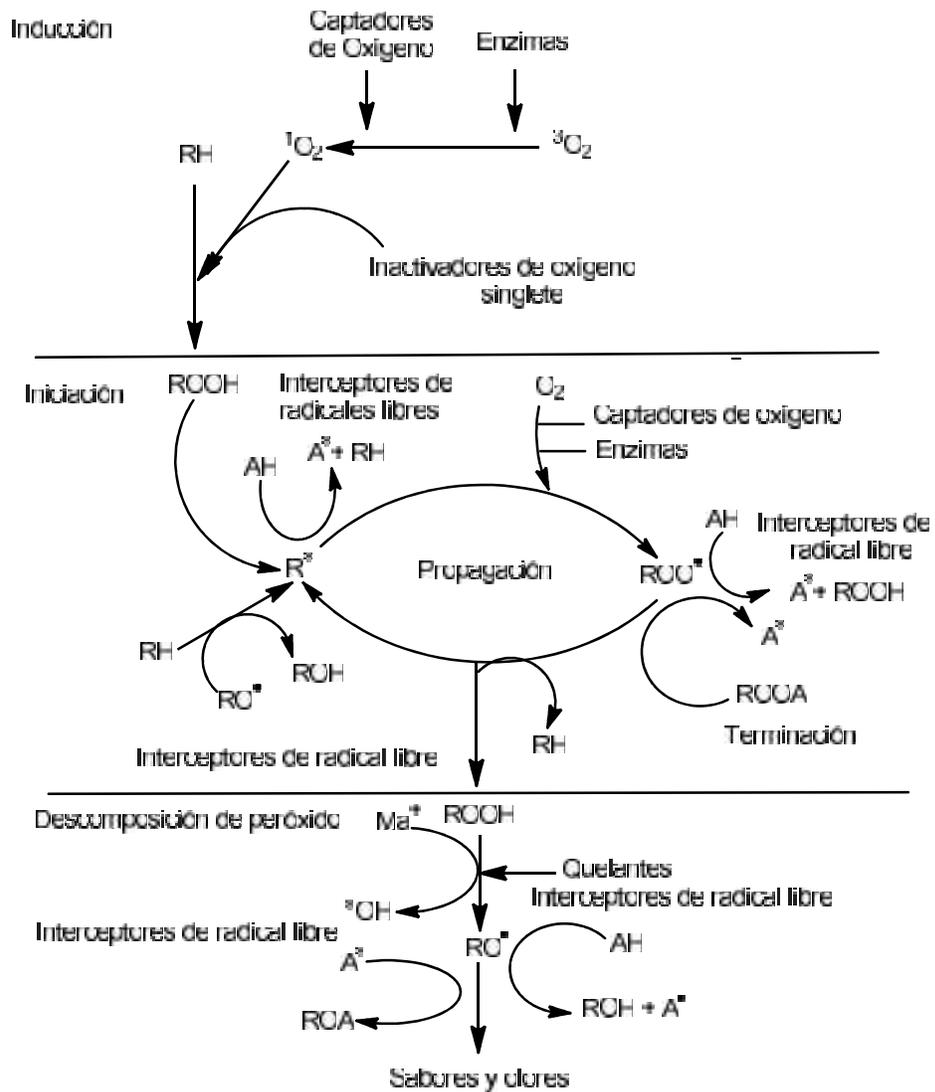


Figura 9. Oxidación de lípidos e interacción de los antioxidantes

Las grasas vegetales naturales contienen cantidades pequeñas de antioxidantes que inhiben la oxidación, causa de la rancidez (0,05 a 0,2 %); en las grasas animales no se encuentran. Los hallados en las grasas vegetales son los llamados tocoferoles. No se separan en grado apreciable en el proceso de la refinación. Sin embargo, en el proceso de fabricación se acostumbra añadir otras sustancias antioxidantes que garanticen la estabilidad del producto durante algún tiempo.

Los tocoferoles son las moléculas antioxidantes más importantes presentes en los aceites comestibles, se encuentran en la mayor parte de los tejidos vegetales, alcanzando tasas de hasta el 0.1% en los aceites de este origen [45]. Aceites de soya, canola, girasol y maíz, contienen relativamente altos contenidos de tocoferoles. Aunque el aceite de palma no contiene altas cantidades de tocoferoles, tiene altas concentraciones de tocotrienoles α , γ , y δ tocotrienoles, 211, 253-372 y 56-67 ppm, respectivamente. Aceite de cárcamo con un contenido de 3.8–7.0 y 7.5– 8.4 ppm de α , y γ tocotrienoles, respectivamente [46]. La Norma ICONTEC 198 para manteca, fija el nivel máximo de los antioxidantes en 0.01% y en 0.02% en los aceites refinados.

4.1 CÚRCUMA (*Cúrcuma longa linn*)

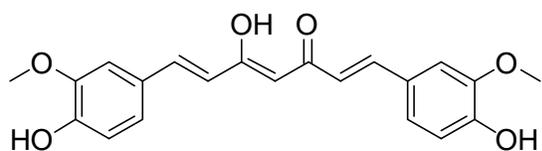
La cúrcuma (*Cúrcuma longa Linn*) conocida también como turmeric o haldi (Asia), de origen asiático pertenece a la familia Zingiberaceae. Se cultiva principalmente en China, India, Indonesia, Jamaica y Perú. El cultivo de cúrcuma se ha introducido en Colombia en las últimas décadas en los departamentos del Quindío y Putumayo de donde proviene el rizoma de la cúrcuma utilizada para este trabajo. (Fig. 10).



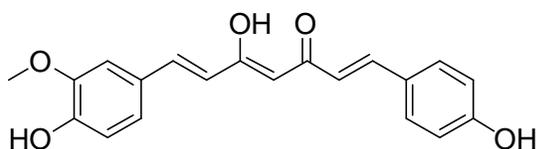
Figura 10. Cultivo y flor de la cúrcuma

Las propiedades de la cúrcuma son muy importantes para la industria debido a que cuando se adiciona a preparaciones alimentarias preserva su frescura e imparte un sabor característico además, de su uso en la medicina tradicional principalmente contra afecciones estomacales [47].

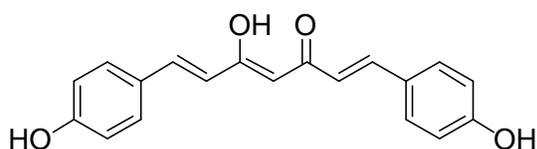
La cúrcuma cuenta en su composición química con compuestos volátiles y no volátiles. Los principales compuestos volátiles encontrados son: cariofileno, arcurmeno, zingibereno, bisaboleno, sesquifelandrenendreno [48] y tres turmeronas [49]; dentro de los compuestos no volátiles más sobresalientes se encuentra un péptido soluble en agua llamado turmerina [50] y los polifenoles [51]. La curcumina es el principal polifenol curcuminoide encontrado en la cúrcuma, junto con la demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina (Figura 11) y la recientemente descubierta ciclocurcumina forman el complejo conocido como azafrán indio, raíz amarilla, jengibre amarillo o amarillo natural. La curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) es también conocida como diferuloilmetano o 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, es un compuesto enólico de bajo peso molecular (369.37g/mol) con punto de fusión 183 °C, de color amarillo en medio ácido (pH 2,5-7) y rojo en medio básico (pH > 7), es soluble en solventes orgánicos como dimetilsulfoxido, etanol, metanol o acetona y muy poco soluble en solventes acuosos [52 - 53].



Curcumina



Demetoxicurcumina



Bisdemetoxicurcumina

Figura 11. Estructura de los principales polifenoles de la cúrcuma

4.2 Curcumina

En la medicina ayurvédica (que en la India significa "ciencia de la vida"), la curcumina principal curcuminoide, es utilizada para diversas afecciones respiratorias (por ejemplo, el asma, hiperactividad bronquial y alergia), así como para trastornos hepáticos, anorexia, el reumatismo, la diabetes, nariz con mucosidad, tos y sinusitis. En la medicina tradicional china, se usa para el tratamiento de enfermedades asociadas con dolor abdominal. En la antigua medicina hindú, es utilizada para el tratamiento de esguinces y la hinchazón. En todo el Oriente, tradicionalmente ha sido utilizada como buen tratamiento terapéutico, en particular como anti-inflamatorio, muchos de sus efectos terapéuticos han sido confirmados por la investigación científica moderna. Estos efectos incluyen antioxidante, anti-inflamatorios, anticancerígeno y antimicrobianos, hepatoprotector, trombosupresivo,

cardiovascular (protección contra el infarto de miocardio), hipoglucemiantes y protección contra la artritis reumatoide [54].

4.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

El objetivo principal de la industria alimentaria a nivel mundial, es remplazar los antioxidantes sintéticos por productos de origen vegetal, de naturaleza fenólica, como los flavonoides, hidroxitirosol, entre otros, como una estrategia para prevenir posibles efectos colaterales a la salud de los seres humanos, principales usuarios de este tipo de productos [55,56]. Los resultados de estudios científicos sobre el consumo de este tipo de aditivos en la salud humana han sido controversiales; algunos de estos muestran una relación directa entre su presencia y los efectos cancerígenos, mientras que otros no muestran ninguna relación y enfatizan en posibles efectos antioxidantes en los animales [57- 59]. A continuación se describen las características generales de dos tipos de antioxidantes sintéticos con funcionalidades similares en el área de estudio de la actividad antioxidante en ensayos In vitro, ellos son el BHT y el TBHQ. La Figura 12 muestra el mecanismo general de acción de los antioxidantes y la estabilización de un intermediario.

- a) En la autooxidación lipídica un radical intermedio se estabiliza cuando una molécula, HA (normalmente un antioxidante), dona un átomo de hidrógeno.
- b) El radical libre antioxidante se estabiliza mediante resonancia y es insuficientemente reactivo para propagar la secuencia de auto oxidación.
- c) Los radicales antioxidantes reaccionan entre sí para terminar el proceso.

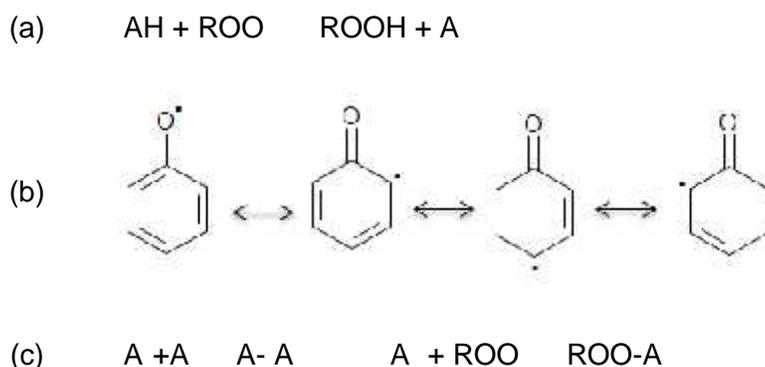


Figura 12. Mecanismo general de acción de los antioxidantes aromáticos Fuente: Coultate, 2007. [45].

4.3.1 Terbutil hidroxitolueno (BHT)

El terbutil hidroxitolueno (BHT), es un antioxidante sintético de gran aplicabilidad en la preservación de productos de consumo humano en la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica y polimérica, entre otras. Pese a que su uso ha sido motivo de discusión por posibles efectos colaterales aún no demostrados, junto con el BHA (Butil hidroxianisol), son los más ampliamente usados [53,54].

4.3.2 Terbutil hidroquinona (TBHQ)

Se presenta como un sólido blanco cristalino, soluble en etanol y éter; muy poco soluble en agua. Es considerado el mejor antioxidante para las aplicaciones de fritura, pero poco eficaz en los procesos de panificación u horneado. Su solubilidad en aceites y grasas es suficiente y tiene la ventaja de que no se compleja con el hierro y el cobre como ocurre con los galatos por lo que no requiere especial presencia de agentes quelantes en el medio para impedir la formación de complejos coloreados (Figura 7).

4.4 Separación cromatográfica de los curcuminoides

4.4.1 Separación por cromatografía en columna

La cromatografía en columna es una técnica usual para la separación de compuestos polifenólicos tipo curcuminoides como la curcumina, demetoxicurcumina y

bisdemetoxicurcumina que se encuentran presentes en la harina de cúrcuma, obtenida a partir de los rizomas de cúrcuma. Con esta técnica Rios y colaboradores reportan la separación, en la universidad del Quindío [48].

4.4.2 Cromatografía en capa delgada

Esta técnica ha sido empleada en la universidad del Quindío para la separación de los curcuminoides, presentes en la harina de cúrcuma, aislados mediante cromatografía en columna, confrontando el resultado con la mezcla de ellos como material de referencia, para estimar, de acuerdo al factor de reparto (R_f), la eficacia de dicha separación [48].

5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Uno de los aspectos más importantes en el tratamiento de datos es el contraste de la hipótesis nula: H_0 con la hipótesis alternativa: H_1 , el cual se puede realizar con el programa estadístico llamado Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Para el contraste de hipótesis, como es el caso de variables cuantitativas, se cuenta con dos tipos de análisis: los paramétricos, que proceden de un modelo que obliga a cumplir ciertos supuestos acerca de los parámetros y la distribución de probabilidad de la población de la que se extrajo la muestra, y los no paramétricos, que son menos restrictivos para poder ser aplicados [60 - 62].

Antes de utilizar las pruebas paramétricas, es indispensable comprobar ciertos supuestos para su aplicación, descritos brevemente a continuación:

5.1 Supuestos

5.1.1 Distribución Normal de las Poblaciones (Prueba de Shapiro-Wilk)

Para la comprobación de la hipótesis de normalidad, se puede emplear la prueba de Shapiro-Wilk, de la cual se puede definir si es posible trabajar con el valor promedio de los datos obtenidos ó si por el contrario, no es posible y se debe utilizar otro tipo de variables. Así, si una muestra aleatoria que procede de cierta distribución desconocida y denotada por $F_{(x)}$, se le va a verificar si los datos fueron generados por un proceso normal, es necesario plantear las siguientes hipótesis estadísticas [62]:

Nula H_0 : “El conjunto de datos sigue una distribución normal”.

Alternativa H_1 : “El conjunto de datos no sigue una distribución normal”.

Seguidamente se calcula el estadístico W (contraste de normalidad), prueba de Shapiro – Wilk, para ver la normalidad de los datos, y si éste (teniendo en cuenta el número de muestras y la tabla de valores críticos ya tabulados) es menor que el $W_{(1-\alpha)}$ tabulado, se acepta que los datos proceden de una distribución normal con un nivel de significancia mayor de 0,05.

6 METODOLOGÍA

A continuación se describe la metodología, equipos y reactivos utilizados, en la separación y cristalización de curcuminoides, técnicas con las cuales se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas, determinación de la estabilidad oxidativa del aceite de Sly los métodos analíticos con los cuales se realizó su seguimiento índice de acidez (IA), índice de peróxidos (IP), dienos (DC) y trienos conjugados (TC). Todos los reactivos fueron de alta pureza y los solventes de grado analítico.

6.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

6.1.1 REACTIVOS

Ácido acético Carlo Erba 98 %, n-Butanol Mallinckrodt 99.9 %, Cloroformo Riedel – de Haen 99.0 %, Metanol J. T Baker 99.99 %, Eter etílico anhidro Fisher Scientific 99.9 %, Metanol Merck 99.9 %. Hexano Fisher Scientific 99.98%. Hidróxido de sodio Fisher Chem Alert 99.9%. Ácido clorhídrico Mallinckrodt AR 37 %. Alcohol etílico absoluto anhidro Mallinckrodt 99.9 % , Acetato de etilo 99.8 %, 1,1,3,3- Tetraetoxipropano (TEP) Sigma – Aldrich 96 %, 2,6-Dimetil-2,4,6-octatrieno Scientific Products Ltda 95.1 %, Silica (70- 230 mesh) Sigma – Aldrich.

6.1.2 EQUIPOS

Balanza analítica Precisa XT220A. Campana de extracción C4, modelo C180X. Plancha de calentamiento y agitación Corning, modelo PC 420. Rotaevaporador Heidolph, modelo Heizbad WB. Micropipeta BRAND 25-250 μ L. Deionizador D&E. Destilador SchottGerate. Infrarrojo con Transformada de Fourier, Thermo modelo IR200, detector UV-VIS G1314A,

columna cromatografica 50 cm de longitud x 2 cm de diámetro, Molino electrónico Cross-Beater Mill Retsch, tamiz de 0.12. mm de abertura.

6.2 OBTENCIÓN DEL RIZOMA

Los rizomas de la cúrcuma fueron aportados por industrias ECHZ, cultivados a 300 m.s.n.m. en el Municipio de la Hormiga, Departamento del Putumayo.

Caracterización fisicoquímica de los rizomas frescos: Se realizó los siguientes análisis a los rizomas frescos.

Limpieza y lavado: En la Figura 13 a, b y c, se muestran los rizomas frescos, los cuales se limpiaron manualmente, se lavaron con agua destilada, se secaron con toallas adsorbentes y cortados en rodajas con un bisturí.



Figura 13. a) Rizoma de la cúrcuma fresco b) Rizoma de la cúrcuma lavado



c) Rizoma de la cúrcuma cortada en rodajas

Humedad: Se empleó el método reportado en la referencia que se consigna, con modificación del tiempo y la temperatura en razón a las condiciones climáticas de la región, descrito a continuación: en cajas petri previamente taradas, se pesó por triplicado 5.001 g de muestra, se sometieron a un horno de aire caliente a 70 °C por 4 días, transcurrido este tiempo se pesaron las cápsulas y se llevaron al desecador por

una hora y se repitió el procedimiento anterior hasta alcanzar peso constante (Figura 14) [63].



Figura 14. Rizoma de la cúrcuma seco

A partir de los pesos obtenidos en la Tabla 6, se determinó el porcentaje de humedad de las muestras utilizando la Ecuación 1.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso}_{\text{muestra húmeda}} - \text{Peso}_{\text{muestra seca}}}{\text{Peso}_{\text{muestra húmeda}}} * 100 \quad (1)$$

Preparación de la Harina: Los rizomas fueron cortados en rodajas y secados por circulación con aire caliente a 70°C por 4 días, se molieron en un molino electrónico hasta obtener un polvo fino(Figura 15), adecuado para las extracciones. La harina obtenida se almacenó para los análisis posteriores en bolsas plásticas ziploc.



Figura 15. Harina de cúrcuma obtenida a partir del rizoma seco.

Extracción del Colorante: Se pesaron 50 g de la harina, la cual fue desengrasada con 150 ml de hexano por el método soxhlet durante 12 horas (Figura 16 a). El material desengrasado se sometió a extracción soxhlet con 150 ml de etanol absoluto por 12 horas con el fin de obtener el extracto de los colorantes vino tinto (Figura 16 b), el cual se enfrió a temperatura ambiente y posteriormente se concentró por presión reducida en un rotaevaporador Heidolph, modelo Heizbad WB (Figura 17 a), hasta obtener un volumen del extracto de 20 ml. Posteriormente se filtró al vacío, obteniendo un extracto crudo seco color rojo naranja (Figura 17 b), dejándolo a temperatura ambiente durante 1 día, hasta total seccedad, dónde finalmente se calculó el porcentaje de extracción de los curcuminoides (Tabla 6).



a.



b.

Figura 16. a) Extracción de grasa por el método Soxhlet **b)** Extracción de curcuminoides por el método soxhlet.



a. **b.**
Figura 17. a) Concentración del extracto por rota evaporación. **b)** Extracto seco de curcuminoides.

Separación y Cristalización de Curcumina

La separación de los curcuminoides se realizó por cromatografía en columna, empleando una columna de 50 cm de longitud y 2 cm de diámetro. Se empleó como fase estacionaria 20 g de sílica gel, grado Merck de 60 μm , tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (70-230 mesh ASTM), la cual se compactó inicialmente con 100 mL de éter de petróleo, se maceró la muestra de 0.2 g de curcuminoides y 0.02 g de sílica, y se depositó en la columna (Figura 18 a); enseguida, se compactó nuevamente la columna con 50 ml de éter de petróleo, posteriormente se adicionó una fracción cero de 50 ml de cloroformo y se procedió a eluir la columna utilizando como fase móvil 150 mL de cloroformo: metanol 99:1, recolectando fracciones de 10 ml hasta obtener la separación de la curcumina. Todas las fracciones fueron sujetas a cromatografía en capa delgada con placas de vidrio, recubiertas con sílica gel para cromatografía con espesor de 0.25 mm y de 5 X 2.5 cm^2 , utilizando como referencia el extracto seco de curcuminoides y fase móvil cloroformo: metanol 19:1 Los desplazamientos de las señales para el cálculo de los Rf se visualizaron en una cámara de ultravioleta modelo C-65.



a.



b.

Figura 18. a) homogenización de la sílice con los curcuminoides **b)** Separación de la curcumina por cromatografía en columna.

Las fracciones de 10 ml fueron recolectadas y analizadas por capa delgada confrontadas con el extracto seco de curcuminoides, luego de dejarse evaporar el solvente dentro de una campana de extracción, se recrystalizaron en 20 mL de metanol: cloroformo 5:2; la mezcla se dejó en reposo toda la noche a una temperatura de 5°C, luego se filtró al vacío, se eliminó el solvente y se determinó finalmente el punto de fusión correspondiente de los cristales.

Caracterización Espectroscópica: Se pesaron 0.01 g de los cristales de curcumina recrystalizados y se disolvieron en 10 mL de etanol, posteriormente se aforaron en un balón de 25 mL con etanol y se realizó un barrido de 200 a 600 nm en un espectrofotómetro de ultravioleta visible GENESYS 8453, usando etanol como blanco y una celda de cuarzo de 10 cm de longitud.

Análisis por Infrarrojo (IR): Se realizó análisis por IR, al extracto de curcuminoides y a los cristales de la curcumina, en un equipo FTIR Thermo Nicolet 340, usando pastillas de bromuro de potasio con KBr grado espectrofotométrico infrarrojo.

6.3 ORIGEN DEL ACEITE DE SI

Las muestras de aceite que se utilizaron para realizar la determinación de la estabilidad oxidativa del aceite de SI, fueron donadas por industrias ECHZ del municipio de la Hormiga, Putumayo.

6.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE

6.4.1 PRUEBA DE HORNO

La estabilidad oxidativa del aceite de la semilla de sachá inchi, se midió con base en el índice de acidez, índice de peróxidos, dienos y trienos conjugados por espectroscopía de UV, en 3 muestras de 20 g de aceite puro, aceite con terbutilhidroquinona (TBHQ) y aceite con curcuminoides extraídos como antioxidante, cada una distribuida en 10 frascos de vidrio ámbar con tapa (Figura 19), durante los días 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 y 40. Todas ellas se calentaron a una temperatura constante de 63 ± 1 °C, excepto las que se trabajaron el día cero. La cantidad adicionada de curcuminoides y TBHQ fue de 0.002 g, igual en todos los frascos.



Figura 19. Muestras de aceite de SI en el horno

6.5 ANÁLISIS DEL ACEITE

6.5.1 PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Para establecer las propiedades físicas y químicas del aceite extraído se efectuaron los siguientes análisis: índice de acidez, índice de peróxidos, de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC (2005). La metodología empleada para cada determinación se describe a continuación:

6.5.1.1 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP) (Norma AOAC 965.33)

A la mezcla de 0,2 g de aceite con 15,0 ml de cloroformo- ácido acético (1:3) se vertió 2,0 ml de solución saturada de KI. La solución se dejó tapada, en reposo y en la oscuridad durante 1 min. Posteriormente, se le adicionó 20 ml de agua destilada y se tituló con una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N, hasta que el color amarillo desapareció. Entonces, se vertieron 0,5 mL de solución indicadora al 1% de almidón y se continuó la titulación hasta la desaparición del color azul. Los volúmenes se midieron por triplicado (Tablas 8 y 9), con dichos resultados se determinó el índice de peróxidos de los aceites en los días de análisis mencionados, aplicando la Ec.3.

$$IP = \frac{(V)(N)}{1000(W)} \quad (3)$$

Donde: (IP): Índice de peróxido expresado en (meq O_2/Kg)

V= V (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para titular la muestra – V (ml) del blanco y N= Normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

W= Peso muestra (g)

6.5.1.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ (IA) (Norma AOAC 940.28)

En esta medición 1,0g de aceite, mezclado con 30,0ml de etanol: éter etílico (1:1 V/V) y unas gotas de fenolftaleína, se valoró con una solución de KOH 0,04 N . En el cálculo se aplicó la Ec. 4, utilizando los volúmenes obtenidos por triplicado en los días de análisis, consignados en las Tablas 10 y 11.

$$IA = \frac{56(V)(N)}{PM} \quad (4)$$

Donde: IA: , V= V(mL) solución de KOH - V(mL) blanco, N= Normalidad de la solución del KOH, PM= Peso de la muestra en gramos o en porcentaje de ácido oleico.

6.6 ANÁLISIS DE DIENOS CONJUGADOS POR ESPECTROMETRÍA UV

6.6.1 DIENOS CONJUGADOS

La cuantificación de dienos conjugados (DC) se estimó directamente a partir de la muestra, midiendo por triplicado la absorbancia a 232 nm de 0,01 g de aceite puro, con TBHQ y con curcuminoides, aforados a 10 ml con isooctano.

6.6.2 TRIENOS CONJUGADOS

La cuantificación de trienos conjugados (TC) en Los aceites de SI, se realizó por el método de curva de calibración. A partir de la solución madre utilizada como patrón, de 50 mg /L de 2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno (Tokyo chemical industry co. Ltd), se construyó la curva de calibración, mediante la lectura por triplicado de la absorbancia en el espectrofotómetro UV-2550 – Genesys, de 6 estándares de 5 ml cada uno, en el rango de 0,05 a 0,50 mg/L del trieno en isooctano. En seguida determinó por triplicado la absorbancia a 276 nm 0,1 - 0,2 g de aceite, aforados en un balón de 10 ml con isooctano.

7 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Se emplearon 2 metodologías las cuales se describen a continuación:

7.1 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs) en aceites

En consideración a que no se contaba con el ácido tiobarbitúrico, se procedió a intentar el análisis con ácido barbitúrico. En tal propósito, se preparó el buffer de HCl-Glicocola, mediante dilución de 7,50 g de glicina y 5,84 g de NaCl en 90 mL de agua destilada y se adicionó 5,9 ml de HCl 0.10 N, hasta bajar el pH a 3.5. Posteriormente, se preparó una solución de 25 ml de ácido barbitúrico (AB) 0.2% (w/v) en butanol, sonicada por 6 horas, con el fin de lograr la disolución del AB.

La curva de calibración se realizó con 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP) como patrón, preparando una solución madre de 25 ml de TEP 0.2 mM (44.06 ppm), la cual se aforó con un buffer de HCl-Glicocola consiguiendo un pH = 3.5; se trabajó un rango de concentración de 0.22 ppm - 2.2 ppm, llevando al aforó con butanol. En seguida la mezcla de 5.0 ml de cada concentración con 5.0 ml de solución de AB / butanol 0.2% (w/v) se

calentó en baño de maría, a 95 °C, durante 2 h. El blanco se preparó calentando bajo las mismas condiciones 5.0 ml de la solución de AB / butanol, 0.2% (w/v). Posteriormente, cada solución se refrigeró y se realizó la lectura UV ($\lambda = 532\text{nm}$) [64].

7.2 Determinación de la Peroxidación lipídica

Se usó el buffer descrito en la sección 7.1. La solución de AB se preparó disolviendo 0,125 g de AB en 25 ml de solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) - agua destilada, al 0.3% (V/V). El catalizador de tricloruro de hierro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) se preparó disolviendo 0,0027g de la sal en 10 ml de agua destilada.

La solución madre se preparó mezclando 20 μl de TEP con 100 ml de solución buffer HCl-Glicocola de pH= 3,5 y con el fin de favorecer la hidrolisis del TEP se adicionó 400 μl de HCl 1.0 N, hasta una concentración de 834.3 $\mu\text{mol/L}$. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 hasta una concentración de 83.5 $\mu\text{mol/L}$ y partir de la cual se obtuvieron las nuevas concentraciones de 0.42, 0.83, 1.67, 2.50, 4.17, 8.30 y 16.7 $\mu\text{mol/L}$, con las que se realizó la calibración de la siguiente manera: a 1.5 ml de cada concentración referenciada se adicionó 1.5 ml de solución de AB y 0.1 ml del catalizador; luego se calentaron en baño maría por 60 minutos a una temperatura de 95 C. Lo mismo se hizo con el blanco (1.5 ml de AB y 0.1 ml de catalizador).

Posteriormente se intentó extraer el aducto de malonaldehído (MDA), representado como: AB-MDA-AB. Para ello, se adicionó a cada tubo de ensayo 2.5 ml de disolución de n-Butanol-piridina (15:1 V/V) y 0.5 mL de agua destilada. La mezcla resultante se centrifugó a 3600 rpm durante 10 minutos y se leyeron las absorbancias ($\lambda = 532\text{nm}$) [65].

8 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA (MÉTODO RANCIMAT).

El análisis de la estabilidad oxidativa se realizó con muestras de aceite de SI puro y por separado con adición de TBHQ y curcuminoides. En la preparación de las muestras con antioxidantes se partió de una solución madre de 400 ppm, la cual se diluyó sucesivamente hasta 50, 100, 150, 200 y 250 ppm, llevándose a un peso constante de 50 g con aceite de SI puro.

La medición del periodo de inducción por el método Rancimat se efectuó por triplicado, utilizando 5,0 g de cada concentración de las muestras. Cada una se adicionó a un tubo de ensayo que fue incluido en un sistema cerrado y calentado a 100 °C, mientras que se exponía a un flujo de aire de 20 L / hora; el aire después de pasar a través del aceite ,se burbujeó en un tubo con agua destilada, cuya conductividad se monitoreó constantemente. Después del período de inducción, la conductividad que era constante, se elevó rápidamente generando un incremento de la pendiente, mediante la cual se calculó el tiempo de inducción, en el que los valores de la conductividad aumentan rápidamente y a partir del cual se determinó el índice de estabilidad oxidativa (OSI) medido en horas. Este análisis fue realizado en la empresa (Ingredion Colombia S.A).



Figura 20.Equipo 679 rancimat

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del índice de peróxidos, índice de acidez, cuantificación de dienos y trienos conjugados en el aceite, están soportados por un tratamiento estadístico SPSS versión 11,5 para Windows y Microsoft Office Excel 2007. Inicialmente, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, aplicando posteriormente las pruebas no paramétricas Kruskal-wallis, U de Man-Withney, correlación de Spearman y estimación curvilínea de mejor ajustey el coeficiente de determinación y el análisis de relación para cada una de las curvas de calibración preparadas [63].

10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE CÚRCUMA

Al realizar el análisis fisicoquímico de la harina de los rizomas cultivados en el departamento del Putumayo Figura 13, se encontró un porcentaje de humedad del 78.6 %, porcentaje de grasa del 7.814 % y un porcentaje de curcuminoides del 0.784 % Tabla 6. En la región del Quindío se reportó como resultado un porcentaje de humedad del 80 % y un porcentaje de grasa de 0,051 %. Al realizar la comparación de los resultados entre estas dos regiones, vemos que en la región del Putumayo, se encontró un porcentaje de humedad más bajo en un 1,4 % de diferencia y un porcentaje de grasa más alto en un 7,763 %, debido a las características ambientales y fisiológicas de los rizomas del Putumayo, se puede pensar que el hecho de que sean provenientes, de una región poco húmeda, con temperaturas elevadas y una menor altura sobre el nivel del mar, estos parámetros no alteren la composición química del rizoma, como si lo podrían hacer los parámetros presentes en la región del Quindío [48], ya que el elevado porcentaje de humedad hace que los rizomas sean propensos a daños por microorganismos, de igual manera su vida útil sea corta en estado fresco (menor a una semana).

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de La harina deCúrcuma

W	%GBS	%G±S	% CV	wC(BSD)	%C(BSD)	%C(BS)	% C± S	%CV	W	% H
50 g	7.838	7.814± 0.18	2.3	0.389	0.844	0.778	0.784± 0.006	0.76	5.001 g	78.6
50 g	7.978			0.392	0.852	0.784			5.001 g	78.6
50 g	7.625			0.395	0.855	0.790			5.001 g	78.6

W: peso muestra en gramos, % GBS: porcentaje de grasa base seca, %G±S: porcentaje de grasa ± desviación estándar, % CV: porcentaje de coeficiente de variación, wC(BSD): peso curcuminoides en base seca desengrasada, %C(BSD): porcentaje de curcuminoides en base seca desengrasada, %C(BS): porcentaje de curcuminoides en base seca, %C± S: porcentaje de curcuminoides ± desviación estándar, W: peso de muestra para determinación de humedad, H: humedad.

10.2 Extracción de curcuminoides

El extracto etanólico de los curcuminoides de color rojo-naranja y olor herbal intenso, se llevó a sequedad a temperatura ambiente, obteniendo el 0.784 % en peso de cristales, cuyo análisis por CCD con la mezcla cloroformo: metanol (19:1), reveló con lámpara UV y directamente, tres manchas de color amarillo con Rf's 0.61, 0.45 y 0.28 (Figura 21) característicos de C, DMC y BDMC [66 - 68]. La curcumina presenta mayor Rf (menor polaridad), probablemente por la formación intramolecular de puentes o enlaces de hidrógeno que comprometen a los grupos hidroxilos fenólicos, los cuales obviamente no se encuentran en BDMC.

10.2.1 Separación y recristalización de Curcumina.

La separación por Cromatografía en columna se realizó con la mezcla eluyente cloroformo-metanol (99:1), modificando levemente la concentración reportada por Rios y colaboradores [48]. Se recogieron 16 fracciones de 10 mL cada una; en las primeras, de la 9 a la 13, se evidenció una sola mancha (menos polar), de acuerdo a la literatura, acorde con la presencia de C (Figura 21) y de la fracción 14 a la 16 se observó dos manchas, correspondientes a C y DMC.



Figura 21. Separación de curcuminoides por CCR

Las fracciones recolectadas cristalizaron en forma de agujas amarillo brillante (Figura 22 a y b). Mediante recristalización con metanol: cloroformo (5:2) se obtuvo cristales con $P_f = 183.4 - 188.6$, consistente con el reportado en la literatura de 183°C [66].

Adicionalmente, se confirmó la presencia de cúrcuma mediante análisis espectroscópico por (IR-TF) y (UV-Vis).

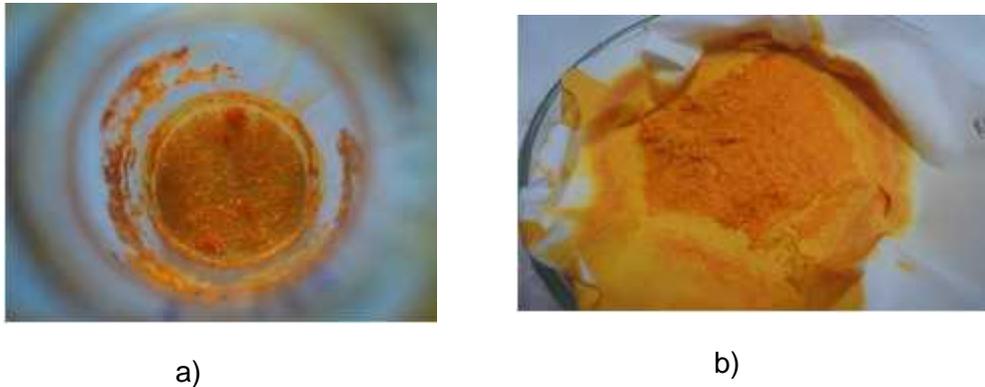


Figura 22. a) cristalización de curcumina obtenida por CCR, b) recrystalización de curcumina.

Los curcuminoides absorben a longitudes de onda muy cercanas, de 429 nm, 424 nm y 419 nm (C, DMC y BDMC respectivamente), con altas posibilidades de solapamiento de las bandas [66]. En la Figura 23 se muestra el espectro UV-Vis de la C, obtenida mediante recrystalización en etanol, revelando una absorción máxima a $\lambda = 426$ nm, muy cercana al valor reportado.

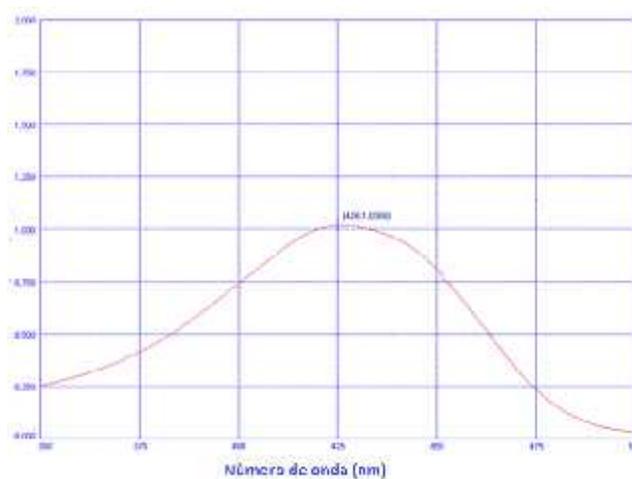


Figura 23. Espectro UV- vis de la C recrystalizada

Para efectos de comparación se presenta a continuación los espectros IR de la mezcla de los curcuminoides y de la curcumina recristalizada. El espectro IR de la mezcla de curcuminoides C, DMC y BDMC presentado en la Figura 24 exhibe una banda a 3425.06 cm^{-1} , que corresponde a las vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico del enlace O-H de los grupos hidroxilos fenólicos. Las bandas con absorción por encima de 3000 cm^{-1} , se deben a los C-H aromáticos y otras, un poco más intensas a 2937.95 cm^{-1} se deben al estiramiento de los enlaces H-C de los metilos de los grupos metoxilos, presentes en C y DMC. Una banda intensa y angosta a 1628.19 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=O y a 1512.15 cm^{-1} está la banda de la vibración C=C.

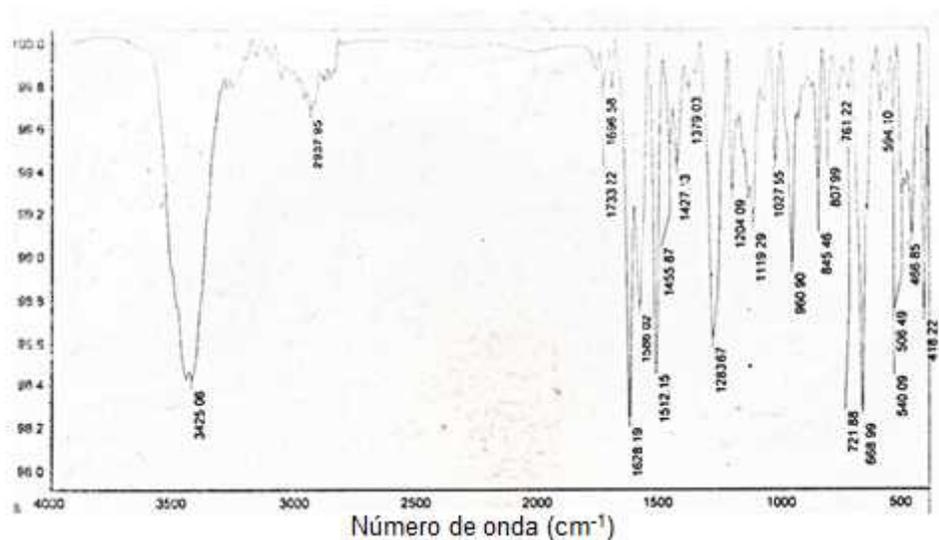


Figura 24. Espectro IR de la mezcla de curcuminoides

En la Figura 25 se observa el espectro IR de la curcumina recristalizada, el cual es consistente con el reportado en la literatura. A continuación se describen las absorciones respectivas: la banda a 3512.68 cm^{-1} corresponde a la vibración O-H fenólica y la de 2935.94 cm^{-1} se debe al estiramiento C-H de los grupos metilos. La señal larga y delgada a 1628.01 cm^{-1} , corresponde al estiramiento del grupo C=O, desplazado a menor número de onda por la conjugación con los anillos aromáticos y el enlace de hidrógeno

intramolecular, entre el grupo carbonilo y el hidrógeno del grupo hidroxilo enólico contiguo. A 1509.72 cm^{-1} se encuentra la señal correspondiente a la vibración C=C y con intensidad media se observa la señal a 1206.27 cm^{-1} , proveniente de la absorción del enlace C-O. Una señal débil a 962.11 cm^{-1} se debe a la vibración C=C fuera del plano.

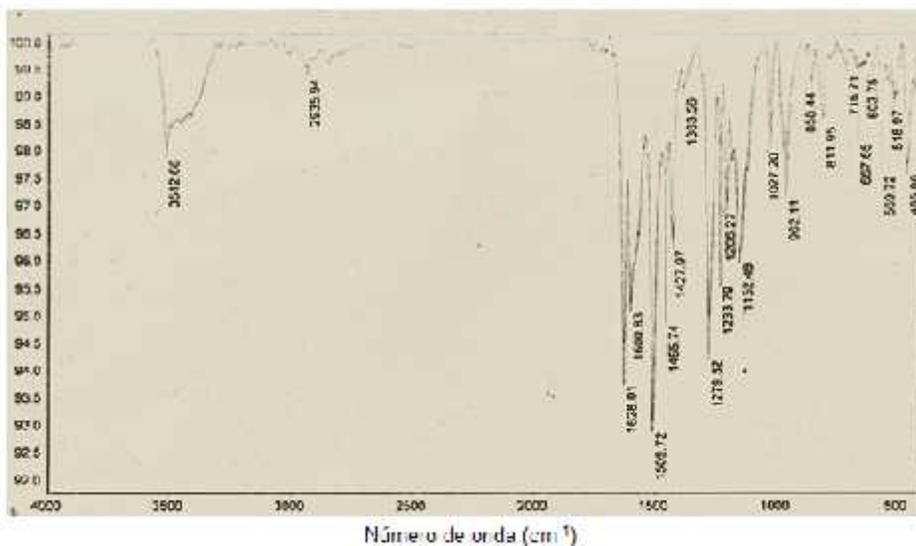


Figura 25. Espectro IR de la curcumina

10.3 ANÁLISIS DEL ACEITE

A continuación se reportan los resultados del índice de peróxidos, índice de acidez, de dienos y trienos conjugados y de estabilidad oxidativa por el método Rancimat, del aceite de Sl.

10.3.1 Determinación del índice de peróxidos (IP)

El índice de peróxidos es un parámetro químico que permite ver la estabilidad oxidativa de un aceite en su estado inicial de deterioro; según el CODEX STAN 210-1999, el nivel máximo de IP permitido a temperatura ambiente, para este tipo de aceites es de 15 meq de Oxígeno activo / Kg aceite; bajo calentamiento, dicho IP es mayor.

Los datos de las titulaciones que se llevaron a cabo en la determinación por triplicado del IP, para las muestras en cada periodo de almacenamiento escogido, se exhiben en la

Tabla 7 para el aceite de SI reciente y aceite de SI del 2010 y en la Tabla 8, para el aceite de SI reciente con TBHQ y curcuminoides.

Tabla 7. Índice de peróxidos en aceite de SI reciente y aceite del 2010

Día	A (blanco)	Aceite de SI reciente		Aceite de SI del 2010	
		B	IP	B	IP
0	0,1	0,58	240	0,64	270
0		0,58	240	0,64	270
0		0,56	230	0,64	270
1	0,1	0,64	270	0,64	270
1		0,64	270	0,62	260
1		0,62	260	0,64	270
2	0,1	0,66	280	0,64	270
2		0,66	280	0,64	270
2		0,66	280	0,64	270
3	0,1	0,66	280	0,64	270
3		0,66	280	0,64	270
3		0,64	270	0,64	270
5	0,1	0,64	270	0,64	270
5		0,64	270	0,64	270
5		0,62	260	0,64	270
10	0,1	0,66	280	0,64	270
10		0,66	288	0,64	270
10		0,62	260	0,64	270
15	0,1	0,66	280	0,64	270
15		0,66	280	0,64	270
15		0,66	280	0,64	270
20	0,1	0,66	280	0,64	270
20		0,66	280	0,64	270
20		0,66	280	0,66	270
30	0,1	0,68	290	0,64	270
30		0,68	290	0,64	270
30		0,68	290	0,64	270
40	0,1	0,72	310	0,64	270
40		0,72	310	0,64	270
40		0,72	310	0,64	270

A: volumen en mL, de Na₂S₂O₃ 0,1N usado para reducir el blanco de cloroformo ácido acético (1:3), **B:** volumen en mL de Na₂S₂O₃ 0,1N usado para determinar el IP (índice de peróxidos en meq. de O activo/Kg aceite) del aceite reciente bajo calentamiento y del 2010 a temperatura ambiente.

Al comparar los resultados del IP de la Tabla 7, se puede inferir una equivalencia del aceite del 2010 con el del aceite reciente entre 1 y cinco días de calentamiento. De igual manera se destaca el valor constante del IP del aceite del 2010, el cual se utilizó como control positivo de la oxidación; mientras que los IP del aceite reciente tuvieron fluctuaciones características del comportamiento de estas especies reactivas.

Tabla 8. ÍPde aceite de SI reciente con TBHQ y con curcuminoides

		Aceite de SI con TBHQ		Aceite de SI con curcuminoides	
Día	A	B	IP	B	IP
0		0,56	230	0,58	240
0	0,1	0,56	230	0,58	240
0		0,56	230	0,58	240
1		0,58	240	0,62	260
1	0,1	0,56	230	0,62	260
1		0,56	230	0,60	250
2		0,62	260	0,62	260
2	0,1	0,62	260	0,62	260
2		0,62	260	0,62	260
3		0,62	260	0,62	260
3	0,1	0,62	260	0,62	260
3		0,60	250	0,62	260
5		0,60	250	0,62	260
5	0,1	0,60	250	0,62	260
5		0,60	250	0,62	260
10		0,64	270	0,62	260
10	0,1	0,62	260	0,62	260
10		0,62	260	0,62	260
15		0,62	260	0,62	260
15	0,1	0,62	260	0,64	270
15		0,62	260	0,62	260
20		0,64	270	0,64	270
20	0,1	0,64	270	0,64	270
20		0,66	280	0,66	280
30		0,64	270	0,64	270
30	0,1	0,64	270	0,64	270
30		0,64	270	0,64	270
40		0,68	290	0,68	290
40	0,1	0,68	290	0,68	290
40		0,68	290	0,68	290

A: volumen en mL, de Na₂S₂O₃ 0,1 N usado para reducir el blanco de cloroformo ácido acético (1:3),

B: volumen en mL de Na₂S₂O₃ 0,1 N usado para determinar el IP (índice de peróxidos en meq. de O activo/Kg aceite) del aceite reciente bajo calentamiento con TBHQ y con curcuminoides.

Al comparar los resultados obtenidos en la prueba de horno, registrados en la Tabla 7 y en la Tabla 8, se observa que las muestras de aceite reciente sin antioxidante al día 40, presentan un IP de 310 meq. de O activo/Kg aceite, mayor que el evaluado con TBHQ y con curcuminoides, para ambos casos de 290. Al realizar un análisis preliminar del comportamiento del IP en las muestras de aceite mencionadas, el aceite con TBHQ presenta una mayor estabilidad oxidativa, bajo el efecto del calor, seguido del aceite con

curcuminoides, hecho que puede contribuir al efecto antioxidante de ellos, inhibiendo el proceso de oxidación de los ácidos grasos, por lo que se daría menor consumo de oxígeno al compararlos con el aceite de SI sin antioxidantes. Un análisis más confiable de las variaciones del IP fue realizado con el programa estadístico spss, teniendo en cuenta los días de almacenamiento, como se muestra a continuación.

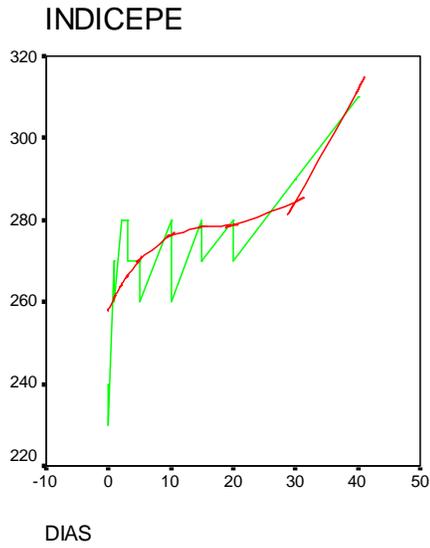
En primer lugar se asume que los resultados obtenidos en el índice de peróxidos para las muestras de aceite tienen distribución no normal, debido a que se rechaza la hipótesis nula H_0 , en virtud a que la prueba de normalidad Shapiro Wilk exhibida en la Tabla 16, anexo 1, produjo un p-valor de 0.000 inferior a 0.05.

Al realizar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para las muestras de aceite de SI (Tabla 17, anexo 1), se obtuvo un p-valor de 0.000, indicando que hay diferencias significativas en los valores del índice de peróxidos para todas las muestras de aceite reciente examinadas en cada intervalo de degradación, lo cual se debe probablemente a la presencia de los antioxidantes que consiguieron afectar positivamente la estabilidad del aceite, retardando el proceso de oxidación a pesar del calentamiento.

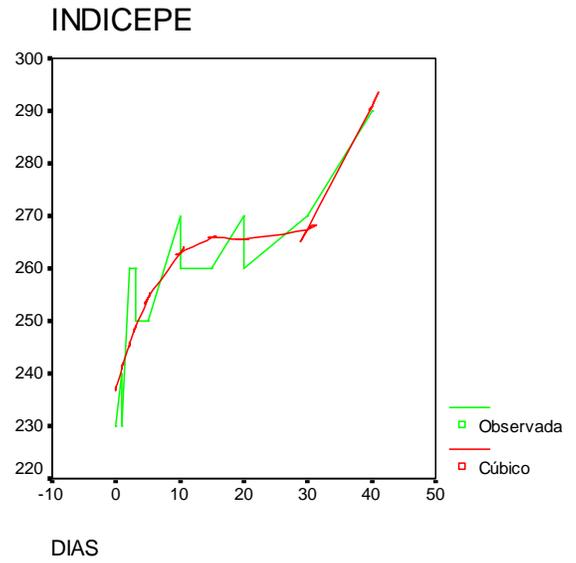
En la Tabla 18, anexo 1, se puede ver la estabilidad oxidativa en el cambio de la variable dependiente en este caso el índice de peróxidos a lo largo del periodo de almacenamiento, donde mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un p-valor de 0,000 <0,05, se afirma que hay una diferencia significativa del cambio en la variación del índice de peróxidos conforme pasan los días, lo cual es confirmado con la correlación de Spearman arrojando un p-valor de 0,563 como se muestra en la (Tabla 19, anexo 1), entre los días y el índice de peróxidos, lo cual indica que hay una correlación positiva directa, es decir en el transcurso de los días se ve un aumento en la variación del IP.

También se aplicó prueba no paramétrica U de Man-Whitney para determinar cuales aceites difieren entre si, obteniéndose un p-valor de 0.000 para todas las comparaciones (Tabla 20, anexo 1), excepto entre el aceite con curcuminoides y el aceite con TBHQ cuyo p-valor de 0.617 indica que no hay una diferencia significativa (Tabla 21, anexo1). En la Figura 26, se muestran los graficos 1a, 1b, 1c y 1d, con las apreciaciones estadísticas de

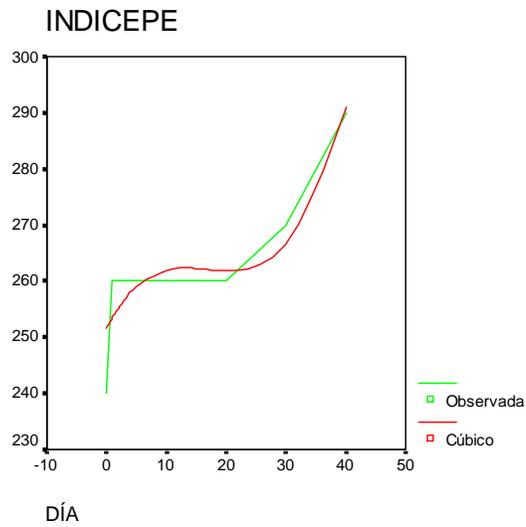
cada aceite, utilizados con la finalidad de definir el modelo que se ajuste más a la variación del IP respectivo, durante el periodo de almacenamiento.



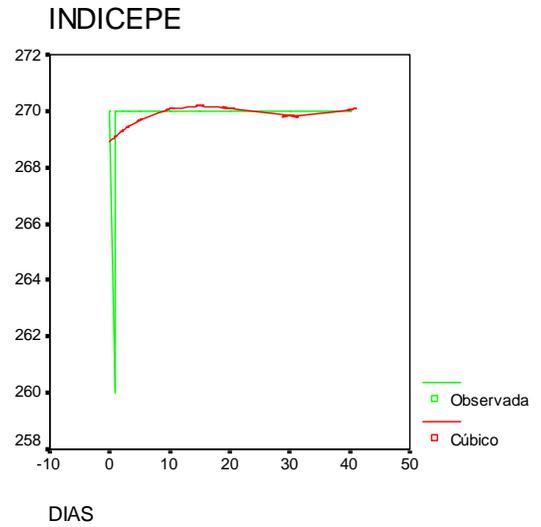
a)



b)



c)



d)

Figura 26. Estimación curvilínea de: a) aceite de SI puro, b) aceite de SI con TBHQ c) aceite de SI con curcuminoides d) aceite de SI del 2010.

En la estimación curvilínea, se determinó que la curva de mejor ajuste en la variación de los resultados obtenidos para todas las muestras en el transcurso de los días, corresponde a una relación cubica ajustándose en un porcentaje mayor a la variación del índice de peróxidos en las muestras, en un 65% para el aceite puro, 80.6% aceite con TBHQ, 77.1% aceite con curcuminoides y 5,7% para el aceite del 2010. Dichos porcentajes son mayores que cuando se asume el comportamiento de los datos a otras relaciones como la lineal, logarítmica y exponencial.

Como se nota en las gráficas 1a, 1b y 1c durante el 0 – 10 día , se presenta un bajo porcentaje en el índice de peróxidos, donde ocurre la oxidación inicial que por lo general es lenta y a una velocidad relativamente uniforme (Inducción), indicando una alta capacidad antioxidante en el caso de el aciete con TBHQ y curcuminoides, y muy probablemente en el aceite puro debido a la presencia de α y γ – tocoferol antioxidantes más activos en los lípidos de los alimentos [69]. la presencia de tocoferoles en el aceite de sachá inchi es de vital importancia, debido a que su actividad antioxidante brinda estabilidad al mismo, de lo contrario, se oxidaría fácilmente pues un aceite con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados es más susceptible a la rancidez oxidativa [70]

Así mismo entre el 10 – 20 día, se observa una menor estabilidad oxidativa en el aceite puro en comparación al aceite con THBQ y curcuminoides por un periodo más largo de almacenamiento entre el 10 – 30 día, retrasando así la velocidad de oxidación (propagación). Del 30 – 40 día se nota un aumento de dicha oxidación, sobrepasando el porcentaje de oxidación incluso del aceite del 2010 que no fue sometido al horno, perdiéndose por completo la capacidad antioxidante, probablemente por pérdidas considerables de vitamina E que podrían causar dicha desestabilización, siendo el proceso térmico una causa de esto, al existir un mayor periodo de tiempo en contacto con el calor y el oxígeno [71].

En cuanto al porcentaje de peróxidos para el aceite puro 240 – 310 meq O_2 / kg de aceite, se nota un aumento considerable a lo reportado por [26] [69], de 5,2 – 5,6 meq O_2 / kg de aceite recientemente extraído, es aquí dónde se tiene en cuenta que se partió de un aceite que llevaba un periodo de 1 año de extraído, por lo que ya ha sufrido un tipo de deterioro oxidativo por la edad. Más considerable para el aceite del 2010 el cual presenta

porcentajes de oxidación entre 270 meq O₂ / kg de aceite, sufriendo procesos de rancidez oxidativa generando un alto grado de deterioro.

10.3.2 Determinación del índice de acidez (IA)

El índice de acidez, es un parámetro químico que muestra el nivel de ácidos grasos libres que podrían incorporarse en procesos de rancidez oxidativa, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9 para el aceite de SI reciente y aceite de SI del 2010 y en la Tabla 10 para el aceite de SI reciente con TBHQ y curcuminoides.

Tabla 9. Índice de acidez aceite de SI reciente y aceite del 2010

Día	Aceite de SI reciente		Aceite de SI del 2010		
	A	B	IA	B	IA
0		0,86	2,31	1,02	2,80
0	0,18	0,86	2,31	1,02	2,80
0		0,84	2,24	1,02	2,80
1		0,92	2,51	1,02	2,80
1	0,18	0,92	2,51	1,02	2,80
1		0,90	2,44	1,00	2,80
2		1,02	2,85	1,04	2,91
2	0,18	1,02	2,85	1,06	2,98
2		1,02	2,85	1,04	2,91
3		1,04	2,91	1,04	2,91
3	0,18	1,04	2,91	1,04	2,91
3		1,04	2,91	1,04	2,91
5		1,04	2,91	1,06	2,98
5	0,18	1,04	2,91	1,04	2,91
5		1,04	2,91	1,06	2,98
10		1,00	2,57	1,04	2,44
10	0,18	1,00	2,57	1,04	2,44
10		1,00	2,57	1,02	2,51
15		1,04	2,91	1,04	2,44
15	0,81	1,04	2,91	1,04	2,44
15		1,04	2,91	1,04	2,44
20		0,98	2,71	1,02	2,37
20	0,18	0,98	2,71	1,02	2,37
20		0,98	2,71	1,04	2,37
30		1,00	2,57	1,06	2,98
30	0,18	1,00	2,57	1,06	2,98
30		0,98	2,71	1,08	3,05
40		1,02	2,85	1,06	2,98
40	0,18	1,02	2,85	1,06	2,98
40		1,02	2,85	1,06	2,98

A: volumen en mL, de KOH 0,04 N usado para determinar los ácidos grasos libres en el blanco de etanol: éter etílico (1:1 V/V), B: volumen en mL de KOH 0,04 N usado para determinar el IA (índice de acidez en mg de KOH / g aceite) del aceite reciente bajo calentamiento y del 2010 a temperatura ambiente.

Tabla 10. Índice acidez aceite de SI con TBHQ y con curcuminoides

Día	Aceite de SI con TBHQ		Aceite de SI con curcuminoides		
	A	B	IA	B	IA
0	0,18	0,8	2,10	0,8	2,10
0		0,8	2,10	0,8	2,10
0		0,8	2,10	0,8	2,10
1	0,18	0,88	2,37	0,88	2,37
1		0,86	2,31	0,88	2,37
1		0,86	2,31	0,90	2,44
2	0,18	0,94	2,57	0,90	2,44
2		0,94	2,57	0,86	2,31
2		0,94	2,57	0,86	2,31
3	0,18	1,02	2,85	0,92	2,51
3		1,00	2,80	0,90	2,44
3		1,00	2,80	0,92	2,51
5	0,18	0,94	2,57	0,86	2,31
5		0,94	2,57	0,88	2,37
5		0,94	2,57	0,88	2,37
10	0,18	0,96	2,64	0,90	2,44
10		0,94	2,57	0,90	2,44
10		0,96	2,64	0,92	2,51
15	0,18	1,02	2,85	0,94	2,57
15		1,02	2,85	0,94	2,57
15		1,04	2,91	0,94	2,57
20	0,18	0,96	2,64	0,88	2,37
20		0,96	2,64	0,88	2,37
20		0,96	2,64	0,88	2,37
30	0,18	0,98	2,71	0,94	2,57
30		0,98	2,71	0,94	2,57
30		0,98	2,71	0,94	2,57
40	0,18	1,00	2,80	0,98	2,71
40		1,00	2,80	0,98	2,71
40		1,00	2,80	0,98	2,71

A: volumen en mL, de KOH 0,04 N usado para determinar los ácidos grasos libres en el blanco de etanol: éter etílico (1:1 V/V), B: volumen en mL de KOH 0,04 N usado para determinar el IA (índice de acidez en mg de KOH / g aceite) del aceite reciente bajo calentamiento con TBHQ y con curcuminoides..

El índice de acidez representa la cantidad de ácidos libres en la grasa, aumenta con el aumento de estos. Es un factor de mala calidad que indica una hidrólisis previa, rompimiento del enlace éster en el glicerol, por mal almacenamiento de las materias primas y acción de las lipasas, o por calor, humedad entre otros. Sin embargo, llega un momento en que estos ácidos libres comienzan a oxidarse, generando otros compuestos y disminuyendo el valor de este índice [70].

De los resultados obtenidos para la determinación del IA, se muestra que el aceite con curcuminoides, se dio una menor liberación de ácidos grasos al medio, reportando un valor de 2,10 – 2,71 mg KOH/ g de aceite, evitando que se genere la hidrólisis del glicerol, mostrando la actividad antioxidante de los curcuminoides adicionados en la disminución del IA en el transcurso de los días de almacenamiento en el horno, comparado con las otras dos muestras con un IA de 2,10 – 2,80 para el aceite con TBHQ y por último el aceite reciente sin antioxidantes con 2,31 – 2,85 mg KOH/ g de aceite, donde se está probablemente generando un mayor rompimiento del enlace del glicerol, mayor liberación de ácidos grasos que permite que dicho índice aumente, pero sin embargo estos valores no exceden lo reportado en el CODEX de 4,0 mg KOH/ g de aceite, hecho que indica que hasta el día 40 el aceite no estaría presentando sabor inaceptable, pero que si se deja mucho más tiempo probablemente la acción del calor contribuya a que esto pase, afectando sus propiedades organolépticas, haciéndolo inaceptable para el consumo humano.

Debido a que el análisis del IA como el de los otros parámetros químicos medidos en el aceite, varían con el tiempo, es necesario que los datos sean sometidos a un estudio estadístico que permita verificar y elucidar con más claridad el comportamiento del IA de las muestras de aceite en los 40 días. Por lo que se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk la cual arrojó un p-valor de 0,000, lo que permitió rechazar la H_0 de normalidad de los datos, por lo cual se aplicó un tratamiento no paramétrico realizando las pruebas de Kruskal-Wallis comparación del aceite para más de 2 parejas de datos (Tabla 22, anexo 2) con un p-valor de 0,000 indicando que hay una diferencia significativa en la variación del IA en el aceite y para el periodo de almacenamiento (Tabla 23, anexo 2) un p-valor 0,000 mostrando igualmente un nivel de significancia diferente. Se realizó también la prueba no paramétrica U de Man-Whitney que permite hacer una comparación entre cada uno de los aceites mostrando que son significativamente diferentes con un p-valor de 0,000- 0,012 (Tabla 24, anexo 2).

Para ver la variación del IA se realizó la estimación curvilínea como se muestra en la Figura 27, para encontrar la curva de mejor ajuste en cuanto al periodo de almacenamiento en el horno.

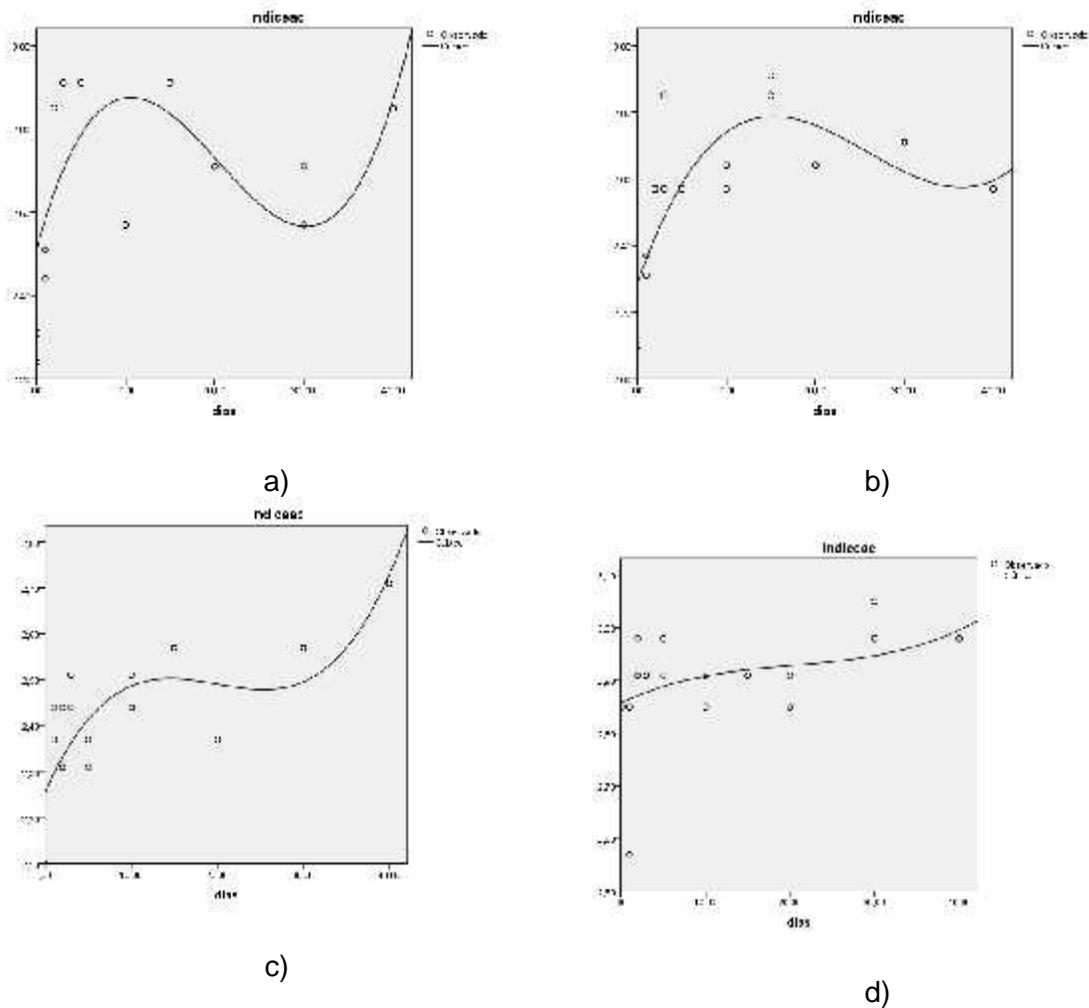


Figura 27. Estimación curvilinea de: a) aceite de SI reciente sin antioxidantes, b) aceite de SI con TBHQ c) aceite de SI con curcuminoides d) aceite de SI del 2010.

Se observa que hay una diferencia significativa en cuanto al comportamiento del día cero (0) que fue tomado como blanco y el día 40 que es el último día de la prueba de horno, donde se nota un aumento en el IA para el aceite de SI reciente sin antioxidantes, mucho mayor que para el aceite con antioxidantes, pudiendo provenir de una reacción hidrolítica por parte de los ácidos grasos lo que se corrobora con la prueba U de Man-Withney mencionada anteriormente. Podemos ver así mismo de una manera más clara el efecto que tiene la adición de antioxidantes al aceite disminuyendo el IA representado por un diagrama de cajas, de las medianas obtenidas representativas estadísticamente al no ser

paramétricas para cada muestra de aceite como se muestra en la Figura 26, evidenciándose un mayor IA en la mediana para el aceite reciente sin antioxidantes, comparado con los aceites que han sido fortalecidos con antioxidantes, destacándose entre estos el aceite de SI con curcuminoides al presentar un IA con una mediana más baja de 2,46 ppm y un periodo de estabilidad mayor comprendido entre el 10 – 30 día del periodo de almacenamiento. Aun presentando niveles bajos de este índice, valores que no superan el 1% que es el límite permitido para aceites vírgenes [71], por lo que podría deberse a una subestimación del IA debido al reacomodo de los ácidos grasos impidiendo ser medidos como ácidos grasos libres.

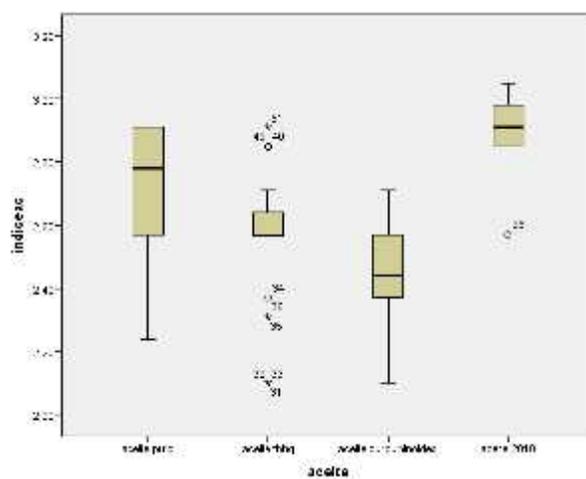


Figura 28. Diagrama de cajas de la mediana del IA para los aceites

10.3.3 Dienes y trienos conjugados

10.3.3.1 Método de cuantificación

Los resultados de la curva patrón de 2,6-dimetil-2,4-octatrieno; empleado como patrón, para la cuantificación de dienos y trienos conjugados en el aceite de SI, se muestran en la Tabla 18, de las cuales se halló el promedio de cada día presentando un coeficiente de variación <5% junto con esto se realizó la prueba estadística de Coeficiente de Regresión, Coeficiente de Determinación y Coeficiente de Determinación Ajustado, obteniendo como resultado que el ajuste del modelo es bueno, ya que los valores del coeficiente de determinación (R^2) son cercanos a 1 y en la gráfica 1 de las curvas se puede apreciar un

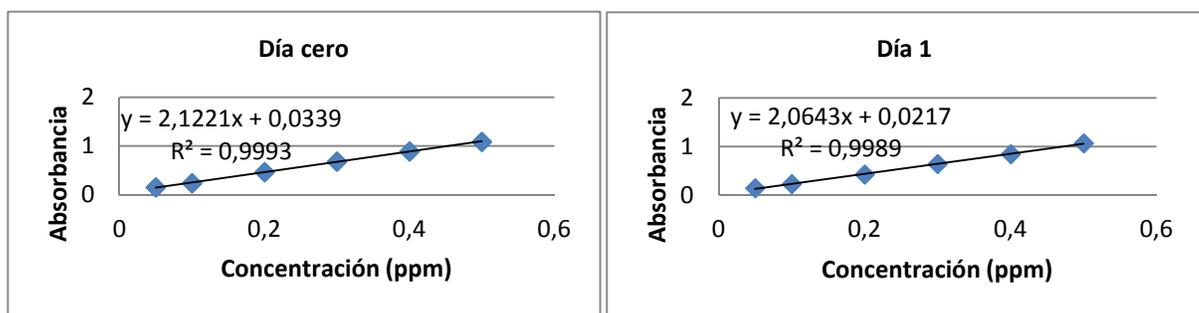
buen coeficiente de correlación R^2 indicando que los puntos experimentales están sobre una recta con pendiente positiva, es decir que existe una buena correlación entre las variables de la curva “absorbancia y concentración”, lo que permitió calcular la concentración de dienos y trienos conjugados en el aceite.

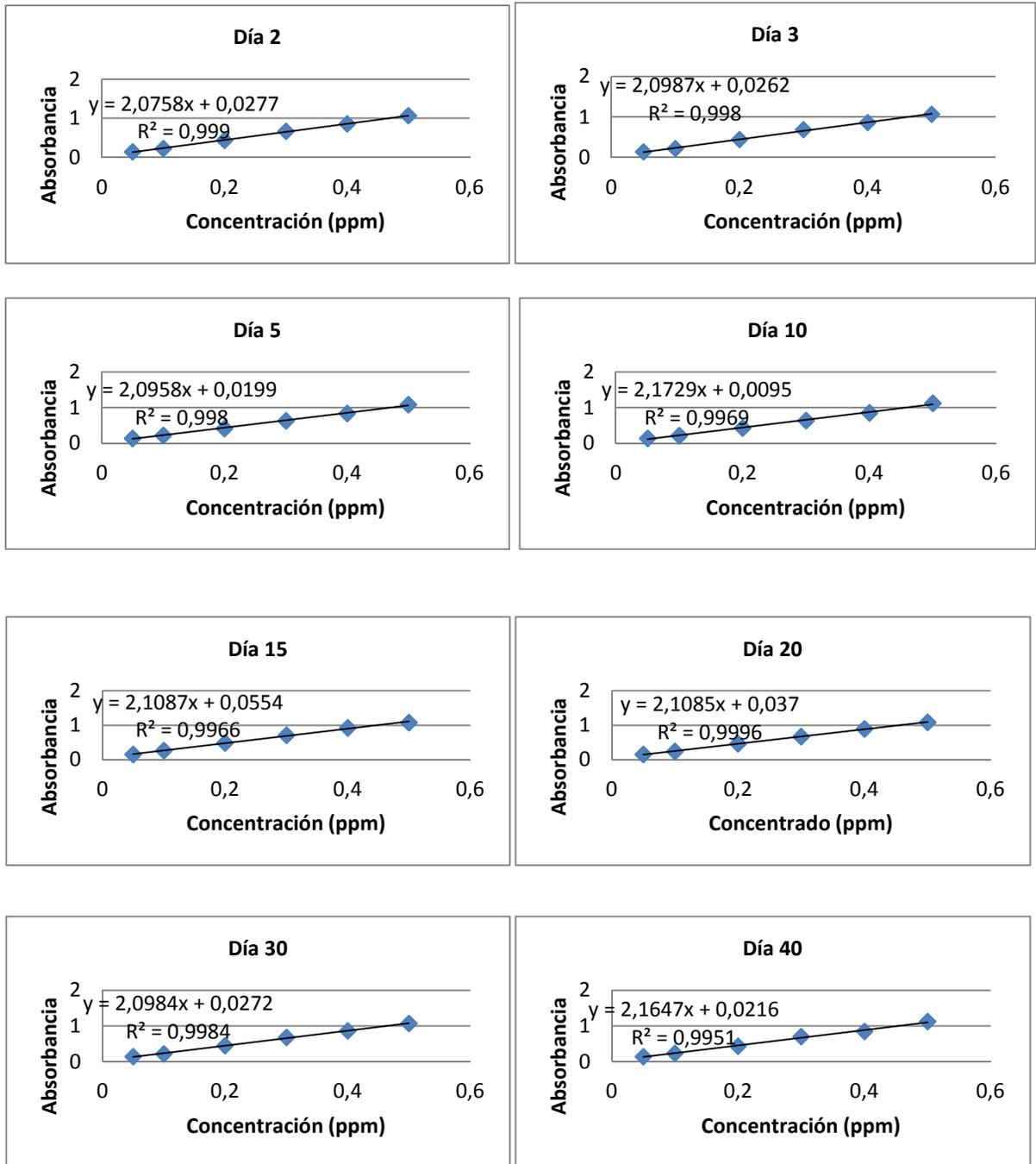
Tabla 11. Estadístico de la curva de calibración para el intervalo de linealidad de dienos y trienos conjugados.

C (ppm) curva día (0)	Promedio			Promedio Abs.	CV	STD
	Abs. Curva 1	Abs. Curva 2	Abs. Curva 3			
0,05	0,146	0,144	0,154	0,148	0,034	0,005
0,1	0,237	0,220	0,234	0,230	0,039	0,009
0,2	0,469	0,451	0,467	0,462	0,019	0,009
0,3	0,667	0,668	0,694	0,676	0,022	0,015
0,4	0,881	0,883	0,907	0,890	0,016	0,014
0,5	1,078	1,080	1,103	1,087	0,013	0,014
día (1)						
0,05	0,141	0,143	0,141	0,142	0,007	0,001
0,1	0,223	0,223	0,225	0,223	0,004	0,001
0,2	0,415	0,424	0,419	0,419	0,009	0,004
0,3	0,634	0,642	0,641	0,639	0,006	0,004
0,4	0,840	0,845	0,840	0,842	0,004	0,003
0,5	1,061	1,072	1,062	1,065	0,006	0,006
día (2)						
0,05	0,135	0,142	0,143	0,140	0,028	0,004
0,1	0,217	0,222	0,230	0,223	0,027	0,006
0,2	0,444	0,416	0,450	0,436	0,041	0,018
0,3	0,685	0,635	0,688	0,669	0,045	0,030
0,4	0,861	0,840	0,858	0,853	0,013	0,011
0,5	1,060	1,060	1,070	1,063	0,006	0,006
día (3)						
0,05	0,132	0,135	0,140	0,136	0,029	0,004
0,1	0,217	0,217	0,220	0,218	0,009	0,002
0,2	0,450	0,440	0,444	0,444	0,011	0,005
0,3	0,690	0,680	0,685	0,685	0,007	0,005
0,4	0,867	0,861	0,861	0,863	0,003	0,003
0,5	1,071	1,060	1,060	1,064	0,006	0,006
día (5)						
C(ppm) curva	Abs. Curva 1	Abs. Curva 2	Abs. Curva 3	Abs.		
0,05	0,143	0,141	0,141	0,142	0,007	0,001
0,1	0,235	0,223	0,236	0,231	0,030	0,007
0,2	0,430	0,414	0,424	0,423	0,019	0,008
0,3	0,645	0,630	0,638	0,638	0,011	0,007
0,4	0,850	0,840	0,843	0,844	0,006	0,005
0,5	1,140	1,060	1,071	1,090	0,039	0,043

C (ppm) curva día (10)	Promedio			Promedio Abs.	CV	STD
	Abs. Curva 1	Abs. Curva 2	Abs. Curva 3			
0,05	0,135	0,142	0,141	0,139	0,028	0,004
0,1	0,217	0,231	0,220	0,222	0,031	0,007
0,2	0,436	0,446	0,434	0,438	0,014	0,006
0,3	0,650	0,648	0,636	0,645	0,011	0,007
0,4	0,860	0,861	0,844	0,855	0,011	0,009
0,5	1,062	1,074	1,062	1,126	0,006	0,007
día (15)						
0,05	0,154	0,143	0,143	0,147	0,041	0,006
0,1	0,254	0,265	0,267	0,262	0,026	0,007
0,2	0,467	0,488	0,488	0,481	0,025	0,012
0,3	0,695	0,715	0,716	0,710	0,017	0,012
0,4	0,906	0,931	0,932	0,923	0,016	0,015
0,5	1,103	1,068	1,062	1,078	0,020	0,022
día (20)						
0,05	0,146	0,144	0,152	0,147	0,030	0,004
0,1	0,240	0,230	0,245	0,238	0,030	0,007
0,2	0,467	0,451	0,470	0,463	0,022	0,010
0,3	0,667	0,668	0,671	0,668	0,003	0,002
0,4	0,880	0,883	0,905	0,889	0,016	0,014
0,5	1,075	1,078	1,102	1,085	0,014	0,015
día (30)						
0,05	0,134	0,140	0,140	0,138	0,022	0,003
0,1	0,220	0,222	0,218	0,220	0,009	0,002
0,2	0,454	0,446	0,437	0,445	0,018	0,008
0,3	0,672	0,687	0,688	0,682	0,013	0,009
0,4	0,867	0,860	0,865	0,864	0,005	0,004
0,5	1,072	1,060	1,071	1,067	0,006	0,007
día (40)						
0,05	0,141	0,143	0,141	0,142	0,007	0,001
0,1	0,235	0,240	0,228	0,234	0,026	0,006
0,2	0,440	0,437	0,430	0,436	0,015	0,005
0,3	0,685	0,710	0,712	0,700	0,021	0,015
0,4	0,840	0,860	0,841	0,847	0,013	0,011
0,5	1,126	1,122	1,130	1,126	0,003	0,004

Gráfica 1. Curvas de calibración para la cuantificación de dienos y trienos en el aceite.





En la Tabla 12 se muestran la concentración de dienos conjugados (DC) y trienos conjugados (TC) por espectroscopia UV, para el aceite de SI reciente sin antioxidantes o aceite puro, en la Tabla 13 la concentración de DC y TC para el aceite con TBHQ , en la

Tabla 14 la concentración de DC y TC para el aceite con curcuminoides y en la Tabla 15 la concentración de DC y TC para el aceite del 2010.

Tabla 12. Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de Slreciente sin antioxidantes.

Día	Absorbancia (232nm)	Dienos conjugados (ppm)	R ²	Absorbancia (276nm)	Trienos conjugados (ppm)
0	0,261	105,55	0,9993	0,476	10,34
0	0,264	106,96		0,472	10,25
0	0,260	106,08		0,477	10,36
1	0,287	128,51	0,9989	0,476	11,00
1	0,280	125,12		0,478	11,05
1	0,280	125,12		0,475	10,97
2	0,429	220,00	0,999	0,548	12,50
2	0,433	220,10		0,546	12,53
2	0,430	220,12		0,550	12,48
3	0,375	200,00	0,998	0,543	12,50
3	0,373	200,00		0,540	12,41
3	0,375	200,00		0,549	12,46
5	0,436	200,00	0,998	0,645	14,50
5	0,439	200,08		0,630	14,34
5	0,440	200,14		0,629	14,53
10	0,378	170,00	0,9969	0,768	17,50
10	0,368	169,50		0,760	17,52
10	0,365	170,20		0,761	17,45
15	0,380	160,00	0,9996	0,909	19,00
15	0,382	160,30		0,880	19,02
15	0,390	160,00		0,886	19,12
20	0,408	190,00	0,9996	1,021	23,50
20	0,492	190,60		1,025	23,00
20	0,430	190,05		1,020	23,10
30	0,475	210,40	0,9984	1,048	25,00
30	0,496	210,00		1,062	25,06
30	0,451	210,00		1,070	25,10
40	0,519	230,00	0,9951	0,779	35,00
40	0,511	230,80		0,780	35,20
40	0,535	230,15		0,778	35,60

Tabla 13. Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI con TBHQ.

Día	Absorbancia (232nm)	Dienos conjugados (ppm)	R ²	Absorbancia (276nm)	Trienos conjugados (ppm)
0	0,260	105,08	0,9993	0,426	9,16
0	0,262	106,02		0,428	9,21
0	0,269	109,32		0,432	9,30
1	0,263	116,89	0,9989	0,494	11,44
1	0,265	117,86		0,489	11,32
1	0,260	115,44		0,490	11,34
2	0,429	150,00	0,999	0,540	12,50
2	0,433	150,80		0,545	12,44
2	0,430	150,00		0,546	12,48
3	0,287	130,00	0,998	0,533	12,00
3	0,290	130,60		0,530	12,01
3	0,304	140,00		0,545	12,10
5	0,411	190,00	0,998	0,637	14,50
5	0,423	190,08		0,623	14,38
5	0,434	189,70		0,629	14,50
10	0,392	180,00	0,9969	0,766	17,50
10	0,400	180,02		0,788	17,52
10	0,422	190,00		0,789	17,45
15	0,378	153,00	0,9996	0,896	19,00
15	0,374	151,17		0,890	18,48
15	0,362	145,68		0,886	19,00
20	0,402	170,00	0,9996	1,014	23,06
20	0,408	170,00		1,022	23,12
20	0,412	170,00		1,012	23,00
30	0,508	229,12	0,9984	1,076	25,00
30	0,496	223,40		1,052	25,06
30	0,468	210,06		1,044	25,12
40	0,440	193,28	0,9951	0,776	35,03
40	0,459	202,06		0,763	35,03
40	0,452	198,82		0,766	35,10

Tabla 14. Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI con curcuminoides.

Día	Absorbancia (232nm)	Dienos conjugados (ppm)	R ²	Absorbancia (276nm)	Trienos conjugados (ppm)
0	0,242	100,00	0,9993	0,470	10,00
0	0,255	101,10		0,470	10,00
0	0,250	100,80		0,468	10,06
1	0,245	110,00	0,9989	0,518	12,00
1	0,240	110,00		0,490	12,01
1	0,242	110,50		0,520	12,03
2	0,429	150,00	0,999	0,540	12,50
2	0,433	150,40		0,545	12,44
2	0,430	150,00		0,546	12,48
3	0,393	150,00	0,998	0,641	15,05
3	0,380	148,60		0,633	15,00
3	0,391	150,00		0,629	15,00
5	0,673	200,70	0,998	0,829	19,50
5	0,650	200,08		0,827	19,50
5	0,644	200,00		0,841	19,44
10	0,419	180,20	0,9969	0,829	19,08
10	0,399	178,90		0,827	19,00
10	0,415	180,00		0,841	19,21
15	0,422	170,17	0,9996	0,941	20,80
15	0,414	170,05		0,933	20,48
15	0,410	170,00		0,928	20,22
20	0,436	190,00	0,9996	1,054	23,80
20	0,455	190,70		1,032	23,50
20	0,444	190,00		1,030	23,41
30	0,439	200,10	0,9984	0,887	20,50
30	0,432	200,00		0,903	20,50
30	0,441	200,10		0,907	20,50
40	0,532	240,00	0,9951	0,708	32,03
40	0,550	240,50		0,712	32,10
40	0,538	240,30		0,715	32,20

Tabla 15. Concentración en (ppm) de dienos y trienos conjugados en aceite de SI del año 2010

Día	Absorbancia (232nm)	Dienos conjugados (ppm)	R ²	Absorbancia (276nm)	Trienos conjugados (ppm)
0	0,269	110,00	0,9993	0,515	11,26
0	0,274	110,10		0,523	11,33
0	0,270	110,00		0,520	11,38
1	0,261	115,92	0,9989	0,535	12,43
1	0,269	119,79		0,541	12,55
1	0,265	118,83		0,536	12,43
2	0,351	160,00	0,999	0,547	12,33
2	0,360	160,40		0,550	12,58
2	0,354	160,00		0,552	12,24
3	0,253	111,00	0,998	0,540	13,12
3	0,260	111,30		0,538	13,00
3	0,265	111,22		0,536	13,00
5	0,338	160,00	0,998	0,553	12,50
5	0,363	160,08		0,550	12,38
5	0,365	160,20		0,551	12,32
10	0,281	124,94	0,9969	0,553	12,50
10	0,288	128,17		0,550	12,38
10	0,295	131,40		0,553	12,50
15	0,267	102,20	0,9996	0,545	11,70
15	0,285	110,43		0,535	11,58
15	0,280	108,15		0,542	11,63
20	0,309	129,00	0,9996	0,562	12,62
20	0,312	130,42		0,567	12,71
20	0,338	142,75		0,560	12,56
30	0,401	178,13	0,9984	0,608	13,87
30	0,389	172,41		0,617	14,20
30	0,409	181,94		0,609	13,92
40	0,532	235,78	0,9951	0,420	18,00
40	0,550	234,85		0,422	18,05
40	0,538	238,55		0,425	18,12

10.3.4 Trienos conjugados

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce trienos conjugados, los cuales pueden generar un incremento en la absorción de la radiación ultravioleta a 276 nm, por lo tanto esta prueba se emplea para obtener información sobre la calidad de una grasa o aceite.

En La Tabla 12, se muestra que durante el periodo de almacenamiento en el horno para el aceite reciente sin antioxidantes en el día 40, se obtuvo una concentración de TC de 35,20 ppm, en la Tabla 13, se muestra que para el aceite con TBHQ al llegar el día 40 la concentración de TC es 35,03 ppm, presentando una estabilidad oxidativa para estas dos muestras del 1- 3 día, un periodo relativamente corto si lo comparamos con la estabilidad que le confiere al aceite, la adición de curcuminoides, del 10 – 30 día, obteniendo finalmente en el día 40 un valor en la concentración de TC de 20 ppm, reportado en la Tabla 14, más bajo que para las otras dos muestras de aceite.

La estadística, permitió obtener las siguientes estimaciones; al realizar la prueba de Shapiro -Wilk (Tabla 25, anexo 3), arrojó un p-valor de 0,000 rechazando la homogeneidad de los datos obtenidos por lo que todas las pruebas que se realizaron corresponden al orden no paramétrico, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, que permite la comparación del aceite para más de 2 parejas de datos (Tabla 26, anexo 3), arrojando un p-valor de 0,012 indicando que hay una diferencia significativa en la concentración de trienos conjugados en las muestras de aceite y para el periodo de almacenamiento (Tabla 27, anexo 3), se obtuvo un p-valor 0,000 mostrando igualmente un nivel de significancia diferente. Se realizó también la prueba no paramétrica U de Man-Withney que permite hacer una comparación entre cada uno de los aceites (Tabla 28, anexo 3) mostrando solo diferencia significativa con p-valor de 0,042 entre el aceite reciente sin antioxidantes y el aceite del 2010, y p-valor de 0,000 para el aceite con curcuminoides y el aceite del 2010, por lo que se explica que las muestras de aceite reciente sin antioxidante o puro, aceite con TBHQ, y aceite con curcuminoides tienen una tendencia similar en el comportamiento, en cuanto a la producción de trienos en el periodo de almacenamiento en el horno.

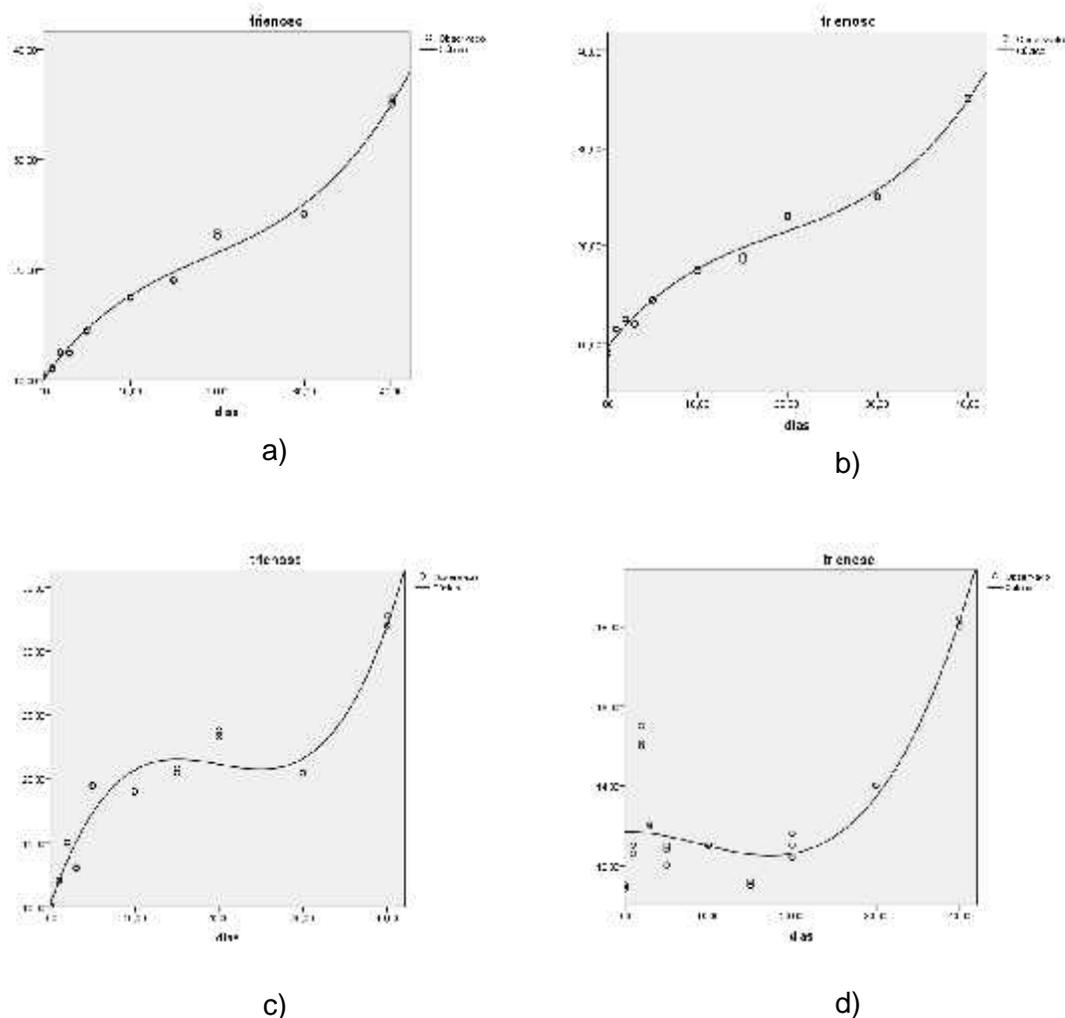


Figura 29. Estimación curvilínea de: a) aceite de SI reciente sin antioxidante, b) aceite de SI con TBHQ c) aceite de SI con curcuminoides d) aceite de SI del 2010.

En la estimación curvilínea Figura 29, se nota una mejor actividad antioxidante de los curcuminoides adicionados al aceite, disminuyendo la concentración de trienos conjugados del 1-10 día, del 10 - 30 día una mejor estabilidad en la oxidación de los ácidos grasos y un aumento progresivo en dicha concentración del 30 – 40 día, donde se pierde por completo la actividad antioxidante de los curcuminoides. En el aceite puro reciente y con TBHQ se presenta un avance muy similar en el transcurso de los días. Una alta capacidad antioxidante, en el caso del aceite puro reciente por la presencia de tocoferoles concediéndole a los ácidos grasos presentes, una disminución en la

concentración de trienos, hecho que indica un menor reordenación de los triples enlaces y por ende una menor oxidación durante el 1-10 día, pero pese a esto no es posible estimar un periodo de días donde se vea claro la estabilidad en la formación de trienos en estas muestras de aceite.

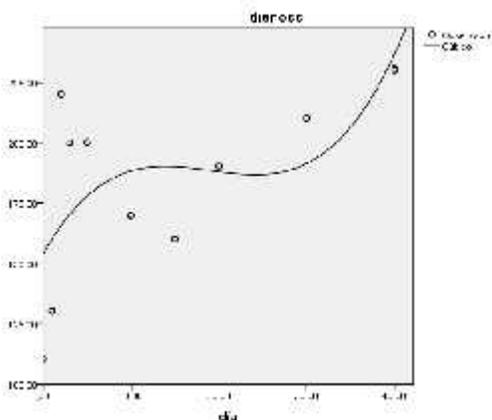
Para el aceite del 2010 se nota un aumento en la concentración de trienos conjugados en el transcurso de los días, indicando una continua oxidación, pero que al ser comparado con los aceites sometidos al horno presenta una concentración baja, por lo que se establece que efectivamente este tipo de aceite con ácidos grasos poliinsaturados así sean fortalecidos con antioxidantes son afectados por la temperatura acelerando el proceso de oxidación causando la rancidez oxidativa.

10.3.5 Dienos conjugados

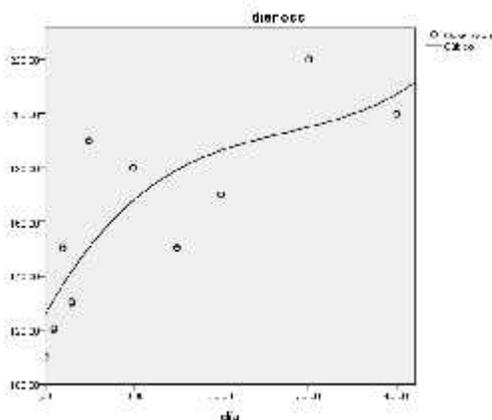
El contenido de dienos conjugados se usa para medir los productos primarios de peroxidación lipídica, formados durante las primeras etapas del proceso de oxidación, junto con los hidroperóxidos [72]. Debido a que en la molécula inicial del aceite poliinsaturado no conjugado, ocurre un reordenamiento de los dobles enlaces, adquiriendo la forma isomérica conjugada del ácido graso poliinsaturado que absorbe a una longitud de onda de 232 nm [73]. Este fenómeno se conoce como desplazamiento batocrómico y se debe a una transición electrónica en la capa de valencia ($\pi \rightarrow \pi^*$) que requiere menor energía que para compuestos no conjugados, lo que lleva al incremento de la longitud de onda [74].

En la etapa primaria de la peroxidación lipídica la formación de dienos e hidroperóxidos es mínima, en la cual la constante de reacción es baja; sin embargo, al finalizar esta etapa, la oxidación se acelera repentinamente y se acelera el aumento de la producción de éstos. Ocurre un tiempo de inducción, en el cual los valores de dienos conjugados se mantienen bajos, finalizando con un aumento marcado en la pendiente de la curva de producción [37]. Este tiempo es un indicador para conocer cuando comienza la rancidez oxidativa de grasas y aceites, disminuyendo la calidad organoléptica y nutricional y para evaluar el efecto antioxidante. En la Figura 30, se muestra la variación de dienos conjugados en el aceite a lo largo del periodo de almacenamiento en el horno.

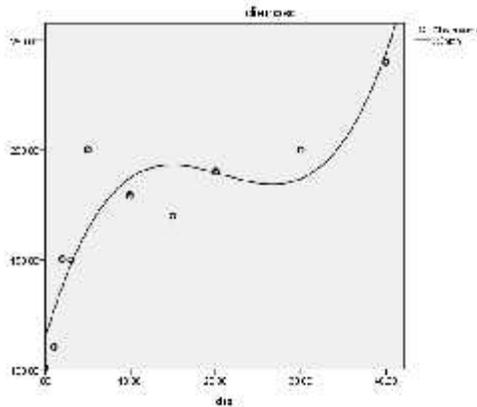
Al comparar los resultados obtenidos en la prueba de horno, registrados en la Tabla 12, 13 y 14 en la determinación de DC, para el aceite reciente, con TBHQ y el aceite con curcuminoides respectivamente, se observa que las muestras de aceite con curcuminoides, al día 40, presenta una concentración de 240,30 ppm, mayor que el evaluado con TBHQ de 198,82 ppm y para el aceite reciente sin antioxidantes, una concentración de 230,15 ppm. Al realizar un análisis del comportamiento de DC en las muestras de aceite mencionadas, pese a que la concentración de DC en el aceite con curcuminoides, el último día sea el mayor, en comparación con las otras muestras de aceite, presenta una mayor estabilidad oxidativa al ser sometido a un agente externo como el calor. Para ver un mejor análisis del comportamiento de los DC en el aceite de SI, los resultados se sometieron estadísticamente al programa spss, como se muestra a continuación.



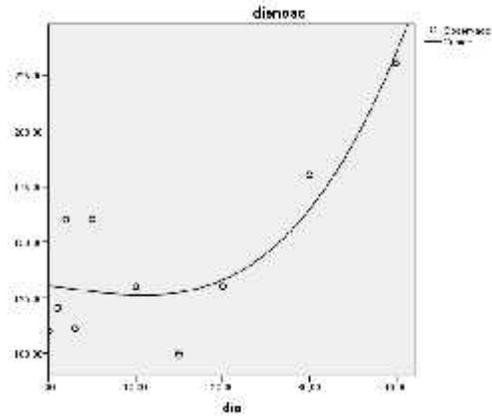
a)



b)



c)



d)

Figura 30. Estimación curvilínea de: a) aceite de SI puro, b) aceite de SI con TBHQ c) aceite de SI con curcuminoides d) aceite de SI del 2010.

Se realizó la estimación relativa para la cuantificación de dienos conjugados en relación con la cuantificación de trienos conjugados, teniendo en cuenta las curvas de calibración realizadas con el patrón de éste mencionado anteriormente.

De los resultados obtenidos gráficamente se observa una relación directa con el comportamiento visto en el índice de peróxidos, para el aceite puro y el aceite con curcuminoides, mostrando una estabilidad del 10-30 día. En la (Tabla 29, anexo 4), a través de la prueba no paramétrica U de Man - Whitney se comprobó esto con p-valor 0,112 ($>0,05$), indicando que no hay una diferencia significativa entre ellos. Del 30- 40 día se observa aumento en la concentración de dienos hecho que indica que se está llevando a cabo la reacción de autooxidación e incrementación debido al atrapamiento de oxígeno durante la primera etapa de oxidación lipídica, permitiendo la formación de peróxidos.

Aunque en la identificación de dienos conjugados no se observa el mismo comportamiento para el aceite con TBHQ, este presenta un valor mediano más bajo de 160,13 ppm, que representa todos los datos (Figura 31) con relación a los días y a las muestras de aceites sometidas al horno, indicando así el poder antioxidante de éste. El

análisis por U de Man - Witney corroboró lo anteriormente mencionado obteniendo un p-valor 0,022 para el aceite puro ($<0,05$) (Tabla 30, anexo 4) indicando una diferencia significativa y para el aceite con curcuminoides p-valor 0,528 ($>0,05$), (Tabla 31, anexo 4), indicando que no hay una diferencia significativa en el comportamiento de la variable independiente para el aceite con curcuminoides y el aceite con TBHQ.

Correspondiente al aceite del 2010 se ve un aumento progresivo de dienos conjugados a partir del 10-40 día, viéndose evidentemente su inestabilidad en comparación con la variación de la concentración de dienos conjugados en las otras muestras de aceites, presentando una diferencia significativa con p-valor de 0,00; 0,030 y 0,016 respectivamente para el aceite puro, con TBHQ y curcuminoides (Tabla 32, 33 y 34, anexo 4). No obstante la mediana del aceite del 2010 de 130,04 ppm es más baja ya que este aceite no fue sometido al horno, pero si presenta una edad mucho mayor que los otros, relacionando así la temperatura con un factor que afecta la producción de dienos consecuente con la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite, pero que puede ser contrarrestado por el efecto antioxidante en este caso mayor para el TBHQ y posteriormente para los curcuminoides.

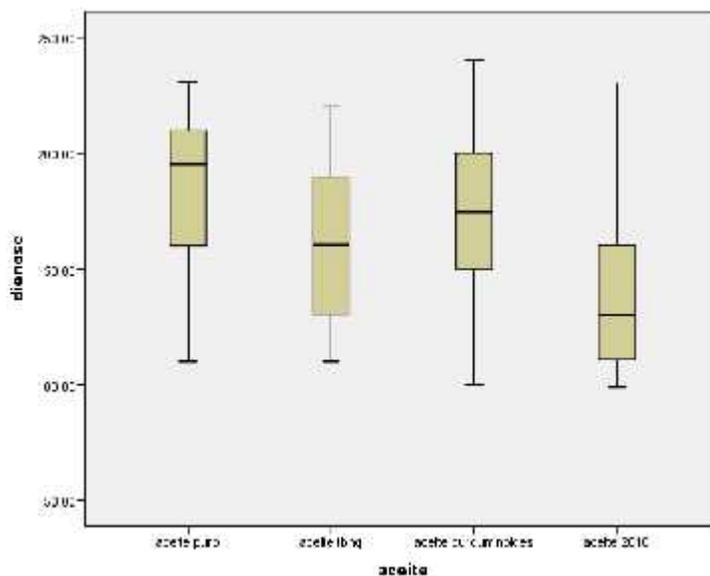


Figura 31. Diagrama de cajas de la mediana de DC para los aceites

10.3.6 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

10.3.6.1 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs) en aceites

En la literatura se ha llevado a cabo la formación del complejo TBA-MDA-TBA de color rojo, el cual se cuantifica por el método de curva de calibración con una absorbancia a 532 nm. Por este método se realiza la cuantificación de las especies secundarias de oxidación formadas en los alimentos como el aceite de SI. En este estudio no fue posible emplear el ácido tiobarbitúrico, por motivos previamente ya mencionados, por lo que se usó el ácido barbitúrico.

Al llevar 5 ml de todas las concentraciones de TEP preparadas en el rango de 0.22 ppm – 2.2 ppm con 5 ml de AB a baño maria como se mencionó en el apartado 7.1, no se observó un cambio de coloración característico de la formación del complejo AB-MDA-AB. Debido a esto solo a un punto de la curva (0.9 ppm) se le realizó el barrido por el UV-VIS, presentando dos bandas de absorción a una longitud de onda de 313 nm y 342 nm, que corresponden al espectro de absorción del ácido barbitúrico [41], con un desplazamiento batocromico, aumentando la longitud de onda de absorción Figura 32. La literatura menciona que el aducto que se forma entre el MDA y el TBA presenta una coloración característica dependiendo las especies que reaccionan con el MDA y de esta misma manera varia la λ_{max} a la cual se presenta dicha absorbancia. Debido a que se trabajó con ácido barbitúrico, esto modificó la λ_{max} de absorción, se esperaría entonces un λ_{max} a 485nm como lo indica la literatura, pero observando los espectros de absorción vemos que no se presenta dicha absorción a la λ_{max} correspondiente, por lo que se concluye que no se dió la formación del complejo [75].

TBA-heptanal: λ_{max} =452 Acido barbitúrico-MDA: λ_{max} = 485.

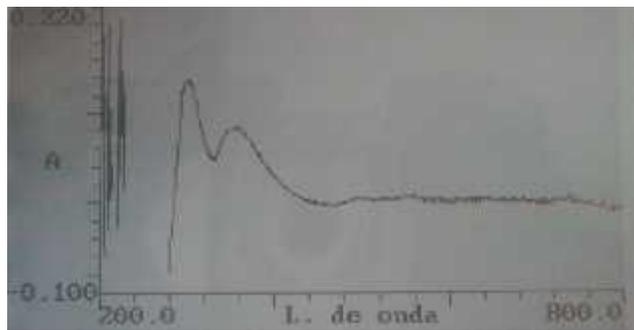


Figura 32. Espectro de 0.9 ppm de la curva de TEP

9.5.4.2 Determinación peroxidación lipídica: Para la determinación de la peroxidación lipídica, en este caso en aceite de SI, se preparó una solución madre de una concentración de 834.3 $\mu\text{mol} / \text{L}$ de TEP a la cual Posteriormente, se le realizó una dilución 1:10 hasta una concentración de 83.5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ y partir de la cual se obtuvieron las nuevas concentraciones de 0.42, 0.83, 1.67, 2.50, 4.17, 8.30 y 16.7 $\mu\text{mol} / \text{L}$, con las que se realizó la calibración de cada concentración referenciada. las cuales fueron llevadas a baño maría, un proceso de extracción y finalmente la lectura en el UV-VIS como se muestra en el apartado 7.2.



Figura 33. Fase de baño maría

Pasada la fase de ebullición y aún sin haber observado un cambio de coloración en dicha etapa, Figura 33, que favoreciera la hidrólisis del TEP y así poder liberar el malonaldehído (MDA) para poder formar el complejo AB-MDA-AB que presenta una coloración roja intensa y una absorción a una longitud de onda máxima de 485 nm, sin embargo se realizó el proceso de extracción del aducto con 2.5 ml de disolución de n-Butanol-piridina (15:1 V/V) y 0.5 mL de agua destilada. en el caso hipotético de que se hubiese formado, sin producir una coloración; se centrifugó y se recogió la capa superior o sobrenadante de cada concentración, se procedió a realizar un barrido de 200-800 nm (Figura 34), por el UV a la concentración de 0,42 μM de TEP, encontrando una absorbancia muy alta, por lo que se realizó una dilución de la concentración de 0.42 μM , tomando 0,13 μL de ésta, llevándose al aforócon butanol hasta 25 ml , obteniendo finalmente una concentración de 2.2×10^{-3} μM , donde se nota en la Figura 35, que hay una máxima absorbancia de 1,355 a una $\lambda = 284\text{nm}$, que no corresponde a la formación del complejo, pero que si es consecuente, con el espectro de absorción de la piridina $\lambda = 251\text{nm}$ con un desplazamiento batocromico [64]. Lo que corrobora una vez más que no se dio la formación del complejo coloreado AB-MDA-AB característico en este tipo de ensayo, tomando como una posible causa, el medio ácido, por el hecho de que no se haya dado la hidrólisis del precursor en este caso el TEP, sin lograr liberar el MDA para acomplejarse con el ácido barbitúrico, que se uso para reemplazar el ácido tiobarbitúrico. También incide el tipo de buffer empleado, que puede permitir la estabilidad de los hidrógenos ácidos presentes en el carbono alfa al grupo carbonilo del ácido barbitúrico y así el MDA en el caso de que hubiese sido liberado, pudiera unirse a este carbono y por último, se denota la etapa del calentamiento que ayudaría a la liberación del MDA en conjunto a lo anteriormente mencionado para la formación del complejo.

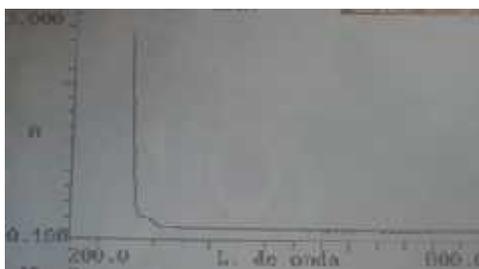


Figura 34. Barrido 200-800nm de 0.42 μM de TEP

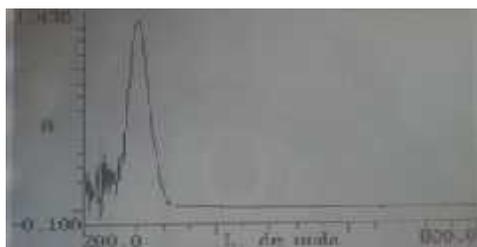
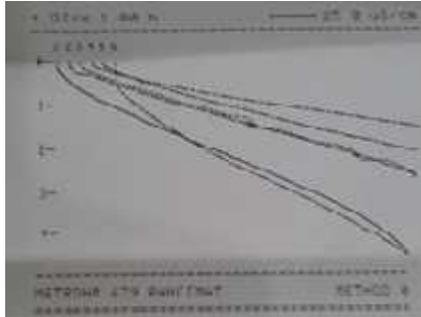


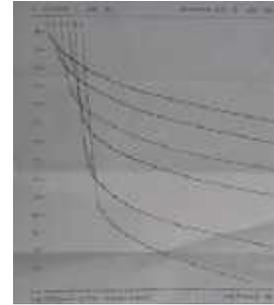
Figura 35. Espectro de absorción de 2.2×10^{-3} μM AB-MDA-AB

10.4 Determinación del periodo de inducción por el método Rancimat

La oxidación de una grasa o un aceite ocurre en dos etapas: un periodo de inducción en el que la oxidación tiene lugar lentamente y a una velocidad relativamente uniforme, y una segunda y una segunda etapa en la que hay un aumento rápido de la oxidación. De esta manera la duración del periodo de inducción se puede tomar como una medida de su resistencia a la oxidación.



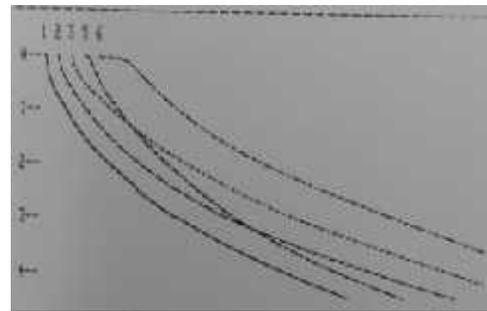
a)



b)



c)



d)

Figura 36. Curvas obtenidas por el rancimat para el aceite de SI a) puro reciente b) con TBHQ, c) con curcumina , d) con curcuminoides.

Al observar la Figura 36, se muestra que el aceite de SI reciente sin antioxidantes, presenta una baja estabilidad oxidativa, y que no fue posible la determinación del tiempo de inducción correspondiente, debido a que al ser sometido al calentamiento no registró un punto de inflexión, en la medida de la conductividad del agua, siendo consecuente con su alto contenido insaturaciones, por lo que se caracteriza este tipo de aceite vegetales obteniéndose una oxidación acelerada que impide que se presente un tiempo de inducción, hecho que se debe como ya se menciona a que en este aceite, mas del 90 % de acidos grasos presentes son insaturados, lo que lo hace susceptible a procesos de

rancidez oxidativa, también debe tenerse en cuenta que se trabajó en el proyecto con aceite crudo lo que de por sí contribuye a que disminuya la estabilidad oxidativa del aceite. Sin embargo dicha estabilidad del aceite de SI, se ve mejorado con la adición de antioxidantes como TBHQ y curcuminoides, que retardan dicha oxidación, registrando periodos de inducción de 3,22 horas - 12,0 horas y 1,83 horas - 3,50 horas respectivamente, acercándose a los tiempos de inducción reportados en la literatura para aceites vegetales como soya de 4 horas - 6,90 horas y maíz hasta de 9,0 horas [63], lo que en forma preliminar permitiría indicar que este tipo de compuestos de origen natural como los curcuminoides, con probadas actividades biológicas benéficas [67], se podrían utilizar como un posible agente estabilizante del aceite de SI, que puede mejorar en único aspecto potencialmente la susceptibilidad a la oxidación.

Por otra parte no se observa una diferencia de la acción antioxidante de la curcumina recristalizada, que permitiera retardar y estabilizar el proceso de oxidación en el aceite, por lo que no fue posible determinar el tiempo de inducción, debido a la degradación rápida de las muestras y a la temperatura de trabajo. Esta degradación rápida se debe a la baja estabilidad oxidativa del aceite reciente sin adición de antioxidantes y se podría asociar en este caso, a una baja actividad antioxidante de la curcumina en productos alimenticios como el aceite, en comparación con los curcuminoides. Estas reacciones de oxidación termosensibilizadas, al igual que las que ocurren durante la auto-oxidación, conducen a la formación de peróxidos pero, a diferencia de estas últimas, no presentan un periodo de inducción apreciable puesto que no son inhibidas ni retardadas por sustancias inhibitoras de la propagación en cadena de radicales libres, como los antioxidantes añadidos (TBHQ y curcuminoides) o los que están presentes naturalmente en el aceite (tocoferoles).

11 CONCLUSIONES

- Se determinó que el tiempo óptimo de estabilidad oxidativa del aceite puro reciente de SI, fue de 10-20 días, para los aceites de SI con TBHQ y curcuminoides fue de 10 - 30 días; en todos los casos las muestras, se sometieron a una temperatura de 63 °C, durante un periodo de almacenamiento de 40 días.
- La temperatura afectó, la estabilidad oxidativa de los ácidos grasos, poliinsaturados presentes en las muestras de aceite, alterando los resultados obtenidos, registrando un aumento en el índice de acidez, índice de peróxidos, dienos y trienos conjugados, durante el periodo de almacenamiento de cero (0) a cuarenta (40) días, teniendo en cuenta lo permitido por el CODEX, hecho que fue comprobado con la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis.
- Se presentó una mayor estabilidad oxidativa, en la medición de las propiedades químicas, para el aceite con TBHQ y curcuminoides del 10-30 día en el periodo de almacenamiento, indicando que los curcuminoides podrían evaluarse en otra clase de alimentos como un potente antioxidante natural.
- Con el IR, se logró identificar los principales grupos funcionales característicos, pertenecientes a la curcumina; logrando así obtener un resultado satisfactorio, en la separación cromatográfica, lo que permitió, la adición y evaluación de la curcumina en el aceite.
- El tiempo de inducción registrado por el método de Rancimat 679, para el aceite de SI con TBHQ y con curcuminoides, fueron satisfactorios, en comparación con el aceite reciente sin adición de antioxidantes y el aceite con adición de curcumina, en los cuales no se logró obtener tiempos de inducción. Evidenciando un alto poder antioxidante del TBHQ y los curcuminoides ante procesos de oxidación lipídica, acercándose a los tiempos de inducción del aceite de maíz y soya.
- Las muestras de aceite de SI con TBHQ y con adición de curcuminoides, registraron tiempos de inducción largos de 3,22 horas – 12,0 horas y de 1,83 horas – 3,50 horas respectivamente, por el método de Rancimat 679. Hecho que potencializa el uso de los curcuminoides, en este tipo de alimentos, logrando aumentar la estabilidad oxidativa de los ácidos grasos.
- Se logró la determinación por espectrofotometría de UV/Vis, de dienos y trienos conjugados en el aceite de SI reciente sin antioxidantes y con adición de

antioxidantes, mostrando una relación directa en la variación del índice de peróxidos, durante el periodo de almacenamiento.

- Factores como el pH y la temperatura pueden ser los determinantes en la reacción de liberación del malonaldehído (MDA) a partir de la acidificación del 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), generando así la imposibilidad de la formación del complejo AB-MDA-AB, para su posterior cuantificación.
- Debido a que estructuralmente el ácido barbitúrico y el ácido tiobarbitúrico, son un poco similares, se esperaría que la formación del complejo se hubiese dado pero con un desplazamiento hipsocromico a una longitud de onda de 432nm.

RECOMENDACIONES

- Realizar la separación de todos los curcuminoides presentes en la cúrcuma, que permitan complementar la información de los resultados obtenidos en este trabajo y ver la actividad antioxidante de cada uno de los curcuminoides en el aceite de sachá inchi del putumayo, Colombia.
- Crear una norma técnica colombiana para el aceite de sachá inchi con el fin de establecer los parámetros (físicos y químicos) que permitan evaluar sus estándares de calidad, garantizando beneficios óptimos para los consumidores y la comunidad en general.
- Determinar el contenido de humedad presente en el aceite de sachá inchi, ya que este podría ser un indicativo de su alto contenido de peróxidos y su susceptibilidad oxidativa.
- Comprobar mediante estudios in vivo, con el aceite de sachá inchi, su actividad biológica, no sólo como hipolipemiante reduciendo los niveles de lípidos en sangre, sino también como agente anticancerígeno.
- Realizar las pruebas químicas necesarias para evaluar la capacidad de los antioxidantes naturales, con respecto a los antioxidantes sintéticos, que permitan conocer el efecto de estos en la oxidación de los ácidos grasos.
- Evaluar la influencia de parámetros, tales como, luz, oxígeno y metales, en la degradación del aceite de sachá inchi con el fin de determinar su estabilidad contra la oxidación.
- Estandarizar el método para medir las especies secundarias de oxidación en los alimentos, pero empleando ácido barbitúrico; acidificando el TEP con otro tipo de solución buffer, variando el tiempo del baño maría y los medios de extracción del complejo.
- Llevar a cabo un procedimiento basado en una reacción tipo Knoevenagel con algunas modificaciones, que permitan tomar nuevas rutas para la formación del complejo coloreado, y posterior cuantificación de las especies secundarias de oxidación en el aceite.

12 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gómez , J. Monografía y cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Bogotá D.C.: Produmedios, (2005). p. 27
- [2] Hardmeier, R. Estudio bioquímico de la semilla de “sachá inchi”. En: Resumen de investigaciones apoyadas por Fundeagro 1988-1992. Tomo I. Lima, TTA. (1993). p. 243-244.
- [3] Huamaní, P. y Flores, E. Estrategias de comercialización del sachá inchi. En: Revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Administrativas, UNMSM. Julio, (2009), vol. 12, no. 23, p. 37-49.
- [4] García, H. Sachá inchi (*Plukenetia volubilis*): Una alternativa para mejorar la nutrición animal y humana. I. Selección de variedades y análisis bioquímico nutricional. En: Resumen de investigaciones apoyadas por Fundeagro 1988-1992. Tomo I. Lima, TTA. (1993). p. 219 - 220.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Perspectivas por sectores principales. En: Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. Roma: FAO, (2002). p. 35.
- [6] Osorio, J. Atehortúa, L. Díaz, P. (2010). Desarrollo de un paquete agronómico y biotecnológico, para el establecimiento de cultivos comerciales e industriales de Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis*).<http://intranet.parquepta.org/archivos/comunicaciones/RARANGO/SACHA%20INCHI/VERSI%C3%93N%20REVISADA%20POR%20COLCIENCIA%20S.pdf>. 08 Diciembre (2013).
- [7] Mataix, J. y Gil, A. Los omega-3 y el omega-9 en la enfermedad cardiovascular. En: Libro blanco de los omega-3: Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Madrid: Editorial Médica Panamericana, (2004). p. 49-64
- [8] Manco, E. Iniea (2006). Cultivo de Sachá Inchi. <http://www.incainchi.es/pdf/1358.pdf>. 03 marzo de (2013).

- [9] Murillo, J. Las Euphorbiaceae de Colombia. En: Biota Colombiana. Diciembre, (2004), vol. 5, no. 2, p. 183 – 200.
- [10] Follegatti, L. Piantino, C. Grimaldi, R. Cabral, F. Supercritical CO₂ extraction of Omega 3 rich Oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. En: Journal of Supercritical Fluids. Marzo, (2009), vol. 49, no. 3, p. 323-329.
- [11] Hamaker, B. *et.al.* Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). En: Cereal Chem. Marzo, (1992), vol. 69, no. 4, p. 461-463.
- [12] Juarez, E. Gobierno Regional de San Martín, DIRCETUR (2007). Estudio sobre sistematización de avances de investigación y propuesta de un modelo productivo competitivo para la Producción de Sacha Inchi en la Región San Martín. <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/3194/1/BVCI0001685.pdf>. 20 Enero (2014).
- [13] Gutiérrez, L. F. Rosada, L.M. Jiménez, A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. En: Grasas y Aceites. Enero-marzo, (2011), vol. 62, no. 1, p. 76-83.
- [14] Shaidi, F., Zhong, Y., Lipid oxidation: Measurement methods, memorial University of Newfoundland, (2005), vol.6.
- [15] Dostert, N.; *et. al.* Factsheet: Datos botánicos de Sacha Inchi. Traducido por Frederico Luebert. Lima: Billy Víctor Odiaga Franco, (2009). 10 p 11, Promamazonia. Definición del producto. Sacha inchi. <http://www.iiap.org.pe/promamazonia/SBiocomercio/Upload/Lineas/Documentos/402.pdf>. 09 Enero (2014).
- [16] Cied (2008). Adaptación y validación participativa de paquete tecnológico para la producción competitiva del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la cuenca del Perené. Protocolo del cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). <http://www.ciedperu.org/descarga/protocolosacha.pdf>. 07 DICIEMBRE 2013.
- [17] Aranda, J. (2009). Monografía del cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo). <http://www.biocomerciooperu.org/admin/recursos/contenidos/Monograf%C3%ADa%20de%20Sacha%20Inchi%20-%20final.pdf>. 10 Diciembre (2013).

- [18] IIAP (2009) . Estudio de viabilidad económica del cultivo de (*Plukenetia volubilis* Linneo), sacha inchi, en el departamento de San Martín. <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/3194/1/BVCI0001685.pdf> 15 ENERO (2014).
- [19] Huaman, Juan, Chavez, Katterine, Castañeda, Erdwin *et al.* Efecto de la *Plukenetia volubilis* Linneo (sacha inchi) en la trigliceridemia posprandial. *An. Fac. med.*, dic. (2008), vol. 69, no.4, p .263-266. ISSN 1025-5583. http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S1726-46342011000400009&script=sci_arttext 12 DICIEMBRE (2013).
- [20] Vázquez, C. De Cos, A. López, C. Lípidos. En: Alimentación y Nutrición. Manual Teórico-Práctico. 2 ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, (2005). p. 15.
- [21] Choksi K, Boylston W, Rabek J, Widger W, Papaconstantinou Journal. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004. Acta 1688: p. 95 - 101.
- [22] Díaz L, Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, (2002). 31(2): p. 127 - 133.
- [23] Lawson H. Aceites y grasas alimentarios. Tecnología, utilización y nutrición, ed. S.R. Acribia. (1999), Saragoza - España: Acribia, SA Royo. p. 333
- [24] Dinçer Y, Akçay T, İlkova H, Alademir Z, Özbay G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus *Mutation Research*, (2003). 527(1): p. 49 -55.
- [25] Fox N, Stachowiak G. Vegetable oil-based lubricants—A review of oxidation. *Tribology International*, (2007). 40: p. 1035 - 1046.
- [26] Hamilton RJ. (1983). *The Chemistry of Rancidity in Foods*. En: Allen JC y Hamilton RJ (Ed.) *Rancidity in Foods*. Applied Science Publishers Ltd., Essex, 1-20
- [27] Stepanyan V, Arnous A, Petrakis C, Kefalas P. Chemiluminiscent evaluation of peroxide value in olive oil. *Talanta*, (2005). 65: p. 1056 - 1058.

- [28] Rudnik, E; Szczucinska, a; Gwardiak, a; Szulc, A and Winiarska, A. comparative studies of stability of linseed oil. En: *Thermochimica Acta*,370, (2001), p.135-140.
- [29] Schuchardf, U; Sercheli, R.AND Martheus, V. Transesterification of vegetable oils a Rewiev. En: *J Braz Chem*, 9 (1), (1998) p. 199-210.
- [30] Moreno, N, Martinez F. and Aíde Perea. Grasas a la medida con lípidos estructurados obtenidos por interesteificación enzimática. IX conferencia internacional sobre ciencia y tecnología de alimentos, (2005).
- [31] Talpur M, Sherazi S, Mahesar S, Bhutto A. A simplified UV spectrometric method for determination of peroxide value in thermally oxidized canola oil. *Talanta*, (2010). 80: p. 1823 - 1826.
- [32] Dou L, Cheng D, Li M, Xiao K, Shi B, Li Z. Unusual high acidity oils from the Great Palogue Field, Melut Basin, Sudan. *Organic Geochemistry*, (2008). 39: p. 210 - 231.
- [33] Bosque J, Mata P, Cuadros L, González A, Rodríguez F, García H. Stability for olive oil control materials. *Food Chemistry*, (2011). 125: p. 1418 - 1422.
- [34] Alarcón J, Panéz R, Ramos E, Valle P, Yon A. Tecnología de Aceites y Grasas - Práctica. Determinación de Índice de Acidez. [Internet]. Miraflores - Perú. (2010). [Actualizado 3 de Agosto de 2012]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/38187921/Determinacion-del-indice-de-acidez>.
- [35] Rao Y, Xiang B, Zhou X, Wang Z, Xie S, Xu J. Quantitative and qualitative determination of acid value of peanut oil using near-infrared spectrometry. *Journal of Food Engineering.*, (2009). 93: p. 249 - 252.
- [36] Marmesat S, Morales J, Velasco J, Ruiz M, Dobarganes M. Relaciones entre los cambios en el índice de peróxidos e índice de dienos conjugados durante la oxidación de aceites de girasol con diferente grado de instauración. *Grasas y Aceites*, (2009). 60: p. 155 - 160.
- [37] Primo E. Química de los alimentos. Primera ed. Síntesis, S.A, ed. S.A. Síntesis. (1998), Madrid. p. 461

- [38]** Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, (2007). 46: p. 244 - 282.
- [39]** Akoh C, David B, Min. *Food Lipids*. 3rd ed. T.F. Grups. (2008), New York. 914.
- [40]** Gaviria C, Ochoa C, Sánchez N, Medina C, Lobo M, et al., Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, (2009). 8(6): p. 519 - 528.
- [41]** Velasco, J; Andersen, M. and Leifs. Evolution of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with Rancimat method and differential scanning calorimetry. En : *Food chemistry*, 85, (2004), p. 623-632.
- [42]** Daniels, R; Kim, H. and David, M. Hydrogenation and interesterification effects on the oxidate stability and melting point of soybean oil. En : *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, (2006), p. 6011-6015.
- [43]** Moreno C. and Larrauri J. principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica .En : *Food SCI tech int*, 4 (6), (1998), p. 391-399.
- [44]** Coultate T. *Manual de Química y bioquímica de los alimentos*. Tercera ed. S.A. Acribia. (2007), Zaragoza (España). p. 446
- [45]** Choe E, Min DB. Mechanism and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, (2006). 5 (4): p. 169-186.
- [46]** Jayaprakasha, G.K.; L.J. Rao y K.K. Sakariah. Chemistry and biological activities of *C. Longa*. *Trends in Food Science and Technology*. (2005). 16 (12): p. 533-548.
- [47]** Qin, N.Y.; Yang F.Q.; Wang Y.T. y S.P. Li. Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2007). 43 (2): p. 486-492.

- [48] Rios, E. Duque, A. León D. Caracterización espectroscópica y cromatográfica de curcumina extraída de los rizomas de Cúrcuma (cúrcuma longa L.) Cultivada en el departamento del Quindío. (2009), p. 32-37.
- [49] Kao, L.; C. Chen y C.J. Chang. Supercritical CO₂ extraction of turmerones from turmeric and high-pressure phase equilibrium of CO₂ + turmerones. *Journal of Supercritical Fluids*. (2007). 43 (2): p. 276-282
- [50] Sharma, R.A.; A.J. Gescher y W.P. Steward. Curcumin: The Story so Far. *European Journal of Cancer*. (2005). 41 (13): p. 1955-1968.
- [51] Jang, H.D.; K.S. Chang; Y.S. Huang; C.L. Hsu; S.H. Lee y M.S. Su. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry*. (2007). 103 (3): p. 749-756.
- [52] Olguín, C.; Meléndez, M.; Zúñiga, R.; Pasquetti, C., Antioxidants and atherosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición* (2004), 12, (4), p.199-206
- [53] Halliwell, B. In *How to characterize an antioxidant: an update*, (1995); 1995; p. 73-101.
- [54] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press Oxford: (1999); Vol. 3.
- [55] GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; Czapski, G., The Felton Reagents. *Free radical biology & medicine* (1993), 15, 435-445.
- [56] Sanchez Ma. Dolores. Venezuela. (2004). Estudio sobre los ácidos grasos libres en queso blanco, Universidad de Los Andes. 46:2.
- [57] Pavia D. L-, Lampman G. M. and Kriz G.S. .Introduction to Organic Techniques, a Contemporary Approach, 3^o. ed.. Saunders College, Fort Worth, (1988).
- [58] Mongay, C. Quimiometría. Universitat de Valencia, España, (2005), p. 302-303.
- [59] Gonzáles, C. Tratamiento de datos. Díaz de Santos, España, (2006), p. 15-71.

- [60] Gutierrez, H. Salazar, R. Análisis y Diseño de Experimentos. Mc Graw – Hill, México, (2004), p.103-105.
- [61] A.O.A.C. Official methods of analysis.16th Edición.3ª Revision.Association of Official Analytical Chemists.Washington D.C. USA. (1997).
- [62] Jebe, Mark G. Matlock and Ronald T. Sleeter “Collaborative Study of the Oil Stability Index Analysis”. JAOCS, vol. 70, #11, pp1055-1061, 1993.
- [63] Correa , J. Rojas, L. Estudio de Potencia de Pruebas de Homogeneidad de Varianza. En: Revista Colombiana de Estadística. (2006), vol. 29, p. 57-76.
- [64] Pike, O. A.; Current protocols in Fodds Analytical Chemistry, 1 Agosto 2001, D.2.4.5 – D.2.4.6. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.fad0203s00/article>. 15 ENERO (2013).
- [65] Estepa , V.; Ródenas, S.; Martín M.C. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. Sección Departamental de Química Analítica , Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040. Madrid (España); p. 4 -12.
- [66] Bernal, I. Análisis de alimentos. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, colección Julio Carrizosa Valenzuela N0 2. Santafé de Bogotá. D.C (1993).
- [67] Schmidt, S. y Pokorný, J. Potential Application of Oilseeds as Sources of Antioxidants for Food Lipids: A Review. En: Czech J. Food Sci. Mayo, (2005), vol. 23, no. 3, p. 93-102
- [68] Singh, J.; *et.al*.Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables.En: Journal of Food Composition and Analysis. Marzo, (2007), vol. 20, no. 2., p. 106-112.
- [69] Gutiérrez, L. Rosada L, Jiménez A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volúbilis* L.) and its relationship with vegetal bioactivity. (2011); 62: p. 76-83.
- [70] Dou, L. Cheng D, Li M, Xiao K, Shi B, Li Z. Unusual high acidity oils from the Great Palogue Field, Melut Basin, Sudan. Organic Geochemistry, (2008). vol. 39: p. 210 - 231.

[71] FAO / OMS. CODEX Stan 19-1981, Norma del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas Individuales, Codex Alimentarius Official Standards, Canadá, (1999).

[72] Zuta, P. Simpson B, Zhao X, Leclerc L. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*, (2007). 100 (2): p. 800 - 807.

[73] Terpinc P, Ceh B, Poklar U, Abromovic H. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*, (2012). 39: p. 210 - 217.

[74] Kamal-Eldin. A, Mäkinen M, Lampi A. M. The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism. Kamal- Eldin A, editor, *Lipid oxidation Pathways*. Sweden: AOCS Press; (2003) : vol. 1 p. 12-40.

[75] R. Guillén-Sans and M. Guzmán-Chozas. The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review. Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Street Prof. García González, w/n 41012 Sevilla, Spain.

ANEXOS

ANEXO 1. Pruebas no paramétricas para Verificar el índice de peróxidos en las muestras de aceite.

Tabla 16. Prueba de normalidad índice de peróxidos

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
INDICEPE	,213	120	,000	,906	120	,000

Tabla 17 y 18. Prueba de Kruskal-Wallis para las muestras de aceite de SI y para los días de análisis.

Estadísticos de contraste(a,b)

	INDICEPE
Chi-cuadrado	34,565
Gl	3
Sig. asintót.	,000

Estadísticos de contraste(a,b)

	INDICEPE
Chi-cuadrado	49,615
Gl	9
Sig. asintót.	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis
b Variable de agrupación: ACEITE

a Prueba de kruskal-wallis
b Variable de agrupación: DIAS

Tabla 19 y 20. Prueba no paramétrica U de Man-Withney para las muestras de aceite.

Rangos

Aceite	N	Rango promedio	Suma de rangos
aceite tbhq	30	265,22	1116,50
Indicepe aceite curcuminoides	30	269,78	713,50
Total	60		

Estadísticos de contraste^a

	Indicepe
U de Mann-Whitney	248,500
W de Wilcoxon	713,500
Z	-3,030
Sig. asintót. (bilateral)	,0617

a. Variable de agrupación: aceite

	Indicepe
Chi-cuadrado	84,109
Gl	3
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis
b. Variable de agrupación: días

Tabla 21. Correlación de Spearman para índice de peróxidos

			Correlaciones		
			INDICEPE	Días	Aceite
Indicepe		Coefficiente de correlación	1,000	,563**	-,165
		Sig. (bilateral)	.	,000	,071
		N	120	120	120
Rho de Spearman	Días	Coefficiente de correlación	,563**	1,000	,000
		Sig. (bilateral)	,000	.	1,000
		N	120	120	120
Aceite		Coefficiente de correlación	-,165	,000	1,000
		Sig. (bilateral)	,071	1,000	.
		N	120	120	120

ANEXO 2. Pruebas no paramétricas para Verificar el índice de acidez en las muestras de aceite.

Tabla 22. Prueba de Kruskal- Wallis índice de acidez para las muestras de aceite.

Rangos		
Aceite	N	Rango promedio
aceite puro	30	66,82
aceite tbhq	30	48,10
Indiceac		
aceite curcuminoides	30	28,97
aceite 2010	30	98,12
Total	120	

	Indiceac
Chi-cuadrado	65,768
Gl	3
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis
b. Variable de agrupación:
aceite

Tabla 23. Prueba de Kruskal - Wallis índice de acidez para los días de análisis.

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Indiceac
Chi-cuadrado	32,202
Gl	9
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis
b. Variable de agrupación:
días

Tabla 24. Prueba U de Man- Withney índice de acidez para las muestras aceite.

Rangos			
Aceite	N	Rango promedio	Suma de rangos
aceite puro	30	36,08	1082,50
Indiceac aceite tbhq	30	24,92	747,50
Total	60		

Estadísticos de contraste ^a	
	Indiceac
U de Mann-Whitney	282,500
W de Wilcoxon	747,500
Z	-2,518
Sig. asintót. (bilateral)	,012

a. Variable de agrupación: aceite

Estadísticos de contraste ^a	
	Indiceac
U de Mann-Whitney	149,500
W de Wilcoxon	614,500
Z	-4,478
Sig. asintót. (bilateral)	,000

a. Variable de agrupación: aceite

ANEXO 3. Pruebas no paramétricas para trienos conjugados en las muestras de aceite.

Tabla 25. Prueba de normalidad trienos conjugados

Aceite	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
aceite puro	,180	30	,014	,853	30	,001
Trienos aceite tbhq	,171	30	,025	,872	30	,002
aceite curcuminoides	,160	30	,048	,907	30	,012
aceite 2010	,251	30	,000	,792	30	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 26. Prueba de Kruskal- Wallis trienos conjugados para las muestras de aceite.

Rangos			
	Aceite	N	Rango promedio
Trienosc	aceite puro	30	64,08
	aceite tbhq	30	61,97
	aceite curcuminoides	30	72,38
	aceite 2010	30	43,57
	Total	120	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Trienosc
Chi-cuadrado	10,995
Gl	3
Sig. asintót.	,012

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: aceite

Tabla 27. Prueba de Kruskal-Wallis trienos conjugados para los días de análisis.

Estadísticos de contraste^{a,b}

	Trienosc
Chi-cuadrado	84,109
Gl	9
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: días

Tabla 28. Prueba U de Man-Withney trienos conjugados entre los aceites reciente sin antioxidantes y aceite del 2010.

Estadísticos de contraste^a

	Trienosc
U de Mann-Whitney	313,000
W de Wilcoxon	778,000
Z	-2,029
Sig. asintót. (bilateral)	,042

a. Variable de agrupación: aceite

Anexo 4. Pruebas no paramétricas para la identificación de dienos conjugados.

Tabla 29. Prueba U de Man-Withney dienos conjugados para aceite reciente sin antioxidantes y con curcuminoides.

Estadísticos de contraste^a

	Dienosc
U de Mann-Whitney	207,500
W de Wilcoxon	672,500
Z	-3,590
Sig. asintót. (bilateral)	,0112

a. Variable de agrupación: aceite

Tabla 30. Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite reciente sin antioxidantes y con TBHQ.

	Aceite	N	Rango promedio	Suma de rangos
	aceite puro	30	35,67	1070,00
Dienosc	aceite tbhq	30	25,33	760,00
	Total	60		

Estadísticos de contraste^a

	Dienosc
U de Mann-Whitney	295,000
W de Wilcoxon	760,000
Z	-2,294
Sig. asintót. (bilateral)	,022

a. Variable de agrupación: aceite

Tabla 31. Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite con TBHQ y curcuminoides.

Estadísticos de contraste^a

	Dienosc
U de Mann-Whitney	407,500
W de Wilcoxon	872,500
Z	-,630
Sig. asintót. (bilateral)	,528

a. Variable de agrupación: aceite

Tabla 32. Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite reciente sin antioxidantes de SI y aceite del 2010.

Estadísticos de contraste^a

	Dienosc
U de Mann-Whitney	183,500
W de Wilcoxon	368,500
Z	-2,169
Sig. asintót. (bilateral)	,000

Tabla 33. Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite con TBHQ y aceite del 2010.

Estadísticos de contraste^a

	Dienosc
U de Mann-Whitney	303,500
W de Wilcoxon	768,500
Z	-2,169
Sig. asintót. (bilateral)	,030

a. Variable de agrupación: aceite

Tabla 34. Prueba U de Man-Withney dienos conjugados aceite con curcuminoides y aceite del 2010.

Estadísticos de contraste^a

	Dienosc
U de Mann-Whitney	287,000
W de Wilcoxon	752,000
Z	-2,413
Sig. asintót. (bilateral)	,016

a. Variable de agrupación: aceite