

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**“DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS,
CAROTENOIDES, FITOESTEROLES, TOCOFEROLES,
ACIDOS GRASOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN
ACEITES EXTRAIDOS DE SEMILLAS DE DIECISEIS
ACCESIONES DE *Plukenetia volubilis* L. (SACHA INCHI).”**

TESIS PRESENTADA POR LA
BACHILLER:

ALAGÓN TALAVERANO TESORO
PARA OBTENER EL TÍTULO
PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORES:

DRA. ROSANA CHIRINOS
GALLARDO

PHD. JAIME CÁRDENAS GARCÍA

AREQUIPA - PERU

2012

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Católica de Santa María**, Mi Alma Mater y fuente de saber inculcado por medio de los docentes del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A la **CUD (Commission Universitaire pour le Développement)** de Bélgica quien a través del proyecto **PIC (Projet Interuniversitaire Ciblé)** 2009-2013 brindó el apoyo financiero para la ejecución de este trabajo de investigación.

Al **Instituto de Biotecnología (IBT)** de la **UNALM**, laboratorio de **Biotecnología Industrial**. Conformado por un gran equipo de personas, quienes me brindaron apoyo y amabilidad en un gran ambiente de formación e investigación científica.

A mis asesores de tesis la **Dra. Rosana Chirinos Gallardo** y **PhD Jaime Cárdenas García**, gracias por la confianza depositada en mi persona para poder llevar a cabo este trabajo de investigación, por la ayuda en la realización del mismo y colaboración en la revisión, enseñanzas y formación compartida.

A los miembros del jurado: **Mgter. Gonzalo Dávila del Carpio**, **Mgter. José Villanueva Salas** y **Mgter. Roxana Bardales Alvarez**, por sus valiosas apreciaciones, motivación, apoyo y críticas, necesarias para la presentación final de este trabajo.

DEDICATORIAS

A DIOS nuestro SEÑOR, gracias por todo, por guiar mis pasos en todo momento, por brindarme la gran oportunidad de poder lograr el desarrollo profesional. Gracias por acompañarme y guiarme siempre.

A mis amados Padres Ronald y Rosario, quienes son la bendición más grande que he podido recibir de Dios. Gracias por su dedicación, apoyo, valores, enseñanzas, consejos y confianza depositadas en mí. Este logro Profesional también es de ustedes, son el mejor ejemplo en mi vida los admiro mucho.

A mis hermanas Roció y Milagros y hermano Cristopher, quienes forman parte importante en mi vida y siempre están conmigo. A toda mi familia por el amor, la confianza, apoyo depositado en mí y los buenos consejos transmitidos día a día.

A todas mis amigas por su gran amistad y por todas las alegrías y penas compartidas durante esta etapa tan importante en mi vida.

Tesoro Alagón Talaverano.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	5
OBJETIVOS.....	7
HIPOTESIS.....	8

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1. SACHA INCHI.....	9
1.1.1. CLASIFICACION Y NOMBRES COMUNES.....	9
1.1.2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL SACHA INCHI.....	10
1.1.3. CARACTERISTICAS ECOLOGICAS DEL SACHA INCHI.....	11
1.1.4. ORIGEN Y DISTRIBUCION.....	12
1.1.5. ESTUDIOS DE CARACTERIZACION EN SACHA INCHI.....	13
1.1.6. USOS.....	15
1.1.7. ACEITE DE SACHA INCHI.....	15
1.2 ACEITES VEGETALES.....	17
1.2.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LOS ACEITES.....	17
1.2.1.1. ACIDOS GRASOS.....	18
1.2.1.2 ACIDOS GRASOS SATURADOS.....	18
1.2.1.3 ACIDOS GRASOS INSATURADOS.....	20
1.2.1.4. ACIDOS GRASOS ESENCIALES.....	21

1.2.2.	OTROS COMPONENTES IMPORTANTES EN LOS ACEITES.....	23
1.2.2.1.	COMPONENTES QUE AFECTAN LA APARIENCIA DEL ACEITE.....	24
1.2.2.2.	COMPONENTES QUE EJERCEN ACCION SOBRE LA ESTABILIDAD DE LOS ACEITES.....	24
1.2.3	REACCIONES QUIMICAS EN LOS ACEITES.....	24
1.2.3.1.	HIDROLISIS.....	25
1.2.3.2.	HIDROGENACION.....	25
1.2.3.3.	POLIMERACION.....	25
1.2.3.4.	ESTERIFICACION.....	25
1.2.3.5.	INTERESTERIFICACION.....	25
1.2.3.6	OXIDACION.....	26
1.2.3.6.1.	Características Generales de la Oxidación de Aceites.....	26
1.2.4.	ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES.....	28
1.2.5.	TECNICAS DE EXTRACCION DE ACEITE.....	29
1.2.5.1	EXTRACCION CON DISOLVENTES.....	29
1.2.7.1.1.	Tipos de Extracción con Disolventes.....	30
1.2.5.2.	EXTRACCION CON GASES EN CONDICIONES SUPERCRTICAS.....	32
1.2.5.3.	EXTRACCION POR PENSADO.....	32
1.3	ESPECIES OXIDANTES, ESTRES OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES....	33
1.3.1.	ESPECIES OXIDANTES: RADICALES LIBRES (RL).....	33
1.3.2.	ESTRES OXIDATIVO.....	35
1.3.3.	ANTIOXIDANTES.....	36
1.3.3.1.	ANTIOXIDANTES NUTRACEUTICOS – ANTIOXIDANTES VEGETALES.....	38

1.3.4. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	38
1.4. COMPUESTOS FENOLICOS.....	39
1.4.1. CLASIFICACION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS.....	40
1.4.2. LOS POLIFENOLES PRESENTES EN LOS ALIMENTOS.....	41
1.4.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES.....	41
1.5. CAROTENOIDES.....	42
1.5.1. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS CAROTENOIDES.....	44
1.5.2. CAROTENOIDES COMO ANTIOXIDANTES.....	45
1.6. TOCOFEROLES.....	45
1.6.1. METABOLISMO DE LOS TOCOFEROLES.....	47
1.6.2. FUNCIONES ANTIOXIDANTES DE LOS TOCOFEROLES.....	48
1.7. FITOESTEROLES.....	48
1.7.1. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS FITOESTEROLES.....	50
1.7.2. OTRAS ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LOS FITOESTEROLES.....	51

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. LUGAR DE INVESTIGACION.....	52
2.2. MATERIALES.....	52
2.2.1. MATERIAL VEGETAL.....	52
2.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO.....	52
2.3. METODOS.....	55

2.3.1. OBTENCION Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.....	55
2.3.2. EXTRACCION DE ACEITE.....	55
2.3.3. DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT).....	57
2.3.4. DETERMINACION DE CAROTENOIDES.....	60
2.3.5. DETERMINACION DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).....	61
2.3.6. DETERMINACION DE TOCOFEROLES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).....	64
2.3.7. DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).....	66
2.3.8. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TEAC (ABTS) HIDROFILICA Y LIPOFILICA.....	69
2.3.9 ANALISIS ESTADISTICO.....	73

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. EXTRACCION DE ACEITE.....	74
3.2. DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT)....	76
3.3. DETERMINACION DE CAROTENOIDES.....	79
3.4. DETERMINACION DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).....	82
3.5. DETERMINACION DE TOCOFEROLES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).....	86
3.6. DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).....	91

3.7. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TEAC (ABTS) HIDROFILICA Y LIPOFILICA.....	96
3.8. RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON TOCOFEROLES TOTALES, CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENOLICOS.....	103
3.8.1 RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON EL CONTENIDO DE TOCOFEROLES TOTALES.....	104
3.8.2 RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES.....	104
3.8.3 RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES.....	105
CONCLUSIONES.....	107
RECOMENDACIONES.....	109
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	110
ANEXOS.....	120

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 01.	Perfil de ácidos grasos del aceite de Sacha Inchi comparado con otros aceites de semillas oleaginosas.....	16
Tabla N° 02.	Acidos Saturados.....	19
Tabla N° 03.	Acidos Insaturados.....	20
Tabla N° 04.	Nomenclatura de Especies reactivas u oxidantes.....	33
Tabla N° 05.	Condiciones clínicas que implican especies reactivas y radicales libres.....	36
Tabla N° 06.	Principales sistemas de defensa antioxidante del organismo.....	37
Tabla N° 07.	Clasificación de los Compuestos Fenólicos.....	40
Tabla N° 08.	Actividades biológicas de los carotenoides en el hombre.....	44
Tabla N° 09.	Rendimiento de aceite de las semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi (%).....	74
Tabla N° 10.	ANOVA de rendimiento de aceite.....	75
Tabla N° 11.	Curva estándar de ácido gálico.....	76
Tabla N° 12.	Contenido de Compuestos Fenólicos en aceites de sacha inchi.....	77
Tabla N° 13.	ANOVA del contenido de compuestos fenólicos.....	78
Tabla N° 14.	Contenido de Carotenoides en aceites de sacha inchi.....	80
Tabla N° 15.	ANOVA del contenido de carotenoides.....	81
Tabla N° 16.	Tiempo de retención para la identificación de fitoesteroles.....	82
Tabla N° 17.	Contenido de Fitoesteroles en aceites de sacha inchi.....	84
Tabla N° 18.	ANOVA del contenido de fitoesteroles.....	85
Tabla N° 19.	Tiempo de retención para la identificación de tocoferoles.....	86
Tabla N° 20.	Contenido de Tocoferoles en aceites de sacha inchi.....	88
Tabla N° 21a	ANOVA del contenido de tocoferoles totales.....	90
Tabla N° 21b	ANOVA del contenido de tocoferoles.....	90

Tabla N° 22.	Tiempo de retención para la identificación de los ácidos grasos.....	91
Tabla N° 23.	Perfil de ácidos grasos en aceites de sachá inchi.....	93
Tabla N° 24.	ANOVA del contenido de ácidos grasos.....	95
Tabla N° 25.	Curva estándar de Trolox – CAH.....	96
Tabla N° 26.	Capacidad antioxidante hidrofílica en aceites de sachá inchi.....	97
Tabla N° 27.	ANOVA de la capacidad antioxidante hidrofílica.....	98
Tabla N° 28.	Curva estándar de Trolox – CAL.....	99
Tabla N° 29.	Capacidad antioxidante lipofílica en aceites de sachá inchi.....	100
Tabla N° 30.	ANOVA de la capacidad antioxidante lipofílica.....	101
Tabla N° 31.	Capacidad antioxidante total en aceites de sachá inchi.....	102
Tabla N° 32.	ANOVA de la capacidad antioxidante total.....	103
Tabla N° 33.	Datos de pasaporte del material genético de la Colección Nacional de Sachá Inchi (<i>Plukenetia Volubilis L.</i>) procedente de la EEA El Porvenir del Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA. Campaña 2010 – 2011.....	121
Tabla N° 34.	Resultados de la extracción de aceite y del rendimiento de aceite de 16 cultivares de semilla de sachá inchi (<i>Plukenetia Volubilis L.</i>).....	128
Tabla N° 35.	Resultados de los compuestos fenólicos totales (CFT) obtenidos de 16 aceites de sachá inchi.....	129
Tabla N° 36.	Resultados de los carotenoides en 16 aceites de sachá inchi.....	130
Tabla N° 37.	Preparación de diluciones de la curva estándar de fitoesteroles.....	131
Tabla N° 38.	Resultados de los fitoesteroles (campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) obtenidos en 16 aceites de sachá inchi.....	133
Tabla N° 39.	Preparación de diluciones de la curva estándar de tocoferoles.....	134
Tabla N° 40.	Resultados de los tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) obtenidos en 16 aceites de sachá inchi.....	136
Tabla N° 41.	Preparación de diluciones de estándar del Perfil de ácidos grasos.....	137

Tabla N° 42.	Datos del perfil de ácidos grasos totales obtenidos de los cromatogramas de los 16 aceites de sacha inchi.....	138
Tabla N° 43.	Resultados de los principales ácidos grasos obtenidos en 16 aceites de sacha inchi.....	139
Tabla N° 44.	Resultados de la capacidad antioxidante hidrofílica (CAH), obtenidos en 16 aceites de sacha inchi.....	140
Tabla N° 45.	Resultados de la capacidad antioxidante lipofílica (CAL), obtenidos en 16 aceites de sacha inchi.....	141

LISTA DE FIGURAS

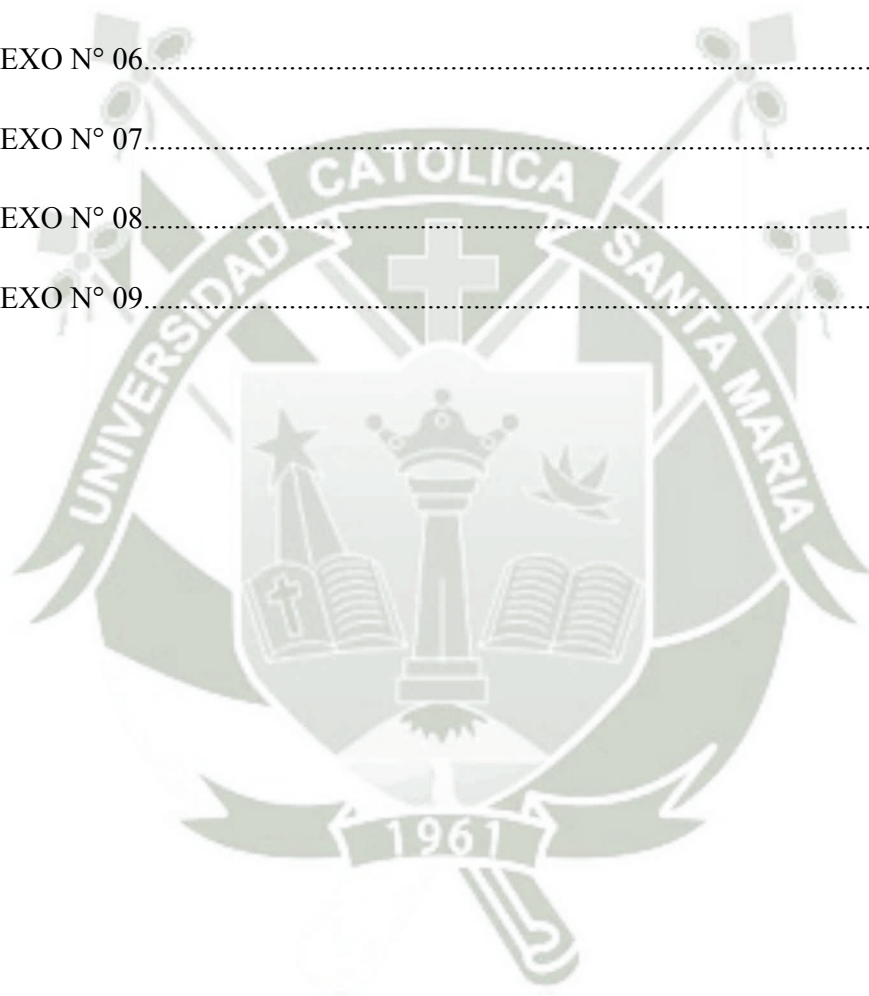
Figura N° 01.	Fruto de Sacha Inchi.....	10
Figura N° 02.	Morfotipo de la semilla de sacha inchi proveniente del departamento de San Martín, Código Nacional PER000394.....	11
Figura N° 03.	Distribución de cultivos de Sacha Inchi (puntos que representan los sitios de recolección de accesiones reportado hasta el 2005), fuente Base del INIEA, Banco de germoplasma de la SUBIRGED, 200.....	13
Figura N° 04.	Formación de un triglicérido.....	17
Figura N° 05.	Estructura de un ácido saturado.....	19
Figura N° 06.	Estructura de un ácido insaturado.....	20
Figura N° 07.	Esquema de la Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados, Prostaglandinas (PG), Leucotrienos (LT), Tromboxanos (TX).....	22
Figura N° 08.	Reacción de Oxidación de un aceite.....	26
Figura N° 09.	Equipo Soxhlet.....	31
Figura N° 10.	Estructura química de un compuesto fenólico.....	39
Figura N° 11.	Estructura de los carotenoides. Licopeno y α y β - caroteno son carotenos, y luteína y zeaxantina son xantofilas.....	43
Figura N° 12.	Formas naturales de vitamina E. Tocoferoles.....	46

Figura N° 13. Estructura de los fitoesteroles más comunes.....	49
Figura N° 14. Fotografías del almacenamiento de los cultivares de semillas.....	55
Figura N° 15. Fotografías del procedimiento de extracción de aceite de sachá inchi.....	56
Figura N° 16. Fotografías del procedimiento de extracción de los compuestos fenólicos.....	58
Figura N° 17. Fotografía del Espectrofotómetro Genesys20, equipo usado para la lectura de las absorbancias de los compuestos fenólicos, carotenoides y capacidad antioxidante.....	59
Figura N° 18. Fotografías del procedimiento de corrida de Fitoesteroles en el Cromatografo de Gases, CG – 2010 PLUS.....	62
Figura N° 19. Fotografía del equipo de HPLC, WATERS 2695.....	64
Figura N° 20. Fotografía del procedimiento de metilación y extracción de los ácidos grasos	67
Figura N° 21. Fotografía del equipo de Cromatografo de Gases, TRACE CG 2000 SERIES.....	68
Figura N° 22. Estructura de la vitamina E y Trolox (análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E).....	69
Figura N° 23. Comparación del rendimiento de aceite de 16 cultivares de semilla de sachá inchi.....	75
Figura N° 24. Representación gráfica de la curva estándar de ácido gálico.....	77
Figura N° 25. Comparación de medias del contenido de compuestos fenólicos en 16 aceites de sachá inchi.....	78
Figura N° 26. Representación gráfica de la curva estándar de β -caroteno.....	79
Figura N° 27. Comparación de medias del contenido de carotenoides en 16 aceites de sachá inchi.....	80
Figura N° 28. Cromatograma de los fitoesteroles (campesterol, estigmasterol y β - sitosterol) de la unidad de aceite PER000408B, obtenido por CG.....	83
Figura N° 29. Comparación del contenido de fitoesteroles (campesterol, Estigmaste- rol y β -sitosterol) respectivamente, en 16 aceites de sachá inchi.....	84

Figura N° 30. Cromatograma de tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) de la unidad de aceite PER000401, obtenido por HPLC.....	87
Figura N° 31. Comparación de tocoferoles (alfa tocoferol, beta tocoferol, gamma tocoferol y delta tocoferol) respectivamente, en 16 aceites de sachá inchi.....	89
Figura N° 32. Cromatograma del perfil de ácidos grasos por CG de la muestra PER000408B.....	92
Figura N° 33. Comparación de contenido en porcentaje de los respectivos ácidos grasos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido vaccénico, ácido linoleico y ácido alfa- linolenico) respectivamente, en 16 aceites de sachá inchi.....	94
Figura N° 34. Representación gráfica de la curva estándar de Trolox - CAH.....	97
Figura N° 35. Comparación de la capacidad antioxidante hidrofílica en 16 aceites de sachá inchi.....	98
Figura N° 36. Representación gráfica de la curva estándar de Trolox - CAL.....	99
Figura N° 37. Comparación de la capacidad antioxidante lipofílica en 16 aceites de sachá inchi.....	101
Figura N° 38. Comparación de la capacidad antioxidante total en 16 aceites de sachá inchi.....	102
Figura N° 39. Correlación entre la capacidad antioxidante total respecto al contenido de tocoferoles totales.....	104
Figura N° 40. Correlación entre la capacidad antioxidante total respecto al contenido de carotenoides.....	105
Figura N° 41. Correlación entre la capacidad antioxidante total respecto al contenido de compuestos fenólicos totales.....	106
Figura N° 42. Galería de imágenes de los 16 cultivares de semilla de sachá inchi, usadas en el presente trabajo de investigación.....	122
Figura N° 43. Representaciones gráficas de las curvas estándar de los fitoesteroles (campesterol, estigmasterol y β -sitosterol).....	132
Figura N° 44. Curvas obtenidas de los estándares de tocoferoles.....	135

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 01.....	121
ANEXO N° 02.....	128
ANEXO N° 03.....	129
ANEXO N° 04.....	130
ANEXO N° 05.....	131
ANEXO N° 06.....	134
ANEXO N° 07.....	137
ANEXO N° 08.....	140
ANEXO N° 09.....	141



ABREVIATURAS

HPLC	Cromatografía Líquida de Alta performance
NCBI	National Center for Biotechnology Information
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
INIEA	Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria
EPA	Acido Eicosapentaenoico
DHA	Acido docosaheptaenoico
AMO	Método de oxígeno activo
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ADHD	Trastorno de Déficit de atención con hiperactividad
DNA	Acido desoxirribonucleico
GPx	Glutación peroxidasa
GRed	Glutación reductasa
GST	Glutación-s- transferasa
GSH	Glutación reducido
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RCS	Especies reactivas de cloro
CAO	Capacidad antioxidante
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfonato)

TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
HAT	Transferencia de átomos de hidrogeno
ET	Transferencia de electrones individuales
TTP	Proteína de transferencia de tocoferol
ATP	Adenosin Trifosfato
ACAT	Acil CoA-colesterol-acil- transferasa
CFT	Compuestos fenólicos totales
FC	Folin- Ciocalteau
GAE	Equivalente ácido gálico
BHT	Butil hidroxitolueno
CG	Cromatografía de Gases
μM	Micromol
TE	Trolox equivalente
ANOVA	Análisis de varianza
CAH	Capacidad antioxidante hidrofílica
CAL	Capacidad antioxidante lipofílica
CAT	Capacidad antioxidante total

RESUMEN

En la presente investigación se trabajó con semillas de 16 accesiones de *Plukenetia Volubilis L.* (Sacha Inchi), procedentes de los departamentos de San Martín y Loreto, de los cuales mediante una extracción por Soxhlet se obtuvieron aceites, en los cuales se determinó los diferentes compuestos bioactivos presentes en ellos.

El rendimiento de aceite de las 16 accesiones de semillas, presentó resultados que oscilan entre 37.57 – 33.24%.

En cuanto al contenido de compuestos fenólicos desarrollado por el método Folin – Ciocalteu, osciló entre 58.98 - 69.66 mg de ácido gálico/100g aceite. El contenido de carotenoides presentó resultados que oscilan entre 0.15 - 0.33 mg β -caroteno/100g aceite.

En el contenido de fitoesteroles evaluado por cromatografía de gases, con respecto a los fitoesteroles; campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, se obtuvieron resultados que oscilan entre 19.75 – 24.60 mg campesterol/100 g aceite, 61.45 - 77.25 mg estigmasterol/100 g aceite y 123.99 - 154.59 mg β -sitosterol/100 g aceite.

El contenido de tocoferoles determinado por HPLC, en el cual se identificó 4 tipos de tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta tocoferol), se obtuvo un promedio de 212.32 mg tocoferol/100 g aceite respecto a los tocoferoles totales entre los 16 aceites, por

otro lado se obtuvieron resultados independientes de cada uno de los tocoferoles, los cuales oscilaron entre 7.69 – 7.92 mg α -tocoferol/100 g aceite , 3.09 - 3.53 mg β -tocoferol/100 g aceite, 70.29 – 160.13 mg γ -tocoferol/100 g aceite y 40.12 – 94.45 mg δ -tocoferol/100 g aceite.

El análisis de ácidos grasos reveló que los ácidos α -linolenico y ácido linoleico fueron los principales ácidos presentes en mayor proporción en los diferentes aceites estudiados, con un promedio de 41.26 y 37.55% respectivamente. También se presentaron ácidos como; ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido vaccénico.

Por otro lado la cuantificación de la capacidad antioxidante hidrofílica, lipofílica y total por ABTS, expresado en equivalente de Trolox, presentaron valores entre 0.89 – 23.65 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g aceite}$ de capacidad antioxidante hidrofílica, 747.22 – 1008.18 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g aceite}$ de capacidad antioxidante lipofílica y 751.71 – 1016.79 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g aceite}$ de capacidad antioxidante total, entre los 16 aceites estudiados.

Todos los resultados encontrados, respecto al contenido de carotenoides, fitoesteroles, tocoferoles, ácidos grasos y capacidad antioxidante, presentaron diferencias significativas estadísticamente (Prueba de Tukey), entre los 16 aceites estudiados, permitido así determinar que existen diferencias concretas en los compuestos bioactivos presentes entre las muestras de aceites estudiadas.

Los resultados indican que el aceite de sacha inchi por sus cualidades tendría importantes aplicaciones en la industria de alimentos e industria farmacéutica por los compuestos bioactivos que este presenta.

Palabras Claves: *Plukenetia Volubilis L.* (Sacha Inchi), Compuestos Fenólicos Totales, Carotenoides, Fitoesteroles, Tocoferoles, Ácidos Grasos, Capacidad Antioxidante Hidrofílica, Capacidad Antioxidante Lipofílica.

ABSTRACT

In the present investigation was working with seeds of 16 accessions of *Plukenetia Volubilis* L. (Sacha Inchi), from the departments of San Martín and Loreto, of which using a Soxhlet extraction oils were obtained, in which it was determined the different bioactive compounds present in them.

The performance of oil of the 16 accessions of seeds, presented results ranging between 37.57 - 33.24 %.

As for to the contents of phenolic compounds developed by the method Folin - Ciocalteu, ranged between 58.98 - 69.66 mg of gallic acid/ 100 g of oil. The carotenoid content presented results ranging between 0.15 - 0.33 mg β -carotene/ 100g of oil.

In the content of phytosterols evaluated by gas chromatography, with regard to phytosterols; campesterol, stigmasterol and β -sitosterol, we obtained results that ranged from 19.75 - 24.60 mg campesterol/ 100 g of oil, 61.45 - 77.25 mg stigmasterol/ 100 g of oil and 123.99 - 154.59 mg β -sitosterol/ 100 g of oil.

The tocopherols content determined by HPLC, in which identified 4 types of tocopherols (alpha, beta, gamma and delta tocopherol), was obtained an average of 212.32 mg tocopherol/ 100 g of oil with regard to the tocopherols totals between the 16 oils, on the other hand were obtained results independent of each one of the tocopherols, which ranged from 7.69 - 7.92 mg α -tocopherol/ 100 g of oil, 3.09 - 3.53 mg β -tocopherol/ 100 g of oil, 70.29 - 160.13 mg γ -tocopherol/ 100 g of oil and 40.12 - 94.45 mg δ -tocopherol/ 100 g of oil.

Fatty acid analysis revealed that the acid α -linolenic and linoleic acid were the main acids present in greater proportion in the different oils studied, with an average of 41.26 and 37.55 % respectively. Also were presented acids as; palmitic acid, stearic acid, oleic acid and vaccenic acid.

On the other hand the quantification the hydrophilic antioxidant capacity, lipophilic and total for ABTS, expressed in equivalent of Trolox, gave values of between 0.89 - 23.65 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g oil}$ hydrophilic antioxidant capacity, 747.22-1008 .18 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g oil}$ lipophilic antioxidant capacity and 751.71-1016 .79 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g oil}$ total antioxidant capacity, among the 16 oils studied.

All results, regarding the content of carotenoids, phytosterols, tocopherols, fatty acids and antioxidant capacity, presented statistically significant differences (Tukey test) among the 16 oils studied, allowing to determine that there are specific differences in the compounds bioactive between oils units studied.

The results indicate that sachu inchi oil for his qualities would have important applications in the food industry and pharmaceutical industry for bioactive compounds that this presents.

Keywords: *Plukenetia Volubilis L.* (Sacha Inchi), total phenolic compounds, carotenoids, phytosterols, tocopherols, fatty acids, antioxidant hydrophilic capacity, lipophilic antioxidant capacity.

INTRODUCCION

El *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi), conocido como “Inca peanut”, “maní del inca”, “maní del monte”, es una planta oleaginosa que pertenece a la familia *Euphorbiaceae* que crece en la selva tropical de América en altitudes entre 200 y 1500 m (Guillen *et al.*, 2003). En la Amazonia Peruana representa un cultivo promisorio de gran importancia, pues ha sido un componente en la dieta de varios grupos nativos cuyas semillas presentan altos contenidos de aceite, proteínas, ácidos grasos esenciales tipo omega-3, omega-6, omega-9 y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), en cantidades significativamente mayores que otras semillas oleaginosas como el maní, palma, soya, maíz y girasol (Hamaker *et al.*, 1992).

Se ha observado que esta especie presenta una amplia variabilidad tanto en su morfología, en su capacidad de producción por planta y en contenido de aceite; por lo que actualmente el INIA- “El Porvenir” cuenta con 51 accesiones colectadas en diferentes departamentos del Perú (Corazon *et al.*, 2009).

Como se sabe los aceites y las grasas constituyen uno de los tres grandes grupos de alimentos, siendo los otros dos las proteínas y los carbohidratos. Desde el punto de vista químico, los aceites vegetales, están constituidos principalmente de triglicéridos (95%) y otros componentes minoritarios. Estos componentes minoritarios se encuentran en proporciones diferentes dependiendo de las condiciones agronómicas, climáticas, la especie, la calidad de los frutos y frutos secos, sistemas de extracción y condiciones de almacenamiento (Lawson, 1999)

Los componentes minoritarios de los aceites vegetales están constituidos por compuestos como los diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y compuestos insaponificables. Dentro de la fracción insaponificable se encuentran los carotenos, tocoferoles, tocotrienoles, alcoholes grasos lineales, fitoles, metil esteroides y esteroides (Lawson, 1999 y Bailey, 1984).

Diferentes estudios han demostrado la presencia de estos compuestos de la fracción insaponificable en el aceite de sacha inchi, los cuales tienen características y

funciones importantes; como los tocoferoles, que por su ingesta están asociados a un reducido riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que actúan como potentes antioxidantes en concentraciones altas de oxígeno (Murray *et al.*, 2001). Los carotenoides, compuestos que por su ingesta están implicados en la prevención de enfermedades como el cáncer y enfermedades del corazón, ya que son eficaces antioxidantes en concentraciones bajas de oxígeno (Britton, 1995). Los compuestos fenólicos, presentes en la mayoría de los alimentos vegetales y tienen papeles importantes como antioxidantes, antimutagénicos y removedores de radicales libres (Bravo, 1998) y por otro lado los fitoesteroles, que actúan disminuyendo los niveles del colesterol total y colesterol LDL (Muñoz *et al.*, 2011). Los compuestos mencionados tales como los tocoferoles, compuestos fenólicos y carotenoides en general presentan acciones importantes como antioxidantes naturales, los cuales contribuyen al refuerzo de las defensas naturales del organismo y previenen enfermedades que están asociadas con el estrés oxidativo (Lampe 1999; Prior 2003).

Por otro parte la presencia de ácidos grasos en el aceite de sacha inchi, como el omega-3 y omega- 6 son de gran importancia, ya que estos presentan acciones importantes como es el caso del omega-3, el cual está relacionado en la prevención de las enfermedades coronarias, así como también se ha demostrado que estos ácidos presentan efectos hipocolesterolémicos cuando son usados como suplementos alimenticios (Follegatti-Romero *et al.*, 2009).

Por lo tanto, estas características del aceite de sacha inchi hace que este tenga propiedades ideales para mejorar la dieta alimenticia de las personas. Por otro lado, el valor del sacha inchi radica no sólo en los aspectos alimenticios, culturales e históricos, sino también en su rentabilidad económica debido a que es un cultivo con un rendimiento económico potencial y grandes posibilidades de industrialización (Arévalo, 1995).

Dada la importancia del aceite de este cultivo, el presente trabajo tiene como finalidad contribuir con el conocimiento en la determinación de los diferentes compuestos bioactivos presentes en los aceites obtenidos de semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi, provenientes de diferentes departamentos del Perú.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar los diferentes componentes bioactivos en los aceites extraídos de semillas de 16 accesiones de *Plukenetia Volubilis L.* (Sacha Inchi).

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Obtener y evaluar el rendimiento de aceite de las semillas de las 16 accesiones de Sacha Inchi a través de una extracción por Soxhlet.
- Determinar los compuestos fenólicos totales, carotenoides, fitoesteroles, tocoferoles, ácidos grasos en los aceites extraídos de semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi.
- Evaluar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica, que se debe a los componentes estudiados en los aceites extraídos de semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi.
- Determinar la variabilidad existente entre los aceites extraídos de semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi.

HIPOTESIS

Dado que el aceite de Sacha Inchi presenta una concentración elevada de ácidos grasos insaturados y antioxidantes (tocoferoles, compuestos fenólicos, carotenoides, etc.), es de suponer que exista una diferencia de sus componentes bioactivos entre los aceites extraídos de semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi.



CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 SACHA INCHI

1.1.1. CLASIFICACION Y NOMBRES COMUNES

Posición taxonómica de *Plukenetia volubilis* L.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	Plukenetia
Especie:	<i>Plukenetia volubilis</i> L.

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Nombres comunes:

La especie *Plukenetia volubilis* L., es conocida con varios nombres, que varía de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres: “maní del monte”, “maní estrella”, “sacha inchi” o “maní del inca” (Soukup, 1987). Internacionalmente la revista especializada Cereal Chemistry de los Estados Unidos (USA), citada por Valles 1993, presentó al “Sacha Inchi” ante la comunidad científica internacional como “Maní del Inca” (Inca peanut).

El Sacha inchi pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, que constituye una extensa familia de plantas anuales que se caracterizan principalmente por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos tricapsulares; por otro lado presentan flores, de las cuales muchas de ellas son de aspecto similar a los cactus y se conocen con el nombre genérico de euforbias. Esta familia

abarca alrededor de 1280 géneros y unas 8.000 especies aproximadamente observándose una distribución en todo el orbe. (Bailey, 1949)

1.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL SACHA INCHI

El Sacha inchi es un arbusto trepador o rastrero silvestre que se le encuentra en bordes de bosques secundarios, en cañaverales, sobre cercos vivos y como malezas en platanales y cultivos perennes (Valles, 1995).

Las hojas son alternas, de 9-16 cm. de largo y 6-10 cm. de ancho y de color verde oscuro, oval-elíptico, aseruladas y pinnitinerias. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi – arriñonada (Manco, 2006).

Las flores presentan un alto porcentaje de polinización cruzada, lo cual indica que se trata de un especie alogama. Se observan 2 tipos de flores: las masculinas que son pequeñas, blanquecinas y están dispuestas en racimos y las femeninas que se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores (Cachique, 2006).

El fruto se presenta como una cápsula de 3.5 – 4.5 cm. de diámetro con 4 lóbulos aristados (tetra lobados) dentro de los cuales se encuentran 4 semillas. Excepcionalmente, algunos ecotipos presentan cápsulas con 5 a 7 lóbulos como se observa en la Figura N°01 (Manco, 2006).



Figura N° 01. Fruto de Sacha Inchi.

Fuente: kizuna Earth

La semilla es ovalada, de color marrón oscuro, ligeramente abultada en el centro y aplastadas hacia el borde como se observa en la Figura N°02. Según algunos ecotipos, el diámetro fluctúa entre 1.3 – 2.1 cm. (Valles, 1995).



Figura N° 02. Morfotipo de la semilla de Sacha Inchi proveniente del departamento de San Martín, Código Nacional PER000394.

1.1.3. CARACTERISTICAS ECOLOGIAS DEL SACHA INCHI

La planta de sachá inchi, crece desde los 100 m.s.n.m. en la Selva Baja y 2000 m.s.n.m. en la Selva alta. Presenta un buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonia Peruana (min. 10°C y máx. 36°C). Las temperaturas muy altas son desfavorables y ocasionan la caída de flores y frutos pequeños, principalmente los recién formados. 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 (Manco, 2006).

La planta 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. Por otro lado el exceso de agua incrementa los daños por enfermedades en las plantas (Manco, 2006).

La planta de sachá inchi presenta una amplia adaptación a diferentes tipos de suelos, crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. Nuestro

territorio selvático favorece el crecimiento de esta planta, que por sus características es llamada a ser importante alternativa para suelos ácidos en los que se cultivó coca (Valles, 1995).

1.1.4. ORIGEN Y DISTRIBUCION

El género *Plukenetia* comprende 17 especies de distribución pantropical, 12 en América, 03 en África, 01 en Madagascar y 01 en Asia (Gillespie, 1993).

Plukenetia Volubilis L., es una planta nativa de la Amazonia peruana que fue descrita por primera vez, como especie, en el año 1753 por el naturalista Linneo; de ahí su nombre científico (Brack, 1999). En América del Sur su presencia ha sido registrada en Bolivia y en la Amazonía Peruana (Arévalo, 1995).

En la Amazonia peruana esta planta se encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Cusco, Amazonas, Loreto y Madre de Dios (Manco, 2006). El sachá inchi también fue cultivado en la costa peruana en la época prehispánica, ya que se encontraron semillas y representaciones en cerámicas de las culturas Chimú y Mochica (Brack, 1999), así como también esta planta fue conocida por la antiguas tribus chancas de la zona de Tarapoto (García, 1992).

En el Perú, en el año de 2005 a través de la ley N° 28477, el sachá inchi fue declarado como Patrimonio genético nacional y producto alternativo en la lucha contra la pobreza (Higuchi, 2004 y Diario Oficial El Peruano). En la actualidad el INIEA (Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria), mantiene la colección nacional más importante de sachá inchi, la cual está constituida por 51 accesiones colectadas en diferentes departamentos de la Amazonía peruana, como se muestra en la Figura N°03 (Corazon *et al.*, 2009).

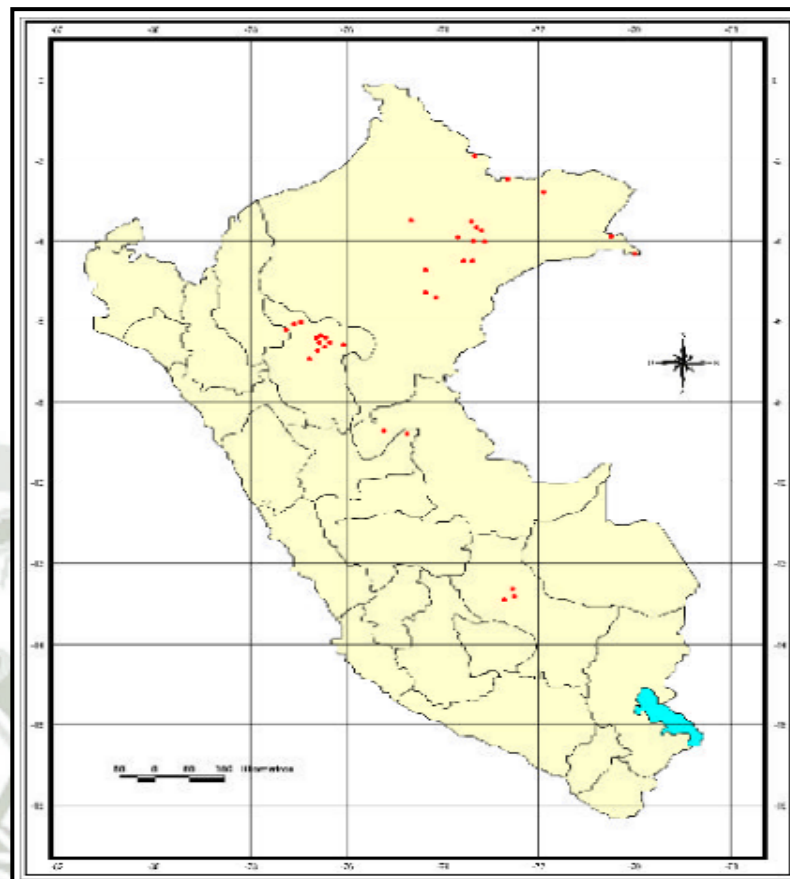


Figura N°03. Distribución de cultivos de Sacha Inchi (puntos que representan los sitios de recolección de accesiones reportado hasta el 2005), fuente Base de datos del INIEA, Banco de germoplasma de la SUBIRGED, 2007.

1.1.5. ESTUDIOS DE CARACTERIZACION EN SACHA INCHI

Se han realizado diferentes estudios morfológicos, agronómicos, bioquímicos, moleculares, de *Plukenetia Volubilis L.*, así como también investigaciones aplicadas en la salud con respecto a diversas enfermedades. Entre ellas tenemos:

El estudio realizado por Pascual y Mejía, 2000, demostraron que las semillas de sacha inchi presentan un rendimiento de aceite de 51,4%. Este mismo trabajo determinó la presencia de ácidos grasos en el aceite crudo de sacha inchi, destacando el ácido linolénico (43,75 %), ácido linoleico (36,99 %) y ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (5,61 %).

Otro estudio realizado en aceite de sacha inchi, demostró un contenido de ácidos grasos poliinsaturados (82,21 %), mono insaturados (9,62 %) y saturados (7,62%) . Así mismo, se demostró la actividad hipolipemiante del aceite de sacha inchi, el cual no produce toxicidad a dosis límite (Gorriti *et al.*, 2006).

A través de otro estudio se determinó que la torta de sacha inchi contiene compuestos fenólicos como; 3.51mg/kg de cafeíco, 42.93 mg/kg de rutina, 53.24 mg/kg de morina y 28.46mg/kg de hesperidina. Mientras que el aceite de sacha inchi presentó fitoesteroles en promedio 75.49 mg/100g de estigmasterol y 74.62 mg/100 de β - sitosterol (Muñoz *et al.*, 2010).

Por otro lado, estudios realizados en 10 diferentes ecotipos de semillas de sacha inchi, demostraron que el ecotipo de Lamas presentó un rendimiento de aceite de 41.7%, el que superó en 1,2 % al ecotipo de Shanao. Se sabe que la calidad del aceite está dada por el alto contenido de ácidos grasos insaturados, es así como los ecotipos de Lamas y Shanao mostraron un alto contenido de estos de 91,33 y 88,81% respectivamente (Benavides *et al.*, 1994).

Los estudios moleculares, de los perfiles genéticos entre 13 accesiones estudiadas, mostraron una alta diversidad con un total de 23 genotipos diferentes. El conocimiento de la distribución de la diversidad genética de los cultivos, es de vital importancia cuando se pretenden desarrollar programas exitosos de mejoramiento y conservación de una especie. (Corazon *et al.*, 2009).

Según estudios aplicados en la salud y respecto al consumo del aceite de sacha inchi en pacientes con hiperlipoproteinemia, se observó que tras la administración de una suspensión a dosis de 2g de omega-3, las concentraciones de las fracciones aterógenas de la sangre disminuían y al mismo tiempo incrementaban los niveles de HDL (Garmendia *et al.*, 2011).

Otro estudio demostró que el consumo de *Plukenetia volubilis L.*, disminuye la trigliceridemia postprandial en adultos jóvenes, por tanto se resaltó la

importancia del consumo de este cultivo por ser rico en omega-3 (Huamán *et al.*, 2008).

1.1.6. USOS

Se dice que los Hampicamayoc o médicos oficiales del Inca, usaban esta almendra sin conocer las propiedades que esta brindaba, la cual combinada con la maca, otra planta con alto valor nutricional, mantenía muy vigorosos a los guerreros (Fernández, 2007).

En la Amazonía Peruana las mujeres nativas usan la mezcla del aceite y la harina de Sacha inchi, agregando aceite de ungurahui para preparar una crema que revitaliza y rejuvenece la piel. Asimismo con el aceite frotran sus cuerpos para calmar dolores musculares y reumáticos (Fernández, 2007).

Las semillas son usadas para la alimentación en la preparación de diversos platos como el inchicapi, ají de sachá inchi, mantequilla de sachá inchi, inchi cucho, etc. (Brack, 1999).

Los posibles campos de aplicación en la salud, se da en caso de enfermedades coronarias, artritis, diabetes, ADHD y enfermedades inflamatorias de la piel (Hanssen y Schmitz, 2011).

Por otro lado, el aceite de sachá inchi al presentar un interesante perfil de ácidos grasos, con predominio de ácidos grasos insaturados ha sido introducido con éxito en la dieta de los suplementos en los mercados de marca (Hanssen, 2008).

Así, dependiendo de las características varietales en cuanto a contenido y calidad de aceite y proteína, el sachá inchi constituye uno de los recursos vegetales más importantes como complemento en la alimentación humana y animal, así como presenta grandes posibilidades de industrialización y un rendimiento económico potencial para reemplazar en alguna medida el cultivo de la coca un problema que afecta a nuestro país (García, 1992).

1.1.7. ACEITE DE SACHA INCHI

A principios de la década de 1990, el aceite derivado de la tuerca de sacha inchi, fue investigado más intensamente (Hamaker *et al.*, 1992). Se encontró que el aceite contiene contenidos notablemente altos de ácido linolénico (49%) y ácido linoleico (36%). Estos resultados fueron confirmados más tarde por un nuevo estudio, el cual clasifica al aceite de sacha inchi como un aceite comestible, con la mayor proporción de ácidos grasos insaturados. (Guillén *et al.*, 2003).

Las semillas de sacha inchi, comparado con otras semillas oleaginosas como el maní, el girasol, etc., presenta un mayor rendimiento de aceite y un alto contenido de ácido linolénico, como se observa en la Tabla N°01. El alto contenido de ácido linolénico, podría conducir a la rancidez oxidativa del aceite, sin embargo algunos estudios han demostrado que el aceite de sacha inchi posee cierta estabilidad, que puede ser explicada por la presencia de alfa tocoferol y caroteno (Hamaker *et al.*, 1992).

Tabla N° 01. Perfil de ácidos grasos del aceite de Sacha Inchi comparado a otros aceites de semillas oleaginosas ^a

Ácidos grasos	Sacha Inchi	Soya	Maní	Algodón	Girasol
Aceite total	54	19	45	16	48
Saturado					
C_{14:0}, Mirístico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C_{16:0}, Palmítico	4.5	10.5	12.0	18.7	7.5
C_{18:0}, Estearico	3.2	3.2	2.2	2.4	5.3
Insaturado					
C_{16:0}, Palmitoleico	0.0	0.0	0.3	0.6	0.0
C_{18:0}, Oleico	9.6	22.3	41.3	18.7	29.3
C_{18:2}, Linoleico	36.8	54.5	36.8	57.5	57.9
C_{18:3}, Linolénico	45.2	8.3	0.0	0.5	0.0
C_{20:1}, Gadoleico	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0

^a todos los valores mostrados son porcentajes. Los valores para la soya, maní, algodón y girasol fueron tomados de Bodwell and Hopkins (1985).

Fuente: Hamaker *et al.*, 1992.

Por presentar una alta cantidad de ácido linolénico, el aceite de sacha inchi pertenece al grupo de los ácidos linolénicos. Los aceites de este grupo contienen cantidades sustanciales de ácido linolénico, entre ellos están los aceites de soja, germen de trigo, linaza, cáñamo y perilla (Bernardini, 1981).

Por tanto, la importancia de este aceite radica en su composición de ácidos grasos, ya que presentan una cantidad mínima de ácidos grasos saturados, aquellos que afectan a la salud y por presentar altos contenidos de ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico y α -linolénico, que son esenciales y de suma importancia para el cumplimiento de ciertas funciones fisiológicas en el cuerpo humano (Mejía, 1997).

1.2 ACEITES VEGETALES

1.2.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LOS ACEITES

Los aceites y grasas, son sustancias de origen vegetal o animal, que consisten en mezclas predominantes de ésteres de la glicerina con los ácidos grasos, es decir triglicéridos. En general el término “grasa” se usa para referirnos a los materiales sólidos o más bien sólidos a la temperatura ambiente; mientras que el término “aceite” se refiere a los que son líquidos en las mismas condiciones (Bailey, 1984).

Los factores más importantes que hacen que una sustancia formada por triglicéridos sea sólida o líquida, son el tamaño de las cadenas de los ácidos grasos y la relación entre la cantidad de ácidos grasos saturados e insaturados (Lawson, 1999).

Desde el punto de vista estructural, un triglicérido puede formarse por la condensación de una molécula de glicerol con tres moléculas de ácidos grasos, para dar tres moléculas de agua y una de un triglicérido como se observa en la Figura N°04 (Bailey, 1984).

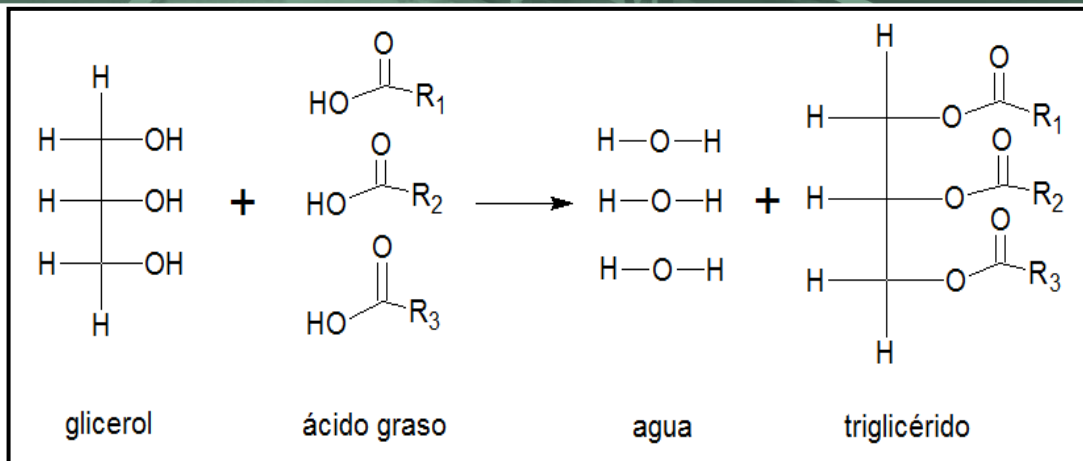


Figura N°04. Formación de un triglicérido

Fuente: Bailey, 1984

Si solamente se unen dos ácidos grasos a una molécula específica de glicerol, tenemos un diglicérido y si se une solo un ácido graso, la molécula es un monoglicérido. Los monoglicéridos y diglicéridos se forman también en el tracto intestinal como resultado de la digestión normal de los triglicéridos (Lawson, 1999).

El componente mayoritario de todas las grasas y aceites son los triglicéridos, representando más del 95% del peso de la mayoría de las grasas alimentarias en la forma en la cual son consumidas. Por otro lado, aquellos ácidos grasos que no están unidos a un glicerol o a alguna molécula en el aceite o grasa son denominados “ácidos grasos libres”, los que están presentes en cantidades relativamente altas en la mayoría de los aceites no refinados (0.5-1.5%), mientras que los aceites y las grasas refinadas que están listos para uso alimenticio, presentan niveles inferiores al 0.05% (Lawson, 1999).

1.2.1.1 ACIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son principalmente cadenas rectas alifáticas saturadas o insaturadas con un número par de átomos de carbono y un grupo carboxilo. Generalmente los ácidos grasos tienen de 4-22 átomos de carbono (Lawson, 1999). Estos ácidos grasos se presentan en los aceites naturales como ésteres, pero también se les encuentra sin esterificar como ácidos grasos libres, los cuales sirven como modalidad plasmática de transporte. Las cadenas que presentan los ácidos grasos pueden ser

saturadas (sin dobles ligaduras) o no saturadas (con una o más dobles ligaduras) (Murray *et al.*, 2001).

La nomenclatura sistemática usada para los ácidos grasos, se basa en poner el nombre del hidrocarburo con el mismo número de átomos de carbono, sustituyéndola al final por la terminación –oico, así los ácidos grasos saturados terminan en –anoico y los ácidos grasos no saturados terminan en –enoico (Murray *et al.*, 2001).

1.2.1.2 ACIDOS GRASOS SATURADOS

Los ácidos grasos saturados teóricamente se pueden considerar como provenientes del ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), que sería el primer miembro de la serie en la cual se adicionan progresivamente $\text{-CH}_2\text{-}$ entre los grupos -COOH y el $\text{CH}_3\text{-}$ terminal (Murray *et al.*, 2001).

En la ilustración de un ácido graso saturado como se observa en la Figura N°05, podemos observar como todos los átomos de carbono tienen uniones con los otros átomos, incluidos los átomos de carbono de la molécula. El “R” es el resto de la molécula, si se tratara de una molécula de 18 átomos de carbono, 15 átomos de carbono estarían incluidos en “R” (Lawson, 1999).

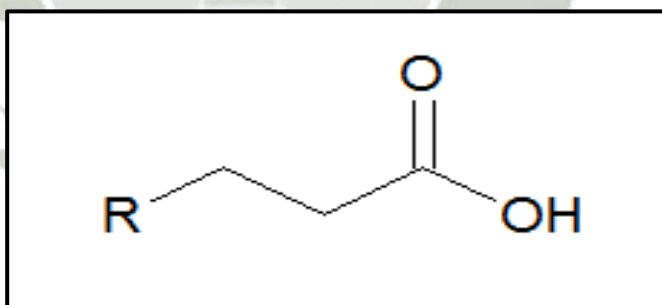


Figura N° 05. Estructura de un ácido saturado

Fuente: Lawson, 1999

Los principales ácidos grasos saturados se muestran en la Tabla N°02, donde se observa los nombres comunes, número de átomos de carbonos y fórmula química de estos (Lawson, 1999).

Tabla N° 02. Ácidos Saturados

Nombre Común	Nombre de Ginebra	N° de átomos de Carbono	Formula
Acético	Etanoico	2	CH ₃ COOH
Butírico	Butanoico	4	C ₃ H ₇ COOH
Caproico	Hexanoico	6	C ₅ H ₁₁ COOH
Caprílico	Octanoico	8	C ₇ H ₁₅ COOH
Cáprico	Decanoico	10	C ₉ H ₁₉ COOH
Laurico	Dodecanoico	12	C ₁₁ H ₂₃ COOH
Mirístico	Tetradecanoico	14	C ₁₃ H ₂₇ COOH
Palmítico	Hexadecanoico	16	C ₁₅ H ₃₁ COOH
Estearico	Octadecanoico	18	C ₁₇ H ₃₅ COOH
Araquídico	Eicosanoico	20	C ₁₉ H ₃₉ COOH
Behénico	Docosanoico	22	C ₂₁ H ₄₃ COOH

Fuente: Lawson, 1999.

1.2.1.3 ACIDOS GRASOS INSATURADOS

Denominamos ácidos grasos insaturados, a aquellos ácidos grasos que en sus cadenas estructurales presentan un doble enlace entre dos átomos de carbono, como se observa en la Figura N°06. Este doble enlace se traduce como una unión que es más reactiva entre estos dos átomos de carbono, lo que en consecuencia manifiesta la capacidad de fijar hidrogeno (u otro elemento) en este doble enlace. De esta manera, un ácido graso insaturado puede reacción con hidrogeno para romper el enlace y formar un ácido saturado (Lawson, 1999).

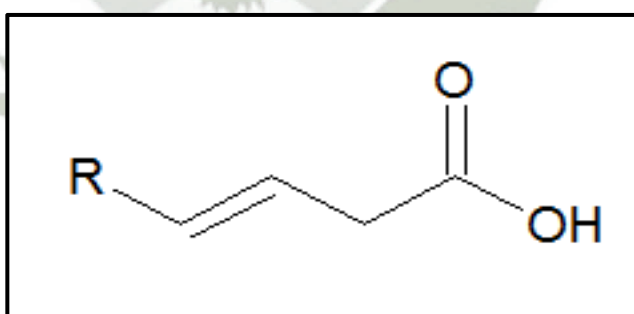


Figura N° 06. Estructura de un ácido insaturado

Fuente: Lawson, 1999

En la tabla N°03, observamos lo principales ácidos insaturados.

Tabla N° 03: Ácidos Insaturados

Nombre Común	Nombre de Ginebra	Numero de dobles enlaces	N° de átomos de Carbono	Formula
Miristoleico	Tetradecenoico	1	14	C ₁₃ H ₂₅ COOH
Palmitoleico	Hexadecenoico	1	16	C ₁₅ H ₂₉ COOH
Oleico	Octadecenoico	1	18	C ₁₇ H ₃₃ COOH
Linoleico	Octadecadienoico	2	18	C ₁₇ H ₃₁ COOH
Linolenico	Octadecatrienoico	3	18	C ₁₇ H ₂₉ COOH
Araquidónico	Eicosatetraenoico	4	20	C ₁₉ H ₃₁ COOH
Erucico	Docosenoico	1	22	C ₂₁ H ₄₁ COOH

Fuente: Lawson, 1999.

Estos ácidos grasos insaturados se pueden subdividir según el grado de insaturación en: (Murray *et al.*, 2001)

1. Ácidos monoinsaturados (monoetenoide, monoenoico), que contienen una doble ligadura.
2. Ácidos poliinsaturados (polietenoide, polienoico), que contienen dos o más dobles ligaduras.
3. Eicosanoides: Estos compuestos derivados de los ácidos grasos eicosapolienoicos (20-C), comprenden a los prostanoideos y los leucotrienos (LT). Los prostanoideos incluyen a las prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI) y tromboxanos (TX).

En los ácidos grasos insaturados existe un tipo de isomería geométrica, dependiendo de la orientación de los átomos o grupos funcionales que se encuentran alrededor del eje de las dobles ligaduras. En su forma natural, presentan mayoritariamente isomería *cis* (95%), en donde todas las funciones metabólicas y estructurales de los ácidos grasos se encuentran asociadas a ella, sin embargo termodinámicamente la isomería *trans* genera estructuras más estables (Nakamura y Nara, 2004).

Otro sistema de nomenclatura para los ácidos grasos insaturados es la clasificación <<omega>> o <<n menos>>. Este término <<omega>>, es usado con frecuencia por bioquímicos para designar lugares de reactividad o especificidad enzimática, es decir se refiere a la posición del doble enlace del ácido graso más cercana al grupo metilo terminal de la molécula. Así

pues el ácido oleico, que tiene su doble enlace en el carbono número 9 a partir del metilo terminal se considera un ácido omega-9 (o un n-9). De modo similar, el ácido linoleico, común en los aceites vegetales es un ácido graso omega-6 y el ácido alfa linolénico que se encuentra en ciertos vegetales, es también un ácido omega-3 (Lawson, 1999).

1.2.1.4 ACIDOS GRASOS ESENCIALES

Los ácidos grasos esenciales se pueden dividir en dos familias: la familia omega-6 (ó n-6) y la familia omega-3 (ó n-3). La familia omega-6 deriva del ácido linoleico (18:2 n-6) y se encuentra en el aceite de girasol, maíz, trigo, uva y cacahuate, mientras que la familia omega-3, con tres dobles enlaces, deriva del ácido α -linolénico (18:3 n-3), que es un ácido graso que se encuentra mayormente en el aceite de colza y soja, con tres dobles enlaces. Tanto el ácido linoleico como el ácido α -linolénico son ácidos grasos esenciales, ya que no pueden ser sintetizados por el organismo y por lo tanto deben ser aportados en la dieta (Sanders, 2000).

Los diferentes números y posiciones de los dobles enlaces de la cadena, le confieren a los ácidos grasos esenciales diferentes propiedades fisiológicas derivadas de su metabolismo. El ácido linoleico se metaboliza a ácido araquidónico (AA) (20:4 n-6) y el ácido α -linolénico da lugar al EPA (20:5 n-3) y al DHA (22:6 n-3), mediante la acción de elongasas y desaturasas como se observa en la Figura N°07 (Nakamura y Nara, 2003)

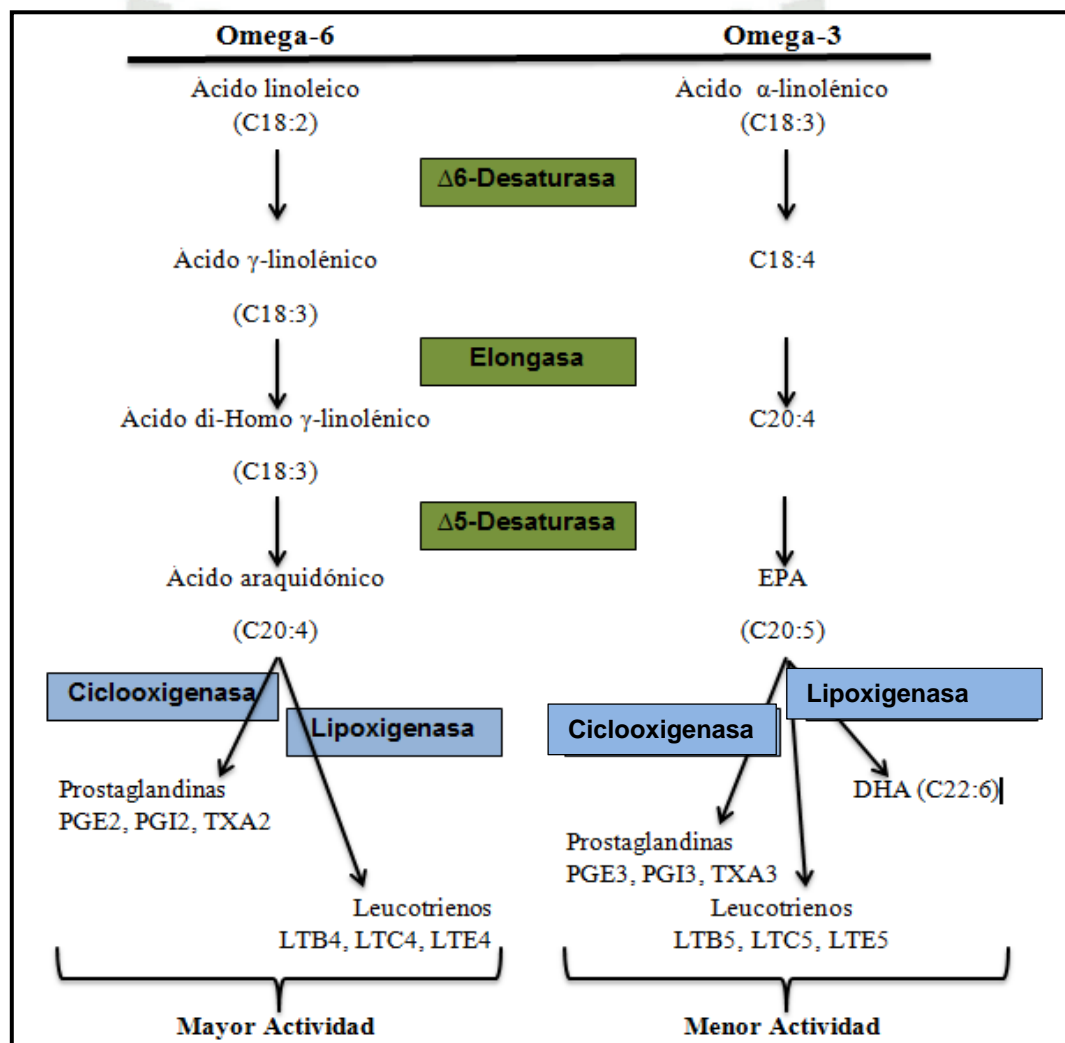


Figura N° 07. Esquema de la Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados. Prostaglandinas (PG), Leucotrienos (LT), Tromboxanos (TX).

Fuente: Martin, 2006

Las prostaglandinas y tromboxanos son hormonas locales que son sintetizadas con rapidez en el momento en que se necesitan y que actúan cerca de los sitios de su síntesis. Las principales actividades fisiológicas de las prostaglandinas son actuar como reguladores de la acción de la adenililo ciclasa, por ejemplo en el control de la agregación plaquetaria y en la inhibición del efecto de la hormona antidiurética en el riñón. Por otro lado los leucotrienos producen contracción muscular y tienen propiedades quimiotácticas, por tanto tiene una intervención importante en las reacciones alérgicas y en la inflamación (Murray *et al.*, 2001).

Por otro lado, el ácido docosahexaenoico (DHA. Omega 3,2:6), que se sintetiza a partir del ácido alfa linolénico o se obtiene de manera directa de aceites de pescado, existe en concentraciones elevadas en la retina, la corteza cerebral, los testículos y el esperma, por lo tanto el DHA es requerido durante el desarrollo cerebral y es suministrado a través de la placenta y la leche. Muchos recién nacidos prematuros tienen una baja actividad de $\Delta 4$ saturada, lo cual reduce su capacidad para sintetizar DHA a partir de precursores de ácidos grasos n-3 (Murray *et al.*, 2001).

Dentro de las funciones generales de los ácidos grasos esenciales, especialmente del Omega-3, destacan las siguientes (Connor, 2000):

- Previenen las enfermedades cardiovasculares.
- Mejoran la deficiencia de ácidos grasos esenciales en la infancia, lo cual tiene beneficio sobre el desarrollo visual y cerebral.
- Previenen las enfermedades autoinmunes como el Lupus y la neuropatía.
- Previenen el desarrollo de la enfermedad de Crohn.
- Previenen el desarrollo del cáncer de mama, colon y próstata.
- Previenen el desarrollo de artritis reumatoide.

1.2.2 OTROS COMPONENTES IMPORTANTES EN LOS ACEITES

Esteroles: Son compuestos característicos de todas las grasas y aceites naturales y que en la mayoría de los casos constituyen la mayor porción de la materia insaponificable, estos son químicamente inertes y no toman ninguna propiedad en los aceites. Son importantes porque constituyen la materia prima para la síntesis de hormonas sexuales y para la preparación artificial de la vitamina D. El esteroles característico de las grasas animales es el colesterol, mientras que los esteroides de los aceites vegetales constan de una mezcla de diferentes miembros que se conocen colectivamente con el nombre de fitoesteroides (Bailey, 1984).

1.2.2.1 COMPONENTES QUE AFECTAN LA APARIENCIA DEL ACEITE

El característico color amarillo rojizo de la mayor parte de las grasas y aceites, se debe a la presencia de diversos pigmentos (carotenoides). La hidrogenación de un aceite disminuye la insaturación de sus pigmentos carotenoides, lo suficiente como para conseguir una significativa reducción del color. Estos pigmentos son termolábiles en cierto grado y sus propiedades cromógenas pueden reducirse también por oxidación (Bailey, 1984).

1.2.2.2 COMPONENTES QUE EJERCEN ACCION SOBRE LA ESTABILIDAD DE LOS ACEITES

Se ha comprobado reiteradamente que los aceites naturales por contener cantidades mínimas de sustancias capaces de inhibir poderosamente la oxidación, son mucho más resistentes a la alteración oxidativa, que los triglicéridos puros (Bailey, 1984).

Tocoferoles: Son un importante tipo de antioxidantes de distribución casi universal idénticos a la vitamina E, dentro de estos encontramos 4 diferentes tipos alfa, beta, gamma y delta tocoferol (Bailey, 1984).

1.2.3 REACCIONES QUIMICAS EN LOS ACEITES

El conocimiento de los cambios químicos que pueden sufrir los aceites es necesario, para comprender como se puede hacer frente a los problemas que se puedan presentar durante el almacenamiento, transporte o uso de los aceites. Las reacciones químicas tienen importancia en dos lugares, (1) los puntos de insaturación de las cadenas de los ácidos grasos y (2) en el punto donde están unidos a la molécula de glicerol (la unión éster) (Lawson, 1999).

1.2.3.1 HIDROLISIS

La hidrolisis es la reacción del agua con una sustancia, como las grasas. Esto se traduce en la separación de algunos de los ácidos grasos a partir del aceite, dando lugar a ácidos grasos libres. La hidrolisis es una reacción que tiene lugar en la unión entre los ácidos grasos y la porción de glicerol, la cual es acelerada por las altas temperaturas y presiones excesivas de cantidades de agua (Lawson, 1999).

1.2.3.2 HIDROGENACION

Es una de las reacciones químicas más importantes de los aceites, este tipo de reacción se da en los puntos de insaturación o dobles enlaces. El hidrogeno se añade directamente a los puntos de insaturación de los ácidos grasos no saturados (Lawson, 1999), para formar los correspondientes ácidos saturados o al menos reducir su grado de insaturación (Bailey, 1984).

1.2.3.3 POLIMERACION

La polimeración es la reacción de una grasa con ella misma, en la cual se combinan moléculas relativamente pequeñas de aceite y grasas para formar moléculas más grandes. La polimerización puede tener lugar en los puntos de insaturación de las cadenas de los ácidos grasos (o en la unión del ácido graso y la molécula de glicerol) (Lawson, 1999).

1.2.3.4 ESTERIFICACION

En su forma simple, la esterificación puede ser considerada la reacción inversa a la hidrólisis. Es la combinación o recombinación de ácidos grasos libres con glicerol para formar triglicéridos, los monoglicéridos y diglicéridos pueden ser también producidos por esterificación (Lawson, 1999).

1.2.3.5 INTERESTERIFICACION

Esta reacción puede ser explicada como un intercambio de radicales de ácidos grasos de una grasa a otra. Se lleva a cabo para desarrollar moléculas de grasas nuevas que tienen propiedades específicas (Lawson, 1999).

1.2.3.6 OXIDACION

Esta reacción tiene lugar en los dobles enlaces o puntos de saturación. Es la reacción de un aceite o grasa con el oxígeno del aire, esta reacción es indeseable ya que afectará negativamente el sabor del aceite, así como del alimento en el cual se use este aceite (Lawson, 1999).

A la oxidación inducida por el aire a temperatura ambiente se le denomina autooxidación, generalmente este es un proceso lento en el cual se necesita un tiempo considerable para producir una cantidad suficiente de peróxidos (los principales productos iniciadores de la autooxidación) como se observa en la Figura N°08, para desarrollar olores y sabores desagradables. Los productos que tienen una proporción más elevada de ácidos grasos insaturados son más propensos a la oxidación, que aquellos que contienen cantidades más bajas. La velocidad de oxidación crece con un incremento en la temperatura, con la exposición al oxígeno del aire, en presencia de luz, y contacto con materiales que son considerados como pro-oxidantes (Lawson, 1999).

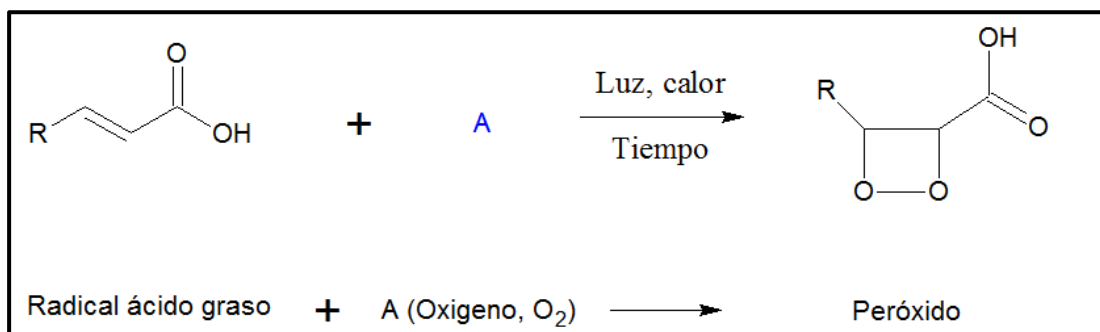


Figura N° 08. Reacción de oxidación de un aceite

Fuente: Lawson, 1999

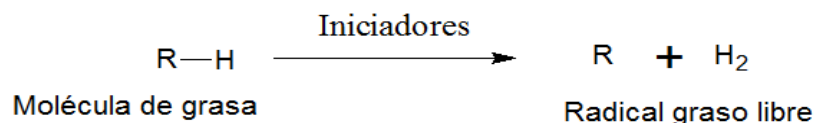
Los aceites y grasas naturales de origen vegetal contienen cantidades pequeñas de sustancias capaces de inhibir la oxidación en cierto grado como el alfa tocoferol, el cual es un antioxidante natural importante.

1.2.3.6.1 Características Generales de la Oxidación de Aceites

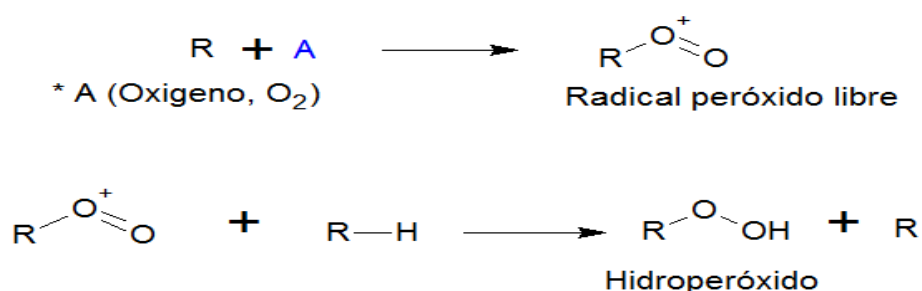
El desarrollo de la oxidación tienen dos fases distintas, durante la fase inicial, la oxidación se efectúa a un ritmo lento y uniforme y una vez alcanzado un grado de oxidación crítica, la oxidación entra en la segunda fase, la que es caracterizada por un ritmo rápidamente acelerado, muchas veces más que el observado en la fase inicial. El punto en el que la grasa comienza a tener olor a rancio coincide con el comienzo de la primera parte de la segunda fase. El periodo inicial de la oxidación, relativamente lento, se llama periodo de inducción (Bailey, 1984).

En un estudio avanzado de los cambios oxidativos, la teoría de los radicales libres de la oxidación incluye una serie de reacciones en tres etapas, las cuales son una versión simplificada de los cambios que tienen lugar:

1. Iniciación: las moléculas de la grasa forman radicales grasos libres en presencia de iniciadores como la luz ultravioleta, calor y metales pesados como el cobre.



2. Propagación:



La descomposición de los hidroperóxidos da lugar a la formación de una amplia variedad de aldehídos, cetonas e hidrocarburos. Estos compuestos son responsables de los sabores y olores a rancio.

3. Terminación de la cadena de reacciones de oxidación: esta etapa tiene lugar si los radicales libres son desactivados o destruidos. Los antioxidantes de aceites y grasas como los tocoferoles pueden reaccionar con los radicales iniciadores y propagadores para dar productos inocuos (Lawson, 1999).

La cantidad de oxígeno que debe ser absorbido para producir ranciedad varía considerablemente con la composición del aceite, ya sea por la presencia o ausencia de antioxidantes y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la oxidación (Bailey, 1984).

1.2.4 ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES

La calidad del aceite y la estabilidad oxidativa, son factores importantes que influyen en la aceptabilidad y el valor de mercado de los aceites comestibles, por lo tanto la determinación de estos dos factores es importante para el control de calidad en aceites y grasas de la industria (Tan *et al.*, 2002 y Smouse, 1995).

Para determinar la estabilidad de los aceites en el laboratorio, es necesario recurrir a algún método para acelerar su ritmo normal de oxidación, por tanto el método más empleado fue denominado comúnmente como el ensayo de aireación, método de oxígeno activo (AMO) o ensayo Swift de estabilidad, que implica una continua aireación de la muestra de aceite a 97.8°C, determinándose por valoración periódica el tiempo requerido para conseguir un índice de peróxido especificado. Otra metodología usada es la de la estufa del ensayo Schael. Encontramos otros métodos, los cuales son métodos acelerados, en los que la absorción de oxígeno por la muestra se mide físicamente y la estabilidad se determina de acuerdo con el súbito incremento que se produce al final del periodo de inducción (Bailey, 1984).

Hoy en día, a menudo se basan en varias pruebas de estabilidad acelerada para evaluar rápidamente la estabilidad de los aceites y grasas. Puesto que la oxidación es la mayor causa de degradación del aceite (Bailey, 1984), la mayor parte de las pruebas aceleradas están diseñadas para acelerar el proceso de oxidación exponiendo a las muestras a temperaturas elevadas en presencia de cantidades en exceso de aire u oxígeno (Cross, 1970).

1.2.5 TECNICAS DE EXTRACCION DE ACEITE

Existen diferentes técnicas en la extracción de aceite de semillas oleaginosas, que a lo largo de la historia se han modificado, dependiendo del uso final del producto.

1.2.5.1 EXTRACCION CON DISOLVENTES

La extracción con disolventes es el método más eficaz en la obtención de aceite y el que mejores ventajas ofrece, sobre todo en semillas con bajos contenidos de aceite, este se realiza por procedimientos como percolación e inmersión (Bernardini, 1981).

La extracción con disolventes, es una técnica que consiste en poner en contacto el material vegetal con un disolvente capaz de solubilizar los

principios activos, los cuales pasan de la materia vegetal al disolvente de manera que se obtiene un extracto líquido, que puede ser concentrado eliminando el disolvente hasta obtener solo el compuesto estudiado (Kukliski, 1998).

Para este tipo de extracción se toma en cuenta diversos factores: (Bernardini, 1981).

- **Características de la materia vegetal:** se observa el estado de la materia vegetal el secado, grado de división adecuado, para facilitar el máximo contacto entre los principios activos y el disolvente.
- **Naturaleza del disolvente:** Los solventes más utilizados son el hexano, éter de petróleo, tricloroetileno y el sulfuro de carbono.

Características que debe reunir un buen disolvente:

- No producir perjuicios a las personas
 - No ser corrosivos
 - Poseer selectividad
 - Fácil de recuperar sin dejar malos olores residuales
 - Fácil adquisición y de bajo costo (Bernardini, 1981).
- **Temperatura del disolvente:** El aumento de la temperatura del solvente favorece a la extracción del aceite, pero a su vez puede favorecer la degradación de los principios activos, por lo que es necesario controlarla.
 - **Cantidad de disolvente:** Manteniendo constante el tiempo y la temperatura de la extracción, la cantidad de solvente tiene una gran influencia en la extracción, la cual debe tener una relación (peso-volumen) entre el material vegetal y el disolvente.
 - **Tiempo de extracción:** Depende de las características de la materia vegetal (dureza, grado de división, etc.), y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables).

1.2.7.1.1. Tipos de Extracción con Disolventes (Kukliski, 1998)

A. Extracción Discontinua o Simultánea: Esta extracción consiste en sumergir el material vegetal en el disolvente, por lo cual al tener un contacto completo la droga con el disolvente la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio. Este tipo de extracción presenta diferentes procedimientos: (Kukliski, 1998).

- Maceración
- Digestión
- Infusión
- Decocción o Cocimiento

B. Extracción Continua o Progresiva: En este tipo de extracción el disolvente utilizado se va renovando y actúa en una sola dirección. Los métodos que usan este tipo de extracción consisten en poner en contacto la droga con el disolvente adecuado y mantener un desequilibrio entre la concentración del principio activo en el material vegetal con el disolvente, para que se produzca la difusión celular. Mediante estos procedimientos se puede llegar a la extracción prácticamente completa de los principios activos del material vegetal. (Kukliski, 1998).

Se utilizan varios métodos de extracción continua como la percolación y soxhlet, este último que es el más usado en la extracción de aceites vegetales.

Soxhlet: Es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato como se muestra en la Figura N°09, que consta de un matraz de fondo plano (A), un cuerpo extractor (B) y un refrigerante (C). En el cuerpo extractor se coloca el disolvente orgánico y la droga, generalmente envuelta en un material poroso que permita el contacto con el disolvente. En el matraz de fondo plano se coloca el disolvente orgánico, se lleva a ebullición y los vapores del disolvente ascienden por el tubo lateral (D) y llegan al refrigerante

donde condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo extractor cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo, este se vacía por el sifón lateral interno (E) y desemboca en el matraz inferior (A) (Kukliski, 1998). El disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior.

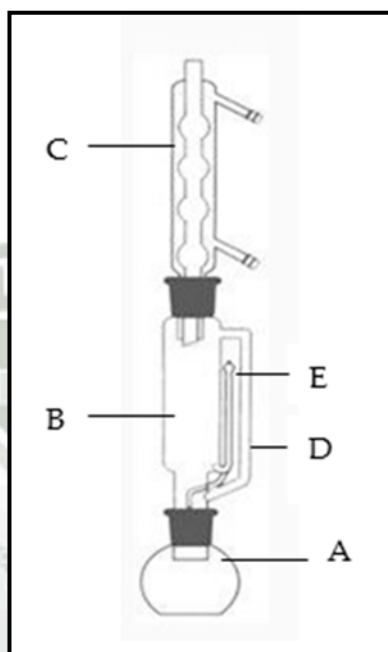


Figura N° 09. Equipo Soxhlet
Fuente: Realización propia

1.2.5.2 EXTRACCIÓN CON GASES EN CONDICIONES SUPERCRTICAS

Este tipo de extracción se trabaja con dispositivos especiales, donde es posible controlar la presión y la temperatura, los cuales son superiores a las presiones y temperaturas críticas. Los gases más utilizados son el dióxido de carbono y el butano. La extracción con gases suele ser muy selectiva así como también, es sencillo eliminar el gas extractor, pero resulta ser muy cara y difícil encontrar las condiciones óptimas de presión y de temperatura (Kukliski, 1998).

El principio de este tipo de extracción se basa en que el fluido es llevado a un estado supercrítico específico, para extraer un soluto determinado,

el material a extraer es expuesto al fluido bajo condiciones de tiempo, temperatura y presión controladas, lo que permite la disolución de los solutos de interés en el fluido supercrítico. El soluto disuelto es separado posteriormente del fluido supercrítico mediante la disminución de la presión de la solución (Nielsen, 1998).

1.2.5.3 EXTRACCION POR PRENSADO

El principio de la extracción por prensado se basa en que cada partícula del material vegetal retiene el aceite en su interior, el objetivo del prensado es lograr que este aceite salga del sistema hacia el exterior. El aceite en la estructura celular se encuentra dentro de pequeños orgánulos (esferosomas), rodeados por una fina membrana y al aplicar una fuerza externa durante el prensado produce una serie de alteraciones (deformaciones), tanto a nivel microscópico como macroscópico, por tanto se comprime cada partícula y se reacomoda en conjunto, así las membranas que limitan a cada esferosoma son destruidas, permitiendo al aceite salir de la partícula y luego a través del sistema macroscópico hacia el exterior (Mattea, 1999).

El rendimiento de aceite en la extracción por prensado de tornillo depende de varios factores, entre ellos el acondicionamiento del material que consiste en una serie de operaciones como la limpieza, molienda, calentamiento, secado o humedecimiento hasta alcanzar el contenido de humedad óptimo (Singh *et al.*, 2002). La aplicación de un tratamiento térmico antes o durante el prensado generalmente mejora la extracción del aceite ya que influye sobre la viscosidad del fluido y la resistencia mecánica de las partículas (Ward, 1976).

1.3 ESPECIES OXIDANTES, ESTRES OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

1.3.1 ESPECIES OXIDANTES: RADICALES LIBRES (RL)

El oxígeno es requerido para la generación de todas las especies reactivas (Tabla N°04), es decir las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies

reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de cloro (RCS) (Fang *et al.*, 2002).

Tabla N° 04. Nomenclatura de Especies reactivas u oxidantes.

RADICALES LIBRES	NO RADICALES
ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)	
Superóxido, O₂⁻	Peróxido de hidrogeno H ₂ O ₂
Hidroxilo, OH	Ácido hipobromoso, HOBr
Hidroperoxilo, HO₂	Acido hipocloroso, HOCl
	Ozono O ₃
Peroxilo, RO₂	Singlete de oxígeno (O)
Alcoxilo, RO	Peróxidos orgánicos, ROOH
Carbonato, CO₃	Peroxinitrito, ONOO ⁻
Dióxido de carbono, CO₂	Ácido peroxinitroso, ONOOH
ESPECIES REACTIVAS DE CLORO (RCS)	
Cloro atómico, Cl	Acido hipocloroso, HOCl
	Cloruro de Nitrilo (nitronio), NO ₂ Cl
	Cloraminas
	Gas de cloro (Cl ₂)
ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (RNS)	
Óxido nítrico, NO	El ácido nitroso, HNO ₂
Dióxido de nitrógeno, NO₂	Catión de nitrosilo, NO ⁺
	Aniones nitroxilo, NO ⁻
	Tetróxido de dinitrógeno, N ₂ O ₄
	Trióxido de dinitrógeno, N ₂ O ₃
	Peroxinitrito, ONOO
	Ácido peroxinitroso, ONOOH
	Catión Nitronio (nitrilo) , NO ₂ ⁺
	Peroxinitritos alquilo, ROONO
	cloruro de Nitrilo (nitronio), NO ₂ Cl

- Fuente: Halliwell y Whiteman (2004)

Son considerados radicales libres, aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad, que lo hace altamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente con las diferentes moléculas integrantes de la estructura celular, como los carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y los derivados de cada uno de ellos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El origen de los RL se puede dar por fuentes endógenas y exógenas. Encontramos cuatro fuentes endógenas para la explicación de la producción de RL por las células:

- a. Como una consecuencia normal de la respiración aeróbica, la mitocondria consume O_2 , reduciéndolo a través de pasos secuenciales para producir H_2O , donde inevitablemente los RL son productos en este proceso.
- b. Las células fagocíticas que destruyen células infectadas de bacterias o virus con un oxidante como óxido nítrico. Las infecciones crónicas por virus, bacterias o parásitos producen una actividad fagocítica crónica.
- c. Peroxisomas, los cuales son orgánulos responsables para la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, estos producen H_2O_2 como un sub-producto, el cual es entonces degradado por la catalasa.
- d. En los animales las enzimas del Citocromo P450, constituyen uno de los sistemas de defensa primario contra los componentes químicos naturales de las plantas, las cuales son la mayor fuente de toxinas de la dieta. La inducción de estas enzimas previenen efectos tóxicos de los químicos pero también en este proceso resultan sub productos oxidantes que dañan el DNA (Ames *et al*, 1993).

Por otro lado encontramos tres fuentes exógenas las cuales pueden incrementar significativamente la carga de los radicales libres producidos por fuentes endógenas:

- i. Los óxidos de nitrógeno del smoke de los cigarrillos son los que causan oxidación de macromoléculas y disminuye los niveles de antioxidantes.
- ii. Las sales de hierro, promueven la generación de radicales oxidables de peróxidos. El hombre cuando absorbe cantidades de hierro más de lo normal en su dieta debido a defectos genéticos, esto produce un incremento de riesgos para el cáncer y enfermedades del corazón.

iii. Las dietas normales contienen comidas con vegetales con grandes cantidades de compuestos fenólicos naturales, como el ácido cafeico y clorogénico, los cuales pueden generar oxidantes por el ciclo de redox (Ames *et al*, 1993).

1.3.2 ESTRES OXIDATIVO

Nuestro organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes, por tanto en determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ROS, por lo cual este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2004). Halliwell y Whiteman, 2004 lo definen como un serio desbalance entre la producción de especies oxidantes y los sistemas de defensas antioxidantes.

Según Halliwell y Whiteman (2004), el estrés oxidativo puede ser el resultado de:

1. Disminución de los niveles de antioxidantes, que se daría por mutaciones que afectan la actividad de los enzimas antioxidantes o por toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes
2. Incremento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición de células a elevados niveles de O_2 u otras toxinas que en sí mismas son especies reactivas (ej. NO_2).

El estrés oxidativo está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Lee *et al.*, 2004). Es así como muchos estudios clínicos han demostrado que muchas de las enfermedades degenerativas están asociadas con los radicales libres, como se observa en la tabla N° 05.

Tabla N° 05. Condiciones clínicas que implican especies reactivas y radicales libres.

TEJIDO/ÓRGANO	PATOLOGÍA
Tracto gastrointestinal	Hepatitis, lesiones hepáticas
Ojos	Cataratas, daño en la retina
Piel	Dermatitis, pigmentos de envejecimiento
Corazón	Ataque al corazón
Articulaciones	Artritis
Pulmón	Asma, hiperoxia
Cerebro	Trauma Cerebral, derrame Cerebral
Fallo multiorgánico	Cáncer
Vasos Sanguíneos	Aterosclerosis, vaso espasmos
Dientes	Periodontitis

Fuente: Lee *et al.* (2004) Basado en Cohen *et al.*, 2000 y Packer y Weber, 2001.

Por otro lado también se ha reportado funciones benignas de los radicales libres, que incluyen la activación de factores de transcripción nuclear, expresión de genes y mecanismos de defensa para células tumorales e infecciones microbianas (Simon *et al.*, 2000), como por ejemplo el anión superóxido que puede servir como un regulador del crecimiento de células (Halliwell, 1997), el oxígeno singlete que puede atacar a varios patógenos e inducir una respuesta inflamatoria fisiológica (Stief, 2003).

Es importante tener en cuenta que la dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal. Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y los compuestos fenólicos, los cuales tienen actividad antioxidante así como potenciales efectos beneficiosos (Lampe 1999, Prior 2003).

1.3.3 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en concentraciones bajas en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y

Gutteridge, 1999). Como sustrato oxidable podemos considerar las moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentren en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y las moléculas de ADN (Thomas, 1994).

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante, en el cual se producen los RL que en si podríamos decir que estos son formados como un producto normal del metabolismo aerobio, pero su producción puede ser elevada en condiciones fisiopatológicas, las cuales comienzan una serie de reacciones y dañan las células. Por tanto los antioxidantes terminan estas reacciones, quitando intermediarios del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación en las cuales se oxidan ellos mismos (Sies, 1997).

Para contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres, nuestro organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante, integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Tabla N°06) (Sies, 1997).



Tabla N° 06. Principales sistemas de defensa antioxidante del organismo.

SISTEMA	FUNCION
<u>Enzimas</u>	
Superóxido dismutasa	Eliminación de radical superóxido
Catalasa	Eliminación de hidroperóxidos (ej. H ₂ O ₂)
Glutación peroxidasa (GPx)	Eliminación de hidroperóxidos
Glutación reductasa (GRed)	Reducción de glutación oxidado
Glutación-s- transferasa GST)	Eliminación de peróxidos lipídicos
Metionina sulfóxido reductasa	Reparación de residuos oxidados de metionina
Peroxidasa	Descomposición de peróxido de hidrogeno y peróxidos lipídicos
<u>Antioxidantes del plasma/suero</u>	
Ácido úrico	Captador de oxígeno singlete y radicales libres
Albumina	Actividad peroxidasa en presencia de GSH
Bilirrubina	Captador de radicales peroxilo
Glutación reducido (GSH)	Sustrato para la acción de los enzimas GPx y GST y captador de radicales libres.
Ubiquinol (coenzima Q)	Captador de radicales libres
<u>Antioxidantes de la dieta</u>	
Ácido ascórbico	Reacción con superóxido, oxígeno singlete y radical peroxilo. Regeneración de tocoferoles.
Tocoferoles	Protección de membrana lipídicas, bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación.
Carotenoides	Desactivación del oxígeno singlete. Bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación
Compuestos fenólicos	Captación de radicales libres y actividad quelante de metales.

Basado en Beckman y Ames (1998), Fang *et al.* (2002) y Lee *et al.* (2004).

1.3.3.1 ANTIOXIDANTES NUTRACEUTICOS - ANTIOXIDANTES VEGETALES

Los nutraceuticos o alimentos funcionales son alimentos que pueden proporcionar efectos beneficiosos para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contenga. Los nutraceuticos son conocidos también como alimentos medicinales, suplementos nutricionales y suplementos dietéticos, los cuales pueden agruparse de diferente manera dependiendo de la fuente del alimento, de su estructura química y del modo de acción (Wildman, 2001).

Uno de los tipos de estos alimentos funcionales son los nutraceuticos antioxidantes, los cuales actúan reduciendo el nivel de las especies reactivas

es decir los radicales libres que son producto del estrés oxidativo el cual causa daño celular. Estos podrían ser enzimas antioxidantes, quelantes de metales o reguladores de oxígeno singlete (Lee *et al.*, 2004).

Entre los nutraceuticos antioxidantes que se han encontrado en los diferentes alimentos, los cuales brindan una gran actividad antioxidante encontramos a los tocoferoles, los cuales son típicos e importantes antioxidantes en los humanos, el ácido ascórbico que aparte de su acción como antioxidante puede ser relacionado con la prevención de muchas enfermedades como el cáncer, enfermedades del corazón, etc., los carotenoides los cuales son antioxidantes potenciales que han sido reportados en la prevención de enfermedades iniciadas por radicales libres y los polifenoles que poseen acción antioxidante ante los radicales libres, así como son considerados antimutagenicos (Lee *et al.*, 2004).

1.3.4 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de los alimentos que consumimos, puede ser evaluada *in vitro* e *in vivo*. Los métodos para medir la capacidad antioxidante están basados en medir la capacidad del radical u oxidante, en lugar de la capacidad antioxidante preventiva de una muestra (Huang *et al.*, 2005).

Las reacciones químicas implicadas en los principales ensayos de capacidad antioxidante se pueden dividir en dos categorías: (Huang *et al.*, 2005).

- Transferencia de átomos de hidrogeno (HAT): Estas controlan la cinética de reacciones competitivas, a través de la cuantificación derivada de las curvas cinéticas. Estos están generalmente compuestos de un generador sintético de radicales libres, una molécula oxidable y un antioxidante.
- Transferencia de electrones individuales (ET): Estas implican una reacción redox con el oxidante (como prueba para monitorizar la reacción), como un indicador del punto final de la reacción.

1.4 COMPUESTOS FENOLICOS

Los polifenoles de las plantas, son esenciales para la fisiología de las plantas ya que contribuyen a la morfología de la planta, en el crecimiento, la reproducción, la resistencia a patógenos (actuando como fitoalexinas o por el incremento de la astringencia en los alimentos). El reciente interés de los compuestos fenólicos en los alimentos, ha aumentado debido a sus papeles como antioxidantes, antimutagenicos y renovadores de los radicales libres y su implicación en la prevención de patologías como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Bravo, 1998).

Los polifenoles son compuestos que tienen una o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo aromático como se observa en la Figura N°10, por tanto el fenol es la estructura sobre la cual se basa todo el grupo, por otro lado los compuestos fenólicos se encuentran generalmente en las plantas en forma de ésteres o glucósidos (Vermerris y Nicholson, 2008).

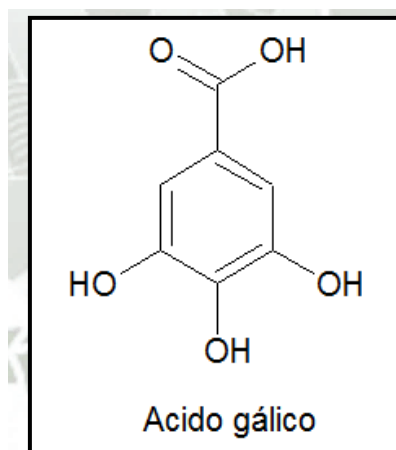


Figura N° 10. Estructura química de un compuesto fenólico
Fuente: Vermerris y Nicholson, 2008

Las estructuras fenólicas, son metabolitos que pueden proceder de la ruta del ácido shikimico o de la ruta del acetato (Kukliski, 1998).

1. Proceden de la ruta del ácido shikimico: fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianos y taninos.

2. Proceden de la ruta de los acetatos o ruta del ácido mevalónico, los siguientes derivados fenólicos: antraquinonas y heterosidos antracenicos.

1.4.1 CLASIFICACION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS

Estos compuestos han sido clasificados en grupos, basados en el número de carbonos en la molécula como se muestra en la Tabla N° 07.

Tabla N° 07. Clasificación de los Compuestos Fenólicos

ESTRUCTURA	CLASE
C6	Fenoles simples
C6-C1	Ácidos fenólicos y componentes relacionados
C6-C2	Acetofenonas y ácidos fenilaceticos
C6-C3	Acido cinámico, aldehído cinamicos, cinamilo alcoholes
C6-C3	Cumarinas, isocumarinas y cromonas
C15	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C15	Flavanoles
C15	Flavonas
C15	Flavanonas
C15	Flavanonoles
C15	Antocianidinas
C15	Antocianinas
C30	Biflavonoles
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenonas, Xantonas, estilbenos
C6, C10, C14	Quinonas
C18	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	dímeros u oligómeros
Lignina	Polímeros
Taninos	oligómeros o polímeros
Flobafenos	polímeros

Fuente: Harbone y Simmonds, 1964.

Fenoles Simples: Son fenoles substituidos, incluyen hidroquinonas y derivados por ejemplo, arbutina, sesamol y floriglucinol. (Bravo, 1998).

Ácidos Fenólicos y Aldehídos: Presentan una estructura C6-C1, así dentro de los ácidos fenólicos tenemos al ácido gálico, ácido vaníllico, ácido salicílico, etc. y dentro de los aldehídos a la vainillina (Harborne, 1989)

Flavonoides: Los flavonoides representan los grupos más comunes dentro de los compuestos fenólicos. Su estructura común es el de difenilpropano (C6-C3-C6) (Bravo, 1998). Entre los flavonoides tenemos:

- Chalconas, tales como el butein, la floridzina que es una dihidrochalcona que es un compuesto encontrado en las hojas de manzana, y que se ha informado que tienen actividad anti-tumoral (Vermerris y Nicholson, 2008; Nelson y Falk, 1993).
- Flavonas como la apigenina, luteolina, diosmetina.
- Flavonoles como la quercetina, miricetina, kaempferol y sus glucósidos que son los compuestos más comunes (Herrmann, 1988).
- Flavanones como la naringenina, hesperidina (Bravo, 1998).
- Las antocianinas, son el grupo más importante de los pigmentos de las plantas. El término antocianina se refiere a los glucósidos de antocianidina por ejemplo, pelargonidina, malvidina, cianidina (Mazza, 1995).

Taninos: Los taninos son un grupo de compuestos con una amplia diversidad en sus estructuras, tienen la capacidad de unirse a proteínas y precipitarlas. Como parte de la medicina natural japonesa y china, los taninos han sido utilizados como compuestos anti-inflamatorios y antisépticos. (Vermerris y Nicholson, 2008).

1.4.2 LOS POLIFENOLES PRESENTES EN LOS ALIMENTOS

Los polifenoles están casi omnipresentes en los alimentos vegetales (verduras, cereales, legumbres, frutas, frutos secos, etc.) y bebidas (Vino, sidra, cerveza, té, cacao, etc.) (Bravo, 1998).

Los polifenoles son parcialmente responsables de las cualidades sensoriales y nutricionales de los alimentos de origen vegetal. La astringencia y la amargura de alimentos y bebidas dependen del contenido de los compuestos fenólicos (Martinez-Velarde *et al.*, 2000).

1.4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación "in vitro" (Decker, 1997).

La eficiencia de los polifenoles como compuestos antioxidantes en gran medida depende de su estructura química, es así que el fenol por sí mismo es inactivo como un antioxidante, pero estructuras como orto y para difenólicos presentan capacidad antioxidante, la cual aumenta con la sustitución de átomos de hidrógeno por grupos etilo o n-butilo (Shahidi y Wanasundara, 1992). Los flavonoides se encuentran entre los más potentes antioxidantes de las plantas debido a que poseen una o más elementos estructurales que intervienen en la actividad antiradical (Bors *et al.*, 1990 Citado por Martínez-Velarde *et al.*, 2000).

1.5 CAROTENOIDES

Los carotenoides no son solo otro grupo de pigmentos naturales, son sustancias con propiedades especiales las cuales ningún otro tipo de sustancias las poseen. Los carotenoides son componentes esenciales en la fotosíntesis oxigénica de diferentes organismos, por lo tanto sin los carotenoides la fotosíntesis y toda la vida en un atmosfera de oxígeno sería imposible. Los carotenoides han sido implicados recientemente en la prevención o la protección de serios desordenes en la salud humana como el cáncer y enfermedades del corazón (Britton, 1995).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno simétrico y lineal de 40 carbonos, formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera que el orden se invierte al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias maneras como por ejemplo por hidrogenación, dehidrogenación, ciclación, etc., dando como resultado una gran diversidad de estructuras. Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1999).

Los carotenoides son sustancias hidrofóbicas, lipofílicas y se disuelven en solventes como la acetona, alcohol, éter etílico, tetrahidrofurano y cloroformo. Los carotenos son fácilmente solubles en éter de petróleo y hexano mientras que las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol (Rodríguez-Amaya, 1999).

Hay dos clases primarias de carotenoides: los carotenos y las xantofilas. Los carotenos son carotenoides hidrocarbonados y las xantofilas contienen un oxígeno en forma de hidroxilo, metoxilo, carboxilo, ceto o grupos epoxi (Lee et al., 2004) como se observa en la Figura N°11.

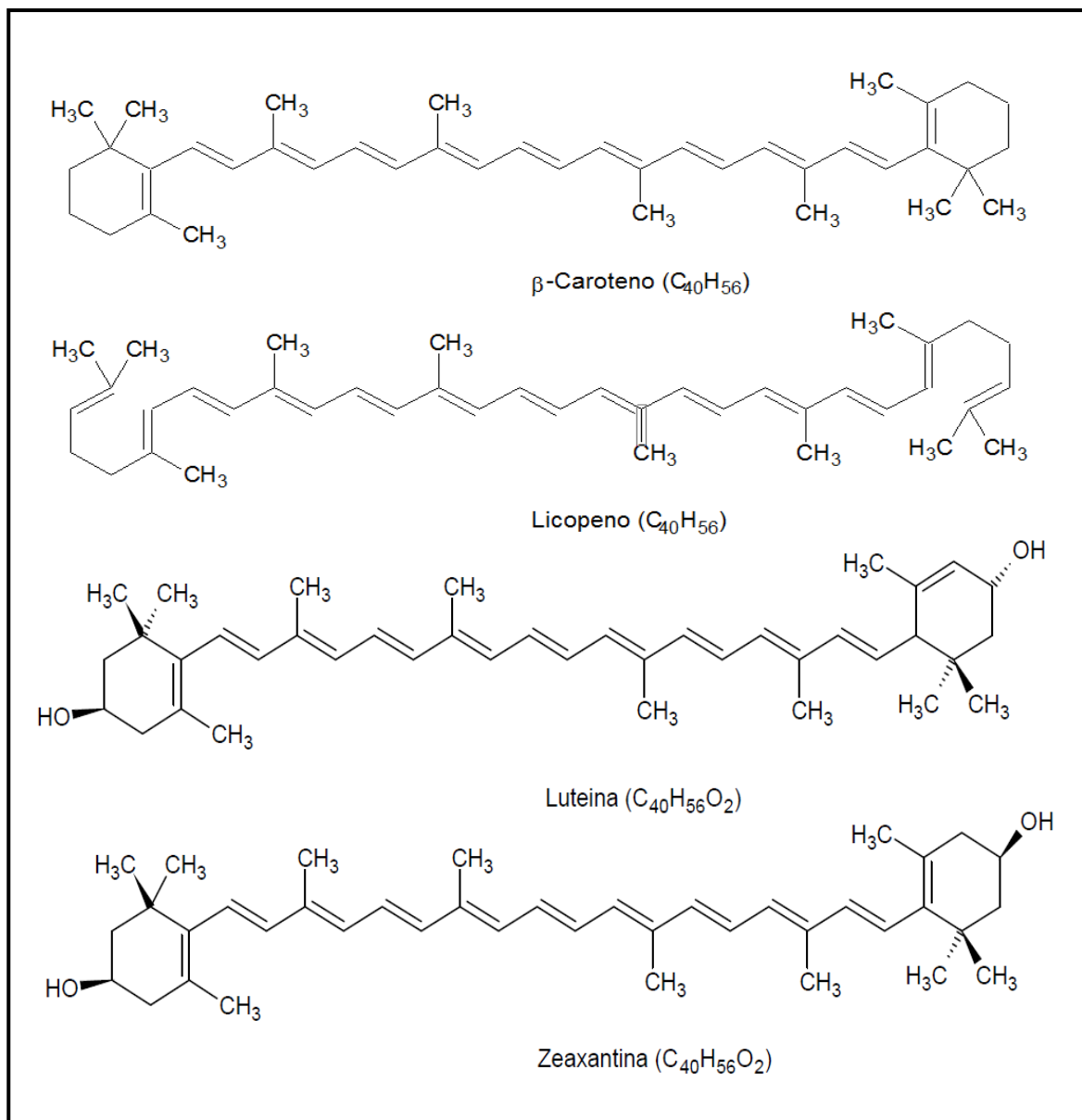


Figura N° 11. Estructura de los carotenoides. Licopeno y β - caroteno son carotenos y luteína y zeaxantina son xantofilas.

Fuente: Lee et al., 2004

Los carotenoides en general, son más estables en sistemas con elevado grado de insaturación, ya que el propio sistema acepta más fácilmente oxígeno y radicales libres antes que el carotenoide, contrario a lo que ocurre en sistemas con lípidos saturados donde carotenoides presentan una mayor inestabilidad.

En consecuencia estos compuestos pueden actuar como pro oxidantes o antioxidantes dependiendo del sistema donde se encuentren (Begoña *et al.*, 2001).

1.5.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS CAROTENOIDES

Las actividades biológicas de los carotenoides pueden ser divididas en tres diferentes categorías: funciones, acciones y asociaciones como se observa a continuación en la Tabla N°08.

Tabla N° 08. Actividades biológicas de los carotenoides en el hombre*

Funciones	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad provitamínica A.
Acciones	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidantes. • Prooxidantes • Inmunopotenciadores. • Inhibición de mutagénesis y transformación. • Inhibición de lesiones pre malignas. • Protección frente a fotosensibilización
Asociaciones (asociación inversa frente a riesgo de):	<ul style="list-style-type: none"> • Cataratas. • Degeneración macular. • Diversos tipos de cánceres. • Enfermedad cardiovascular.

*Adaptado de Bendich y Olson (1989).

Las **funciones** pueden ser definidas como roles esenciales que los carotenoides desempeñan, por lo menos en ciertas condiciones definidas.

Las **acciones**, estas pueden ser consideradas fisiológicamente o farmacológicamente respuestas de la administración de carotenoides, sin embargo la respuesta que puede ser beneficiosa o adversa.

Finalmente las **asociaciones**, las cuales definen correlaciones entre los carotenoides y algunos eventos fisiológicos o médicos, que pueden o no mostrar una relación causal (Bendich y Olson, 1989).

La dieta proporciona la vitamina A, en forma de vitamina A preformada (retinol, retinal, ácido retinoico, etc.) a partir de alimentos de origen

animal como por ejemplo hígado, leche, pescado y carnes y los carotenoides que se pueden transformar biológicamente a vitamina A (provitamina A), por otro lado la provitamina A tiene la ventaja de convertirse a vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere; evitando así la toxicidad por una sobredosis de vitamina A (Rodríguez-Amaya, 1999).

1.5.2 CAROTENOIDES COMO ANTIOXIDANTES

Para actuar como un eficaz antioxidante, una molécula tal como el carotenoide debe poder remover los radicales libres presentes en el sistema, ya sea reaccionando con ellos para producir productos inofensivos o interrumpiendo la cadena de reacciones de estos radicales libres. Se ha demostrado que los carotenoides son eficaces antioxidantes en solución orgánica bajo condiciones definidas, especialmente en concentraciones relativamente bajas de oxígeno (Britton, 1995).

La provitamina A más importante es el β -caroteno tanto en términos de bioactividad como de amplia ocurrencia, el cual en altas concentraciones de oxígeno puede actuar como un prooxidante más que un antioxidante. La actividad antioxidante del β -caroteno se incrementa en bajas concentraciones de oxígeno, por lo tanto no solo la concentración del oxígeno sino también la concentración de los carotenoides juegan un papel importante en la determinación de propiedades antioxidantes o prooxidantes de los carotenoides (Lee *et al.*, 2004).

1.6 TOCOFEROLES

La vitamina E es un término que abarca un grupo de antioxidantes potentes, solubles en lípidos, que rompen la cadena de los RL. La estructura molecular de los tocoferoles consiste en un anillo cromanol y una cola de 15 carbonos derivados de homogentisato (HGA) y difosfato de fitilo, la condensación de HGA y difosfato de fitilo es catalizada por fitilo transferasa HGA (HPT). Los tocotrienoles difieren estructuralmente de los tocoferoles por la presencia de 3 dobles enlaces *trans* en la cola hidrocarbonada (Sen *et al.*, 2006).

Por otro lado los estudios estructurales han revelado que las moléculas que tienen actividad antioxidante de la vitamina E incluyen cuatro tocoferoles (α , β , γ y δ) los cuales se muestran en la Figura N°12 y cuatro tocotrienoles (α , β , γ y δ) (Brigelius-Flohe y traber, 1999).

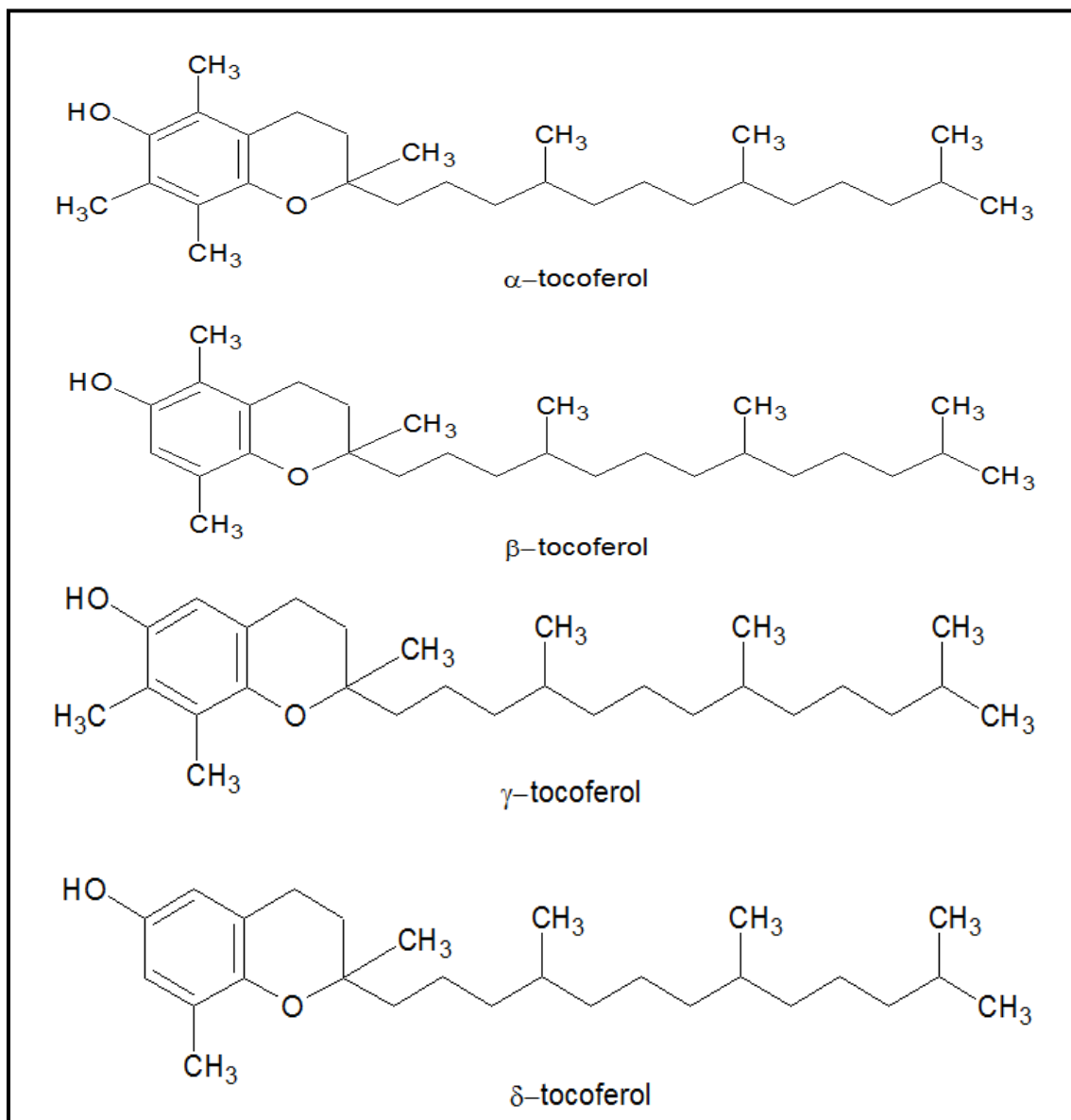


Figura N° 12. Formas naturales de vitamina E. Tocoferoles

Fuente: Brigelius-Flohe y traber, 1999

Del grupo de los tocoferoles que componen la Vitamina E, el α -tocoferol tiene la mayor actividad biológica y debido a las potentes propiedades antioxidantes de los tocoferoles, el impacto del α -tocoferol en la prevención de las

enfermedades crónicas que se cree que están asociados con el estrés oxidativo, han sido estudiadas y efectos beneficiosos han sido demostrados. Recientes estudios demuestran que el α -tocoferol a través de la proteína de transferencia de α -tocoferol es metabolizada en el hígado para su incorporación en el plasma, se ha observado que el α -tocoferol da señales de funciones en las células vasculares del músculo liso (Brigelius-Flohe y Traber, 1999).

En los seres humanos, la deficiencia severa de vitamina E conduce a anomalías neuromusculares caracterizados por una ataxia espino-cerebelosa y miopatías (Burck *et al.*, 1981 y Krendel *et al.*, 1987), por ejemplo la neuropatía periférica probablemente ocurre debido al daño de los radicales libres a los nervios y una degeneración retrograda de las neuronas sensoriales. Del mismo modo, se produce la anemia por deficiencia de la vitamina E, en gran medida en los bebés prematuros, como resultado del daño de los radicales libres ya que disminuye el lapso de vida de los eritrocitos y aumenta la susceptibilidad a la hemólisis inducida por peróxidos (Farrell *et al.*, 1977 y Simon *et al.*, 1998)

1.6.1 METABOLISMO DE LOS TOCOFEROLES

La vitamina E que es administrada a través de la dieta y a través de suplementos vitamínicos son absorbidos y liberados en el hígado, pero de los diferentes antioxidantes con actividad de vitamina E, solo el α -tocoferol es reconocido por la proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP) y es transferida al plasma, mientras que las otras formas de vitamina E (por ejemplo, γ -tocoferol o tocotrienoles) son removidos de la circulación. La α -TTP hepática es requerida para mantener las concentraciones plasmáticas y tisulares de α -tocoferol. El hígado es el principal regulador de los niveles de vitamina E en el cuerpo, que no sólo controla las concentraciones de α -tocoferol, también parece ser el sitio principal del metabolismo y excreción de la vitamina E. Esta vitamina se metaboliza de manera similar a los xenobióticos; estos son inicialmente oxidados por el citocromo P450, se someten a varias rondas de β -oxidación, después se conjugan y se excretan (Traber, 2007).

1.6.2 FUNCIONES ANTIOXIDANTES DE LOS TOCOFEROLES

Los tocoferoles actúan como antioxidantes, interrumpiendo reacciones de cadena con radicales libres, como resultado de su capacidad para transferir un hidrogeno fenólico a un radical peroxilo libre de un ácido graso poliinsaturado peroxidado. El radical fenoxi libre formado puede reaccionar con la vitamina C para generar un tocoferol o reaccionar luego con otro radical peroxilo libre. Por tanto, el alfa-tocoferol no se acopla con facilidad a oxidaciones reversibles, el anillo cromanol y la cadena lateral se oxidan hasta la formación de un producto no libre, este producto de oxidación se conjuga con ácido glucorónico por medio del grupo 2-oxihidrido y se excreta en la bilis. La acción antioxidante del tocoferol es eficaz en concentraciones altas de oxígeno (Murray *et al.*, 2001)

En contraste con el α -tocoferol, el γ -tocoferol es un nucleófilo potente que atrapa mutágenos electrofílicos en compartimentos, un mutágeno electrofílico propenso a reaccionar con γ -tocoferol es el peroxinitrito, por lo tanto el γ -tocoferol puede proteger a los lípidos, ADN y proteínas de daños que dependen del peroxinitrito (Brigelius-Flohe y traber, 1999).

La actividad antioxidante de la vitamina E a persuadió a muchos grupos para estudiar su capacidad para prevenir enfermedades crónicas, especialmente aquellas en las que se sabe que tienen un componente del estrés oxidativo, tal como enfermedades cardiovascular, aterosclerosis y cáncer (Brigelius-Flohe y traber, 1999 y Stampfer *et al.*, 1993).

1.7 FITOESTEROLES

Los fitoesteroles se encuentran en todos los alimentos vegetales, en especial en los aceites (Muñoz *et al.*, 2011). Estos producen un amplio espectro de actividades biológicas en animales y seres humanos, particularmente son considerados eficaces agentes reductores del colesterol (Ling y Jones, 1995).

Los esteroleos son compuestos que se encuentran distribuidos en los reinos animal y vegetal, formando parte de la estructura de las membranas celulares y como precursores de hormonas, ácidos biliares y vitamina D. Los

fitoesteros, son esteroides vegetales (compuestos de 28 o 29 átomos de carbono) de estructura similar al colesterol (27 carbonos), los que presentan un núcleo central que es el ciclo pentano perhidrofenantreno y una cadena lateral hidrocarbonada con 9 ó 10 carbonos y algunos que presentan doble enlace como el estigmasterol (Muñoz *et al.*, 2011 ; Valenzuela, 2004). Estos fitoesteros no son sintetizados por el organismo (Ros, 2006). Los fitoesteros que se encuentran en mayor proporción en fuentes de origen vegetal como se muestran en la Figura N°13, el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, constituyendo el 95-98% de los fitoesteros identificados (Valenzuela, 2004).

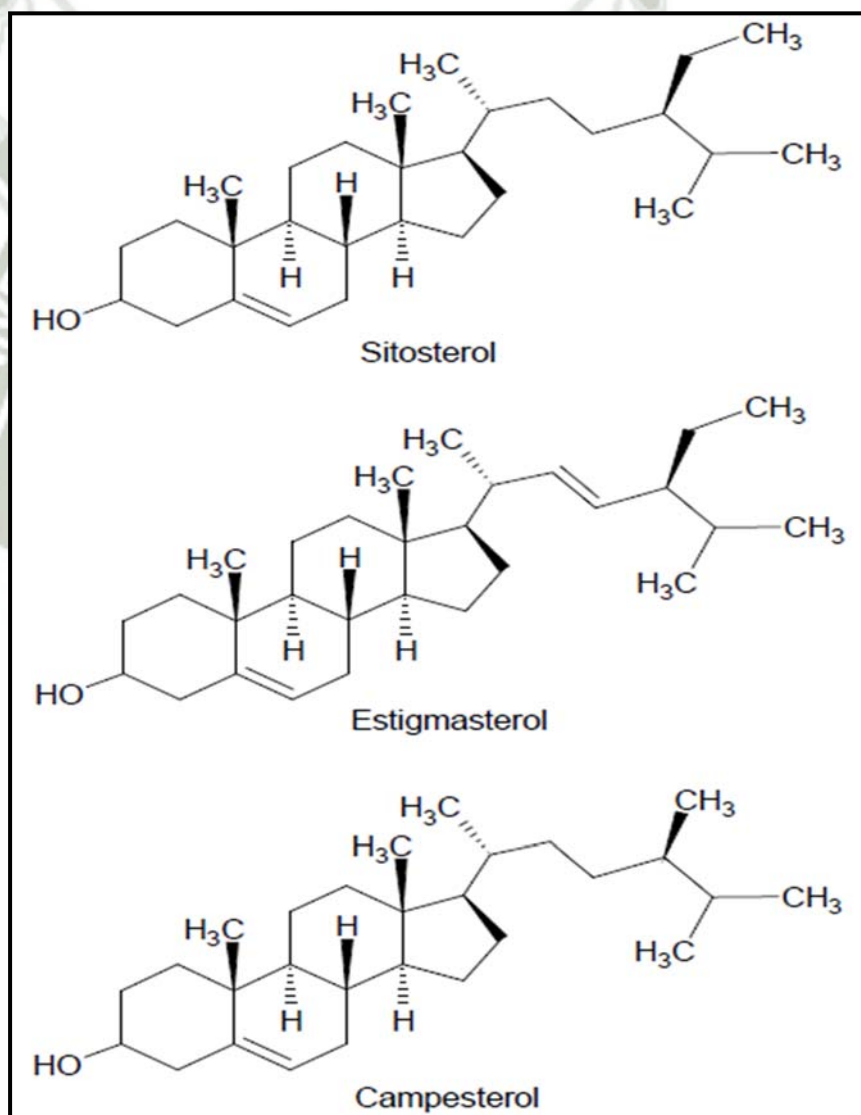


Figura N°13. Estructura de los fitoesteros más comunes

Fuente: Lagarda *et al.*, 2006

Los esteroides de las plantas se absorben poco en el intestino, menos del 5%, la posible explicación a esta baja absorción es que la ACAT (AcilCoA-colesterol-acil- transferasa), presenta una baja afinidad por los esteroides vegetales lo cual hace que estos resulten poco esterificados (Palou, 2010).

1.7.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FITOESTEROLES

La ingesta de colesterol puede variar, por una parte tenemos el colesterol proveniente de los alimentos y el colesterol intestinal que proviene de dos fuentes endógenas, la bilis y la descamación del epitelio intestinal (Ros, 2006a). La absorción del colesterol en el intestino tiene un promedio del 50%, el resto se elimina por las heces. A pesar que sus estructuras son casi idénticas, el colesterol y los fitoesteroides se metabolizan de modo distinto (Ros, 2003).

El colesterol proveniente de la dieta y la bilis conforman micelas que están constituidas por agregados de sales biliares y fosfolípidos en el lumen intestinal. Esta forma de micela permite la difusión del colesterol a través de la delgada capa acuosa que cubre la superficie del enterocito (fundamental para su difusión) por el cual es captado (Muñoz *et al.*, 2011).

De acuerdo al tamaño de las cadenas laterales que presentan los fitoesteroides y por ser más lipofílicos que el colesterol, estos actúan por tres mecanismos:

1. En cantidades de gramos, en la luz intestinal los esteroides y estanoles procedentes de la dieta, desplazan por competencia al colesterol de la micela mixta, por lo tanto al tomar contacto la micela con el enterocito, los fitoesteroides ocuparían el lugar del colesterol. El colesterol no emulsionado (desplazado de la micela) no podrá ser absorbido y será eliminado con las heces (Plat y Mensink, 2005).
2. El colesterol libre que llega al interior del enterocito, normalmente esterificado por ACAT-2, es incorporado junto con los triglicéridos y la apolipoproteína B48 a los quilomicrones nacientes. En este proceso de acoplamiento, interviene la proteína microsómica transportadora de

triglicéridos, fundamental en el ensamblaje de los quilomicrones en el intestino y de las lipoproteínas de muy baja densidad VLDL en el hígado. Los fitoesteroles, inhibirían la acción de la enzima ACAT (AcilCoA-colesterol-acil- transferasa) e impedirán la esterificación del colesterol y su incorporación a los quilomicrones (Lima *et al.*, 2005 y Muñoz *et al.*, 2011).

3. El colesterol no esterificado en la célula intestinal, es nuevamente excretado al lumen intestinal a través de un transportador.

La reducción de la absorción del colesterol mediante los mecanismos mencionados hace que llegue menos colesterol al hígado, lo que tiene dos efectos compensatorios; primero el aumento de la síntesis e incremento de la expresión de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y segundo que se da un el efecto neto que es la reducción de las cifras de colesterol total y reducción de las concentraciones de LDL en el suero (Muñoz *et al.*, 2011)

1.7.2 OTRAS ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LOS FITOESTEROLES

Se han reportado evidencias de la acción de los fitoesteroles, como la inhibición del crecimiento así como la apoptosis de células tumorales. En general, la ingesta de 2 g/día de fitoesteroles tiene efectos beneficiosos: inhibición de la absorción de colesterol, disminución de las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL, efectos antiinflamatorios, antitumorales y efectos bactericidas (Muñoz *et al.*, 2011).

Actualmente se puede asumir que el consumo de niveles moderados de fitoesteroles, ofrecen ventajas como agentes reductores del colesterol para uso en seres humanos. Por lo cual encontramos diferentes tipos de productos alimenticios funcionales, tales como grasas para untar, yogures y leches los cuales pueden contener fitoesteroles libres o esteres de ácidos grasos fitoestereril, los cuales son añadidos en niveles altos en estos productos que están disponibles en el mercado, especialmente en varios de los países de Europa (Lagarda *et al.*, 2006).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1 LUGAR DE INVESTIGACION

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de la unidad de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT), de la Universidad Nacional Agraria La Molina – Ciudad de Lima.

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fue proporcionado por el INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria). En total se analizaron 16 accesiones de la colección de semillas de Sacha Inchi, de las cuales 9 corresponden a San Martín y 7 a Loreto.

Los datos de pasaporte de las semillas utilizadas se muestran en la Tabla N°33 del Anexo N°01.

2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Reactivos químicos:

- Éter de petróleo (Tedia)
- Nitrógeno gaseoso N₂ UHP (AGA)
- Etanol (J.T. Baker)
- Ácido gálico (Sigma Aldrich)
- BHT (Sigma Aldrich)
- Alcohol metílico grado HPLC (Fermont)
- Alcohol metílico q.p. (Fermont)
- Agua destilada
- Folin 2N (Merck)

- Carbonato de sodio (J.T. Baker)
- Acetona (J.T. Baker)
- Hexano (J.T. Baker)
- Colestanol (Chromadex)
- Campesterol (Chromadex)
- Estigmasterol (Chromadex)
- B-sitosterol (Chromadex)
- Alfa tocoferol (Chromadex)
- Beta tocoferol (Chromadex)
- Gamma tocoferol (Chromadex)
- Delta tocoferol (Chromadex)
- FAMES (Sigma Aldrich)
- N- heptano (Tedia)
- Hidróxido de potasio (J.T. Baker)
- Sulfato de sodio (J.T. Baker)
- Diclorometano (J.T. Baker)
- ABTS (2,2' azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (Sigma Aldrich)
- Persulfato de potasio (Sigma Aldrich)
- 2- propanol (Tedia)
- Trolox (Sigma Aldrich)
- B-caroteno (Sigma Aldrich)
- Ácido clorhídrico al 37% (Fisher)
- Ácido acético (Fermont)

Material de laboratorio:

- Mortero
- Vasos de precipitación (50ml, 100ml, 250ml, 500ml)
- Fiolas (5ml, 10ml, 25ml, 50ml, 100ml)
- Probetas (5ml, 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml)
- Frascos de vidrio ámbar (5ml, 10ml, 15ml, 20ml)

- Pera de decantación (250ml)
- Tubo de ensayo
- Gradilla
- Tubos falcón con tapa rosca (15ml, 50ml)
- Pipetas graduadas (5ml, 10ml)
- Micro pipetas de 20- 200 μ L, 100-1000 μ L y 500-5000 μ L
- Tubo de ensayo hermético (50ml)
- Matraces esmerilados (250ml)
- Tubos ependors (1.5 ml)
- Espátulas
- Jeringas de 1ml
- Viales para CG
- Viales para HPLC
- Adaptadores de viales
- Filtros de nylon para HPLC

Equipos:

- Balanza analítica (OHAUS Modelo AR2140, U.S.A.)
- Equipo Soxhlet (Pyrex)
- Calentador multiple (VWR Scientific Products- Glass Col)
- Campana de Extracción
- Agitador magnético con plancha calefactora (Ceramag Midi- IKA Works USA)
- Estufa al vacío (VWR 1400 E-2, U.S.A.)
- Desecador
- Sistema de purificación de agua (Simplicity Millipore, Francia)
- Congelador -70°C (Ilshin Lab – Deep Freezzer)
- Congelador -20°C (Electrolux H300, Brasil)
- Agitador Vortex (VELP Scientifica Modelo F202A0175, Europa)
- Rota vapor (Heidolph Modelo Heizbad HB, Alemania)
- Refrigerador (LG P/No 3850JD2244B, Corea)
- Destilador automático (GLF tipo 2008 No 1114511I, Alemania)

- Espectrofotómetro (Thermo Scientific Modelo Genesys 10 UV, U.S.A.)
- Baño María con agitación (GFL Modelo 1083, Alemania)
- Agitador rotatorio (Heidolph Polymax 2040, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacuubrand Modelo ME2C, Alemania)
- HPLC (Waters 2695)
- Cromatografo de gases – CG-2010 Plus (Shimatzu Plus)
- Cromatografo de gases – Trace (Milan Italie)

2.3 METODOS

2.3.1 OBTENCION Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las semillas de las 16 accesiones, obtenidos de la Colección Nacional de Sacha Inchi procedentes del INIA, se muestran en la galería de fotos de la Figura N°42 del Anexo N°01. Estas semillas, fueron almacenadas debidamente rotuladas y selladas en bolsas de papel y polipropileno (Figura N°14), en una congeladora a -20°C .



Figura N° 14. Fotografías del almacenamiento de las accesiones de semillas.

2.3.2 EXTRACCION DE ACEITE

La extracción de los aceites fue realizado a través de una extracción continúa solido-liquido en equipo Soxhlet.

Procedimiento: De cada accesión de semilla, se pesó 35 g de almendra molida (molienda grosera), este se empaqueto en papel filtro rápido (doble empaque) y se colocó en el equipo Soxhlet. Se agregó 300ml de éter de petróleo y se sometió a la extracción a una temperatura de 40°C , por 6 horas. Concluido este tiempo, se retiró el balón y se le colocó directamente sobre

una plancha calentadora a una temperatura de 40°C, donde se eliminó el solvente residual con nitrógeno gaseoso, finalmente el balón fue llevado a una estufa a 40°C por 30 minutos. El contenido de aceite se cuantificó por diferencia de pesos previo y posterior a la extracción.

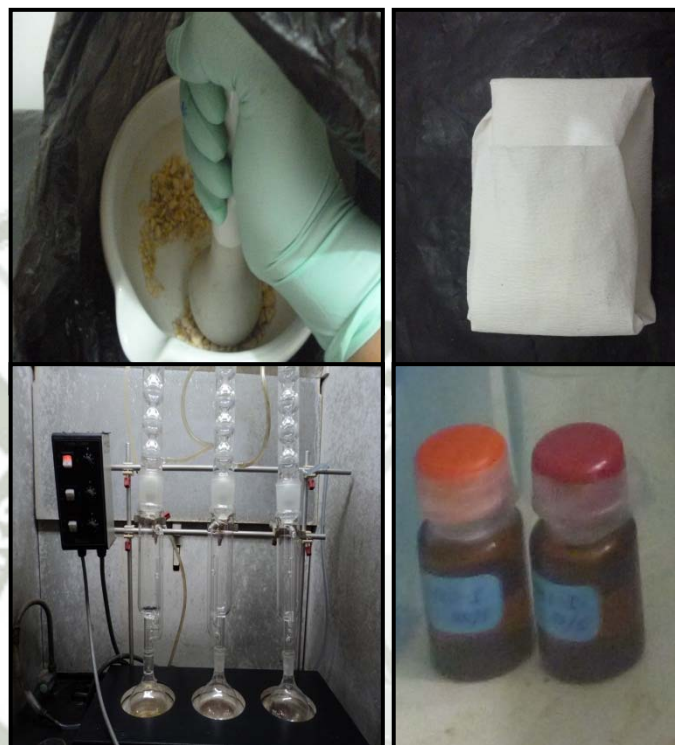


Figura N° 15. Fotografías del procedimiento de extracción de aceite de Sacha Inchi.

CALCULOS:

Los resultados de rendimiento de aceite fueron expresados en (%), con el uso de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Aceite} = \left(\frac{W_i - W_f}{W_m} \right) \times 100$$

Dónde:

W_i = peso inicial del balón vacío (g)

W_f = peso final del balón más aceite obtenido (g)

W_m = peso de muestra - almendra molida (g)

2.3.3 DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT)

Para la determinación de compuestos fenoles totales (CFT), el ensayo Folin-Ciocalteu (FC) ha llegado a ser uno de los métodos más empleados en alimentos.

Método Folin-Ciocalteu (FC), Swain y Hills, 1959.

El método de Folin-Ciocalteu, adaptado por Singleton *et al.* (1999), consiste en que los compuestos fenólicos (CF), presentes en la muestra, se oxidan por acción del reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico), el cual en cambio se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 755 nm, esta se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico o catequinas.

Extracción de los compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos fue efectuada según el método descrito por Araujo, 1999 citado por Michotte, 2009.

Procedimiento: Se pesó 0.5g de aceite y se le agregó 5ml de éter de petróleo, la mezcla fue homogenizada con la ayuda de un vortex y transferida en una pera de decantación de 250ml. Seguidamente, se procedió a agregar 11 ml de una solución de etanol 80% (v/v) en la pera de decantación y la mezcla se agito manualmente durante 1 minuto. El sistema fue dejado en reposo para decantar hasta la separación total de las fases, transcurrido ello la fase etanólica fue recuperada en un frasco ámbar de 15 ml de capacidad. Aproximadamente, se obtuvo 11 ml del extracto etanólico, este fue evaporado en un rota vapor a 37°C hasta sequedad y el residuo fue resuspendido en metanol absoluto a un volumen conocido entre 3 a 4 ml, finalmente estos

extractos fueron almacenados con nitrógeno a -20°C hasta su análisis espectrofotométrico.



Figura N°16. Fotografías del procedimiento de extracción de los compuestos fenólicos.

Determinación de compuestos fenólicos totales por espectrofotometría

Primero se realizó la preparación de la curva estándar, esta consistió en preparar una solución madre con 28.9 mg de ácido gálico en 25ml de agua Milli-Q y después con factor de dilución de 1/10 una solución de trabajo. Partiendo de esta última, se preparó las 5 diluciones con diferentes concentraciones en un rango entre 0.00925-0.02774 mM.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales, primero se realizaron diluciones de los extractos, en el factor necesario para que las absorbancias se encuentren en el rango de la curva estándar. Ya conocidas las diluciones, se procedió a colocar en tubos de ensayo protegidos de la luz, 500 μL de extracto de muestra diluida, se le agregó 250 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y 1250 μL de la solución de carbonato de sodio 5M. Esta mezcla se homogenizó con la ayuda de un vortex y se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad. Paralelamente se preparó un blanco empleando agua destilada en lugar de la muestra y se trabajó bajo las mismas condiciones, este blanco sirvió para llevar a cero el espectrofotómetro. Finalmente se procedió a medir las absorbancias a 755nm.

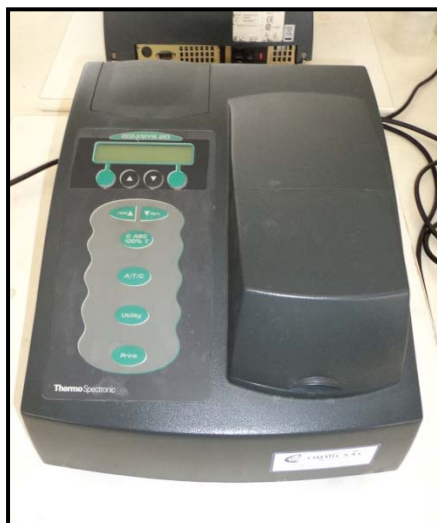


Figura N°17. Fotografía del Espectrofotómetro Genesis20, equipo usado para la lectura de las absorbancias de los compuestos fenólicos, carotenoides y capacidad antioxidante.

CALCULOS:

El contenido de los compuestos fenólicos totales, fueron expresados como mg GAE /100 g de aceite, utilizando los datos de la curva estándar obtenida y las siguientes ecuaciones:

$$mg\ GAE/g = \left[\left(\frac{Abs + b}{m} \right) \times V \times Fd \right] \div Wma = A$$

$$mg\ GAE/100\ g = A \times 100$$

Dónde:

m: pendiente

b: intercepto

Abs: Absorbancia de la muestra (a 755nm)

V: Volumen final de extracto de muestra (ml)

Fd: Factor de dilución

Wma: Peso de muestra de aceite (g)

GAE: Equivalente a ácido Gálico

A: mg GAE/g

2.3.4 DETERMINACION DE CAROTENOIDES.

Para determinar el contenido de carotenoides se desarrolló el método reportado por Talcott y Howard 1999 y sus modificaciones, el que se basa en una extracción en medio apolar y con un antioxidante (BHT), de tal forma que la concentración puede ser determinada por medición espectrofotométrica.

Primero se realizó la preparación de la curva estándar, para ello se preparó una solución stock de β -Caroteno con hexano y partiendo de ella se preparó las 5 diluciones con diferentes concentraciones, en un rango entre 0.001-0.005 mg β -Caroteno/ml.

Extracción de carotenoides

Procedimiento: En condiciones de oscuridad se pesó 0.5g de aceite, se adicionó 10 mL (V1) de una solución de acetona: etanol en proporción 1:1 que contiene además 200mg/L de solución de BHT. Después se adicionó un volumen de hexano 5 mL (V2), este volumen es considerado a partir de (V2=V1/2), seguido la mezcla se agitó vigorosamente con la ayuda de un vortex y se dejó reposo por 30 minutos para que la solución se estabilice. Pasado el tiempo mencionado, se agregó 2.5 mL (V3) de agua destilada, volumen que fue considerado de (V3=V2/2), luego se agitó y dejó reposar por 20 minutos para producir la separación de fases. Transcurrido ello se tomó una alícuota de la fase superior de hexano y se procedió a leer en el espectrofotómetro a 470nm. Se usó como blanco hexano para llevar a cero el espectrofotómetro.

CALCULOS:

El contenido de carotenoides, fue expresado como mg β -caroteno/100g de aceite, utilizando los datos de la curva estándar obtenida y las siguientes ecuaciones:

$$mg \beta - caroteno/g = \left[\left(\frac{Abs + b}{m} \right) \times V \times Fd \right] \div Wma = B$$

$$mg \beta - \text{caroteno}/100 g = B \times 100$$

Dónde:

m: pendiente

Abs: Absorbancia de la muestra (a 470nm)

V: Volumen final de solvente- hexano (ml)

Fd: Factor de dilución

Wma: Peso de muestra de aceite (g)

B: mg β - caroteno/g

2.3.5. DETERMINACION DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG)

La determinación de fitoesteroles, fue realizada por el método descrito por Duchateau *et al.*, 2002. En el cual se realiza una extracción de los fitoesteroles a partir del aceite, mediante una saponificación (digestión alcalina con hidróxido de potasio a una temperatura y por un tiempo adecuado), técnica que es ampliamente utilizada para liberar la materia insaponificable, la cual contiene compuestos importantes (tocoferoles, fitoesteroles, fitoestanoles y sus ésteres, etc.), de la matriz oleosa (triglicéridos).

Preparación de estándares

Primero se realizó la preparación del estándar interno (β -colestanol), para ello se pesaron 5mg de β -colestanol con 25ml de n-heptano (concentración final = 0.2mg/ml), este fue almacenado y protegido de la luz a -20°C.

La preparación de los estándares campesterol, estigmasterol y β -sitosterol (Anexo N°05), consistió en preparar una solución madre y partiendo de ella se realizaron diluciones de diferentes concentraciones, haciendo uso también del estándar interno como se observa en la Tabla N°37 del ANEXO N°05.

Extracción de fitoesteroles

Procedimiento: Para la saponificación, se pesó 100mg de aceite en un tubo

de ensayo hermético, se agregó 100µl de estándar interno y seguido se adicionó 1ml de solución etanólica de hidróxido de potasio 12%, esta mezcla se homogenizó y se colocó a baño maría a 60°C por 1 hora y media con una agitación lenta. Después se retiró el tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se procedió a extraer la fracción insaponificable, para lo cual, se agregó 1mL de agua destilada y 5 mL de n-heptano, esta mezcla fue homogenizada y transferida a una pera de decantación. La fase orgánica fue recolectada en un tubo que contenía sulfato de sodio, y la extracción fue repetida dos veces más con 5ml y 4 ml de n-heptano respectivamente. Las tres fases orgánicas extraídas ya combinadas y homogenizadas, fueron evaporados con un rotavapor a 40°C hasta sequedad, el residuo fue resuspendido con 1ml de n-heptano y almacenado en micro viales a -20°C. Para el momento de la inyección, se tomó un volumen del extracto en un vial para CG y se procedió a inyectar al Cromatografo de Gases.



Figura N°18. Fotografías del procedimiento de corrida de Fitoesteroles en el Cromatografo de Gases, CG-2010 PLUS.

Características del Cromatografo de gases

El análisis de los fitoesteroles se realizó con un CG (Shimadzu Plus GC-2010) equipado con un inyector de columna, con un detector FID (300°C) y un inyector automático. El gas portador a presión constante (20-25cm/sec) es Helio (He). El volumen de inyección es de 2µl. La columna capilar utilizada es de SUPELCO, la columna es una SAC-5 de 30m X 0.25mm ID, (con

película interna de 0.25µm de 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxano). El programa de la pendiente de la temperatura del horno sigue los siguientes pasos, comienza a una temperatura inicial de 60°C, se mantiene por un minuto, entonces aumenta la temperatura hasta 300°C con un aumento de temperatura de 10°C/min, la que se mantiene por 50 minutos y finalmente disminuye la temperatura con 10°C/min hasta una temperatura de 40°C.

Contenido de Fitoesteroles por CG

Para la identificación de cada uno de los fitoesteroles, se utilizó como referencia, el tiempo de retención que presentó cada uno de los estándares de referencia (campesterol, estigmasterol y β-sitosterol), en sus respectivos cromatogramas generados.

La cuantificación de los fitoesteroles, se realizó a partir de las curvas de calibración de los estándares de referencia de cada compuesto y el estándar interno (colestanol).

CALCULOS:

El contenido de fitoesteroles, fue expresado en mg de fitoesterol/ 100g de aceite, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$mg F/g = \frac{CM \times V}{Wma} = C$$

$$mg F/100 g = C \times 100$$

Dónde:

F: Fitoesterol (campesterol, estigmasterol, b-sitosterol) el que corresponda.

V: Volumen final de extracto de muestra (ml)

Wma: Peso de muestra de aceite (g)

CM: Concentración de muestra (mg/ml).

C: mg F/g

1.3.6. DETERMINACION DE TOCOFEROLES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

La determinación de tocoferoles, fue realizado por el protocolo descrito por Amaral et al., 2005.

Primero se realizó la preparación de los estándares alfa tocoferol, beta tocoferol, gamma tocoferol y delta tocoferol (ANEXO N°06), para ello de cada uno de los estándares independientemente, se preparó una solución madre, las cuales fueron almacenadas a -70°C . Después partiendo de estas soluciones se prepararon diferentes diluciones como se observa en la Tabla N° 39 del ANEXO N°06.

Procedimiento: Para la preparación de las muestras, se pesó 100 mg de aceite en fioles de 10 ml, que fueron llevadas a volumen con hexano grado HPLC, luego se homogenizó manualmente y se tomó una alícuota que fue filtrada en un vial para HPLC, finalmente las muestras fueron inyectadas y analizadas en el HPLC.



Figura N°19. Fotografía del equipo de HPLC, WATERS 2695

Características de HPLC

El análisis de los tocoferoles se realizó en un equipo de HPLC (Waters 2695) integrado con un inyector automático, equipado con un detector de diodos (Waters 2996) conectado en serie con un detector fluorescente (Waters

2475), programado para excitación a 290 nm y emisión 330 nm. La separación cromatográfica fue realizada en una columna capilar de AGILENT, la columna es una Zorbac Eclipse XBD-C18 DE 4.6 X 150mm, 3.5 micron, la temperatura de la columna usada fue de 30°C. La Fase móvil usada fue una mezcla de Hexano: 2-propanol: Ácido acético (en proporciones 1000: 6: 5 respectivamente), el flujo es de 0.7ml/min, el volumen de inyección es de 10µl.

Contenido de Tocoferoles por HPLC

Para la identificación de cada uno de los tocoferoles, se utilizó como referencia, el tiempo de retención que presentó cada uno de los estándares de referencia (alfa, beta, gamma y delta tocoferol), en sus respectivos cromatogramas generados.

La cuantificación de los tocoferoles, se realizó a partir de las curvas de calibración de los estándares de referencia de cada compuesto.

CALCULOS:

Los resultados fueron expresados en mg de tocoferol/ 100g de aceite, utilizando los datos obtenidos del HPLC y las siguientes ecuaciones:

$$mg\ T/g = \frac{CM \times V}{Wma} = D$$

$$mg\ T/100\ g = D \times 100$$

Dónde:

T: Tocoferol (alfa, beta, gamma y beta) el que corresponda.

V: Volumen final de muestra (ml)

Wma: Peso de muestra de aceite (g)

CM: Concentración de muestra (mg/ml)

D: mg T/g

1.3.7.DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG)

Este estudio se realizó en el Institut des Sciences de la vie & Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale. Biologie de la nutrition et toxicologie environnementale (BNTE) – Bélgica.

La determinación de los ácidos grasos, fue realizado de acuerdo al método descrito por Michotte, 2009. Método que requiere de un proceso de pre-metilado, ya que se sabe que la metilación rompe los enlaces éster de los triglicéridos y añade un grupo metilo a los ácidos grasos, por tanto los ácidos grasos metilados son más volátiles y menos polares, lo que permite su buena elución en la cromatografía de gases.

Primero, se realizó la preparación del estándar del perfil de ácidos grasos-FAMES (Anexo N°07), para ello se preparó una solución madre y una solución de trabajo, de esta última se partió para preparar las diferentes diluciones, como se observa en la Tabla N°41 del Anexo N°07.

Procedimiento:

Metilación de ácidos grasos: Se pesó 500 mg de aceite en un tubo hermético, se adicionó 10 ml de una solución metanólica de KOH 0.1M y se cerró el tubo herméticamente. Enseguida el tubo fue colocado a baño maría a 70° C durante 60 minutos, donde a los 5, 20 y 40 minutos se agitó vigorosamente. Después de retirar el tubo y enfriarlo a temperatura ambiente, se realizó la metilación, para ello se adicionó 4 ml de una solución metanólica de HCl 1.2N, se agitó vigorosamente la mezcla y se colocó en baño maría a 70°C durante 20 minutos, a los 10 minutos se agitó vigorosamente. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente para continuar con la extracción de los ácidos grasos.

Extracción de ácidos grasos y diluciones: Después de realizar la metilación se procedió a la extracción de los ácidos grasos, para ello, se adicionó 20 ml de hexano grado HPLC y 10 ml de agua Mili-Q, se agitó primero

manualmente y después con una vortex y se dejó reposar a 4°C en un refrigerador durante una noche. Al día siguiente se realizó la dilución, tomando 150ul de la fase superior del tubo (hexano) y colocándola en una fiola de 20ml, donde se enrasa con hexano y se conserva a -20°C. Para el momento del análisis se toma una alícuota y se coloca en un vial para CG y se procede a la inyección y el análisis en el CG.



Figura N°20. Fotografía del procedimiento de metilación y extracción de los Ácidos grasos.

Características de Cromatografo de gases

El análisis de ácidos grasos se realiza con un Trace CG (Milan, Italia) de thermo finnigan, equipado con un inyector de columna, con un detector FID (225°C) y un inyector automático. El gas portador a presión constante (200kPa) es Helio (He). El volumen de inyección es de 1ul. La columna utilizada es un RESTEK Rt-2560 (Bellefonte, PA, USA) compuesto de biscianopropyl polysiloxano, tiene un largo de 100m, un diámetro interno de 0.25 mm y la película del interior tiene un espesor de 0.2um. El programa de la pendiente de la temperatura del horno sigue los siguientes pasos:

1. Temperatura inicial: 80°C
2. Aumento de la temperatura (25°C/min) hasta 175 °C.
3. Primer nivel: 175°C dado por 25 min.
4. Aumento de temperatura (10°C/min) hasta 205°C.
5. Segundo nivel: 205°C por 4 min.
6. Aumento de temperatura (10°C/min) hasta 225°C.

7. Tercer nivel: 225°C por 20min.
8. Diminución de temperatura (20°C/min) hasta 80°C.



Figura N°21. Fotografía del equipo Cromatografo de Gases, TRACE CG 2000 SERIES.

Contenido de Ácidos grasos por CG

Para la identificación de cada uno de los ácidos grasos, se utilizó como referencia, el tiempo de retención que presentó el estándar de referencia, en su respectivo cromatograma generado. En este caso se consideraron los ácidos grasos principales (Ac. Palmítico, Ac. Esteárico, Ac. Oleico, Ac. Vaccénico, Ac linoleico y Ac. α -linolenico)

CALCULO:

Los resultados obtenidos fueron dados como mg AG/L de solución inyectada. Esta expresión se traducirá en porcentaje del total de ácidos grasos identificados AGT.

$$\% \text{ Acido graso} = \frac{\text{Concentracion de AG (mg/l)}}{\text{Concentracion de AGT (mg/l)}} \times 100$$

Dónde:

AG: Ácido graso

AGT: Ácidos grasos totales

1.3.8. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TEAC(ABTS) HIDROFILICA Y LIPOFILICA

La determinación de la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica fue desarrollada a través de uno de los métodos más usados, el cual es explicado a continuación.

Método TEAC- ABTS (Trolox equivalent antioxidant capacity). Millar y Rice-Evans, 1997.

El fundamento del método TEAC, radica en la decoloración del radical monocatión preformado $ABTS^+$ (Sánchez-Moreno, 2002). El radical $ABTS^+$ posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm.

La generación del radical $ABTS^+$ se produce tras una oxidación, entre el $ABTS^{2-}$ (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfonato) y el persulfato de potasio. Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E como se observa en la Figura N°22.

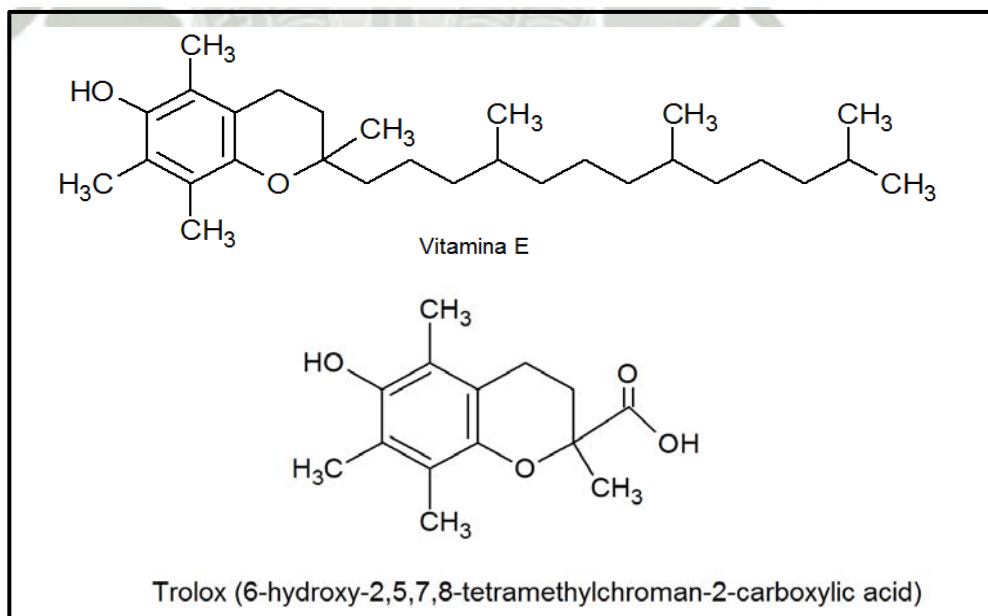


Figura N°22. Estructura de la vitamina E y Trolox (análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E).

Una de las propiedades del ABTS es que es soluble en solvente acuoso y orgánico, lo cual hace que el método sea apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológicos.

Para la determinación de la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica, se utilizó el método reportado por (Arnao et al., 2001), el cual se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la reducción de un radical estable pre-formado (ABTS) en medio alcohólico (metanol).

Extracción de componentes antioxidantes

- **Extracto hidrofílico:** Se pesó 0.5g de aceite, inmediatamente se agregó 5 ml de metanol 80% (v/v), se agitó con un vortex y la mezcla fue transferida en una pera de decantación de 250ml, se dejó en reposo hasta la separación de fases. La fase metanólica, que es la que contiene los compuestos antioxidantes hidrofílicos, fue recolectada en un frasco ámbar y almacenada con nitrógeno a -20°C , hasta el momento del análisis espectrofotométrico.
- **Extracto Lipofílico:** Se pesó 0.25g de aceite, se agregó 10 ml de diclorometano y se agitó por 20 minutos en un agitador magnético a temperatura ambiente. El extracto fue almacenado en un frasco ámbar con nitrógeno a -20°C , hasta el momento del análisis espectrofotométrico.

Determinación de la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica por espectrofotometría

Preparación de Curvas estándar: La curva estándar, para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica, se preparó a partir de una solución madre de 12.5mg de Trolox con 10 ml de metanol y con un factor de dilución de 1/10, una solución de trabajo. De esta última se realizaron 5 diluciones, en un rango de 0.01-0.4 μM .

Por otro lado, la curva estándar para la determinar la capacidad antioxidante lipofílica, se preparó a partir de una solución madre de 12.5 mg de Trolox en 10 ml de diclorometano y con un factor de dilución de 1/10, una solución de trabajo. De esta última se realizaron 5 diluciones, en un rango de 0.1-0.8 μM .

Preparación de la solución madre ABTS⁺: Primero se preparó una solución de ABTS²⁻, el que recibe el nombre de reactivo A, este se preparó pesando 78,4 mg de ABTS²⁻ y llevando a volumen con agua destilada a una fiola de 10ml. Por otro lado, también se preparó una solución de persulfato de potasio, el que recibe el nombre de reactivo B, para ello se pesó 13,2 mg de persulfato de potasio y se llevó a volumen con agua destilada a una fiola de 10 ml. Ambas soluciones fueron almacenadas en frascos ámbar bajo condiciones de refrigeración y oscuridad.

Para preparar la solución madre ABTS⁺, se mezclaron volúmenes iguales de los reactivos A y B (relación 1:1), mezcla que se dejó reaccionar a temperatura ambiente y en oscuridad por 12 horas antes de ser usada.

De la solución madre ABTS⁺, se preparó una solución diluida de ABTS⁺, para ello en un frasco ámbar se colocó 1ml de solución madre de ABTS⁺ y se le adicionó 62 ml de metanol aproximadamente, hasta que la solución diluida presente una absorbancia de 1.1 +/- 0.02 a 734 nm, corrigiendo la lectura con metanol o solución madre de ABTS⁺ según sea el caso. Previo a la lectura de la absorbancia de la solución diluida, se llevó a cero el espectrofotómetro con metanol.

Ensayo con los extractos hidrofílicos y lipofílicos: Para proceder a la cuantificación de la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica respectivamente, se colocó en tubos de ensayo protegidos de la luz, 150µl de muestra (diluida si es que fuera necesario) y 2850 µl de la solución diluida de ABTS⁺, después se homogenizaron con la ayuda de un vortex y se colocaron en un agitador rotatorio por 2 horas y 15 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente transcurrido el tiempo de reacción, se procedió a realizar la lectura a 734 nm, previo a ello se llevó a cero el espectrofotómetro con metanol. Paralelamente a las muestras se preparó el blanco en las mismas condiciones, pero en este caso se utilizó metanol en lugar de la muestra.

CALCULOS

Los resultados obtenidos, se expresaron como µmol TE/100 g de aceite. De

acuerdo a las curvas obtenidas respectivamente y a las siguientes ecuaciones:

Capacidad antioxidante hidrofílica

$$\mu\text{mol TE/g} = \left[\left(\frac{\Delta\text{Abs} - b}{m} \right) \times V \times Fd \right] \div Wma = E$$

$$\mu\text{mol TE/100 g} = E \times 100$$

Dónde:

m: pendiente

b: intercepto

ΔAbs : Absorbancia del Blanco – Absorbancia de la muestra (a 734 nm)

V: Volumen final de extracto de muestra (ml)

Fd: Factor de dilución.

TE: Equivalente a Trolox

E: $\mu\text{mol TE/g}$

Wma: Peso muestra de aceite (g)

Capacidad antioxidante lipofílica

$$\mu\text{mol TE/g} = \left[\left(\frac{\Delta\text{Abs} + b}{m} \right) \times V \times Fd \right] \div Wma = F$$

$$\mu\text{mol TE/100 g} = F \times 100$$

Dónde:

m: pendiente

b: intercepto

ΔAbs : Absorbancia del Blanco – Absorbancia de la muestra (a 734 nm).

V: Volumen final de extracto de muestra (ml).

Fd: Factor de dilución.

TE: Equivalente a Trolox

F: $\mu\text{mol TE/g}$

Wma: Peso muestra de aceite (g).

2.3.9. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron presentados, como promedios con desviación estándar, correspondiente a dos repeticiones. Los análisis estadísticos, se hicieron en el programa Statistical Package for the Social Scienses versión 19 (SPSS) en el entorno de Windows 7.

Para observar si existen diferencias significativas, entre las 16 unidades de aceite, respecto al contenido de fenoles totales, carotenoides, fitoesteroles, tocoferoles, ácidos grasos y capacidad antioxidante, se realizaron test de ANOVA, a un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$) y para relacionar las 16 unidades de aceite, se realizó un test de Tukey.



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 EXTRACCION DE ACEITE

El resumen de los resultados obtenidos, de acuerdo a la metodología para la extracción de aceite, son mostrados en la Tabla N°09 y los resultados completos se observan en la Tabla N°34 (Anexo N°02). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°23 para una mejor apreciación.

Tabla N°09. Rendimiento de aceite de las semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi (%)*

ACCESION	ACEITE (%)
PER000394	35.46 ± 0.15
PER000395-A	37.57 ± 0.44
PER000401	35.84 ± 1.12
PER000403	34.54 ± 2.80
PER000405	35.38 ± 0.99
PER000406-A	35.52 ± 0.07
PER000406-B	34.68 ± 0.21
PER000408-B	35.07 ± 1.32
PER000416	34.87 ± 0.38
PER000417	35.23 ± 0.59
PER000418	35.95 ± 1.52
PER000420	34.44 ± 0.45
PER000421	37.24 ± 0.51
PER000422	33.47 ± 0.34
PER017597	36.89 ± 0.90
PER017598	35.65 ± 0.33

*Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar (n=2).

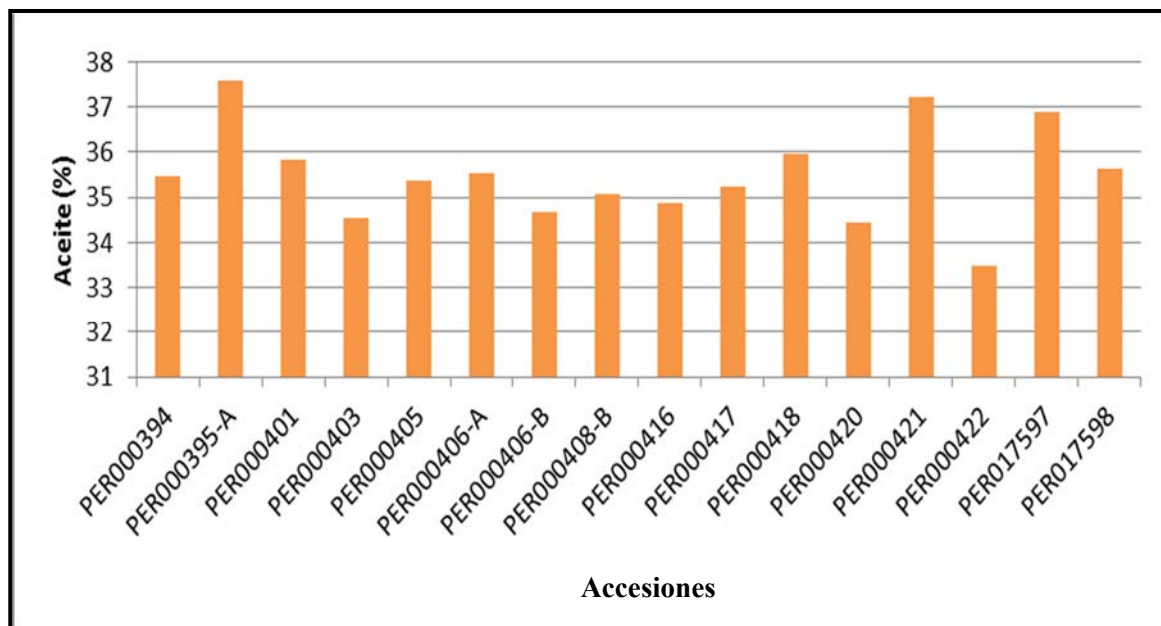


Figura N°23. Comparación del rendimiento de aceite de semillas de 16 accesiones de Sacha Inchi.

Las semillas de las 16 accesiones, en promedio, presentan un rendimiento de 35.49%. La accesión PER000395A, con 37.57% presentó el mayor rendimiento, mientras que la accesión PER000422 con 33.47%, presentó el menor rendimiento.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°10), se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los rendimientos de las 16 accesiones de semillas.

Tabla N°10. ANOVA del rendimiento de aceite

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Inter-grupos	34.154	15	2.277	2.226	0.062
Intra-grupos	16.369	16	1.023		
Total	50.522	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

El rendimiento de aceite de las semillas de las 16 accesiones, está en un rango entre 33.47 y 37.57%. Estos valores son inferiores respecto a otros trabajos (Follegati-Romero et al. 2009) en donde, usando hexano, se obtuvo un 54.3% de rendimiento. En este mismo trabajo cuando se usa CO₂ en estado supercrítico, el rendimiento osciló entre 41.9 a 50.1%. Estos últimos

resultados son de muestras provenientes de la ciudad de Tingo María, mientras que el presente trabajo se desarrolló con muestras provenientes de San Martín y Loreto. Por otro lado, datos similares a los obtenidos en el presente trabajo, fueron reportados por otro trabajo (Bondioli et al, 2006), cuyo rendimiento fue de 34.42%. Mientras que otro estudio (Merino, 2009), reportó rendimientos entre 7.62 – 20.23%, valores que son inferiores con respecto a los obtenidos en el presente trabajo, en este último estudio se trabajó con 10 diferentes ecotipos provenientes de San Martín, Loreto y Amazonas.

Esta diferencia de resultados puede deberse a muchos factores tales como:

- a. Diferentes semillas
- b. Procedencia de semillas
- c. Temporada de cosecha
- d. Tipo de suelo donde se desarrolló el cultivo

3.2 DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT)

De acuerdo al método desarrollado de Folin-Ciocalteu (2.3.3). Los datos obtenidos, de la curva estándar de ácido gálico, se observan en la Tabla N°11.

Tabla N° 11. Curva estándar de ácido gálico

Concentración (ppm)	Absorbancia a 755nm		Promedio ± Desviación estándar	
	R1	R2		
9.25	0.106	0.105	0.106	0.001
13.87	0.229	0.230	0.230	0.001
18.50	0.359	0.362	0.361	0.002
23.12	0.507	0.515	0.511	0.006
27.74	0.647	0.651	0.649	0.003

Con estos datos, se obtiene el siguiente gráfico de calibración (Figura N°24).

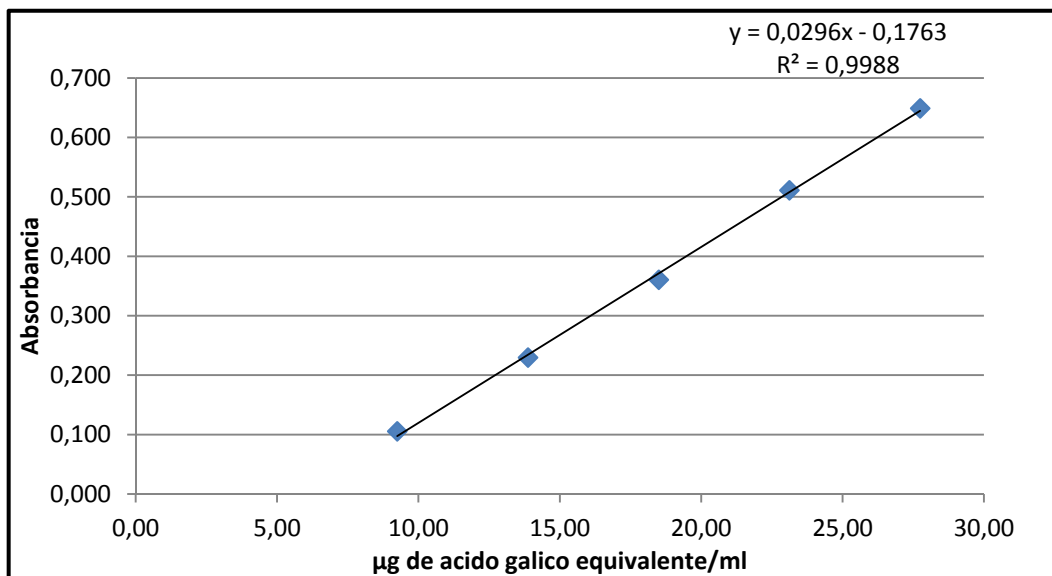


Figura N°24. Representación gráfica de la curva estándar de ácido gálico.

La Tabla N°12, muestra el resumen de los resultados obtenidos del contenido de compuestos fenólicos de las 16 unidades de aceite y los resultados completos se observan en la Tabla N°35 (Anexo N°03). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°25 para una mejor apreciación.

Tabla N° 12. Contenido de Compuestos Fenólicos en aceites de sachá inchi*

ACEITE	Compuestos Fenólicos (mg GAE/100g aceite)	
PER000394	64.53	± 4.41
PER000395-A	60.21	± 0.47
PER000401	60.68	± 2.19
PER000403	62.10	± 1.98
PER000405	60.84	± 1.08
PER000406-A	59.05	± 0.25
PER000406-B	60.23	± 1.38
PER000408-B	62.11	± 2.36
PER000416	60.74	± 0.57
PER000417	62.62	± 2.21
PER000418	59.80	± 0.65
PER000420	69.66	± 10.14
PER000421	63.09	± 4.97
PER000422	64.03	± 5.07
PER017597	65.82	± 7.13
PER017598	58.98	± 1.65

*Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2).

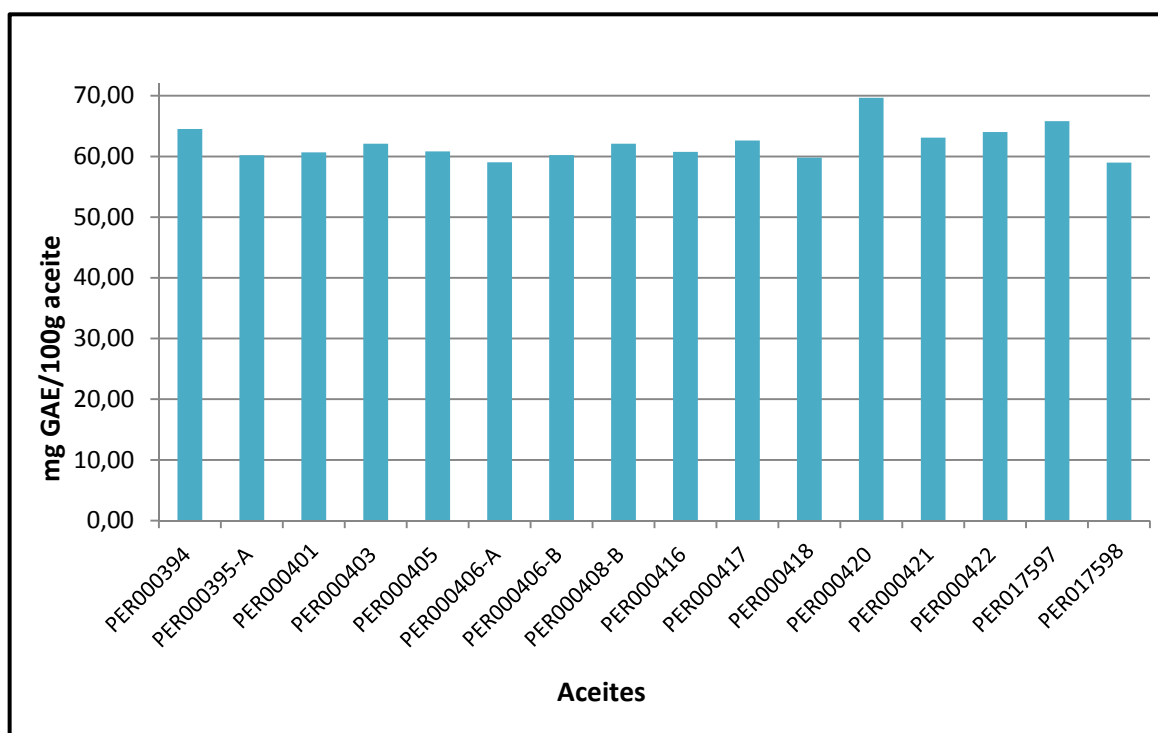


Figura N°25. Comparación de medias del contenido de Compuestos Fenólicos en 16 muestras de aceite de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan un contenido de CFT de 62.16 mg GAE/100g aceite. La unidad de aceite PER000420, con 69.66 mg GAE/100g aceite, presentó el mayor contenido, mientras que la unidad de aceite PER017598, con 58.98 mg GAE/100g aceite, presentó el menor contenido.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°13), se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en el contenido de los CFT entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N°13. ANOVA del contenido de compuestos fenólicos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
Inter-grupos	237.304	15	15.820	1.014	0.487
Intra-grupos	249.551	16	15.597		
Total	486.856	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

El contenido de compuestos fenólicos de los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 58.98 - 69.66mg GAE/100 g aceite. Estos valores son superiores comparados a otros trabajos (Fanali et al., 2011) en donde, se reportó un valor de 6.20 mg GAE/100 g aceite de contenido.

Esta diferencia de resultados puede deberse a muchos factores tales como:

- a. Diferentes semillas
- b. Diferente metodología en la extracción de CFT

3.3 DETERMINACION DE CAROTENOIDES

De acuerdo a la metodología desarrollada (2.3.4), los datos obtenidos de la curva estándar de β -caroteno, presentan el siguiente gráfico de calibración (Figura N°26).

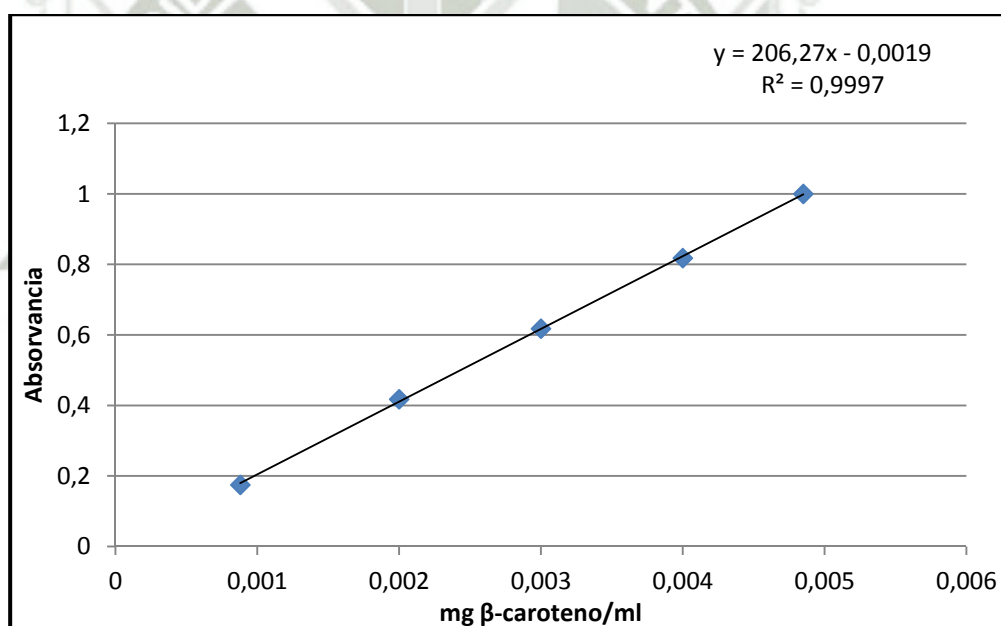


Figura N°26. Representación gráfica de la curva estándar de β -caroteno

El resumen de los resultados obtenidos, del contenido de carotenoides, son mostrados en la Tabla N°14 y los resultados completos se observan en la Tabla N°36 (Anexo N°04). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°27 para una mejor apreciación.

Tabla N° 14. Contenido de Carotenoides en aceites de sachá inchi*

ACEITE	Carotenoides (mg β -caroteno/100g aceite)	
PER000394	0.23 ^{c,d}	± 0.01
PER000395-A	0.15 ^a	± 0.01
PER000401	0.29 ^{e,f}	± 0.10
PER000403	0.31 ^f	± 0.01
PER000405	0.26 ^{d,e}	± 0.13
PER000406-A	0.23 ^{c,d}	± 0.15
PER000406-B	0.18 ^{a,b}	± 0.00
PER000408-B	0.26 ^{d,e}	± 0.01
PER000416	0.20 ^{b,c}	± 0.01
PER000417	0.33 ^f	± 0.01
PER000418	0.20 ^{b,c}	± 0.01
PER000420	0.22 ^{b,c,d}	± 0.02
PER000421	0.28 ^{e,f}	± 0.01
PER000422	0.29 ^{e,f}	± 0.00
PER017597	0.28 ^{e,f}	± 0.01
PER017598	0.26 ^{d,e}	± 0.02

*Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

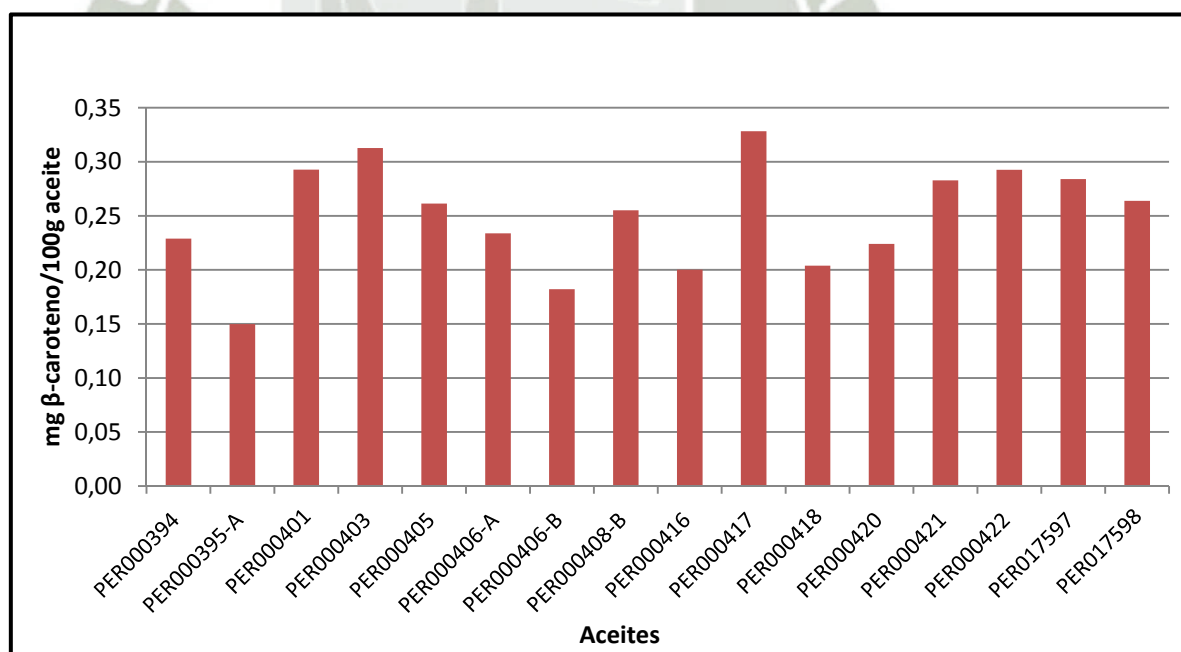


Figura N°27. Comparación de medias del contenido de Carotenoides en 16 muestras de aceites de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan un contenido de carotenoides de 0.25 mg β -caroteno/100g aceite. La unidad PER000417, con un valor de 0.33 mg β -caroteno/100g aceite, presentó el mayor contenido, mientras que la unidad PER000395A, con 0.15 mg β -caroteno/100g aceite, presentó el menor contenido.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°15), se observa que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de carotenoides entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 15. ANOVA del contenido de carotenoides

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
Inter- grupos	0.074	15	0.005	38.096	0.000
Intra-grupos	0.002	16	0.000		
Total	0.076	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación, se evalúa los 16 promedios usando el test de Tukey y los resultados se muestran en la Tabla N°14. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e y f) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

El contenido de carotenoides de los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 0.15-0.33 mg β -caroteno/100g aceite. Estos valores son relativamente superiores respecto a otros trabajos (Hamaker et al.,1992) en donde, se obtuvo 0.08 mg β -caroteno/100 g aceite.

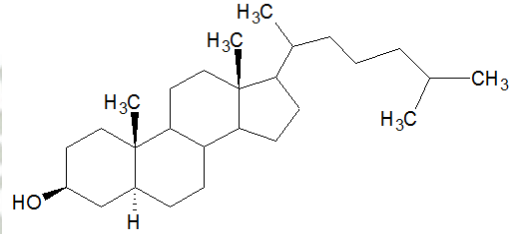
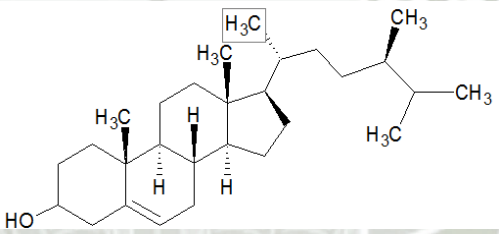
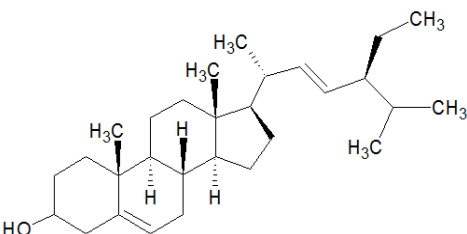
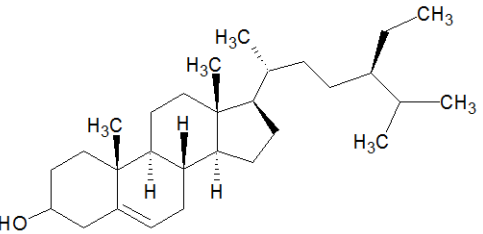
Esta diferencia de resultados puede deberse a muchos factores tales como:

- a. Diferentes semillas
- b. Diferente metodología en la extracción de carotenoides

3.4 DETERMINACION DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG)

De acuerdo a la metodología desarrollada (2.3.5), los tiempos de retención que presentaron cada uno de los estándares de referencia, para la identificación del estándar interno y los fitoesteroleos (Campesterol, estigmasterol y β -sitosterol), se muestran en la Tabla N°16.

Tabla N°16. Tiempo de retención para la identificación de fitoesteroleos.

Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención (min)
Colestanol (EI)*		16.9
Campesterol		34.1
Estigmasterol		35.5
β-Sitosterol		38.2

*EI= Estándar interno.

Por otro lado, los datos obtenidos de las curvas de calibración de los estándares campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, se observan gráficamente en la Figura N°43 del Anexo N°5.

Asimismo, mediante la metodología realizada, se obtuvieron cromatogramas, uno de los cuales se muestra en la Figura N° 26., que nos permitieron identificar y cuantificar los fitoesteroles (campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) presentes en las 16 unidades de aceite.

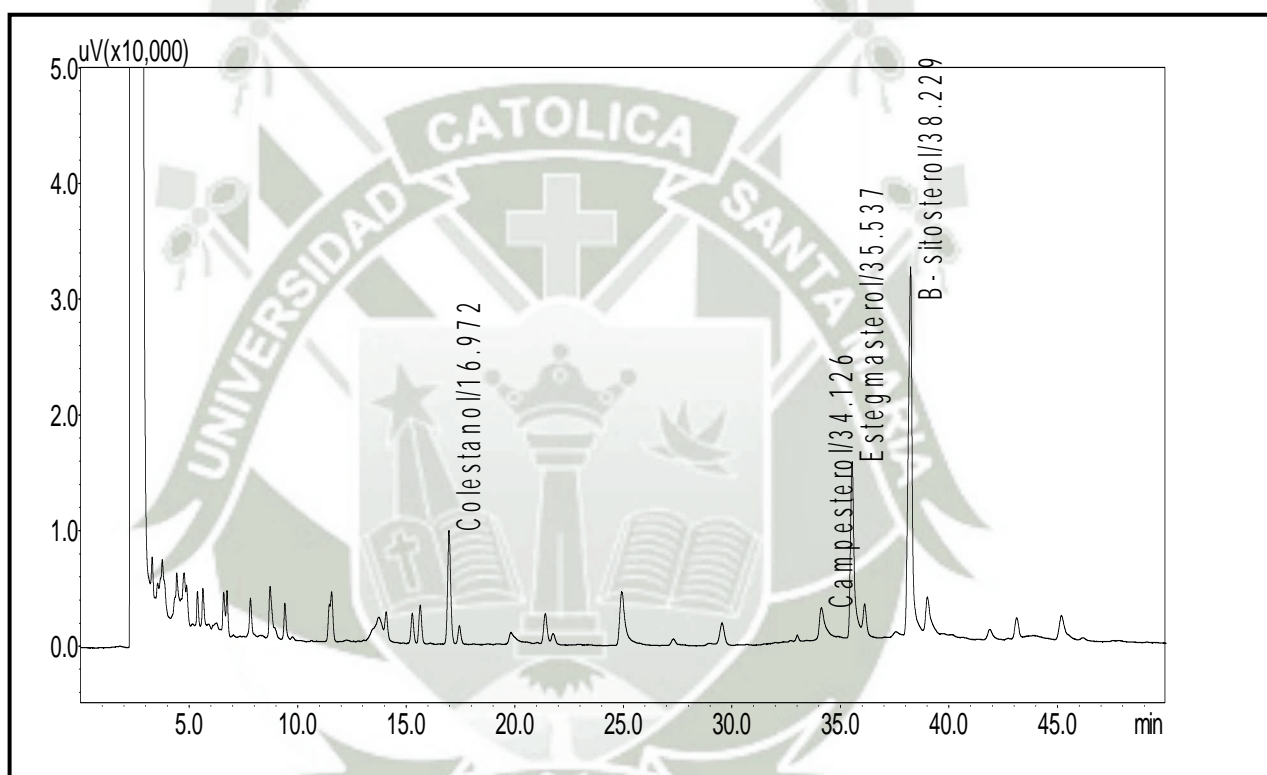


Figura N°28. Cromatograma de los fitoesteroles (campesterol, estigmasterol y β -sitosterol) de la unidad de aceite PER000408B, obtenido por CG.

La Tabla N° 17, muestra el resumen de los resultados obtenidos del contenido de los fitoesteroles de las 16 unidades de aceite y los resultados completos se observan en la Tabla N°38 (Anexo N°05). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°29 para una mejor apreciación del contenido de cada uno de los fitoesteroles.

Tabla N°17. Contenido de Fitoesteroles en aceites de sacha inchi *

ACEITE	Campesterol (mg campesterol/100g aceite)		Estigmasterol (mg estigmasterol/100g aceite)		β-Sitosterol (mg campesterol/100g aceite)	
PER000394	21.05	± 0.88	61.45 ^a	± 2.08	130.69 ^{a,b}	± 0.03
PER000395-A	22.99	± 1.43	68.13 ^{a,b,c}	± 3.22	131.39 ^{a,b}	± 2.81
PER000401	20.07	± 0.91	65.53 ^{a,b,c}	± 0.48	127.01 ^a	± 0.06
PER000403	22.75	± 0.51	76.11 ^{b,c}	± 7.17	144.40 ^{a,b,c}	± 4.86
PER000405	22.65	± 1.41	70.43 ^{a,b,c}	± 1.39	139.56 ^{a,b,c}	± 2.72
PER000406-A	24.60	± 2.91	74.59 ^{a,b,c}	± 1.70	127.63 ^{a,b}	± 5.40
PER000406-B	23.25	± 4.88	63.02 ^{a,b}	± 3.74	138.14 ^{a,b,c}	± 8.18
PER000408-B	22.85	± 0.43	69.54 ^{a,b,c}	± 0.68	150.64 ^{b,c}	± 1.76
PER000416	21.43	± 0.28	71.71 ^{a,b,c}	± 0.37	137.49 ^{a,b,c}	± 2.41
PER000417	20.53	± 1.29	66.31 ^{a,b,c}	± 0.12	131.81 ^{a,b,c}	± 0.03
PER000418	19.75	± 1.42	63.50 ^{a,b,c}	± 0.40	138.18 ^{a,b,c}	± 7.18
PER000420	22.77	± 0.03	67.68 ^{a,b,c}	± 1.61	141.73 ^{a,b,c}	± 4.66
PER000421	20.78	± 2.32	64.78 ^{a,b,c}	± 4.92	135.60 ^{a,b,c}	± 8.90
PER000422	23.91	± 1.30	77.25 ^c	± 8.49	154.59 ^c	± 12.91
PER017597	20.20	± 1.37	68.90 ^{a,b,c}	± 3.53	123.99 ^a	± 8.27
PER017598	23.04	± 0.72	62.74 ^{a,b}	± 1.72	146.02 ^{a,b,c}	± 0.82

*Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, (p< 0,05) según el test de Tukey.

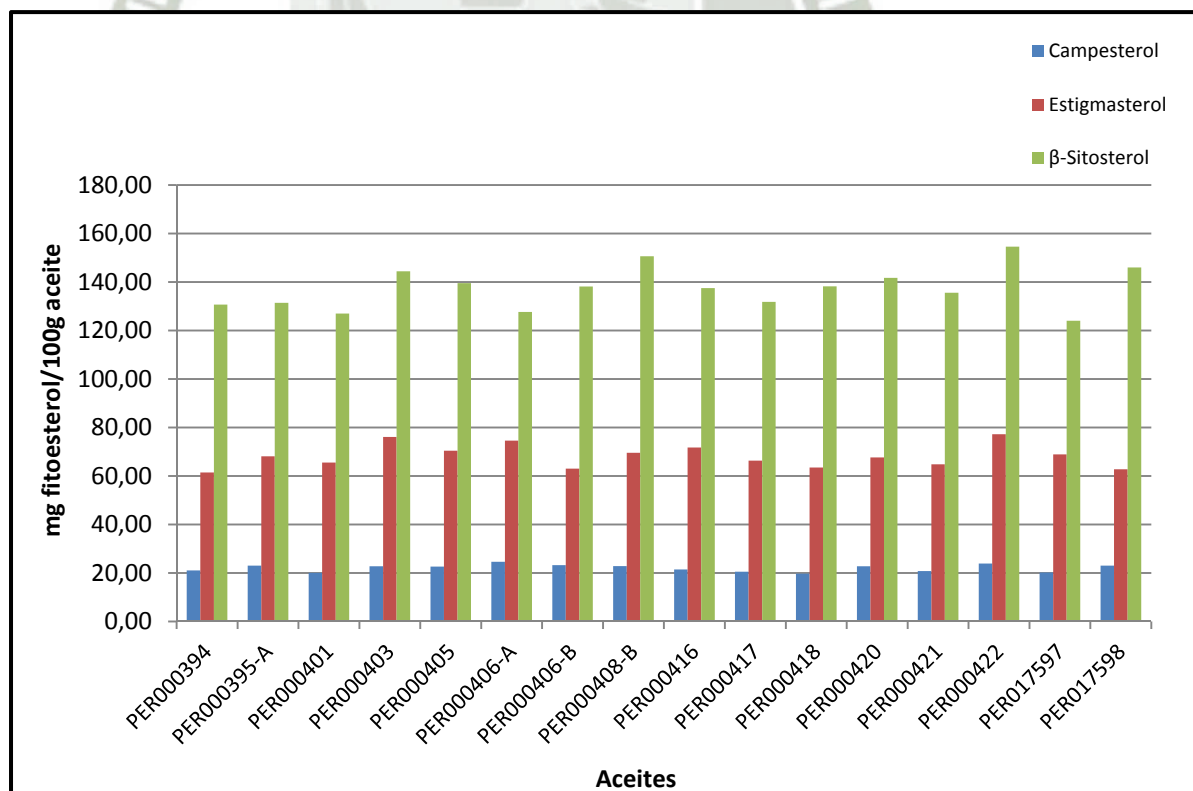


Figura N°29. Comparación del contenido de Fitoesteroles (Campesterol, Estigmasterol, β- sitosterol) en 16 muestras de aceites de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan un contenido de fitoesteroles de 22.04 mg campesterol/100 g aceite, 68.23 mg estigmasterol/100 g aceite y 137.43 mg β -sitosterol/100 g aceite. La unidad PER000422, con 23.91 mg campesterol/100 g aceite, 77.25 mg estigmasterol/100 g aceite y 154.59 mg β -sitosterol/100 g aceite, presentó el mayor contenido; mientras que la unidad PER000401, con 20.07 mg campesterol/100 g aceite, 65.53 mg estigmasterol/100 g aceite y 127.01 mg β -sitosterol/100 g aceite, presentó el menor contenido.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°18), se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en el contenido de campesterol. Mientras que en el contenido de estigmasterol y β -sitosterol, se observa que si existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 18. ANOVA del contenido de fitoesteroles

Fuentes de Variación		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
Campesterol	Inter-grupos	66.348	15	4.423	1.373	0.268
	Intra-grupos	51.529	16	3.221		
	Total	117.877	31			
Estigmasterol	Inter-grupos	703.574	15	46.905	3.750	0.006
	Intra-grupos	200.119	16	12.507		
	Total	903.694	31			
β -Sitosterol	Inter-grupos	2234.368	15	148.958	4.479	0.002
	Intra-grupos	532.108	16	33.257		
	Total	2766.477	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación se evalúa los 16 promedios del contenido de estigmasterol y β -sitosterol usando el test de Tukey, cuyos resultados se muestran en Tabla N°17. Las letras minúsculas (a, b y c) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

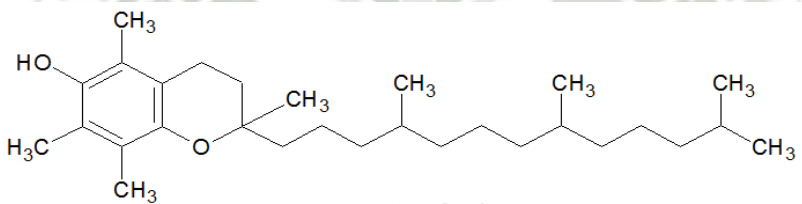
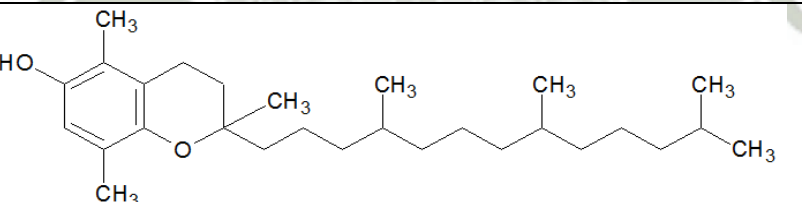
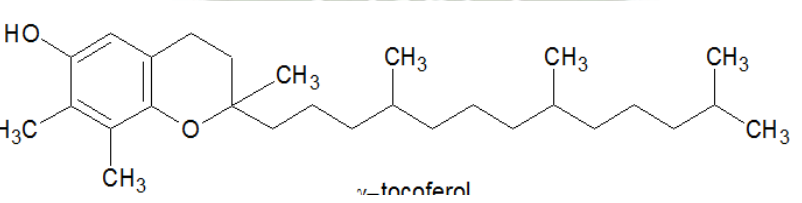
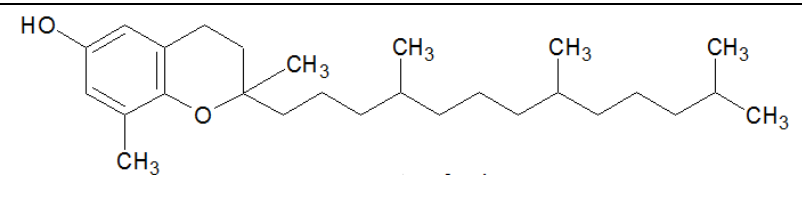
El contenido de los fitoesteroles estudiados de los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 19.75 - 24.60 mg campesterol/100 g aceite, 61.45 – 77.25 mg

estigmasterol/100 g aceite y 123.99 – 154.59 mg β -sitosterol/100 g de aceite. Estos valores son similares con respecto a otros trabajos (Bondioli et al., 2006), en donde se reportó valores de 17.55 mg campesterol/100 g aceite, 68.97 mg estigmasterol/100 g aceite y 139.67 mg β -sitosterol/100 g aceite.

3.5 DETERMINACION DE TOCOFEROLES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

De acuerdo a la metodología desarrollada (2.3.6), los tiempos de retención que presentaron cada uno de los estándares de referencia, para la identificación de los tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta), se muestran en la Tabla N°19.

Tabla N°19. Tiempo de retención para la identificación de tocoferoles.

Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención (min)
α -tocoferol		5.0
β -tocoferol		7.4
γ -tocoferol		8.2
δ -tocoferol		12.6

Por otro lado, los datos obtenidos de las curvas de calibración de los estándares alfa, beta, gamma y delta tocoferol, se observan gráficamente en la Figura N°44 del Anexo N°06.

Asimismo, mediante la metodología realizada, se obtuvieron cromatogramas, uno de los cuales se muestra en la Figura N° 30, que nos permitieron identificar y cuantificar los tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) presentes en las 16 unidades de aceite.

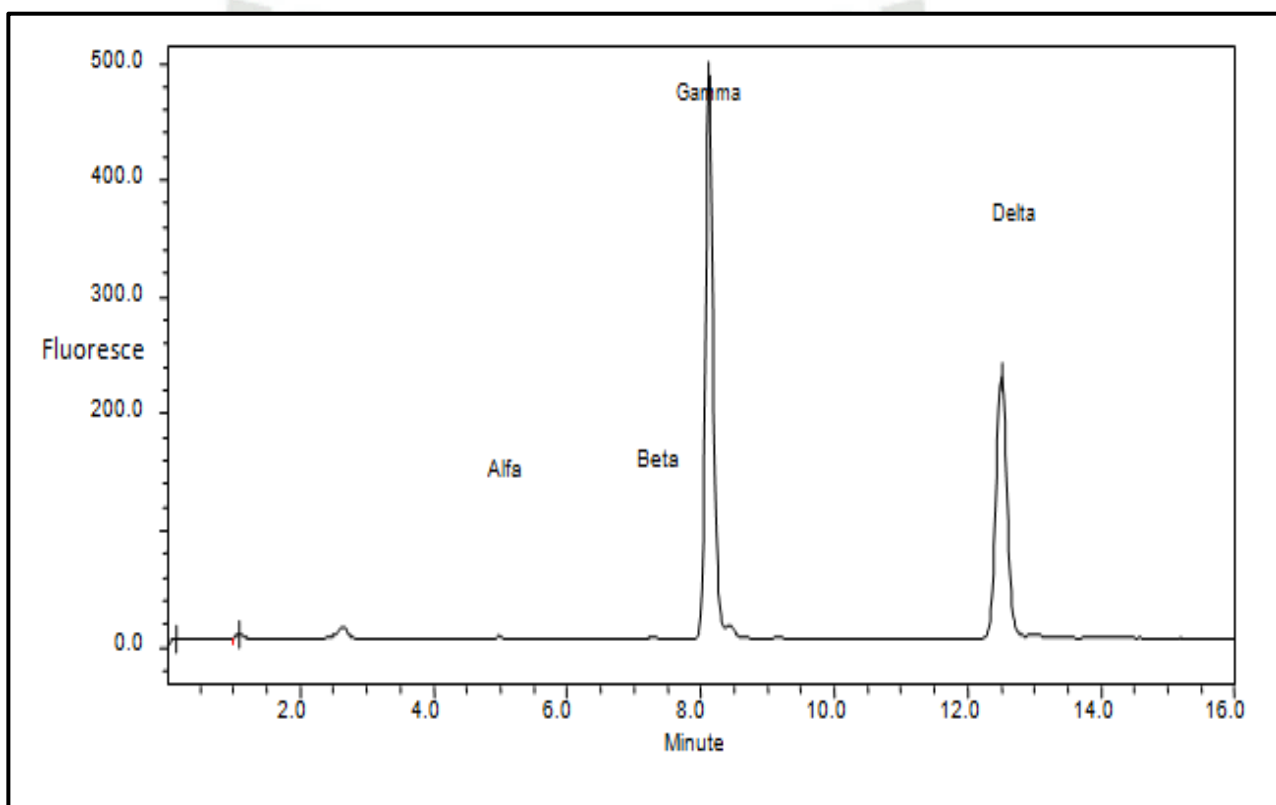


Figura N°30. Cromatograma de Tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) de la unidad de aceite PER000401, obtenido por HPLC.

En la Tabla N°20, se muestra el resumen de los resultados obtenidos del contenido de tocoferoles de las 16 unidades de aceite y los resultados completos se observan en la Tabla N°40 (Anexo N°06). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°31 para una mejor apreciación del contenido de cada uno de los tocoferoles.

Tabla N° 20. Contenido de Tocoferoles en aceites de sachá inchi *

ACEITE	Alfa Tocoferol (mg α - tocoferol/100g aceite)	Beta Tocoferol (mg β - tocoferol/100g aceite)	Gamma Tocoferol (mg γ - tocoferol/100g aceite)	Delta Tocoferol (mg δ - tocoferol/100g aceite)	Tocoferoles Totales (mg tocoferol/100g aceite)*
PER000394	7.80 ^{a,b,c,d} \pm 0.01	3.31 ^{d,e} \pm 0.00	134.07 ^{e,d} \pm 1.17	72.65 ^d \pm 2.43	217.82 ^{d,e,f} \pm 3.60
PER000395-A	7.83 ^{b,c,d} \pm 0.01	3.42 ^{e,f,g} \pm 0.01	139.56 ^{d,e} \pm 0.91	87.12 ^{e,f,g} \pm 0.98	237.92 ^{f,g,h} \pm 1.89
PER000401	7.92 ^d \pm 0.04	3.33 ^{d,e} \pm 0.02	160.13 ^g \pm 1.86	91.76 ^{f,g} \pm 0.40	263.14 ^h \pm 2.28
PER000403	7.69 ^a \pm 0.05	3.27 ^{b,c,d} \pm 0.00	118.06 ^c \pm 0.25	74.87 ^{d,e} \pm 0.55	203.88 ^{d,e} \pm 0.85
PER000405	7.84 ^{b,c,d} \pm 0.01	3.36 ^{d,e,f} \pm 0.00	144.75 ^{d,e,f,g} \pm 1.16	80.60 ^{d,e,f} \pm 0.17	236.55 ^{f,g,h} \pm 0.98
PER000406-A	7.75 ^{a,b,c} \pm 0.10	3.17 ^{a,b,c} \pm 0.09	119.61 ^c \pm 17.34	55.66 ^{b,c} \pm 9.82	186.19 ^{c,d} \pm 27.36
PER000406-B	7.81 ^{a,b,c,d} \pm 0.00	3.35 ^{d,e,f} \pm 0.01	140.30 ^{d,e,f} \pm 1.46	78.24 ^{d,e} \pm 0.76	229.70 ^{e,f,g} \pm 2.21
PER000408-B	7.86 ^{c,d} \pm 0.03	3.46 ^{f,g} \pm 0.03	157.39 ^{e,f,g} \pm 0.51	92.43 ^{f,g} \pm 0.66	261.14 ^{g,h} \pm 0.16
PER000416	ND	3.09 ^a \pm 0.01	70.29 ^a \pm 0.82	40.12 ^a \pm 0.43	113.50 ^a \pm 0.38
PER000417	7.83 ^{b,c,d} \pm 0.00	3.46 ^{f,g} \pm 0.00	158.57 ^{e,f,g} \pm 1.81	92.06 ^{f,g} \pm 0.71	261.92 ^h \pm 2.52
PER000418	ND	3.14 ^{a,b} \pm 0.06	79.32 ^{a,b} \pm 3.21	43.00 ^{a,b} \pm 1.32	125.47 ^a \pm 4.59
PER000420	7.72 ^{a,b} \pm 0.02	3.28 ^{c,d} \pm 0.02	143.70 ^{d,e,f,g} \pm 1.87	83.28 ^{d,e,f,g} \pm 1.71	237.98 ^{f,g,h} \pm 3.59
PER000421	7.73 ^{a,b} \pm 0.04	3.35 ^{d,e,f} \pm 0.00	140.67 ^{d,e,f,g} \pm 6.58	94.45 ^g \pm 7.07	246.19 ^{f,g,h} \pm 13.69
PER000422	ND	3.32 ^{d,e} \pm 0.02	91.96 ^b \pm 1.50	72.16 ^d \pm 1.31	167.44 ^{b,c} \pm 2.80
PER017597	7.92 ^d \pm 0.00	3.53 ^g \pm 0.03	159.80 ^{f,g} \pm 3.43	92.60 ^{f,g} \pm 3.45	263.85 ^h \pm 6.91
PER017598	ND	3.17 ^{a,b,c} \pm 0.04	82.61 ^{a,b} \pm 0.72	58.60 ^c \pm 0.08	144.38 ^{a,b} \pm 0.85

*Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, (p < 0,05) según el test de Tukey, ND= no detectado.

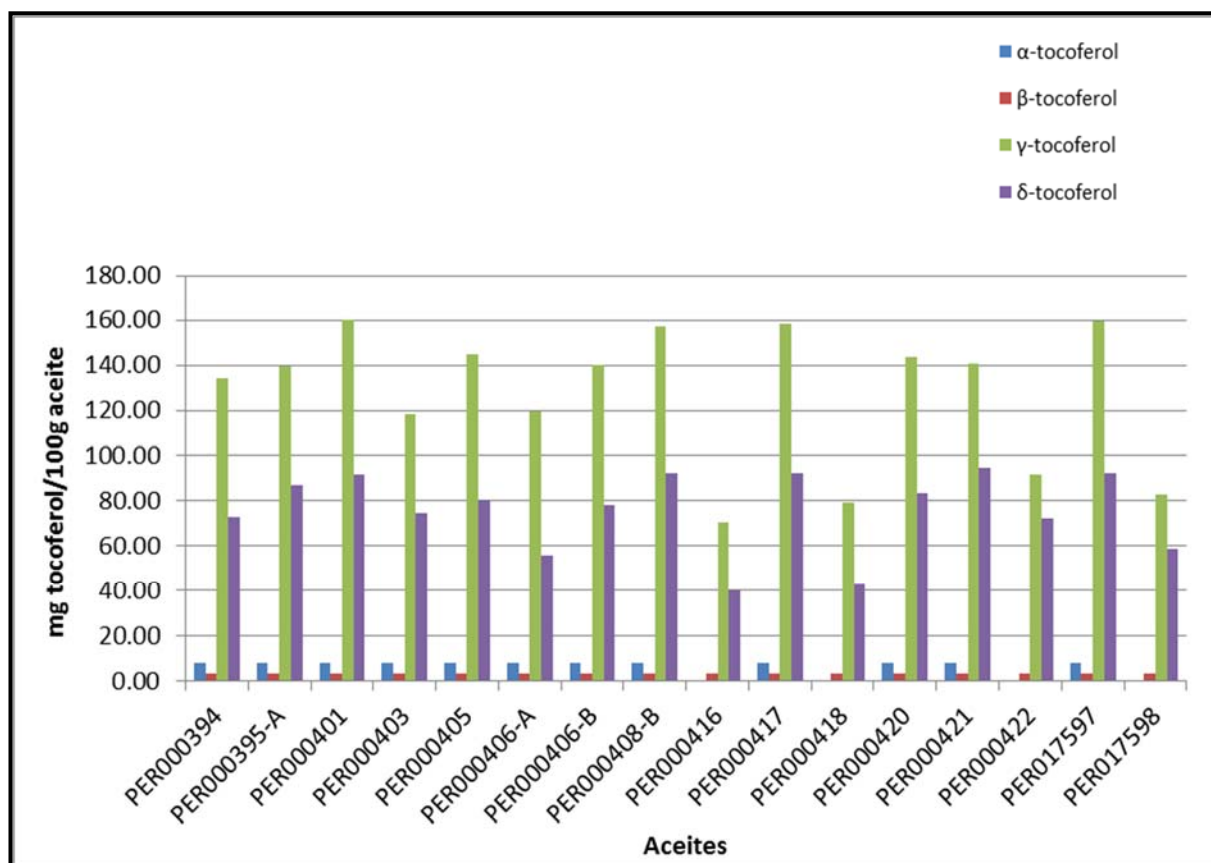


Figura N°31. Comparación de Tocoferoles (alfa tocoferol, beta tocoferol, gamma tocoferol y delta tocoferol) en muestras de 16 aceites de Sacha inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan un contenido de tocoferoles totales de 212.32 mg tocoferol/100 g aceite y con respecto a cada uno de los tocoferoles, un promedio de 7.81 mg α -tocoferol/100 g aceite (promedio de 12 unidades de aceite, ya que en 4 unidades no se detectó este tocoferol), 3.31 mg β -tocoferol/100 g aceite, 127.55 mg γ -tocoferol/100 g aceite y 75.60 mg δ -tocoferol/100 g aceite. La unidad de aceite PER017597 con 263.85 mg tocoferol/100 g aceite, presentó el mayor contenido de tocoferoles totales, mientras que la unidad de aceite PER000416 con 113.50 mg tocoferol/100 g aceite, presentó el menor contenido de tocoferoles totales.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°21a y 21b), se observa que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$), en el contenido de tocoferoles entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 21a. ANOVA del contenido de tocoferoles totales

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
Inter-grupos	76311.358	15	5087.424	80.353	0.000
Intra-grupos	1013.012	16	63.313		
Total	77324.370	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Tabla N° 21b. ANOVA del contenido de tocoferoles

Fuentes de variación		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Alfa tocoferol	Inter-grupos	365.917	15	24.394	21901.970	0.000
	Intra-grupos	0.018	16	0.001		
	Total	365.935	31			
Beta tocoferol	Inter-grupos	0.457	15	0.030	29.321	0.000
	Intra-grupos	0.017	16	0.001		
	Total	0.473	31			
Gamma tocoferol	Inter-grupos	28151.732	15	1876.782	77.825	0.000
	Intra-grupos	385.845	16	24.115		
	Total	28537.577	31			
Delta tocoferol	Inter-grupos	9425.559	15	628.371	57.880	0.000
	Intra-grupos	173.704	16	10.857		
	Total	9599.264	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación, se evalúa los 16 promedios del contenido de los tocoferoles totales y de cada uno de los tocoferoles, usando el test de Tukey, cuyos resultados se observan en la Tabla N°20. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e, f y g) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

El contenido de los tocoferoles totales de los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 113.50 – 263.85 mg tocoferol/100 g aceite y los respectivos tocoferoles en un rango de 7.69 – 7.92 mg α -tocoferol/100 g aceite, 3.09 – 3.53 mg β -tocoferol/100 g aceite, 70.29 – 160.13 mg γ -tocoferol/100 g de aceite y 40.12 – 94.45 mg δ -tocoferol/100 g aceite. Estos valores son similares con respecto a otros trabajos (Follegati - Romero, 2009), en donde, se reportó

valores de 0.00 de α -tocoferol/100 g aceite, 114 mg γ -tocoferol/100 g aceite y 125 mg δ -tocoferol/100g aceite. Por otro lado, valores inferiores a los obtenidos en el presente trabajo con respecto al contenido de α -tocoferol, fueron reportados por otro trabajo (Hamaker et al., 1992), cuyo contenido estuvo en un rango de 3.8 – 6.3 mg α -tocoferol/100 g aceite.

3.6 DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES (CG)

De acuerdo a la metodología desarrollada (2.3.7), los tiempos de retención que presentaron los principales ácidos grasos, para la identificación de cada uno de ellos, se muestran en la Tabla N°22.

Tabla N°22. Tiempo de retención para la identificación de los ácidos grasos.

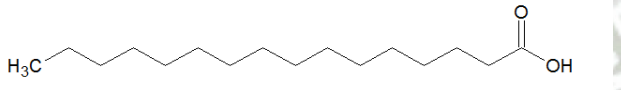
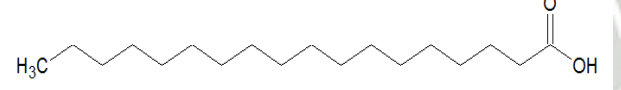
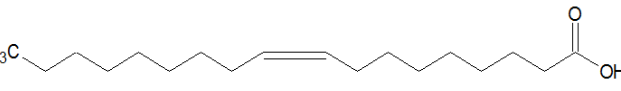
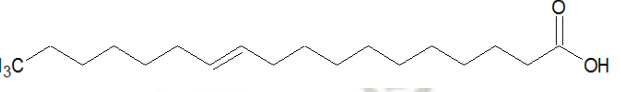
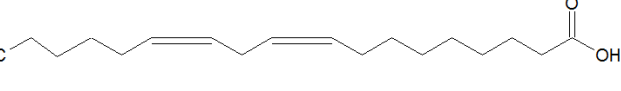
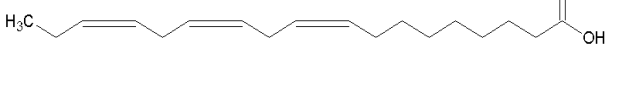
Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención (min)
Ácido palmítico C16:0		16.3
Ácido esteárico C18:0		21.8
Ácido oleico C18:1C9		24.2
Ácido vaccénico C18:1C11		24.5
Ácido linoleico C18:2C9C12		26.4
Ácido α -linolenico C18:3C9C12C15		32.4

Tabla N° 23 . Perfil de ácidos grasos en aceites de Sacha Inchi *

ACEITES	Acido palmítico (%)	Acido esteárico (%)	Ácido oleico (%)	Ácido Vaccénico (%)	Ácido Linoleico (%)	Ácido linolenico (%)
PER000394	4.79 ^{a,b} ± 0.04	3.31 ^{b,c,d,e} ± 0.07	10.96 ^c ± 0.14	0.72 ± 0.05	37.71 ^{e,f} ± 0.10	42.12 ^{f,g,h} ± 0.16
PER000395-A	4.90 ^{b,c} ± 0.06	3.64 ^f ± 0.01	12.48 ^h ± 0.08	0.65 ± 0.01	36.55 ^{b,c} ± 0.03	41.41 ^{e,f} ± 0.18
PER000401	5.24 ^{d,e,f,g} ± 0.03	3.46 ^{d,e,f} ± 0.01	11.09 ^c ± 0.01	0.71 ± 0.01	36.48 ^b ± 0.06	42.62 ^h ± 0.10
PER000403	5.61 ^h ± 0.07	3.39 ^{c,d,e} ± 0.08	11.71 ^{d,e} ± 0.05	0.77 ± 0.05	40.85 ⁱ ± 0.09	37.26 ^a ± 0.08
PER000405	5.13 ^{c,d,e,f} ± 0.07	3.29 ^{a,b,c,d} ± 0.02	11.32 ^{c,d} ± 0.12	0.81 ± 0.13	37.32 ^d ± 0.04	41.75 ^{e,f,g} ± 0.30
PER000406-A	5.47 ^{g,h} ± 0.07	3.48 ^{d,e,f} ± 0.04	12.24 ^{g,h} ± 0.12	0.75 ± 0.04	39.05 ^h ± 0.03	38.61 ^b ± 0.21
PER000406-B	5.54 ^h ± 0.06	3.29 ^{a,b,c,d} ± 0.09	11.76 ^{e,f} ± 0.17	0.76 ± 0.04	36.81 ^c ± 0.04	41.47 ^{e,f,g} ± 0.23
PER000408-B	5.05 ^{c,d,e} ± 0.05	3.11 ^a ± 0.07	9.91 ^a ± 0.14	0.74 ± 0.01	36.76 ^c ± 0.12	44.12 ⁱ ± 0.30
PER000416	5.15 ^{d,e,f} ± 0.07	3.47 ^{d,e,f} ± 0.06	12.10 ^{e,f,g,h} ± 0.12	0.72 ± 0.02	36.18 ^a ± 0.03	42.03 ^{f,g,h} ± 0.24
PER000417	5.14 ^{d,e,f} ± 0.08	3.51 ^{e,f} ± 0.04	12.21 ^{g,h} ± 0.10	0.71 ± 0.00	37.56 ^{d,e} ± 0.04	40.50 ^{e,d} ± 0.17
PER000418	5.01 ^{b,c,d} ± 0.07	3.36 ^{c,d,e} ± 0.02	11.69 ^{d,e} ± 0.08	0.73 ± 0.00	38.26 ^g ± 0.02	40.58 ^{e,d} ± 0.17
PER000420	5.28 ^{f,g} ± 0.04	3.30 ^{a,b,c,d} ± 0.02	12.17 ^{f,g,h} ± 0.06	0.78 ± 0.01	36.03 ^a ± 0.11	42.04 ^{f,g,h} ± 0.23
PER000421	5.55 ^h ± 0.07	3.22 ^{a,b,c} ± 0.06	11.93 ^{e,f,g} ± 0.17	0.79 ± 0.02	37.86 ^f ± 0.10	40.25 ^c ± 0.16
PER000422	4.65 ^a ± 0.05	3.12 ^{a,b} ± 0.03	11.24 ^c ± 0.09	0.66 ± 0.01	37.79 ^{e,f} ± 0.00	42.22 ^{g,h} ± 0.17
PER017597	5.05 ^{c,d,e,f} ± 0.02	3.33 ^{c,d,e} ± 0.01	11.26 ^c ± 0.00	0.72 ± 0.00	38.22 ^g ± 0.05	41.05 ^{d,e} ± 0.10
PER017598	5.26 ^{e,f,g} ± 0.04	3.63 ^f ± 0.06	10.45 ^b ± 0.10	0.70 ± 0.04	37.44 ^d ± 0.05	42.13 ^{f,g,h} ± 0.20

*Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar de dos repeticiones (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, (p<0,05) según el test de Tukey.

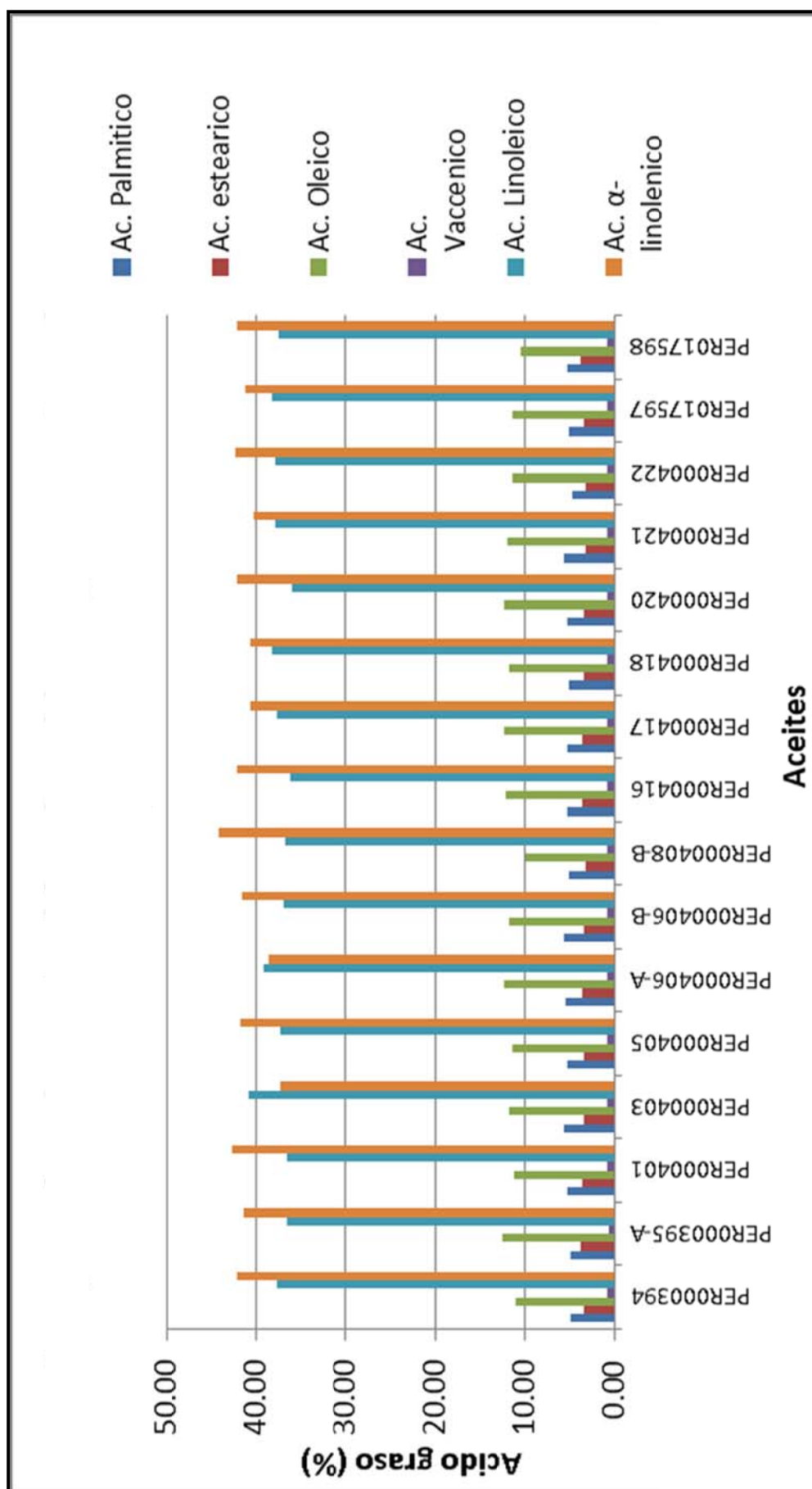


Figura N°33. Comparación de contenido en porcentaje de los respectivos ácidos grasos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido vaccénico, ácido linoleico y ácido alfa-linolenico) respectivamente, en 16 aceites de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan un contenido de ácidos grasos de 5.18% de ácido palmítico, 3.37% de ácido esteárico, 11.53% de ácido oleico, 37.55% de ácido linoleico y 41.26% de ácido alfa-linolénico. La unidad PER000408B, con valores de 5.05% de ácido palmítico, 3.11% de ácido esteárico, 9.91% de ácido oleico, 0.74% ácido vaccénico, 36.76% de ácido linoleico 44.12% y ácido alfa-linolenico, presentó el mayor contenido; mientras que la unidad PER000403, con 5.61% de ácido palmítico, 3.39% de ácido esteárico, 11.71% de ácido oleico, 0.77% ácido vaccénico y 40.85% de ácido linoleico y 37.26% de ácido alfa-linolénico, presentó el menor contenido.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°24), se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en el contenido del ácido vaccénico, en cambio en caso del contenido de los demás ácidos grasos estudiados, se observa que si existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 24. ANOVA del contenido de ácidos grasos

Fuentes de variación		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig. (p)
Ac. palmítico	Inter-grupos	2.275	15	0.152	45.943	0.000
	Intra-grupos	.053	16	0.003		
	Total	2.328	31			
Ac. esteárico	Inter-grupos	0.733	15	0.049	19.495	0.000
	Intra-grupos	0.040	16	0.003		
	Total	0.773	31			
Ac. oleico	Inter-grupos	14.750	15	0.983	85.097	0.000
	Intra-grupos	0.185	16	0.012		
	Total	14.935	31			
Ac. vaccénico	Inter-grupos	0.057	15	0.004	2.159	0.069
	Intra-grupos	0.028	16	0.002		
	Total	0.086	31			
Ac. linoleico	Inter-grupos	43.772	15	2.918	653.948	0.000
	Intra-grupos	0.071	16	0.004		
	Total	43.844	31			
Ac. α - linolenico	Inter-grupos	78.209	15	5.214	132.847	0.000
	Intra-grupos	0.628	16	0.039		
	Total	78.837	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación, se evalúa los 16 promedios de los contenidos de los ácidos grasos a excepción del contenido del ácido vaccénico, usando un test de Tukey, cuyos resultados se muestran en la Tabla N°23. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e, f, g, h y i) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

El contenido de cada uno de los ácidos grasos en los 16 aceites, se encuentran en un rango entre 4.65 - 5.61% de ácido palmítico, 3.11 – 3.64% de ácido esteárico, 9.91 – 12.48% de ácido oleico, 0.65 – 0.81% ácido vaccénico, 36.03 – 40.85% de ácido linoleico y 37.26 – 44.12 % de ácido alfa-linolénico. Estos valores son similares con respecto a otros trabajos (Hamaker et al., 1992), en donde, se reportó valores de 4.5% de ácido palmítico, 3.2% ácido esteárico, 9.6% de ácido oleico, 36.8% de ácido linoleico y 45.2% de ácido alfa-linolénico. Por otro lado, valores similares a los obtenidos en el presente trabajo, también fueron reportados en otro trabajo (Pascual y mejía, 2000), cuyos datos fueron de 5.61% de ácido palmítico, 2.23% ácido esteárico, 9.6% de ácido oleico, 36.99% de ácido linoleico y 43.75% de ácido alfa-linolénico.

3.7 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TEAC (ABTS) HIDROFILICA Y LIPOFILICA

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFILICA (CAH)

De acuerdo al método desarrollado por ABTS (2.3.8). Los datos obtenidos, de la curva estándar de Trolox, se observan en la Tabla N°25.

Tabla N° 25. Curva estándar de Trolox - CAH

Concentración (umol Trolox/ml)	Absorbancia a 734nm		Abs. Blanco = 0.999		Promedio ± Desviación estándar	
	R1	R2	□R1	□R2		
0.39954	0.394	0.381	0.605	0.618	0.612	0.009
0.19977	0.675	0.676	0.324	0.323	0.324	0.001
0.09988	0.880	0.826	0.119	0.173	0.146	0.038
0.04994	0.902	0.904	0.097	0.095	0.096	0.001
0.02497	0.938	0.939	0.061	0.060	0.061	0.001
0.00999	0.955	0.955	0.044	0.044	0.044	0.000

Con estos datos, se obtiene el siguiente gráfico de calibración (Figura N°34).

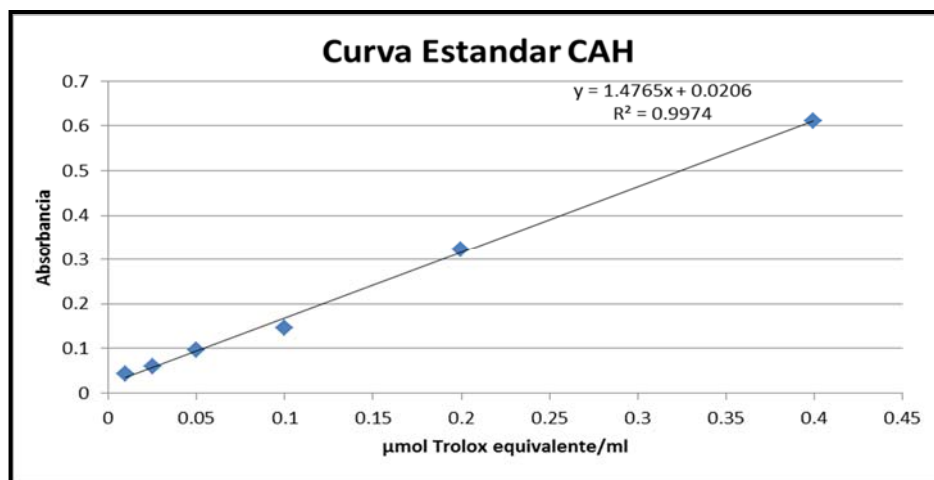


Figura N° 34. Representación gráfica de la curva estándar de Trolox - CAH

La Tabla N°26, muestra el resumen de los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante hidrofílica de las 16 unidades de aceite y los resultados completos se observan en la Tabla N°44 (Anexo N°08). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°35 para una mejor apreciación.

Tabla N° 26. Capacidad antioxidante hidrofílica en aceites de Sacha Inchi*

ACEITE	CAH (μmol Trolox/100g aceite)	
PER000394	0.89 ^a	± 0.00
PER000395	7.97 ^{c,d}	± 1.03
PER000401	ND	
PER000403	11.58 ^e	± 0.18
PER000405	ND	
PER000406-A	4.48 ^b	± 0.46
PER000406-B	6.37 ^{b,c}	± 0.55
PER000408-B	22.11 ^g	± 0.59
PER000416	8.38 ^{c,d}	± 0.46
PER000417	8.21 ^{c,d}	± 0.70
PER000418	ND	
PER000420	5.78 ^b	± 0.46
PER000421	14.41 ^f	± 0.21
PER000422	8.61 ^d	± 0.78
PER017597	6.47 ^{b,c}	± 0.19
PER017598	23.65 ^g	± 0.92

*Los valores presentados son el promedio ± desviación estándar (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, (p< 0,05) según el test de Tukey, ND=no detectado.

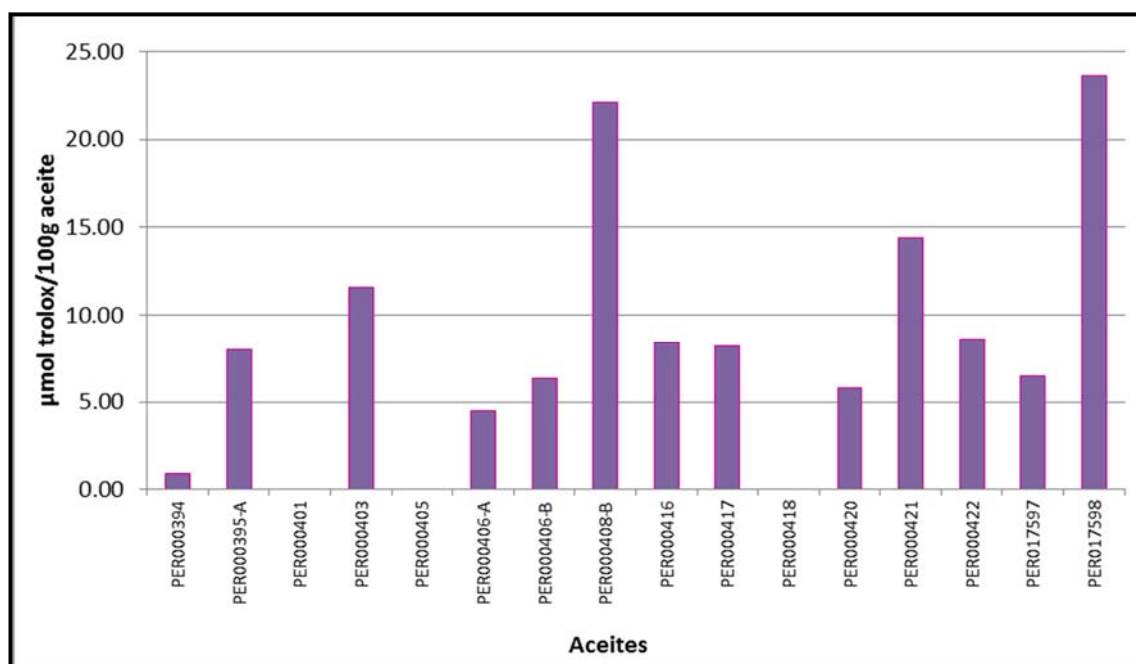


Figura N°35. Comparación de la capacidad antioxidante hidrofílica en 16 muestras de aceites de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan una CAH de 9.92 μmol Trolox/100 g aceite (promedio de 13 unidades de aceite, ya que en 3 unidades no se detectó la CAH). La unidad PER000394, con 0.89 μmol Trolox/100 g aceite, presentó la menor CAH y la unidad PER017598, con 23.65 μmol Trolox/100 g aceite, presentó la mayor CAH.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°27), se observa que si existe diferencias significativas ($p < 0.05$), en la capacidad antioxidante hidrofílica entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 27. ANOVA de la capacidad antioxidante hidrofílica

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Inter-grupos	1526.354	15	101.757	371.660	0.000
Intra-grupos	4.381	16	0.274		
Total	1530.735	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación se evalúa los 16 promedios usando el test de Tukey, cuyos resultados se muestran en la Tabla N°26. Las letras minúsculas (a, b, c,

d, e, f y g) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

La capacidad antioxidante hidrofílica de los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 0.89 – 23.65 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g aceite}$. Estos valores son similares con respecto a otros trabajos (Jáuregui et al., 2010), en donde, se reportó valores de 0.988 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g aceite}$.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA (CAL)

Los datos obtenidos, de la curva estándar de Trolox, se observan en la Tabla N°28.

Tabla N° 28. Curva estándar de Trolox como patrón - CAL

Concentración ($\mu\text{mol Trolox/ml}$)	Absorbancia		Blanco= 1.059		Promedio \pm Desviación estándar	
	R1	R2	DR1	DR2		
0.7978	0.141	0.133	0.918	0.926	0.9220	0.006
0.6007	0.325	0.330	0.734	0.729	0.7315	0.004
0.3979	0.605	0.623	0.454	0.436	0.4450	0.013
0.1989	0.844	0.815	0.215	0.244	0.2295	0.021
0.0995	0.997	0.990	0.062	0.069	0.0655	0.005

Con estos datos, se obtiene el siguiente gráfico de calibración (Figura N°36).

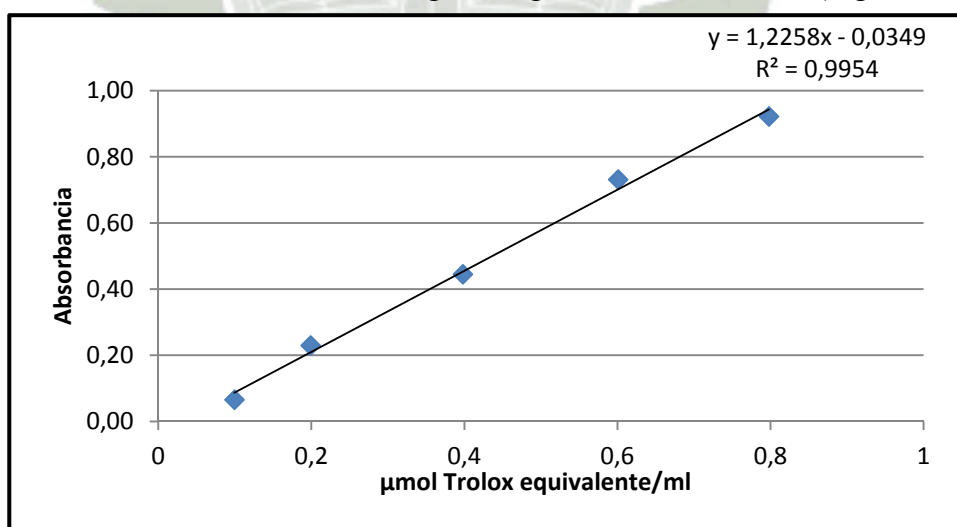


Figura N°36. Representación gráfica de la curva estándar de Trolox – CAL

La Tabla N°29, muestra el resumen de resultados obtenidos de la capacidad

antioxidante lipofílica de las 16 unidades de aceite y los resultados completos se observan en la Tabla N°45 (Anexo N°09). Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°37 para una mejor apreciación.

Tabla N°29. Capacidad antioxidante lipofílica en aceites de Sacha Inchi

ACEITE	CAL ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g aceite}$) *
PER000394	905.95 ^{e,f} \pm 5.87
PER000395A	873.16 ^{b,c,d,e,f} \pm 0.25
PER000401	926.68 ^{f,g} \pm 13.28
PER000403	801.61 ^{a,b} \pm 7.28
PER000405	833.29 ^{b,c,d,e} \pm 66.30
PER000406-A	747.22 ^a \pm 3.40
PER000406-B	817.67 ^{a,b,c} \pm 2.29
PER000408-B	902.16 ^{d,e,f} \pm 5.60
PER000416	855.83 ^{b,c,d,e,f} \pm 20.62
PER000417	856.02 ^{b,c,d,e,f} \pm 12.68
PER000418	822.27 ^{a,b,c,d} \pm 25.78
PER000420	897.65 ^{c,d,e,f} \pm 16.06
PER000421	871.55 ^{b,c,d,e,f} \pm 14.77
PER000422	1008.18 ^g \pm 1.92
PER017597	882.87 ^{b,c,d,e,f} \pm 11.46
PER017598	909.37 ^{e,f} \pm 19.88

*Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, (p< 0,05) según el test de Tukey.

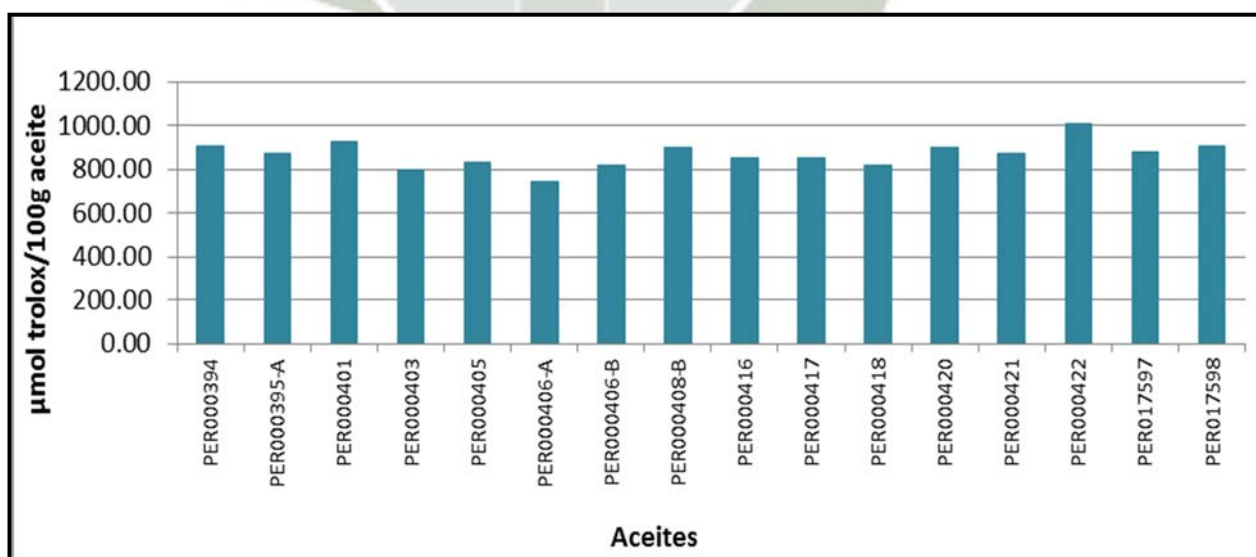


Figura N°37. Comparación de la capacidad antioxidante lipofílica en 16 muestras de aceites de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan una CAL de 869.47 μmol Trolox/100 g aceite. La unidad PER000406A, con 747.22 μmol Trolox/100 g de aceite, presentó la menor CAL, mientras que la unidad PER000422, con 1008.18 μmol Trolox/100 g de aceite, presentó la mayor CAL.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°30), se observa que si existe diferencia significativa ($p < 0.05$), en la capacidad antioxidante lipofílica entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 30. ANOVA de la capacidad antioxidante lipofílica

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	107262.075	15	7150.805	16.426	0.000
Intra-grupos	6965.457	16	435.341		
Total	114227.531	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación se evalúa los 16 promedios usando el test de Tukey, cuyos resultados se muestran en la Tabla N°29. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e, f y g) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

La capacidad antioxidante lipofílica de los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 747.22 – 1008.18 μmol Trolox/100 g de aceite. Estos valores son superiores con respecto a otros trabajos (Jáuregui et al., 2010), en donde, se reportó valores de 0.066 μmol Trolox/100 g aceite.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Los resultados de la capacidad antioxidante total, se muestran en la Tabla N°31. Estos valores, se obtuvieron a partir de la suma de los valores obtenidos de la capacidad antioxidante hidrofílica y la capacidad antioxidante lipofílica. Estos resultados son presentados gráficamente en la Figura N°38 para una mejor apreciación.

Tabla N°31. Capacidad antioxidante total en aceites de Sacha Inchi

ACEITE	CAH (μmol Trolox/100g aceite)	CAL (μmol Trolox/100g aceite)	CAT μmol Trolox/100g aceite)*	
PER000394	0.89	905.95	906.84 ^{d,e}	± 5.87
PER000395-A	7.97	873.16	881.14 ^{b,c,d,e}	± 0.78
PER000401	ND	926.68	926.68 ^e	± 13.28
PER000403	11.58	801.61	813.19 ^{a,b}	± 7.45
PER000405	ND	833.29	833.30 ^{a,b,c,d}	± 66.31
PER000406-A	4.48	747.22	751.71 ^a	± 2.95
PER000406-B	6.37	817.67	824.04 ^{a,b,c,d}	± 2.84
PER000408-B	22.11	902.16	924.27 ^e	± 6.19
PER000416	8.38	855.83	864.21 ^{b,c,d,e}	± 21.07
PER000417	8.21	856.03	864.24 ^{b,c,d,e}	± 11.99
PER000418	ND	822.27	822.27 ^{a,b,c}	± 25.78
PER000420	5.78	897.65	903.43 ^{c,d,e}	± 16.52
PER000421	14.41	871.55	885.95 ^{b,c,d,e}	± 14.98
PER000422	8.61	1008.18	1016.79 ^f	± 1.14
PER017597	6.47	882.87	889.35 ^{b,c,d,e}	± 11.26
PER017598	23.65	909.37	933.02 ^e	± 18.96

*Los valores presentados son el promedio \pm desviación estándar (n=2), las letras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0,05$) según el test de Tukey.

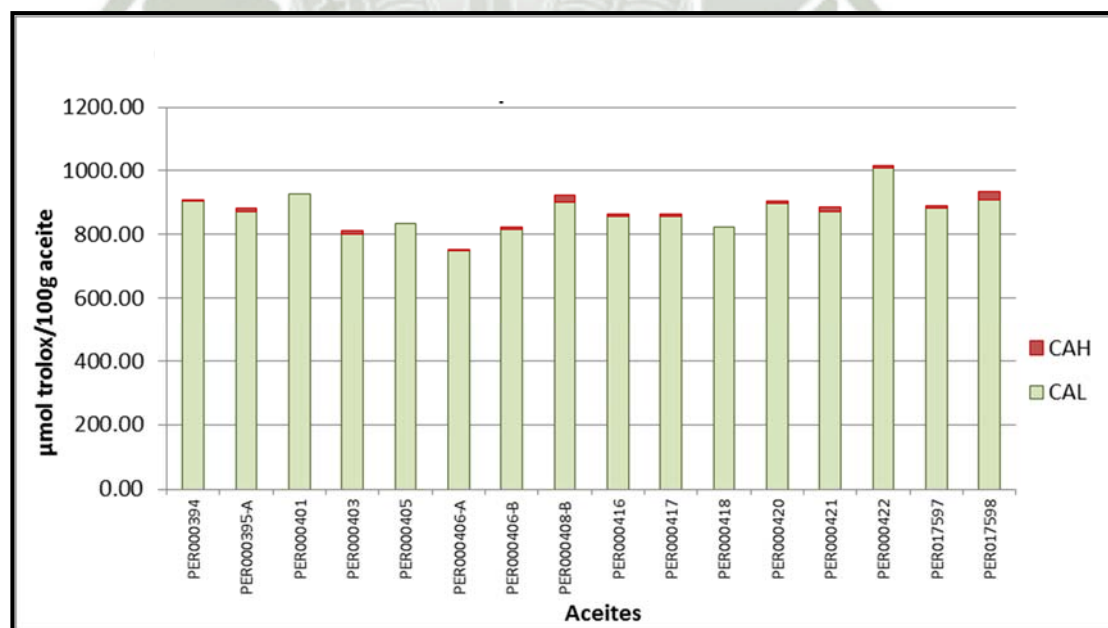


Figura N°38. Comparación de la capacidad antioxidante total en 16 muestras de aceites de Sacha Inchi.

Las 16 unidades de aceite, en promedio, presentan una CAT de 877.53 μmol Trolox/100 g aceite. La unidad PER000406A, con 751.71 μmol Trolox/100 g de aceite, presentó la menor CAT, mientras que la unidad PER000422, con 1016.79 μmol Trolox/100 g de aceite, presentó la mayor CAT.

Haciendo un test de ANOVA (Tabla N°32), se observa que si existe diferencias significativas ($p < 0.05$), en la capacidad antioxidante total entre las 16 unidades de aceite.

Tabla N° 32. ANOVA de la capacidad antioxidante total

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.(p)
Inter-grupos	114044.365	15	7602.958	17.489	0.000
Intra-grupos	6955.803	16	434.738		
Total	121000.167	31			

Sig.(Bilateral); valor p de significación estadística.

Por lo que a continuación se evalúa los 16 promedios usando el test de Tukey, cuyos resultados se muestran en la Tabla N°31. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e y f) en superíndice indican la similitud entre cada unidad de aceite estudiado.

La capacidad antioxidante total entre los 16 aceites, se encuentra en un rango entre 751.71 – 1016.79 en μmol Trolox/100 g de aceite.

3.8 RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON TOCOFEROLES TOTALES, CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENOLICOS

Para determinar la correlación que existe, entre la capacidad antioxidante del aceite y otros compuestos como los tocoferoles, compuestos fenólicos y carotenoides (Bailey, 1984), usamos regresiones polinómicas. Para este análisis se consideran solo los datos de 12 unidades de aceite (PER000394, PER000395A, PER000401, PER000403, PER000405, PER000406A, PER000406B, PER000408B, PER000417, PER000420, PER000421 y

PER017597), ya que estas unidades de aceite, presentan un mayor contenido de los compuestos estudiados.

3.8.1 RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON EL CONTENIDO DE TOCOFEROLES TOTALES

Los resultados de la correlación, entre los valores del contenido de tocoferoles y la capacidad antioxidante total, se observan gráficamente en la Figura N°39.

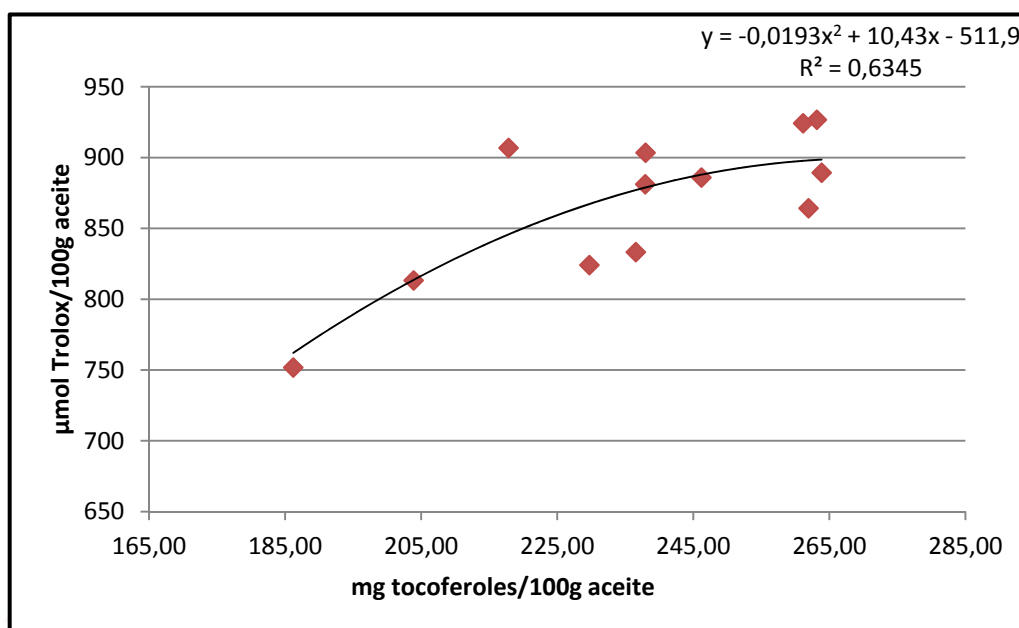


Figura N°39. Correlación entre la capacidad antioxidante total y el contenido de tocoferoles totales.

Estos resultados, muestran que los tocoferoles están relacionados en un gran porcentaje a la capacidad antioxidante, es decir que estos compuestos son responsables en un gran porcentaje de la capacidad antioxidante total que presentan los aceites en estudio. Debido a que presentan un coeficiente de determinación (R^2) de 0.63, dato que nos indica el porcentaje de la variación de una variable con respecto a la otra.

3.8.2 RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CON EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES

Los resultados de la correlación, entre los valores del contenido de

carotenoides y la capacidad antioxidante total, se observan gráficamente en la Figura N°40.

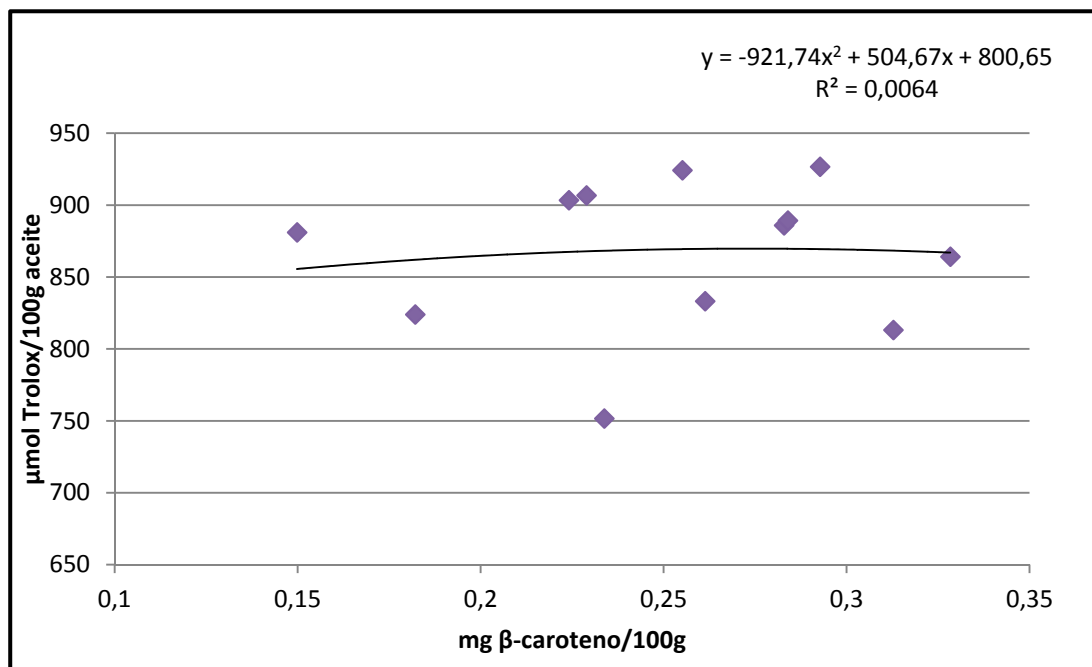


Figura N°40. Correlación entre la capacidad antioxidante total respecto al contenido de carotenoides.

Estos resultados, muestran que los carotenoides no están relacionados con la capacidad antioxidante, es decir que los carotenoides no son responsables de la capacidad antioxidante que presentan los aceites de estudio. Debido a que presentan un coeficiente de determinación (R^2) de 0.01, dato que nos indica el porcentaje de la variación de una variable con respecto a la otra.

3.8.3. RELACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL CON EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES.

Los resultados de la correlación, entre los valores del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total, se observan gráficamente en la Figura N°41.

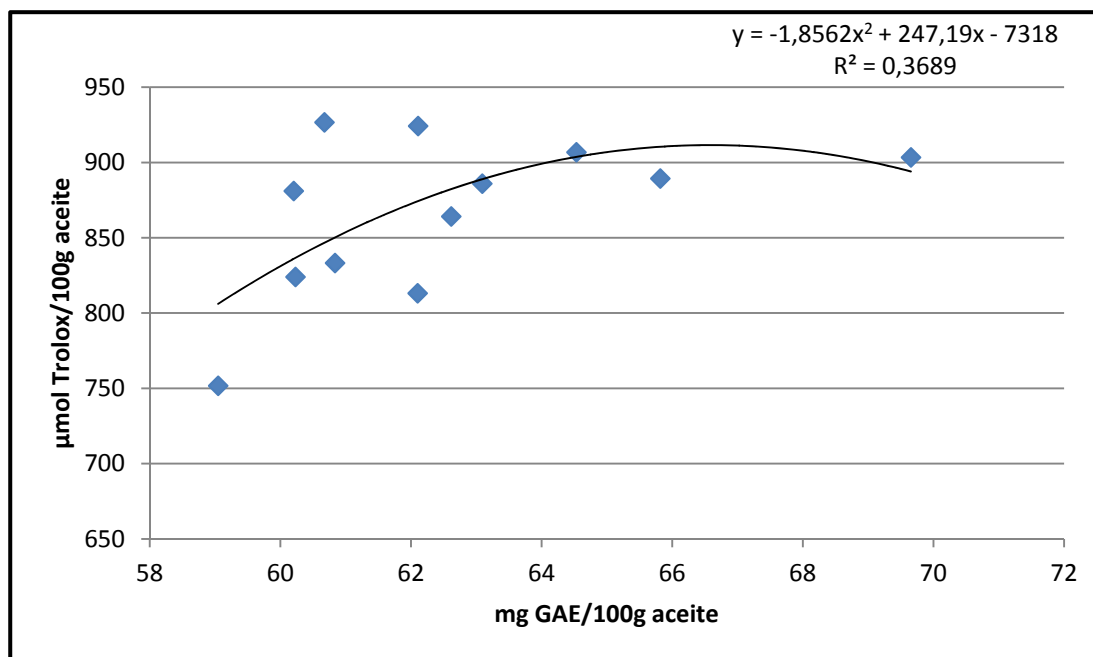


Figura N°41. Correlación entre la capacidad antioxidante total respecto al contenido de compuestos fenólicos totales.

Estos resultados, muestran que los compuestos fenólicos están relacionados en un mínimo porcentaje con la capacidad antioxidante, es decir que estos compuestos son responsables en cierto porcentaje con la capacidad antioxidante que presentan los aceites en estudio. Debido a que presentan un coeficiente de determinación (R^2) de 0.37, dato que nos indica el porcentaje de la variación de una variable con respecto a la otra.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los aceites de los 16 cultivares de semilla, que presentaron en promedio un rendimiento de 35.49%.
2. Las unidades de estudio, presentaron un contenido de compuestos fenólicos, entre 58.98 - 69.66 mg de ácido gálico/100 g aceite, los cuales no presentaron diferencias significativas.
 - Las unidades de estudio, presentaron un contenido de carotenoides entre 0.15 – 0.33 mg β -caroteno/100 g aceite, los cuales presentaron diferencias significativas.
 - Las unidades de estudio, presentaron un contenido de fitoesteroles en promedio de 22.04 mg campesterol/100 g aceite, 68.23 mg estigmasterol/100 g aceite y 137.43 mg β -sitosterol/100 g aceite. Dentro de los cuales, el contenido de campesterol no presentó diferencias significativas, en cambio el contenido de estigmasterol y β -sitosterol, si presentaron diferencias significativas.
 - Las unidades de estudio, presentaron un contenido de tocoferoles en promedio de 212.32 mg tocoferol/100 g aceite respecto a los tocoferoles totales y un promedio de 7.81 mg α -tocoferol/100 g aceite, 3.31 mg β -tocoferol/100 g aceite, 127.55 mg γ -tocoferol/100 g aceite y 75.60 mg δ -tocoferol/100 g aceite respecto a cada uno de los tocoferoles. Dentro de estos valores se presentaron diferencias significativas.
 - Las unidades de estudio, presentaron un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, es decir ácido linoleico (omega 6) y ácido alfa-linolénico (omega 3). Todos los ácidos grasos obtenidos presentaron, en promedio, valores de 5.18% de ácido palmítico, 3.37% de ácido esteárico, 11.53% de ácido oleico, 0.73% de ácido vaccénico 37.55% de ácido linoleico y 41.26% de ácido alfa-linolénico. Dentro de estos

valores, el contenido de ácido vaccénico no presentó diferencias significativas, en cambio el contenido de los demás ácidos estudiados si presentaron diferencias significativas.

3. Las unidades de estudio, presentaron datos entre 0.89 – 23.65 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ aceite de CAH y 747.22 – 1008.18 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ aceite de CAL. Mientras que la capacidad antioxidante total presentó datos entre 751.71 – 1016.79 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ aceite. Dentro de estos valores se presentaron diferencias significativas.
 - Se determinó que los tocoferoles son responsables en un gran porcentaje de la capacidad antioxidante que presentan los aceites en estudio.
4. Teniendo en consideración a todos los compuestos bioactivos analizados, se logró determinar diferencias marcadas entre las 16 unidades de aceite de Sacha Inchi estudiadas, sin embargo no se puede determinar un cultivar selecto. No obstante las bondades que brinda el aceite de Sacha Inchi independiente del cultivar de donde se extraiga, queda manifestada por los importantes compuestos bioactivos que presenta, los cuales son buenos para la salud humana.

RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones de acuerdo a los diferentes tipos de compuestos fenólicos que se pueden encontrar en el aceite de Sacha inchi, para determinar cuál de ellos es el que está asociado a la acción antioxidante que presentan los compuestos fenólicos.
2. Se sugiere continuar los estudios sobre el contenido de compuestos bioactivos del Sacha Inchi ya que es un producto muy importante para el ser humano.
3. Se plantea evaluar el efecto del medio ambiente sobre las accesiones de semillas sembrados en diferentes localidades.
4. Se sugiere realizar estudios de toxicidad sobre el consumo de aceite de Sacha Inchi.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **AMARAL, J.;** CASAL, S.; TORRES, D.; SEABRA, R. AND OLIVEIRA, B., 2005 Simultaneous Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Hazelnuts by a Normal Phase liquid Chromatographic Method. Analytical Sciences. Vol. 21, 1545-1548.
2. **AMES, N. B.;** SHIGENAGA, K. M. AND HAGEN, M. T., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Prod. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 90, pp. 7915-7922, September, 1993.
3. **AREVALO, G.**, 1995. Informes de Resultados de Investigación. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. E.E. “El Porvenir”. Años 1989-1995.
4. **ARNAO, M.B.,** CANO, A., ACOSTA, M., 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry 73, 239–244.
5. **BAILEY, A. E.**, 1984. Aceites y grasas industriales. 2da Edición. Pg. 4-212
6. **BAILEY, L.L.**, 1949. Manual of cultivated plants. The Mac Millan Co. New York. p. 118
7. **BECKMAN, KB. AND AMES, BN.**, 1998. The free radical theory of ageing matures. Physiol Rev. 78: 547-581.
8. **BEGOÑA, O. A.;** FERNANDO, G. L. AND BLANCO, N. I., 2001. Carotenoides y Salud Humana. Fundación Española de la Nutrición. Madrid, septiembre, 2001.
9. **BENAVIDES, J.;** MORALES, J. AND PASCUAL, G., 1994. Avance en la caracterización del aceite y proteína del cultivo de sacha inchi o maní de monte (*Plukenetia volubilis* L.) Como alternativa para la alimentación humana y animal, Yurimaguas (Perú). Instituto Nacional de Investigación Agraria. 1994. 17 h.
10. **BENDICH, A. AND OLSON, J. A.**, 1989. Biological actions of carotenoids. The Faseb journal. Vol. 3. pp.1927-1932. June 1989.

11. **BERNARDINI**, 1981. Tecnología de aceites y grasa. Editorial Alhambra. S.A. Madrid. p. 234-239.
12. **BONDIOLI**, P.; **DELLA**, B. AND **RETTKE**, P., 2006. Alpha linolénic acid rich oils. Composition of Plukenetia Volubilis (Sacha Inchi) oil from Perú. La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse. 2006, 83(3): 120-123.
13. **BRACK**, A., 1999. Plukenetia volubilis L. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD. Cuzco – Perú. p. 550.
14. **BRAVO**, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56:317–33.
15. **BRIGELIUS-FLOHE**, R. AND **TRABER**, M. G., 1999. Vitamin E: Function and metalism. The Fased Journal. Vol.13, p. 1145-1155. July 1999.
16. **BRITTON**, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. The Faseb Journal. Vol. 9 December 1995.
17. **BURCK**, U.; **GOEBEL**, H. H.; **KUHLEND AHL**, H. D.; **MEIER**, C. AND **GOEBEL**, K. M., 1981. Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man. Neuropediatrics. Vol.12, 267–278
18. **CACHIQUE**, D., 2006. “Estudio de la Biología Floral y Reproductiva en el Cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) INIEA – UNSM”, tesis para optar el título de Ing. Agrónomo, Universidad Nacional San Martín – Perú.
19. **CASTAÑO**, D.L.T.; **VALENCIA**, M.P.G.; **MURILLO**, E.P.; **MENDEZ**, J.J.A. AND **JOLI**, J.E., 2012. Composición de Ácidos grasos de Sacha Inchi (*Plukenetia volúbilis* Linneo) y si relación con la bioactividad del vegetal. Rev Chil Nutr Vol. 39.
20. **COHEN**, J.H.; **KRISTAL**, A.R. AND **STANFORD**, J.L., 2000. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. J. Natl. Cancer Inst. Vol,92:61–8.
21. **CONNOR**, W., 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. Am. J. Clin. Nutr. Vol.71: 171.
22. **CORAZON**, G. M.; **CATRO**, R. D.; **CHOTA**, M. W.; **RODRIGUEZ**, A.; **CACHIQUE**, D.; **MANCO**, E.; **DEL**, C. D.; **RENNO**, J. AND **GARCIA**, D. C., 2009. Caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del Banco Nacional de germoplasma de Sacha Inchi Plukenetia Volubilis L. (E.E. El

- Porvenir - INIA). Vol. 18 N°1-2 2009: 23-31.
23. **CROSS, C. K., 1970.** Oil stability: a DSC alternative for the active oxygen method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 47, 229-230.
 24. **DECKER, E.A., 1997.** Phenolics: Prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*, 1997;55(1),396-398.
 25. **DIARIO OFICIAL EL PERUANO, 2005.** Normas Legales. Ley N° 28477. Ley que declara a los cultivos, Crianzas nativas y especies silvestres Usufrutuadas patrimonio Natural de la nación. p. 289574-289575.
 26. **DUCHATEAU, G. S. M. J. E.; BAUER-PLANK, C. G.; LOUTER, A. J. H.; VAN DER HAM, M.; BOERMA, J. A.; VAN ROOIJEN, J. J. M., et al. (2002).** Fast and accurate method for total 4-desmethyl sterol(s) content in spreads, fat-blends, and raw materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 273–278.
 27. **FANALI, Ch.; DUGO, L.; CACCIOLA, Fr.; BECCARIA, M.; GRASSO, S.; DACHA, M.; DUGO, P. AND MONDELLO, L., 2011.** Chemical Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis L.*) Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
 28. **FANG, YZ.; YANG, S. AND WU, G., 2002.** Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879.
 29. **FARRELL, P.; BIERI, J.; FRATANTONI, J.; WOOD, R. AND DISANT'AGNESE, P. 1977.** The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. *J. Clin. Invest.* 60, 233–241
 30. **FERNANDEZ, I. M., 2007.** Sacha Inchi – planta promisorio. Exposición en evento. *Rev. Acad. Peru Salud* 14(2), pp.52.
 31. **FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; PIANTINO C.R.; GRIMALDI, R. AND CABRAL, F. A., 2009.** Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia Volubilis L.*) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, vol.,49. p. 323-329.
 32. **GARCIA, H., 1992.** Resumen de investigaciones apoyadas por Fundeagro 1988-1992. Tomo I. Proyecto de transformación de la tecnología agropecuaria. TTA. Lima. p.61-63.

33. **GARMENDIA, F.**; PANDO, R. AND RONCEROS, G., 2011. Efecto del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis L.*) sobre el perfil lipídico en pacientes con hiperlipoproteinemia.
34. **GILLESPIE, L. J.**, 1993. A synopsis of neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. *Systematic Botany* 18 (4): 575 – 592
35. **GORRITI, A.**; CÓRDOVA, A.; ARROYO, J.; et al. 2006. Estudio farmacognóstico, toxicidad aguda oral y actividad hipolipemiante de las semillas de *Plukenetia volubilis L.* (sacha inchi). IX Jornadas de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas “Dra. Bertha Pareja Pareja”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2006.
36. **GUILLEN, M. D.**; Ruiz, A.; Cabo, N.; Chirinos, R.; AND PASCUAL, G., 2003. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*) oil by FTIR spectroscopy and ¹H NMR comparison with linseed oil. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*. Vol. 80, 755 e 762.
37. **HALLIWELL, B.**, 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* 55:S44–9.
38. **HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C.**, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, U.K.: Oxford University Press.
39. **HALLIWELL, B. AND WHITEMAN M.**, 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean *Br J Pharmacol.* 142:231 - 255.
40. **HAMAKER, B.**; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R.; CLARK, D.; GARCIA, H.; GONZALES, A.; HOHLSTAD, I.; CASTRO, M.; VALDIVIA, R.; RODRIGUEZ, T. AND LESCANO, M., 1992. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia Volubilis L.*). *American association of cereal chemist.* 69.4, 461-465.
41. **HANSSEN, H.P.**, 2008. Sacha Inchi e die Inka-Nuss auf dem Weg zum Weltmarkt. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 148, 60 - 61.
42. **HANSSEN, H. P. AND SCHMITZ, H. M.**, 2011. Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis L.*) Nut oil and its therapeutic and Nutricinal Uses. *Nuts & Seeds in*

- Health and Disease Prevention. Cap. 117. p. 991-994.
43. **HARBORNE, J. B. AND SIMMONDS, N. W.**, 1964. Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press, London, pp 101.
 44. **HARBORNE, J.B.**, 1989. Methods in plant biochemistry, I: Plant phenolics. London: Academic Press.
 45. **HAZEN, STOEWESAND. AND DUCLOS.**, 1980. Resultados de análisis del aceite y proteína del cultivo de sachá inchi. Universidad de Cornell USA.1980.
 46. **HERRMANN, H.**, 1988 On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988;186:1-5
 47. **HIGUCHI, S.**, 2004. Proyecto de Ley N° 11367/2004 – C12: Ley que declara al sachá inchi como patrimonio genético Nacional y producto alternativo en la lucha contra la pobreza. Lima, 08 septiembre 2004.
 48. **HUAMÁN, J.; CHÁVEZ, K.; CASTAÑEDA, E.; CARRANZA, S.; CHAVEZ, T.; BELTRAN, Y.; CAFFO, C.; CADILLO, R. AND CADENILLAS, J.** 2008. Efecto de la *Plukenetia volubilis* Linneo (sachá inchi) en la trigliceridemia posprandial. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2008; 69(4):263-6.
 49. **HUANG, D.; OU, B. AND PRIOR, L. R.**, 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Rev: J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841-1856.
 50. **KRENDEL, D. A.; GILCHREST, J. M., JOHNSON, A. O., AND BOSSEN, E. H.**, 1987 Isolated deficiency of vitamin E with progressive neurologic deterioration. *Neurology* 37, 538 –540.
 51. **KIZUNA EARTH.** 2012 [http://kizunaeearth.blogspot.com /2011/02/introduccion-del-sacha-inchi.html](http://kizunaeearth.blogspot.com/2011/02/introduccion-del-sacha-inchi.html)
 52. **KUKLISKI, C.** 1998: “Farmacognosia, estudio de la drogas y sustancias medicamentosas de origen natural”. 1ª edición. 1998. Fondo Editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú.
 53. **JAUREGUI, M. A.; RAMOS, E. F.; ALVARADO, O-U. C.; CASTAÑEDA, C. B.; BARNETT, M. E.; YAÑEZ, F. J. AND CAJALEON, A. D.**, 2010. Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en semilla de sachá inchi (*Plukenetia Volubilis L.*). *Rev. Soc. Quim. Peru.* 76(3)2010.

54. **LAGARDA, M.J.;** GARCIA-LLATAS, G. AND FARRE, R., 2006. Analysis of phytosterols in food. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
55. **LAWSON, H.,** 1999. Aceites y grasas alimentarias. Tecnología, utilización y nutrición. Pp.
56. **LAMPE, J W.,** 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanics of action in human experimental studies. *American Journal Clinical Nutrition*. 70:475S-490S.
57. **LEE. J.;** KOO, N. AND MIN, DB., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21-33.
58. **LIMA, J.;** FONOLLOSA, V. AND CHACÓN, P., 2005. Inhibición selectiva de la absorción de colesterol: una nueva perspectiva en el tratamiento de la hipercolesterolemia. *Med Clin (Barc)* 2005;125(1):16-23.
59. **LING, W.H. AND JONES, P.J.H.,** 1995. Dietary Phytosterols: A Review of Metabolism, Benefits and side Effects. *Life Sciences*, Vol.57, N.3, pp.195-206.
60. **MANCO, E.,** 2006. “Cultivo de Sacha Inchi”, Innovación Nacional de Investigación y Extensión agraria; Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental agraria “El Porvenir”, junio 2006.
61. **MARTIN, B. E.,** 2006. “Efectos de la intervención nutricional con un preparado lácteo enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas sobre marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y con el metabolismo óseo en pacientes dislipémicos”. Tesis para optar el grado de doctora en Farmacia. Universidad de Granada.
62. **MARTINEZ-VELARDE, I.;** PERIAGO, J. M. AND ROS, G., 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Alan* Vol. 50 n.1 , Caracas mar. 2000.
63. **MATTEA, M.A.,** 1999. Fundamentos sobre el prensado de semillas oleaginosas. *Aceites y Grasas*, pp. 427-431.
64. **MAZZA, G.,** 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1995;35:341-71

65. **MEJÍA, M.**, 1997. Extracción y refinación del aceite de sachá inchi. Tesis para optar el Título de Ingeniero de Industrias Alimentarias. Lima: Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
66. **MERINO, C.**, 2009. Caracterización de ácidos grasos y aminoácidos de diez ecotipos de *Plukenetia volubilis* L. (Sachá Inchi) de los departamentos de Loreto, San Martín y Amazonas. Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – UNAP, Facultad de Industrias Alimentarias. 2009.
67. **MICHOTTE, D.**, 2009. Etude de la stabilité oxydative de l'huile de lin en présence de composés phénoliques naturels.
68. **MILLER, N. AND RICE-EVANS, C.** 1997. The relative contributions of Ascorbic acid and phenolic antioxidant to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* Vol. 60 N°3 pp. 331-337.
69. **MUÑOZ, J.A.; RAMOS, E. F.; ALVARADO, O. C.; CASTAÑEDA, C. B.; BARNETT, M. E.; YAÑEZ, F. J. AND CAJALEON, A. D.**, 2010. Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en semilla de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Rev. Soc. Quim. Perú.* 76(3).
70. **MUÑOZ, J. AM.; ALVARADO-ORTIZ, U. C. AND ENCINA, Z. CHR.**, 2011. Fitoesteroles y Fitoestanoles: Propiedades saludables. *Rev. Horizonte Medico.* Vol 11(2). Julio-diciembre 2011.
71. **MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P., Y RODWELL, V.** Bioquímica de Harper 15ª Edición. Pag. 144, 575-577.
72. **NAKARUMA, M.T. AND NARA, T.Y.**, 2003. Essential fatty acid sintesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leuk Essent Acids* 2003; 68:145-150.
73. **NAKAMURA, MT. AND NARA, TY.**, 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta 6, delta 5, and delta 9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 345-376.
74. **NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> Fecha de consulta: 14/03/2012.

75. NELSON, J. A., AND FALK, R. E., 1993. The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth, *Anticancer Res.* 13: 2287-2292.
76. NIELSEN, S.S., 1998. Food analysis. En: *Crude fats analysis*. Purdue University, West afayette, Indiana, pp. 203-214.
77. PALOU, A., 2005. *El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación*. Barcelona: 2ª Edición Unilever Foods S.A.
78. PASCUAL, G. AND MEJÍA, M., 2000. Extracción y caracterización del aceite de sacha inchi. *Anales Científicos UNALM*. Lima. 2000. Enero-Marzo (42): 144 – 158.
79. PLAT, J. AND MENSINK, R., 2005. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am. J. Cardiol.* 2005; 96(Suppl):15D–22D.
80. PRIOR, RL., 2003. Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage. *American Journal Clinical Nutrition.* 78:570S-578S.
81. RODRIGUEZ-AMAYA, B. D., 1999. Carotenoides y Preparación de Alimentos: La retención de los carotenoides Provitamina A en Alimentos preparados, Procesados y Almacenados.
82. ROS, E., 2003 Inhibición de la absorción intestinal del colesterol: nueva diana terapéutica en la reducción de la colesterolemia. *Clin. Invest. Arterioscl.* 2003; 15(6):261-75.
83. ROS, E., 2006. Recomendaciones sobre el consume de fitoesteroides y estanoles. *Jano* [revista en internet] 2006 14-21 julio. [acceso 25 de julio de 2012];0(1617):[46-7]. Disponible <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1617/46/1v0n1617a13091320pdf001.pdf>
84. ROS, E., 2006a Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.* 2006; 6:52G-62G.
85. SÁNCHEZ-MORENO, C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int.* 8:121-137
86. SANDERS, T.A., 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 176S-180S.

87. **SEN**, Ch, K.; **Khanna**, S. AND **ROY**, S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. The Ohio state university medical center.
88. **SHAHIDI**, F. AND **WANASUNDARA**, PKJPD., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1992;32:67-103.
89. **SIES**, H., 1991. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. New York: Academic Press.
90. **SIES**, H., 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (82): 291-5.
91. **SIMON**, HU.; **HAJ-YEHIA**, A. AND **LEVI-SCHAFFER**, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in the apoptosis induction. *Apoptosis* 5:415-8.
92. **SINGH**, K.K.; **WIESENORN**, D.P.; **TOSTENSON**, K. AND **KANGAS**, N., 2002. Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79 (2): 165-170.
93. **SINGLETON**, V.L.; **ORTHOFFER**, R. AND **LAMUELA-RAVENTOS** R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299: 152-178.
94. **SMOUSE**, T. H., 1995. Factors affecting oil quality and stability. In K. Warner, & n.a.m. Eskin (Eds), *Methods to asses quality ans stability of oils and fat-containing foods* (pp. 71-36). Champaign, Illinois: American Oil Chemists' Society.
95. **SOUKUP**, J., 1987. *Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catalogo de los Géneros*. Editorial Salesiana. Lima – Perú. 436 p.
96. **STAMPFER**, M.; **HENNEKENS**, C.; **MANSON**, J.; **COLDITZ**, G.; **ROSNER**, B. AND **WILLETT**, W., 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.* 328, 1444 –1449.
97. **STIEF**, T. W., 2003. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth* 60:567-72.
98. **SWAIN**, T, **HILLIS**, WE., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* ; 10: 63- 68.

- 99. TALCOTT, S.T. AND HOWARD, L.R., 1999.** Phenolic autooxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* 47:2109-2115.
- 100. TAN, C.; CHE MAN, Y.; SELAMAT, J. AND YUSOFF, M., (2002).** Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chemistry.* 76, pp. 385-389.
- 101. THOMAS, J.A., 1994.** Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. *Modern nutrition in health and disease.* 8ed. Williams and Wilkins; Philadelphia. 501-12.
- 102. TRABER, M. G., 2007.** Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* Vol. 27:347-62.
- 103. VALENZUELA, A., 2004.** Los fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev. Chil. Nutr.* 2004;31(suppl):161-169.
- 104. VALLES, R. C., 1995.** Investigador agrario. Profesor asociado de la Facultad de Agrónoma de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto (UNSM). Investigador de la especie *Plukenetia*. Entrevista personal.
- 105. VELARDE, F. D.; RIOS, L. LI.; CARRILLO, C. Fr. AND ESTRADA, J. R., 2007.** Catálogo de las Colecciones Nacionales. Banco de Germoplasma de la SUDIRGEB – INIEA. Vol. 1.
- 106. VERMERRIS, W. AND NICHOLSON, R., 2008 .** Phenolic Compound Biochemistry. Pag. 1-3
- 107. WARD, J.A., 1976.** Processing high oil content seeds in continuous press. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 53: 261-264.
- 108. WILDMAN, REC., 2001.** Nutraceuticals, classifying nutraceuticals: a brief review of historical and teleological aspects. In: Wildman REC, editor. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 1–12 y 13-30.
- 109. WOLF, G., 2005.** The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill". *J Nutr* 135 (3): 363 - 6.




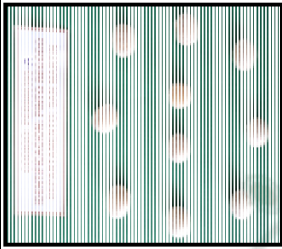







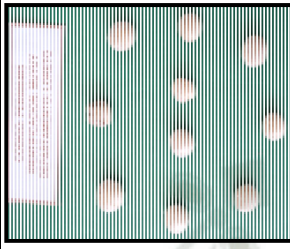
ANEXO N°01.


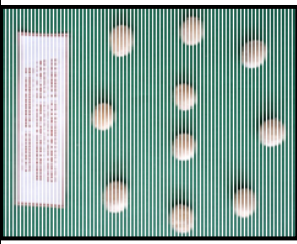




Tabla N° 33: Datos de pasaporte del material genético de la Colección Nacional de Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis L.*) procedente de la EEA El Porvenir del Instituto Nacional de Innovación Agraria- INIA. Campaña 2010-2011.







REGISTRO DE DATOS DE PASAPORTE DE MATERIAL GENÉTICO DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE SACHA INCHI (<i>Plukenetia Volubilis L.</i>)						
N°	CODIGO NACIONAL	IDENTIFICACION	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	
1	PER000394	Shilcayo	San Martin	Maynas	La Banda de Shilcayo	
2	PER000395-A	Pinto Recodo	San Martin	Lamas	Pinto Recodo	
3	PER000401	Caballococha	Loreto	Mariscal Ramón Castilla	Ramón Castilla	
4	PER000403	Santa Clara Alto	Loreto	Maynas	Alto Nanay	
5	PER000405	Muyuy	Loreto	Reqena	Capelo	
6	PER000406-A	Pacaya	Loreto	Reqena	Puinahua	
7	PER000406-B	Pacaya	Loreto	Reqena	Puinahua	
8	PER000408-B	Rio Mamon	Loreto	Maynas	Punchana	
9	PER000416	Chazuta	San Martin	San Martin	Chazuta	
10	PER000417	Saposa	San Martin	Huallaga	Saposa	
11	PER000418	Moyobamba	San Martin	Moyobamba	Moyobamba	
12	PER000420	Rio Palmira	Loreto	Maynas	Alto Nanay	
13	PER000421	Alto Shamboyacu	San Martin	Lamas	Lamas	
14	PER000422	Alto Pucayacu	San Martin	Lamas	Zapatero	
15	PER017597	Chirapa	San Martin	El Dorado	Santa Rosa	
16	PER017598	Shapaja	San Martin	San Martin	Shapaja	




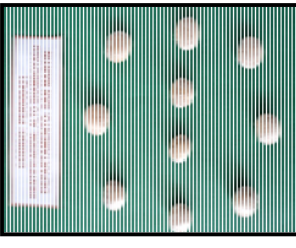


Figura N° 42. Galería de imágenes de los 16 cultivares de semilla de Sacha Inchi, usadas en el presente trabajo de investigación


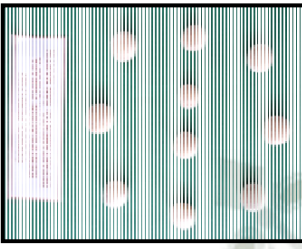


Número	Código Identificación	Departamento	Semilla de Sacha inchi		Almendra de Sacha inchi	
			Fotografía	Peso, mg*	Fotografía	Peso, mg*
1	PER000394 Shilcayo	San Martín		0.793		0.518
2	PER000395- A Pinto Recodo	San Martín		0.816		0.540

3	PER000401 Caballococha	Loreto		0.716		0.460
4	PER000403 Santa Clara Alto	Loreto		0.787		0.497
5	PER000405 Muyuy	Loreto		0.669		0.439

6	PER000406- A Pacaya	Loreto		0.494
7	PER000406- B Pacaya	Loreto		0.422
8	PER000408- B Rio Mamon	Loreto		0.464
				0.747
				0.652
				0.742

9	PER000416 Chazuta	San Martín	 CODIGO: PER000416 IDENTIFICACION: CHAZUTA DEPARTAMENTO: SAN MARTIN	0.675	 CODIGO: PER000416 IDENTIFICACION: CHAZUTA DEPARTAMENTO: SAN MARTIN	0.444
10	PER000417 Saposa	San Martín	 CODIGO: PER000417 IDENTIFICACION: SAPOSOA DEPARTAMENTO: SAN MARTIN	0.696	 CODIGO: PER000417 IDENTIFICACION: SAPOSOA DEPARTAMENTO: SAN MARTIN	0.445
11	PER000418 Moyobamba	San Martín	 CODIGO: PER000418 IDENTIFICACION: MOYOBAMBA DEPARTAMENTO: SAN MARTIN	0.765	 CODIGO: PER000418 IDENTIFICACION: MOYOBAMBA DEPARTAMENTO: SAN MARTIN	0.490

12	PER000420 Rio Palmira	Loreto		0.714		0.452
13	PER000421 Alto Shamboyacu	San Martin		0.775		0.492
14	PER000422 Alto Pucayacu	San Martin		0.718		0.475

15	PER017597 Chirapa	San Martín		0.748		0.478
16	PER017598 Shapaja	San Martín		0.793		0.539

*Los valores de peso (mg), de semilla y almendra son promedio (n=10)

ANEXO N°02.

Tabla N° 34. Resultados de la extracción de aceite y del rendimiento de aceite de semillas de 16 accesiones de semilla de *Plukenetia Volubilis L.* (Sacha Inchi)

CODIGO CULTIVAR	Rep	Aceite obtenido, g	Rendimiento, %	Promedio rendimiento de aceite, %	DS
PER000394	1	12.3747	35.3544	35.4582	0.1468
	2	12.4476	35.5620		
PER000395-A	1	13.2618	37.8845	37.5730	0.4405
	2	13.0428	37.2615		
PER000401	1	12.2663	35.0427	35.8351	1.1207
	2	12.8237	36.6275		
PER000403	1	11.3983	32.5655	34.5429	2.7963
	2	12.7833	36.5202		
PER000405	1	12.1393	34.6783	35.3756	0.9862
	2	12.6260	36.0729		
PER000406-A	1	12.5909	35.5723	35.5234	0.0691
	2	12.5543	35.4745		
PER000406-B	1	12.0875	34.5315	34.6789	0.2085
	2	12.1903	34.8263		
PER000408-B	1	11.9494	34.1383	35.0735	1.3225
	2	12.6036	36.0086		
PER000416	1	12.3105	35.1406	34.8748	0.3760
	2	12.1197	34.6089		
PER000417	1	12.486	35.6514	35.2333	0.5912
	2	12.1937	34.8153		
PER000418	1	12.2105	34.8788	35.9540	1.5206
	2	12.9628	37.0293		
PER000420	1	12.1656	34.7570	34.4354	0.4547
	2	11.9402	34.1139		
PER000421	1	12.9064	36.8734	37.2353	0.5118
	2	13.1601	37.5972		
PER000422	1	11.8003	33.7092	33.4708	0.3371
	2	11.6337	33.2324		
PER017597	1	12.6886	36.2508	36.8880	0.9012
	2	13.1348	37.5252		
PER017598	1	11.7227	35.4157	35.6505	0.3320
	2	11.8783	35.8852		

Rep: Numero de repeticiones, g: Gramos, DS: Desviación estándar.

ANEXO N°03.

Tabla N°35. Resultados de los Compuestos Fenólicos Totales (CFT) obtenidos de 16 aceites de Sacha Inchi

CODIGO ACEITE	Rep	[]*, mg GAE/ml	CFT []*, mg GAE/g	CFT []*, mg GAE/100g	Promedio CFT []*, mg GAE/100g	DS
PER000394	1	0.0079	0.6765	67.6499	64.5330	4.4079
	2	0.0077	0.6142	61.4162		
PER000395-A	1	0.0076	0.6054	60.5397	60.2064	0.4714
	2	0.0075	0.5987	59.8731		
PER000401	1	0.0076	0.6223	62.2255	60.6773	2.1895
	2	0.0074	0.5913	59.1290		
PER000403	1	0.0073	0.6070	60.7048	62.1026	1.9768
	2	0.0079	0.6350	63.5004		
PER000405	1	0.0076	0.6160	61.5992	60.8382	1.0762
	2	0.0075	0.6008	60.0772		
PER000406-A	1	0.0071	0.5923	59.2259	59.0483	0.2511
	2	0.0074	0.5887	58.8708		
PER000406-B	1	0.0077	0.6121	61.2116	60.2331	1.3838
	2	0.0074	0.5925	59.2546		
PER000408-B	1	0.0075	0.6378	63.7810	62.1093	2.3642
	2	0.0076	0.6044	60.4375		
PER000416	1	0.0076	0.6115	61.1460	60.7407	0.5732
	2	0.0075	0.6034	60.3354		
PER000417	1	0.0076	0.6106	61.0559	62.6176	2.2086
	2	0.0076	0.6418	64.1794		
PER000418	1	0.0075	0.6026	60.2574	59.7951	0.6538
	2	0.0074	0.5933	59.3328		
PER000420	1	0.0074	0.7683	76.8272	69.6558	10.1418
	2	0.0078	0.6248	62.4845		
PER000421	1	0.0075	0.6661	66.6086	63.0939	4.9706
	2	0.0075	0.5958	59.5791		
PER000422	1	0.0083	0.6761	67.6139	64.0317	5.0659
	2	0.0076	0.6045	60.4496		
PER017597	1	0.0072	0.7086	70.8613	65.8174	7.1331
	2	0.0076	0.6077	60.7736		
PER017598	1	0.0071	0.6015	60.1501	58.9818	1.6522
	2	0.0072	0.5781	57.8135		

Rep: Numero de repeticiones, g: Gramos, ml: mililitros, mg: miligramos, CFT: Compuestos fenólicos totales, []*: Concentración, GAE: Equivalente a ácido gálico, DS: Desviación estándar.

ANEXO N°04.

Tabla N° 36. Resultados de los Carotenoides obtenidos en 16 aceites de Sacha Inchi

CODIGO ACEITE	Rep	Carotenoide []*, mg β-caroteno/ml	Carotenoide []*, mg β-caroteno/g	Carotenoide []*, mg β-caroteno/100g	Promedio Carotenoide []*, mg β-caroteno/100g	DS
PER000394	1	0.0002	0.0023	0.2326	0.2289	0.0052
	2	0.0002	0.0023	0.2253		
PER000395-A	1	0.0001	0.0015	0.1462	0.1499	0.0052
	2	0.0002	0.0015	0.1535		
PER000401	1	0.0003	0.0030	0.3000	0.2927	0.0103
	2	0.0003	0.0029	0.2855		
PER000403	1	0.0003	0.0032	0.3187	0.3128	0.0083
	2	0.0003	0.0031	0.3069		
PER000405	1	0.0003	0.0025	0.2519	0.2613	0.0133
	2	0.0003	0.0027	0.2708		
PER000406-A	1	0.0002	0.0024	0.2445	0.2338	0.0152
	2	0.0002	0.0022	0.2231		
PER000406-B	1	0.0002	0.0018	0.1846	0.1821	0.0035
	2	0.0002	0.0018	0.1797		
PER000408-B	1	0.0002	0.0025	0.2491	0.2551	0.0085
	2	0.0003	0.0026	0.2611		
PER000416	1	0.0002	0.0019	0.1942	0.2001	0.0084
	2	0.0002	0.0021	0.2061		
PER000417	1	0.0003	0.0034	0.3354	0.3283	0.0100
	2	0.0003	0.0032	0.3213		
PER000418	1	0.0002	0.0021	0.2086	0.2039	0.0067
	2	0.0002	0.0020	0.1991		
PER000420	1	0.0002	0.0023	0.2349	0.2241	0.0153
	2	0.0002	0.0021	0.2133		
PER000421	1	0.0003	0.0029	0.2923	0.2829	0.0133
	2	0.0003	0.0027	0.2734		
PER000422	1	0.0003	0.0029	0.2901	0.2925	0.0034
	2	0.0003	0.0029	0.2950		
PER017597	1	0.0003	0.0029	0.2924	0.2840	0.0119
	2	0.0003	0.0028	0.2756		
PER017598	1	0.0003	0.0028	0.2807	0.2638	0.0239
	2	0.0002	0.0025	0.2470		

Rep: Numero de repeticiones, g: Gramos, ml: mililitros, mg: miligramos, []*: Concentración, DS: Desviación estándar.

ANEXO N°05.

Preparación de los estándares de Fitoesteroles (Campesterol, Estigmasterol y B-sitosterol) para obtener las respectivas curvas de trabajo.

SOLUCIÓN MADRE: 5mg campesterol, 5mg de estigmasterol, 5mg de b-sitosterol con 25ml de n-heptano.

Concentración final de solución madre = 0.6 mg/ml

ESTANDAR INTERNO: Se pesaron 5mg de β -colestanol y se diluyo en 25ml de n-heptano dando una concentración final de 0.2mg/ml.

Tabla N°37. Preparación de diluciones de la curva estándar de fitoesteroles

DILUCIONES					
N°	Solución madre, ml	Estándar interno, ml	n-heptano, ml	Volumen Final	[]* , mg/ml
1	1	0.2	0.8	2	0.3 (A)
2	1	0.3	1.7	3	0.2 (B)
3	1	0.5	3.5	5	0.12 (C)
4	1	1	8	10	0.06 (D)

- Ya teniendo listas nuestras diluciones A,B,C y D estas son inyectadas al Cromatograma de Gases para sus respectivas corridas.

CURVAS DE FITOESTEROLES

CAMPESTEROL

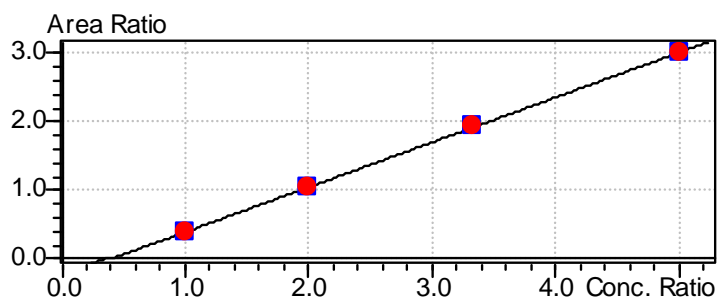
$$Y = aX + b$$

$$a = 0.6545996$$

$$b = -0.2517545$$

$$R^2 = 0.9998544$$

$$R = 0.9999272$$



ESTIGMASTEROL

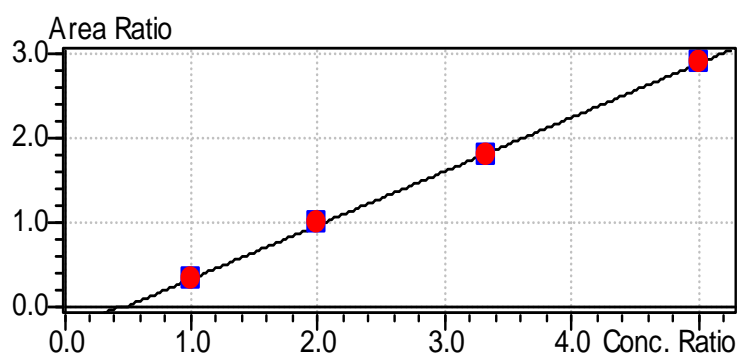
$$Y = aX + b$$

$$a = 0.6327479$$

$$b = -0.2814789$$

$$R^2 = 0.9999166$$

$$R = 0.9999583$$



β -SITOSTEROL

$$Y = aX + b$$

$$a = 0.5927812$$

$$b = -0.2785481$$

$$R^2 = 0.9996837$$

$$R = 0.9998418$$

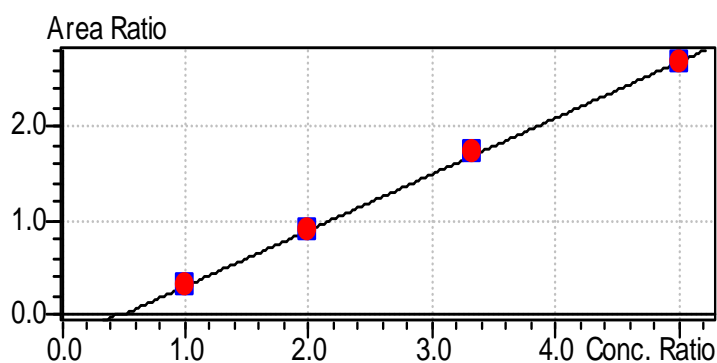


Figura N°43. Representaciones gráficas de las curvas estándar de los fitoesteroles (Campesterol, estigmasterol y β -sitosterol).

Tabla N° 38. Resultados de los Fitoesteroides (Campesterol, Estigmasterol y β -sitosterol) obtenidos en 16 aceites de Sacha Inchi

CODIGO ACEITE	Rep	fitosterol []*, mgF/ml			fitosterol []*, mgF/g			fitosterol []*, mgF/100g			Promedio fitosterol []*, mgF/100g			DS		
		Campesterol	Estigmasterol	B-Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	B-Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	B-Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	B-Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol	B-Sitosterol
PER000394	1	0.0217	0.0631	0.1311	0.2167	0.6292	1.3066	21.6702	62.9186	130.6644	21.0475	61.4467	130.6873	0.8806	2.0816	0.0323
	2	0.0205	0.0602	0.1311	0.2042	0.5997	1.3071	20.4248	59.9747	130.7102						
PER000395-A	1	0.0240	0.0704	0.1334	0.2400	0.7040	1.3337	24.0048	70.4043	133.3744	22.9906	68.1289	131.3903	1.4343	3.2179	2.8059
	2	0.0220	0.0661	0.1298	0.2198	0.6585	1.2941	21.9764	65.8535	129.4063						
PER000401	1	0.0195	0.0659	0.1271	0.1943	0.6587	1.2697	19.4319	65.8653	126.9685	20.0731	65.5291	127.0108	0.9068	0.4755	0.0597
	2	0.0208	0.0655	0.1276	0.2071	0.6519	1.2705	20.7143	65.1928	127.0530						
PER000403	1	0.0232	0.0713	0.1483	0.2311	0.7104	1.4783	23.1110	71.0381	147.8344	22.7538	76.1050	144.3971	0.5051	7.1657	4.8611
	2	0.0225	0.0815	0.1415	0.2240	0.8117	1.4096	22.3966	81.1719	140.9598						
PER000405	1	0.0217	0.0716	0.1381	0.2165	0.7141	1.3764	21.6537	71.4075	137.6410	22.6513	70.4250	139.5611	1.4107	1.3894	2.7153
	2	0.0237	0.0697	0.1419	0.2365	0.6944	1.4148	23.6488	69.4425	141.4811						
PER000406-A	1	0.0226	0.0737	0.1243	0.2254	0.7339	1.2382	22.5390	73.3914	123.8169	24.5960	74.5901	127.6336	2.9090	1.6952	5.3976
	2	0.0267	0.0760	0.1318	0.2665	0.7579	1.3145	26.6530	75.7888	131.4503						
PER000406-B	1	0.0268	0.0659	0.1445	0.2670	0.6566	1.4393	26.6988	65.6618	143.9306	23.2500	63.0152	138.1445	4.8773	3.7429	8.1828
	2	0.0198	0.0604	0.1324	0.1980	0.6037	1.3236	19.8013	60.3685	132.3583						
PER000408-B	1	0.0226	0.0692	0.1497	0.2254	0.6906	1.4939	22.5440	69.0598	149.3935	22.8463	69.5399	150.6387	0.4275	0.6790	1.7610
	2	0.0232	0.0703	0.1525	0.2315	0.7002	1.5188	23.1486	70.0201	151.8839						
PER000416	1	0.0213	0.0722	0.1362	0.2123	0.7198	1.3578	21.2299	71.9760	135.7841	21.4277	71.7134	137.4868	0.2798	0.3713	2.4080
	2	0.0217	0.0717	0.1396	0.2163	0.7145	1.3919	21.6256	71.4509	139.1894						
PER000417	1	0.0197	0.0665	0.1323	0.1962	0.6623	1.3179	19.6169	66.2273	131.7930	20.5306	66.3127	131.8119	1.2922	0.1208	0.0268
	2	0.0215	0.0665	0.1321	0.2144	0.6640	1.3183	21.4443	66.3981	131.8308						
PER000418	1	0.0187	0.0632	0.1433	0.1874	0.6322	1.4326	18.7438	63.2169	143.2591	19.7463	63.5002	138.1847	1.4178	0.4006	7.1763
	2	0.0208	0.0639	0.1334	0.2075	0.6378	1.3311	20.7489	63.7835	133.1103						
PER000420	1	0.0228	0.0666	0.1386	0.2276	0.6654	1.3843	22.7569	66.5416	138.4317	22.7747	67.6776	141.7293	0.0252	1.6066	4.6635
	2	0.0228	0.0690	0.1453	0.2279	0.6881	1.4503	22.7925	68.8136	145.0270						
PER000421	1	0.0225	0.0684	0.1422	0.2242	0.6826	1.4189	22.4201	68.2589	141.8940	20.7815	64.7832	135.6015	2.3173	4.9154	8.8989
	2	0.0192	0.0615	0.1297	0.1914	0.6131	1.2931	19.1429	61.3074	129.3090						
PER000422	1	0.0230	0.0833	0.1637	0.2299	0.8325	1.6372	22.9890	83.2535	163.7153	23.9055	77.2498	154.5861	1.2960	8.4905	12.9106
	2	0.0249	0.0715	0.1459	0.2482	0.7125	1.4546	24.8219	71.2461	145.4569						
PER017597	1	0.0193	0.0665	0.1184	0.1924	0.6641	1.1814	19.2373	66.4068	118.1416	20.2030	68.9035	123.9915	1.3657	3.5309	8.2731
	2	0.0212	0.0714	0.1298	0.2117	0.7140	1.2984	21.1687	71.4002	129.8415						
PER017598	1	0.0226	0.0616	0.1469	0.2253	0.6153	1.4660	22.5263	61.5252	146.5959	23.0370	62.7441	146.0185	0.7223	1.7238	0.8165
	2	0.0236	0.0640	0.1456	0.2355	0.6396	1.4544	23.5477	63.9630	145.4412						

Rep: Numero de repeticiones, g: Gramos, ml: mililitros, mg: miligramos, []*: Concentración, F: Fitoesterol (Campesterol, Estigmasterol, B-sitosterol) el que corresponda.

ANEXO N°06.

Preparación de los estándares de Tocoferoles (alfa, beta, gamma y delta) para obtener las respectivas curvas de trabajo.

SOLUCION MADRE: Se preparó una solución madre independiente, de cada uno de los respectivos estándares, tomando 50mg de alfa tocoferol, 50mg beta tocoferol, 50mg gamma tocoferol y 50 mg delta tocoferol con 50ml de hexano respectivamente. Cada solución madre, obtuvo una concentración final de 1mg/ml.

SOLUCIÓN DE TRABAJO: Cada una de las soluciones madres independientemente, fue diluida 1/5. Dando una concentración final de 0.2mg/ml de cada uno de los estándares. Estos datos los llevamos a ug/ml.

Concentración final de solución trabajo = 200ug/ml

Tabla N° 39. Preparación de diluciones de la curva estándar de Tocoferoles.

DILUCIONES											
N°	Solución trabajo alfa tocoferol , ml	Solución trabajo beta tocoferol , ml	Solución trabajo gamma tocoferol , ml	Solución trabajo delta tocoferol , ml	Hexano , ml	Dilución A	Dilución B	Dilución C	Dilución D	Vol. Final	[]*, ug/ml c/u
1	2	2	2	2	2	-	-	-	-	10	40 (A)
2	-	-	-	-	5	5	-	-	-	10	20 (B)
3	-	-	-	-	5	-	5	-	-	10	10 (C)
4	-	-	-	-	5	-	-	5	-	10	5 (D)

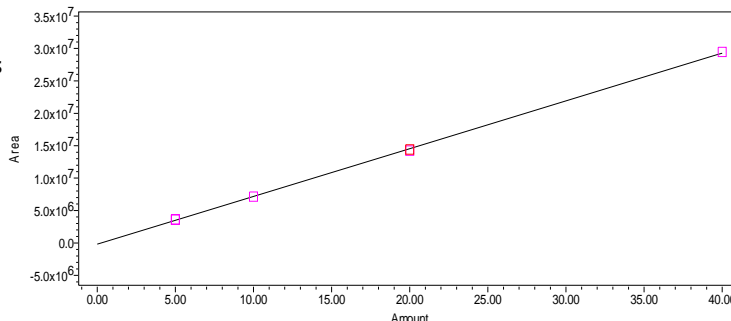
- Ya teniendo listas nuestras diluciones (A, B, C y D), fueron inyectadas en el HPLC para sus respectivas corridas.

CURVAS DE TOCOFEROLES

ALFA: $y = 7.37 \times 10^5 x - 1.94 \times 10^5$

$R^2 = 0.999$

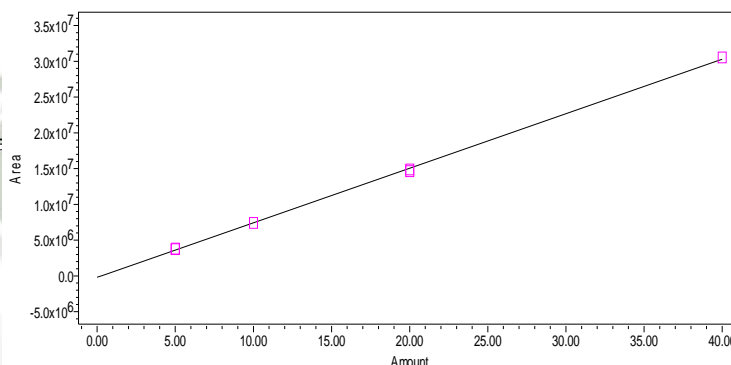
"x" en ug/ml



BETA: $y = 7.62 \times 10^5 x - 1.93 \times 10^5$

$R^2 = 0.999$

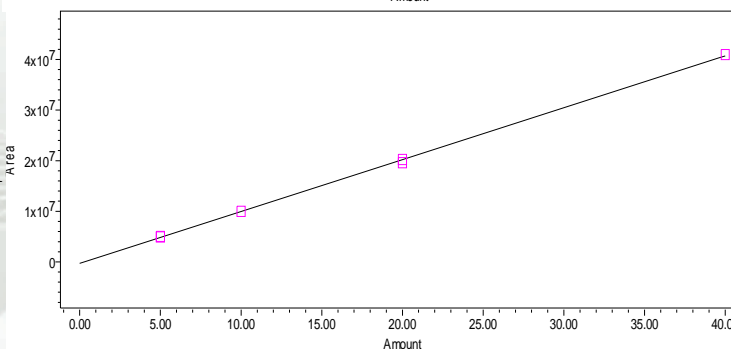
"x" en ug/ml



GAMMA: $y = 9.33 \times 10^5 x - 1.76 \times 10^5$

$R^2 = 0.999$

"x" en ug/ml



DELTA: $y = 1.03 \times 10^6 x - 2.94 \times 10^5$

$R^2 = 0.999$

"x" en ug/ml

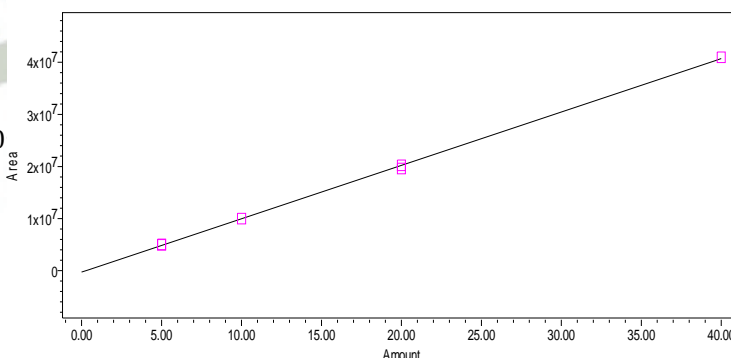


Figura N°44. Representaciones gráficas de las curvas estándar de los tocoferoles (Alfa, Beta, Gamma y Delta tocoferol).

Tabla N°40. Resultados de los Tocóferoles (alfa, beta, gamma y delta) obtenidos en 16 aceites de Sacha Inchi

CODIGO ACEITE	Re	Tocóferol [μ g ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) T/ml				Tocóferol [μ g ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) T/g				Tocóferol [μ g ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) T/100g				Promedio Tocóferol [μ g ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) T/100g				DS			
		alfa (α)	beta (β)	gamma (γ)	delta (δ)	alfa (α)	beta (β)	gamma (γ)	delta (δ)	alfa (α)	beta (β)	gamma (γ)	delta (δ)	alfa (α)	beta (β)	gamma (γ)	delta (δ)	alfa (α)	beta (β)	gamma (γ)	delta (δ)
PER0000394	1	0.780	0.331	13.324	7.093	0.0780	0.0331	1.324	0.7093	7.8000	3.3100	133.2400	70.9300	7.7961	3.3133	134.0676	72.6478	0.0055	0.0047	1.1703	2.4294
	2	0.780	0.332	13.503	7.444	0.0779	0.0332	1.3490	0.7437	7.7922	3.3167	134.8951	74.3656	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
PER0000395-A	1	0.784	0.343	13.919	8.660	0.0782	0.0342	1.3891	0.8643	7.8244	3.4232	138.9122	86.4271	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
	2	0.784	0.341	14.020	8.781	0.0784	0.0341	1.4020	0.8781	7.8400	3.4100	140.2000	87.8100	7.9171	3.3267	160.1336	91.7630	0.0383	0.0188	1.8576	0.4002
PER0000401	1	0.796	0.332	16.177	9.223	0.0794	0.0331	1.6145	0.9205	7.9441	3.3134	161.4471	92.0459	7.6889	3.2666	118.0591	74.8676	0.0550	0.0048	0.2533	0.5482
	2	0.789	0.334	15.882	9.148	0.0789	0.0334	1.5882	0.9148	7.8900	3.3400	158.8200	91.4800	7.8350	3.3600	144.7500	80.6000	0.0071	0.0000	1.1597	0.1697
PER0000403	1	0.765	0.327	11.788	7.448	0.0765	0.0327	1.1788	0.7448	7.6500	3.2700	117.8800	74.4800	7.7477	3.1731	119.6073	55.6587	0.1023	0.0946	17.342	9.8165
	2	0.772	0.326	11.812	7.518	0.0773	0.0326	1.1824	0.7526	7.7277	3.2633	118.2382	75.2553	7.8089	3.3467	140.3046	78.2439	0.0016	0.0094	1.4642	0.7582
PER0000405	1	0.783	0.336	14.557	8.048	0.0783	0.0336	1.4557	0.8048	7.8300	3.3600	145.5700	80.4800	7.8643	3.4631	157.3852	92.4251	0.0282	0.0282	0.5081	0.6634
	2	0.784	0.336	14.393	8.072	0.0784	0.0336	1.4393	0.8072	7.8400	3.3600	143.9300	80.7200	7.7477	3.1731	119.6073	55.6587	0.1023	0.0946	17.342	9.8165
PER0000406-A	1	0.766	0.310	10.713	4.862	0.0768	0.0311	1.0734	0.4872	7.6754	3.1062	107.3447	48.7174	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
	2	0.782	0.324	13.187	6.260	0.0782	0.0324	1.3187	0.6260	7.8200	3.2400	131.8700	62.6000	7.8089	3.3467	140.3046	78.2439	0.0016	0.0094	1.4642	0.7582
PER0000406-B	1	0.780	0.335	13.913	7.763	0.0781	0.0335	1.3927	0.7771	7.8078	3.3534	139.2693	77.7077	7.8643	3.4631	157.3852	92.4251	0.0282	0.0282	0.5081	0.6634
	2	0.781	0.334	14.134	7.878	0.0781	0.0334	1.4134	0.7878	7.8100	3.3400	141.3400	78.7800	7.7477	3.1731	119.6073	55.6587	0.1023	0.0946	17.342	9.8165
PER0000408-B	1	0.790	0.345	15.806	9.214	0.0788	0.0344	1.5774	0.9196	7.8842	3.4431	157.7445	91.9561	7.8643	3.4631	157.3852	92.4251	0.0282	0.0282	0.5081	0.6634
	2	0.786	0.349	15.734	9.308	0.0784	0.0348	1.5703	0.9289	7.8443	3.4830	157.0259	92.8942	7.8643	3.4631	157.3852	92.4251	0.0282	0.0282	0.5081	0.6634
PER0000416	1	ND	0.308	7.080	3.977	ND	0.0308	0.7087	0.3981	ND	3.0831	70.8709	39.8098	ND	3.0931	70.2903	40.1151	ND	0.0142	0.8211	0.4318
	2	ND	0.310	6.964	4.038	ND	0.0310	0.6971	0.4042	ND	3.1031	69.7097	40.4204	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
PER0000417	1	0.782	0.345	15.698	9.137	0.0784	0.0346	1.5729	0.9155	7.8357	3.4569	157.2946	91.5531	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
	2	0.783	0.346	15.985	9.256	0.0783	0.0346	1.5985	0.9256	7.8300	3.4600	159.8500	92.5600	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
PER0000418	1	ND	0.310	7.698	4.202	ND	0.0310	0.7706	0.4206	ND	3.1031	77.0571	42.0621	7.8322	3.4166	139.5561	87.1186	0.0111	0.0093	0.9106	0.9778
	2	ND	0.318	8.151	4.389	ND	0.0318	0.8159	0.4393	ND	3.1832	81.5916	43.9339	7.7227	3.2783	143.6950	83.2795	0.0180	0.0166	1.8739	1.7105
PER0000420	1	0.771	0.329	14.237	8.207	0.0771	0.0329	1.4237	0.8207	7.7100	3.2900	142.3700	82.0700	7.7227	3.2783	143.6950	83.2795	0.0180	0.0166	1.8739	1.7105
	2	0.772	0.326	14.473	8.432	0.0774	0.0327	1.4502	0.8449	7.7355	3.2665	145.0200	84.4890	7.7278	3.3483	140.6653	94.4494	0.0393	0.0023	6.5836	7.0703
PER0000421	1	0.770	0.335	13.601	8.945	0.0770	0.0335	1.3601	0.8945	7.7000	3.3500	136.0100	89.4500	7.7278	3.3483	140.6653	94.4494	0.0393	0.0023	6.5836	7.0703
	2	0.774	0.334	14.503	9.925	0.0776	0.0335	1.4532	0.9945	7.7555	3.3467	145.3206	99.4489	7.7278	3.3483	140.6653	94.4494	0.0393	0.0023	6.5836	7.0703
PER0000422	1	ND	0.334	9.108	7.137	ND	0.0333	0.9090	0.7123	ND	3.3333	90.8982	71.2275	7.7278	3.3483	140.6653	94.4494	0.0393	0.0023	6.5836	7.0703
	2	ND	0.330	9.284	7.294	ND	0.0331	0.9303	0.7309	ND	3.3066	93.0261	73.0862	7.7278	3.3483	140.6653	94.4494	0.0393	0.0023	6.5836	7.0703
PER017597	1	0.793	0.352	15.753	9.513	0.0792	0.0352	1.5737	0.9503	7.9221	3.5165	157.3726	95.0350	7.9231	3.5347	159.7991	92.5973	0.0015	0.0257	3.4315	3.4473
	2	0.794	0.356	16.255	9.034	0.0792	0.0355	1.6223	0.9016	7.9242	3.5529	162.2255	90.1597	7.9231	3.5347	159.7991	92.5973	0.0015	0.0257	3.4315	3.4473
PER017598	1	ND	0.315	8.226	5.866	ND	0.0314	0.8210	0.5854	ND	3.1437	82.0958	58.5429	ND	3.1719	82.6079	58.6015	ND	0.0398	0.7242	0.0828
	2	ND	0.320	8.312	5.866	ND	0.0320	0.8312	0.5866	ND	3.2000	83.1200	58.6600	ND	3.1719	82.6079	58.6015	ND	0.0398	0.7242	0.0828

Rep: Numero de repeticiones, ug: microgramos, g: Gramos, ml: mililitros, mg: miligramos, T: Tocóferol, [μ]: Concentración, DS: Desviación estándar, ND: No detectable.

ANEXO N°07.

Preparación de los estándares de perfil de ácidos grasos completos.

SOLUCIÓN MADRE: FAMES →30mg/ml , con 10ml de hexano

Concentración final de solución madre = 3 mg/ml

SOLUCION DE TRABAJO: Tomamos 1 ml de la solución madre y agregamos 10 ml de hexano.

Concentración Solución de trabajo= 0.3 mg/ml

Tabla N°41. Preparación de diluciones de estándar del Perfil de ácidos Grasos

DILUCIONES				
N°	Solución trabajo, ml	Hexano, ml	Volumen Final	[]* , mg/ml
1	0.7	2.3	3	0.07 (A)
2	1	2	3	0.1 (B)
3	1	1	2	0.15 (C)

- Ya teniendo listas nuestras diluciones A,B y C estas son inyectadas al Cromatograma de Gases para sus respectivas corridas.

Tabla N° 42. Datos del perfil de Ácidos grasos totales, obtenidos de los cromatogramas de los 16 aceites de Sacha Inchi

CODIGO ACEITE	Rep	Perfil de Ácidos Grasos																Sumatoria de AGT
		Ac. Caprílico	Ac. Caprílico	Ac. Tridecilico	Ac. Mirístico	Ac. Palmítico	Ac. Margarico	Ac. Palmítico	Ac. Margarico	Ac. Palmítico	Ac. Margarico	Ac. Margarico	Ac. Margarico	Ac. Margarico	Ac. Margarico	Ac. Margarico	Ac. Margarico	
PER000394	1	0.000	0.108	0.056	0.046	7.358	0.058	0.095	0.142	5.143	16.906	1.046	0.142	57.522	0.142	64.195	152.8170	
	2	0.015	0.113	0.051	0.039	7.936	0.000	0.094	0.150	5.440	18.120	1.255	0.135	63.043	0.135	70.458	166.8490	
PER000395-A	1	0.000	0.118	0.053	0.028	7.512	0.000	0.073	0.152	5.544	19.040	0.980	0.151	55.575	0.151	62.730	151.9560	
	2	0.014	0.116	0.056	0.036	7.893	0.000	0.073	0.165	5.903	20.193	1.060	0.157	59.375	0.157	67.513	162.5540	
PER000401	1	0.019	0.111	0.062	0.032	8.411	0.000	0.110	0.155	5.342	17.708	1.156	0.139	58.368	0.139	68.010	159.8230	
	2	0.014	0.118	0.054	0.040	8.453	0.000	0.102	0.179	5.384	17.950	1.143	0.146	58.964	0.146	69.090	161.8370	
PER000403	1	0.028	0.116	0.042	0.034	8.629	0.000	0.100	0.141	5.094	17.810	1.234	0.148	62.425	0.148	56.747	152.5480	
	2	0.021	0.116	0.058	0.029	9.038	0.000	0.129	0.157	5.603	19.103	1.191	0.155	66.324	0.155	60.685	162.6090	
PER000405	1	0.000	0.102	0.059	0.037	8.000	0.000	0.085	0.146	5.107	17.612	1.391	0.162	57.576	0.162	64.135	154.4120	
	2	0.017	0.107	0.058	0.036	8.118	0.000	0.110	0.138	5.240	17.968	1.142	0.135	59.714	0.135	67.092	159.8750	
PER000406-A	1	0.000	0.101	0.052	0.036	8.754	0.000	0.108	0.192	5.570	19.573	1.236	0.139	61.968	0.139	61.068	158.7970	
	2	0.013	0.126	0.056	0.036	8.837	0.000	0.125	0.174	5.636	19.824	1.177	0.152	63.720	0.152	63.210	163.0860	
PER000406-B	1	0.000	0.108	0.053	0.031	8.787	0.000	0.099	0.150	5.280	18.700	1.151	0.136	57.941	0.136	65.066	157.5020	
	2	0.015	0.113	0.062	0.038	8.926	0.000	0.105	0.146	5.230	18.887	1.276	0.138	59.787	0.138	67.576	162.2990	
PER000408-B	1	0.021	0.104	0.059	0.000	7.694	0.000	0.098	0.120	4.787	15.154	1.110	0.000	55.763	0.000	66.463	151.3730	
	2	0.013	0.118	0.067	0.029	7.939	0.000	0.103	0.126	4.842	15.526	1.177	0.104	58.010	0.104	70.122	158.1760	
PER000416	1	0.000	0.109	0.050	0.039	8.135	0.000	0.088	0.142	5.491	19.083	1.102	0.124	56.678	0.124	65.552	156.5930	
	2	0.014	0.121	0.062	0.036	7.916	0.000	0.099	0.138	5.321	18.660	1.134	0.121	56.168	0.121	65.559	155.3490	
PER000417	1	0.000	0.094	0.056	0.046	8.099	0.000	0.085	0.138	5.524	19.141	1.112	0.136	58.506	0.136	62.942	155.8790	
	2	0.013	0.121	0.056	0.027	7.956	0.000	0.094	0.145	5.452	19.014	1.110	0.136	58.874	0.136	63.611	156.6090	
PER000418	1	0.000	0.112	0.051	0.000	7.714	0.000	0.099	0.148	5.131	17.909	1.116	0.135	58.332	0.135	61.657	152.4040	
	2	0.015	0.114	0.051	0.038	7.254	0.000	0.093	0.128	4.886	17.003	1.064	0.121	55.888	0.121	59.467	146.1220	
PER000420	1	0.000	0.113	0.068	0.032	8.121	0.000	0.107	0.155	5.069	18.675	1.213	0.110	55.221	0.110	64.044	152.9280	
	2	0.017	0.112	0.063	0.027	8.295	0.000	0.100	0.171	5.199	19.159	1.220	0.132	56.787	0.132	66.654	157.9360	
PER000421	1	0.000	0.105	0.058	0.030	8.691	0.000	0.129	0.176	5.055	18.695	1.208	0.106	58.634	0.106	62.270	155.1570	
	2	0.020	0.116	0.053	0.032	8.670	0.000	0.128	0.155	5.004	18.600	1.265	0.133	59.704	0.133	63.547	157.4270	
PER000422	1	0.000	0.114	0.056	0.000	7.122	0.000	0.083	0.109	4.770	17.208	1.023	0.114	57.514	0.114	64.064	152.1770	
	2	0.017	0.112	0.057	0.031	6.947	0.000	0.077	0.103	4.663	16.820	0.984	0.099	56.883	0.099	63.722	150.5150	
PER017597	1	0.000	0.124	0.039	0.037	7.795	0.000	0.084	0.136	5.132	17.306	1.115	0.141	58.815	0.141	62.988	153.7120	
	2	0.015	0.117	0.057	0.025	7.754	0.000	0.088	0.111	5.124	17.327	1.108	0.128	58.785	0.128	63.305	153.9440	
PER017598	1	0.000	0.112	0.060	0.027	8.247	0.000	0.092	0.150	5.722	16.394	1.046	0.158	58.415	0.158	65.448	155.8710	
	2	0.019	0.107	0.053	0.032	7.693	0.000	0.093	0.145	5.270	15.253	1.059	0.145	54.965	0.145	62.123	146.9570	

Rep: Numero de repeticiones, AGT: Ácidos grasos totales.

ANEXO N°08.

Tabla N° 44. Resultados de la Capacidad antioxidante hidrofílica (CAH), obtenidos en 16 aceites de Sacha Inchi.

CODIGO ACEITE	Rep	CAH []*, μmol TE/ml	CAH []*, μmol TE/g	CAH []*, μmol TE/100g	Promedio CAH []*, μmol TE/100g	DS
PER000394	1	0.0009	0.0089	0.8906	0.8905	0.0001
	2	0.0009	0.0089	0.8904		
PER000395-A	1	0.0077	0.0725	7.2490	7.9747	1.0262
	2	0.0091	0.0870	8.7003		
PER000401	1	-0.0045	-0.0393	-3.9281	ND	1.1731
	2	-0.0058	-0.0559	-5.5871		
PER000403	1	0.0125	0.1145	11.4535	11.5803	0.1794
	2	0.0125	0.1171	11.7072		
PER000405	1	-0.0038	-0.0349	-3.4852	ND	0.6435
	2	-0.0038	-0.0440	-4.3952		
PER000406-A	1	0.0043	0.0416	4.1579	4.4832	0.4601
	2	0.0050	0.0481	4.8085		
PER000406-B	1	0.0070	0.0676	6.7606	6.3707	0.5514
	2	0.0064	0.0598	5.9808		
PER000408-B	1	0.0240	0.2252	22.5236	22.1090	0.5862
	2	0.0226	0.2169	21.6945		
PER000416	1	0.0091	0.0871	8.7073	8.3832	0.4583
	2	0.0084	0.0806	8.0591		
PER000417	1	0.0084	0.0771	7.7140	8.2072	0.6974
	2	0.0091	0.0870	8.7003		
PER000418	1	-0.0004	-0.0039	-0.3896	ND	0.4553
	2	0.0003	0.0025	0.2543		
PER000420	1	0.0064	0.0610	6.1044	5.7819	0.4561
	2	0.0057	0.0546	5.4594		
PER000421	1	0.0152	0.1456	14.5583	14.4067	0.2145
	2	0.0152	0.1426	14.2550		
PER000422	1	0.0084	0.0806	8.0559	8.6081	0.7810
	2	0.0098	0.0916	9.1603		
PER017597	1	0.0070	0.0634	6.3380	6.4749	0.1936
	2	0.0070	0.0661	6.6118		
PER017598	1	0.0253	0.2430	24.2975	23.6502	0.9155
	2	0.0240	0.2300	23.0028		

Rep: Numero de repeticiones, ml: mililitros, mg: miligramos, CAH: Capacidad antioxidante hidrofílica, TE: Equivalente a Trolox, []*: Concentración, DS: Desviación estándar, ND: No detectable.

ANEXO N°09.

Tabla N°45: Resultados de la Capacidad antioxidante lipofilica (CAL), obtenidos en 16 aceites de Sacha Inchi.

CODIGO ACEITE	Rep	CAL []*, Umol TE/ml	CAL []*, Umol TE/g	CAL []*, Umol TE/100g	Promedio CAL []*, Umol TE/100g	DS
PER000394	1	0.2276	9.1010	910.1000	905.9518	5.8664
	2	0.2260	9.0180	901.8037		
PER000395-A	1	0.2187	8.7334	873.3387	873.1643	0.2465
	2	0.2187	8.7299	872.9900		
PER000401	1	0.2341	9.3607	936.0736	926.6822	13.2815
	2	0.2298	9.1729	917.2908		
PER000403	1	0.1992	7.9647	796.4654	801.6113	7.2773
	2	0.2022	8.0676	806.7571		
PER000405	1	0.2203	8.8018	880.1758	833.2933	66.3018
	2	0.1968	7.8641	786.4109		
PER000406-A	1	0.1876	7.4963	749.6296	747.2228	3.4038
	2	0.1862	7.4482	744.8160		
PER000406-B	1	0.2052	8.1929	819.2918	817.6704	2.2930
	2	0.2043	8.1605	816.0490		
PER000408-B	1	0.2271	9.0612	906.1240	902.1621	5.6029
	2	0.2249	8.9820	898.2002		
PER000416	1	0.2176	8.7041	870.4053	855.8259	20.6184
	2	0.2106	8.4125	841.2465		
PER000417	1	0.2162	8.6499	864.9920	856.0249	12.6813
	2	0.2122	8.4706	847.0579		
PER000418	1	0.2103	8.4050	840.5009	822.2710	25.7810
	2	0.2011	8.0404	804.0411		
PER000420	1	0.2208	8.8199	881.9862	897.6461	16.0589
	2	0.2157	8.6110	861.1045		
PER000421	1	0.2279	9.0900	909.0015	871.5453	14.7656
	2	0.2217	8.8629	886.2908		
PER000422	1	0.2528	10.0954	1009.5367	1008.1790	1.9201
	2	0.2517	10.0682	1006.8213		
PER017597	1	0.2227	8.9098	890.9760	882.8725	11.4601
	2	0.2190	8.7477	874.7689		
PER017598	1	0.2241	8.9531	895.3150	909.3728	19.8807
	2	0.2311	9.2343	923.4306		

Rep: Numero de repeticiones, g: Gramos, ml: mililitros, mg: miligramos, CAL: Capacidad antioxidante lipofilica, TE: Equivalente a Trolox, []*: Concentración, DS: Desviación estándar.