

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**“EFECTO DE LA HIDRÓLISIS DE GALOTANINOS DE TARA
(*Caesalpinia spinosa*) SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN*
VITRO Y ESTABILIDAD DEL ACEITE DE SACHA INCHI (*Plukenetia*
volubilis)”**

Presentado por:

RULY TERAN HILARES

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Abancay - Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TESIS

TÍTULO:

"EFECTO DE LA HIDRÓLISIS DE GALOTANINOS DE TARA (Caesalpinia spinosa) SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO Y ESTABILIDAD DEL ACEITE DE SACHA INCHI (Plukenetia volubilis)"

Responsable: **RULY TERÁN HILARES**



Asesor
Ing. Víctor Huamani Meléndez



M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavillca
Presidente de jurado



Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres
Primer miembro de jurado



Accesitario
Nut. Cándida López Loayza

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**“EFECTO DE LA HIDRÓLISIS DE GALOTANINOS DE TARA
(*Caesalpinia spinosa*) SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN*
VITRO Y ESTABILIDAD DEL ACEITE DE SACHA INCHI (*Plukenetia*
volubilis)”**

Presentado por:

RULY TERAN HILARES

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Abancay - Perú

2015





“EFECTO DE LA HIDRÓLISIS DE GALOTANINOS DE TARA (*Caesalpinia spinosa*) SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO Y ESTABILIDAD DEL ACEITE DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*)”

Agradezco:

A Nuestro Señor por darme salud y oportunidades para alcanzar mis objetivos.

A mis Padres, Hermanos y Amigos por su apoyo y motivación para alcanzar mis objetivos.

Al Dr. David Campos Gutiérrez y la Dra. Rosana Chirinos Gallardo por su orientación y apoyo durante la ejecución de esta tesis.

Al Instituto de Biotecnología Industrial-IBT y la UNALM, por permitirme la oportunidad de desarrollar esta tesis.

Al MSc. Víctor Huamani Meléndez por su apoyo y orientación.

A la UNAMBA por darme la iniciativa para construir mis grandes objetivos.

A todos los docentes de la UNAMBA, UNALM –PERÚ y USP-BRASIL, que me incentivan cada día a mejorar.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice	
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	3
2.1. Compuestos fenólicos	3
2.1.1. Clasificación de compuestos fenólicos	3
2.1.2. Relación estructura-actividad de compuestos fenólicos	6
2.2. Taninos	7
2.3. Aceite de sacha inchi	10
2.4. Mecanismos de oxidación de lípidos	13
2.4.1. Iniciación	14
2.4.2. Propagación	14
2.4.3. Finalización	14
2.5. Uso de calorimetría de barrido diferencial en la determinación de estabilidad oxidativa de aceites	14
2.6. Los Antioxidantes	18
2.7. Compuestos fenólicos como antioxidantes	22
2.8. Interacción de antioxidantes	22
III. Materiales y métodos	25
3.1. Lugar de ejecución	25
3.2. Materiales y métodos	25
3.2.1. Materia prima	25
3.2.2. Reactivos	25
3.2.3. Materiales	25
3.2.4. Equipos	26
3.3. Métodos de análisis	26
3.4. Metodología experimental	30
3.4.1. Extracción de compuesto fenólico de Tara	30
3.4.2. Hidrólisis térmica de galotaninos de Tara	32
3.4.3. Diseño de mezclas antioxidantes	32
3.4.4. Pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C	33

IV.	Resultados y discusiones	34
4.1.	Hidrólisis de galotaninos de tara	34
4.2.	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	38
4.3.	Evaluación de la eficacia antioxidante de galotaninos hidrolizados en la estabilidad del aceite de sachá inchi	41
4.4.	Capacidad antioxidante de mezclas de extractos fenólicos	45
4.4.1.	Evaluación del efecto sinérgico de mezclas antioxidantes de extractos fenólicos de tara con PA, ácido cítrico y α -tocoferol	45
4.4.2.	Evaluación del efecto de la concentración del extracto hidrolizado de tara y del palmitato de ascorbilo sobre la eficacia antioxidante en el aceite de sachá inchi	46
4.5.	Pruebas de almacenamiento acelerado	49
4.5.5.	Contenido de tocoferoles	49
4.5.5.	Contenido de fitoesteroles	54
V.	Conclusiones	56
VI.	Recomendaciones	57
VII.	Referencias bibliográficas	58
VIII.	Anexos	65

Índice de cuadros

Cuadro	Pág.
1 Clasificación de compuestos fenólicos	4
2 Porcentaje de ácidos grasos de diferentes aceites vegetales.	10
3 <i>Tiempos</i> de inducción para diferentes aceites obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (CBD) a una temperatura de 120 °C.	18
4 Evolución del contenido de ácido gálico, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los galotaninos de tara hidrolizados a diferentes tiempos.	39
5 Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección del aceite de sacha inchi en presencia de extractos de tara de diferentes grados (tiempo de hidrólisis) a una concentración de 200 ppm.	43
6 Periodo de inducción, grado de protección y factor de estabilización del aceite de sacha inchi obtenidos en presencia de antioxidantes.	46
7 Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección determinados para el aceite de sacha inchi en presencia de mezclas de extractos hidrolizados de tara y palmitato de ascorbilo.	48
8 Variación en el contenido de tocoferoles en mg/100 g de aceite de sacha inchi durante las pruebas de almacenamiento acelerado.	51
9 Variación del contenido de fitosteroles en el aceite de sacha inchi sometidos a pruebas de almacenamiento acelerado.	54

Índice de figuras

Figura		Pág.
1	Estructura de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámicos.	5
2	Estructura general de una molécula de flavonoide.	7
3	Enlace característico en galotaninos (<i>meta</i> -depsídico) y estructura del pentagaloil glucosa.	8
4	Hidrólisis de ácido tánico.	9
5	Curva de oxidación obtenida mediante calorimetría de barrido diferencial del aceite de maíz. (A) Curva isotérmica a 130°C con nitrógeno (99.9%) y (B) curva isotérmica a 130°C con oxígeno (98.0%).	17
6	Estructura química de los tocoferoles.	20
7	Extracción, purificación parcial e hidrólisis de galotaninos presentes en extracto de tara (<i>Caesalpiniaspinosa</i>).	31
8	Evolución del contenido de ácido gálico libre (a) y grado de hidrólisis (b) durante el tratamiento de los extractos de tara a 121.1°C y 105 kPa.	35
9	Perfiles cromatográfico de extractos de tara con diferentes grados de hidrólisis.	37
10	Modelos de ajuste de la capacidad antioxidante de extractos hidrolizados de tara con diferentes tiempos de hidrólisis.	40
11	Termograma obtenido para el aceite de sachá inchi a 120 °C conteniendo diferentes antioxidantes.	41
12	Grado de protección del aceite de sachá inchi obtenida por efecto de la adición de extractos de tara hidrolizados.	44
13	Capacidad antioxidante específica de las mezclas de compuestos fenólicos.	53

Índice de Anexos

Anexo		Pág.
1	Curva estándar para la determinación de ácido gálico	65
2	Curva estándar para la determinación de fenólicos totales	65
3	Curva estándar para la determinación de capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	66
4	Curva estándar para la cuantificación de tocoferoles en el aceite de sachá inchi	66
5	Cromatograma correspondiente a los estándares de fitosteroles	67

Abreviación

AA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'-azinobis (2-amidinopropano)-dihidrocloruro
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido alfa linolénico
AG	Ácido gálico
AOAC	Association Of Analytical Communities
ASI	Aceite de sacha inchi
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CG	Cromatografía de gases
CBD	Calorimetría de barrido diferencial
DC	Dienos conjugados
DHA	Ácido docosahexanoico
EAG	Equivalente de ácido gálico
EROS	Especies reactivas del oxígeno
EPA	Ácido eicosapentanoico
EHT	Extracto hidrolizado de Tara
EFIM	Extracto fenólico de Inca Muña
EFM	Extracto fenólico de Mashua
ET	Equivalente Trolox
IP	Índice de peróxidos
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
GH	Grado de Hidrólisis
GP	Galato de propilo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
VPA	Valor <i>p</i> -anisidina
PI	Periodo de Inducción
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
SAR	Relación estructura – actividad
TH	Tiempo de Hidrólisis
TC	Trienos conjugados
TBHQ	Butil hidroxiquinona terciaria

RESUMEN

Los aceites vegetales con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a la oxidación, siendo necesaria la adición de antioxidantes sintéticos para su conservación. El objetivo fue diseñar un antioxidante de naturaleza fenólica que actúe eficientemente en la conservación del aceite de sachá inchi (ASI). Bajo estas consideraciones se estudió el efecto de la hidrólisis térmica de galotaninos de tara a 121.1°C y 105 KPa por 60, 120 y 180 minutos sobre la capacidad antioxidante *in vitro* (método ABT+). En etapas posteriores se evaluó la efectividad de mezclas antioxidantes conteniendo extractos hidrolizados de tara (EHT) con palmitato de ascorbilo (PA), ácido cítrico (AC) y α -Tocoferol (AT) empleando calorimetría de barrido diferencial (CBD) y pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C por 30 días para evaluar el efecto de las mezclas sobre la estabilidad de tocoferoles e fitoesteroles. Los resultados demuestran que el tratamiento térmico a 121.1°C y 105 KPa por 180 minutos permite obtener un grado de hidrólisis (GH) de 29.8%, con capacidad antioxidante *in vitro* de 941 μ mol Equivalente Trolox (ET)/ml. La efectividad antioxidante determinado por CBD en aceite de sachá inchi (ASI) demostró que la adición de 200 ppm de extracto hidrolizado de tara a 180 minutos permite obtener el máximo periodo de inducción (PI) de 68.58 minutos en relación al aceite de sachá inchi (sin adición de antioxidante) que fue de 57.45 minutos. El grado de protección del aceite de sachá inchi por el extracto hidrolizado de tara fue de 18.10% y 55.61% para la mezcla antioxidante (EHT+PA). Los resultados correspondientes a las mezclas binarias demostraron que existe un efecto sinérgico de 24% para la mezcla EHT+PA, efecto antagónico para la mezcla EHT+AT, y efecto aditivo para la mezcla EHT+AC. Las pruebas de almacenamiento acelerado muestran que la mezcla desarrollada (EHT+PA) presenta potencial antioxidante en el aceite de sachá inchi, permitiendo conservar los principales componentes activos del aceite de sachá inchi (γ - y δ -Tocoferol). Finalmente los galotaninos de tara presentan potencial uso en combinación con otros antioxidantes para la conservación de aceites ricos en ácidos grasos insaturados como el aceite de linaza, sachá inchi, entre otros.

PALABRAS CLAVES: *Caesalpinia espinosa*, hidrólisis térmica, mezclas antioxidantes, aceite de sachá inchi.

I. INTRODUCCIÓN

Los aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), son susceptibles a la oxidación. La oxidación lipídica de los aceites no sólo puede producir olores, sabores desagradables y decoloración, también puede disminuir la calidad y la seguridad nutricional debido a la degradación de ácidos grasos en acroleína y peróxidos, dando lugar a efectos perjudiciales en la salud humana (Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002). En la actualidad para superar los problemas de estabilidad de los aceites y grasas, tienen un uso extendido los antioxidantes sintéticos tales como el hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y ter-butil hidroquinona (TBHQ). Informes demuestran que estos compuestos pueden estar implicados en muchos riesgos de salud, incluyendo el cáncer y la carcinogénesis (Prior, 2004). Por lo tanto, hay una tendencia hacia el uso de antioxidantes naturales de origen vegetal para reemplazar a estos antioxidantes sintéticos.

Los antioxidantes naturales de naturaleza fenólica como los taninos hidrolizables (galotaninos) y taninos condensados (elagitaninos), flavonoides, entre otros, se encuentran en varios productos vegetales (frutas, hojas, semillas y aceites) y son conocidos por proteger componentes fácilmente oxidables (hidrofílicos y lipofílicos) de los constituyentes alimenticios (Jeong *et al.*, 2004). Así se ha reportado que taninos como el ácido tánico, galato de epigalocatequina y galotaninos poseen actividad antioxidante, así como actividades antimicrobianas y antivirales (Akiyama *et al.*, 2001; Chambi *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2014). Más aún, se indica que la hidrólisis de los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), producen compuestos derivados con mayores actividades antioxidantes y antimicrobianas que cuando se encuentran en su estado natural.

Dentro de este contexto encontramos las vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*), producto que es ampliamente conocido como fuente de hidrocoloides (gomas) y de taninos hidrolizables (del tipo galotaninos); recientemente se ha estudiado la hidrólisis de estos taninos via hidrólisis química obteniéndose ácido gálico, pirogalol y otros productos intermediarios (galotaninos de bajo peso molecular), los cuales presentaron elevadas actividades antioxidantes *in vitro* (Tian *et al.*, 2009, Chambi *et al.*, 2013).

Finalmente indicar que, es conocido que los antioxidantes pueden conservar y evitar la oxidación de las grasas y aceites, cuando son empleados bajo la forma de mezcla, respecto a cuándo son empleados independientemente, dado al efecto sinérgico o aditivo que se produce entre ellos; así como también podrían presentarse efectos antagonicos. Bajo las consideraciones mencionadas, en la presente investigación se propuso evaluar el efecto de la combinación de los extractos hidrolizados de tara con palmitato de ascorbilo, ácido cítrico y α -tocoferol, en la protección frente a la oxidación de un aceite altamente insaturado, como es el aceite de sachá inchi, en especial sobre sus constituyentes bioactivos: tocoferoles y fitoesteroles. Así los objetivos de la presente tesis fueron:

- Evaluar el proceso de hidrólisis térmica de los galotaninos de tara sobre la capacidad antioxidante *in vitro*, y sobre su eficacia antioxidante frente a la oxidación del aceite de sachá inchi.

- Diseñar mezclas antioxidante binarias empleando extracto hidrolizado de tara y antioxidantes como palmitato de ascorbilo, ácido cítrico y α -tocoferol, para alcanzar una mayor eficacia antioxidante que permita conservar al aceite de sachá inchi de la oxidación y de la degradación de sus compuestos bioactivos naturales propios como tocoferoles y fitoesteroles.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático y sus estructuras pueden variar desde una molécula fenólica sencilla hasta un polímero de alto peso molecular. Los compuestos fenólicos son característicos de las plantas y, como grupo se encuentran generalmente en forma de ésteres o glucósidos y no como compuestos libres, son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes (Vermerris y Nicholson, 2006; Balasundram *et al.*, 2006).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la estructura, en particular, el número y las posiciones de los grupos hidroxilo y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos (Balasundram *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos presentan una amplia gama de propiedades fisiológicas, tales como anti-alérgico, anti-inflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, anti-trombótico, cardioprotector y efecto vasodilatador (Hertog *et al.*, 1993; Parr y Botwell, 2000).

2.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo al Cuadro 1, de los cuales los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos son considerados como los principales compuestos fenólicos presentes en la dieta (King y Young, 1999). Los ácidos fenólicos se clasifican en dos subgrupos, los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (Figura 1). Los ácidos hidroxibenzoicos incluyen el ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico y siringico, que en común tienen la estructura C6-C1.

Los ácidos hidroxicinámicos, son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos (C6-C3) y son representantes los ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumarico y sinápico son los más comunes (Bravo, 1998).

Cuadro 1: Clasificación de compuestos fenólicos

Estructura	Clases
C6	Fenólicos simples
C6-C1	Ácidos fenólicos y compuestos relacionados
C6-C2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C6-C3	Ácido cinámico, cinamil aldehídos, cinamil alcoholes
C6-C3	Cumarinas, isocumarinas, cromones
C15	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C15	Flavanos
C15	Flavonas
C15	Flavanonas
C15	Flavanoles
C15	Antocianidinas
C30	Antocianinas
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenona, xantonas, estilbenos
C6, C10, C14	Quinonas
C18	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	Dímeros u oligómeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	Oligómeros o polímeros
Flobafenos	Polímeros

Fuente: Harborne, (1989); Harborne *et al.* (1999)

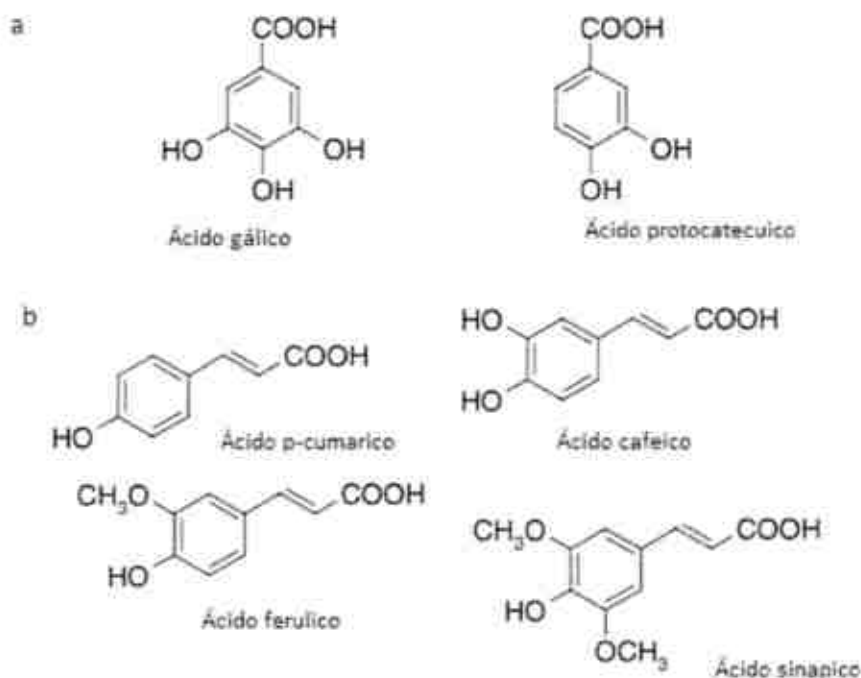


Figura 1: Estructura de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinámicos (b)

Fuente: Vermerris y Nicholson (2009)

Los flavonoides constituyen el mayor grupo de compuestos fenólicos en las plantas, lo que representa más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos naturales identificados (Harbone *et al.*, 1999). Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono (Figura 2), con la estructura general C6-C3-C6, los cuales pueden o no formar un tercer anillo (Cartaya y Reynaldo, 2001). El anillo A es derivado de la vía del acetato/malonato, mientras que el anillo B es derivado de la fenilalanina a través de la vía de shikimato (Bohm, 1998; Mermen y Beecher, 2000).

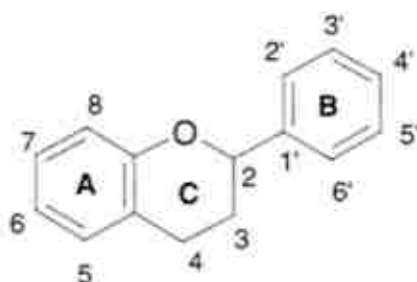


Figura 2. Estructura general de una molécula de flavonoide

Fuente: Vermerris y Nicholson (2010)

Las variaciones en los patrones de sustitución en el anillo C, resultan en las diferentes clases de flavonoides como los: flavonoides, flavonas, flavanonas, flavonoles (o catequinas), isoflavonas, flavanonoles, y antocianidinas (Hollman y Katan, 1999). La sustitución del anillo A y B dan lugar a los diferentes compuestos dentro de cada clase de los flavonoides. Estas sustituciones pueden incluir oxigenación, alquilación, glicosilación, acilación y sulfatación (Hollman y Katan, 1999).

Los taninos, compuestos de peso molecular relativamente alto, que constituyen el tercer grupo importante de compuestos fenólicos, pueden ser subdivididos en taninos hidrolizables y condensados. Los primeros son ésteres de ácido gálico (galo- y elagitaninos), mientras que el segundo (también conocido como proantocianidinas) son polímeros de los monómeros de los polyhydroxyflavan-3-ol (Porter, 1989).

2.1.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar a los radicales libres, átomos de hidrógeno o donar electrones, o quelar metales catiónicos (Amarowicz *et al.*, 2004). La estructura de los compuestos fenólicos es un determinante clave de su actividad de captación de radicales y quelación de metales, y esto se conoce como relaciones estructura-actividad (SAR). En el caso de los ácidos fenólicos, por ejemplo, la actividad antioxidante depende de los números y posiciones de los grupos hidroxilo en relación con el grupo funcional carboxilo (Rice-Evans *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999).

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos aumenta con el incremento del grado de hidroxilación, como es el caso del ácido gálico, que está trihidroxilado, lo que muestra una alta actividad antioxidante. Sin embargo, la sustitución de los grupos hidroxilo en la posición 3- y 5- con grupos metoxilo como el ácido siríngico reduce la actividad. Los ácidos hidroxicinámicos exhiben mayor actividad antioxidante en comparación con los ácidos hidroxibenzoicos (Andreasen *et al.*, 2001). La mayor actividad de los ácidos hidroxicinámicos podría ser debido al grupo $C=CH-COOH$ asociado al anillo fenólico que posee, lo que asegura una mayor capacidad de donar

hidrógenos y estabilizar radicales que el grupo -COOH presente en los ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans *et al.*, 1996).

2.2. LOS TANINOS

Los grupos importantes entre los taninos son los taninos hidrolizables y taninos condensables. Los taninos hidrolizables son ésteres de ácidos fenólicos tales como ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos) con un azúcar (generalmente glucosa) o un polialcohol (ácido quínico) (González *et al.*, 2010).

Los galotaninos presentan un núcleo de poliol (en referencia a un compuesto con múltiples grupos hidroxilo) sustituido con 10 a 12 residuos de ácido gálico (Figura 3). Presentan enlaces meta-depsídicos entre los residuos de ácido gálico, estos enlaces son más lábiles que un enlace éster alifático (Vermerris y Nicholson, 2009).

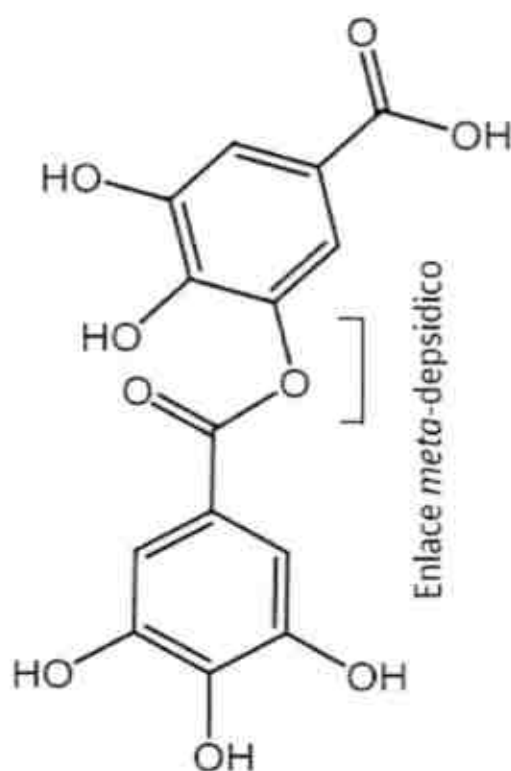
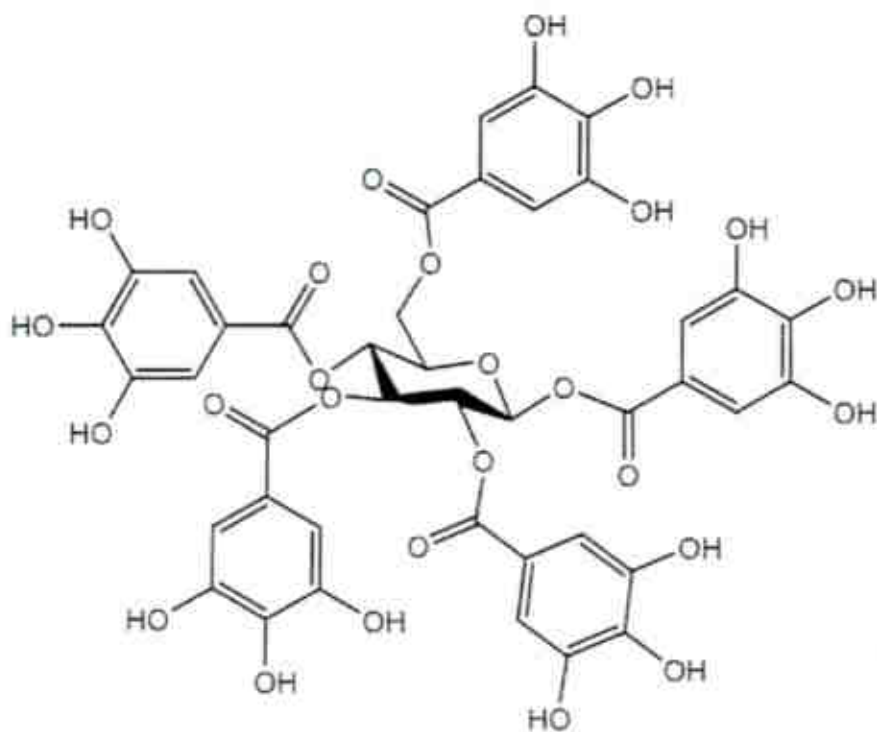


Figura 3. Enlace característico en galotaninos (*meta*-depsídico)

Fuente: González *et al.* (2010)



PGG: Penta Galoíl Glucosa
1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose

Figura 4. Estructura de un galotanino (pentagaloiil glucosa)

Fuente: González *et al.* (2010)

Los taninos hidrolizables han sido reportados por ser bacteriostáticos o bactericidas frente a *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Akiyama *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Estudios reportan también que el ácido tánico parcialmente procesado presenta una alta capacidad antioxidante y antimicrobiana, respecto a un ácido tánico no procesado (Kim *et al.*, 2010). En la Figura 5, se presenta a la hidrólisis del ácido tánico.

Los taninos condensados son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidinas condensadas. Al ser tratados con ácidos en caliente, se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos, llamados flobafenos o taninos rojos. Se pueden encontrar en maderas como el castaño, quebracho, entre otros (Alvarez y Lock, 1992).

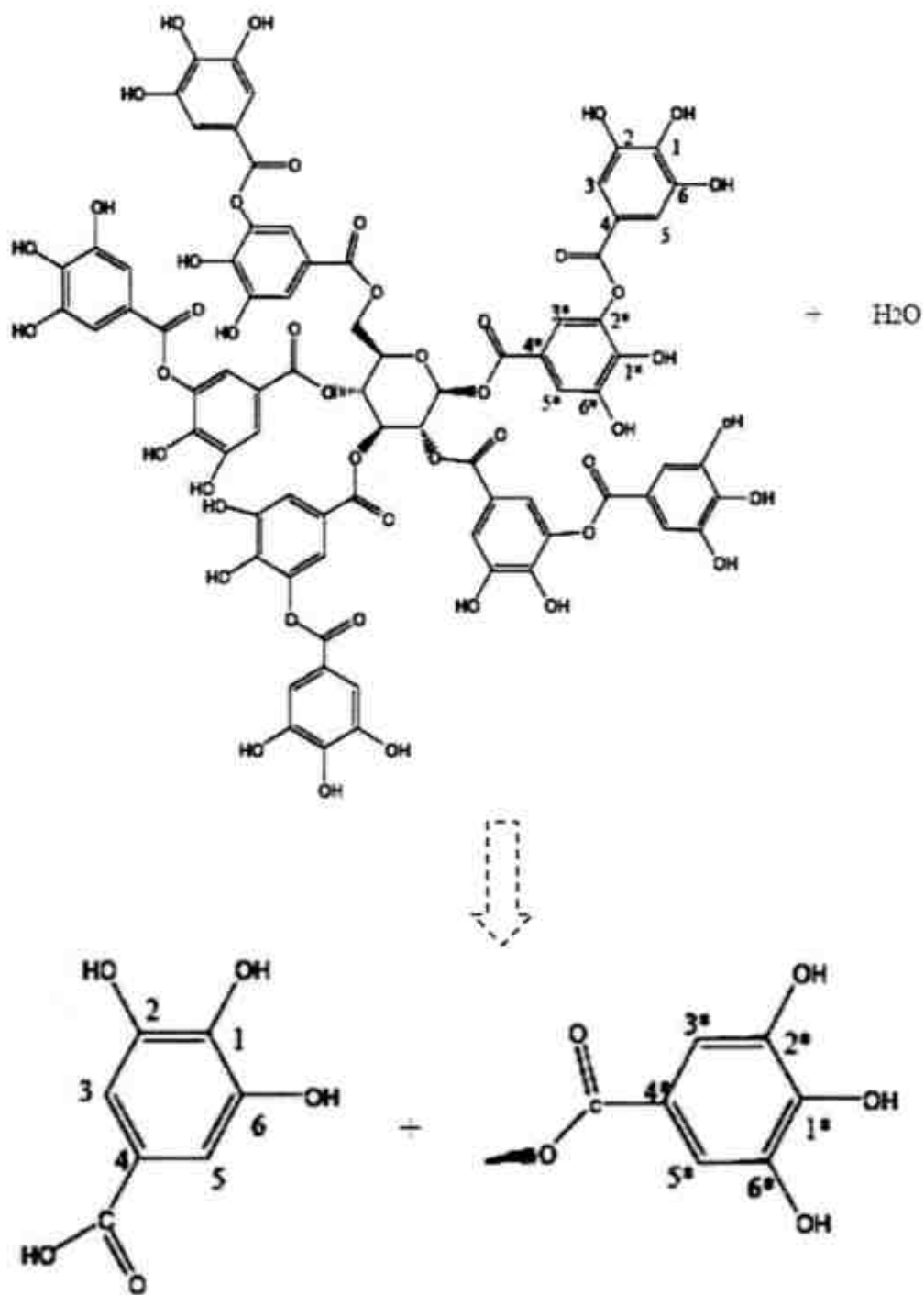


Figura 4. Hidrólisis de ácido tánico

Fuente: Kim *et al.* (2010)

Las vainas de tara son importantes fuentes de galotaninos hidrolizables, que, pueden ser hidrolizados mediante un tratamiento térmico en un medio ácido. Los galotaninos de la tara pueden ser hidrolizados a ácido gálico, empleando ácido sulfúrico 2 N y temperatura de 100 °C, alcanzándose una hidrólisis completa a las 20 horas, obteniéndose una concentración de ácido gálico liberado por hidrólisis de 18.8 mg EAG/ml (Chambi *et al.*, 2013). Existe una relación directa entre el incremento del ácido gálico liberado y la capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados, alcanzando un máximo valor de ~ 500 µmol ET/ml medidos mediante ensayos FRAP y ABTS⁺ a 8 horas de hidrólisis, mientras que mediante el ensayo ORAC obtuvieron ese valor a 4 horas de hidrólisis (Chambi *et al.*, 2013).

La extracción de los taninos de diversas fuentes depende mucho del tipo de solvente utilizado. Tian *et al.* (2009) determinaron que la actividad antioxidante o la capacidad de captación de radicales libres en extractos de la *Galla chinensis* depende del solvente utilizado y la actividad de los extractos obtenidos tuvieron el siguiente orden: acetato de etilo > éter de petróleo > etanol > agua.

2.3. ACEITE DE SACHA INCHI

El sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo), es una planta que es originaria de las selvas tropicales del Perú y crece a altitudes comprendidas entre los 200 y 1,500 m (Liu *et al.*, 2014).

Las semillas contienen aproximadamente, de 48 a 54% de aceite y ~ 27% de proteínas, los mismos que son ricos en cisteína, tirosina, treonina y triptófano (Follegatti-Romero *et al.*, 2009; Fanali *et al.*, 2011; Maurer *et al.*, 2012).

Los ácidos grasos del aceite de sacha inchi están principalmente constituidos por ácidos grasos insaturados en aproximadamente un 93%, siendo un 45.2% de ácido linolénico (ALA, 18:3 omega-3) y 36.8% de ácido linoleico (AL, 18:2 omega-6) (Follegatti-Romero *et al.*, 2009).

La ingesta dietaria óptima del ALA corresponde a 2 g/día o 0.6-1% de la ingesta total de energía (Follegatti-Romero *et al.*, 2009). Estos ácidos grasos poliinsaturados pueden ser alargados y desaturados en sus derivados de cadena más larga a ácidos araquidónico y eicosapentanoico (EPA, 20:5 omega-3) y a ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 omega-3). Varios estudios han sugerido fuertemente que estos ácidos grasos son importantes en relación a la patogénesis (y prevención) de enfermedades cardíaca coronarias y la hipertensión, además de mostrar un efecto hipocolesterolémico cuando se usan como suplementos alimenticios (Follegatti-Romero *et al.*, 2009). Una comparación entre el perfil de ácidos grasos encontrados en el aceite de sacha inchi y otros aceites vegetales se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje de ácidos grasos de diversos aceites vegetales

Aceite vegetal	Porcentaje de ácidos grasos (%)									
	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1
Aceite de palma*				5	36	2	50	8		
Aceite de girasol*					7	5	19	68		
Aceite de soya*					11	4	23	54	8	
Aceite de linaza*					6	2	19	24	47	
Aceite de canola*					4	2	60	21	10	1
Aceite de coco*	7	7	48	18	9	3	6	2		
Aceite de mani**					9	3	52	32		
Aceite de sacha inchi***					4	3	9	36	47	

Fuente: * Dyer *et al.* (2008); ** Ozcan (2010); *** Fanali *et al.* (2011).

Adicionalmente a la presencia de los ácidos grasos omegas, el sacha inchi presenta tocoferoles. Chirinos *et al.* (2013) reportaron la presencia de α -, β -, γ - y δ -tocoferol en 16 diferentes cultivares de sacha inchi, en rangos entre 1.13 - 1.27, 0.67 - 0.95, 56.8 - 81.4 y 29.2 - 54.6 mg/100 g de semilla, respectivamente. En estudios realizados por Fanali *et al.* (2011) se determinaron α -, γ -, δ -tocoferol, en concentraciones de 0.004, 1.257 y 0.869 g/Kg de aceite, respectivamente.

Se ha reportado que la actividad antioxidante evaluada *in vitro* disminuye en el siguiente orden γ - > δ - > β - > α -tocoferol (Fanali *et al.*, 2011). Desde un punto de vista nutricional, la absorción intestinal de γ -tocoferol es similar al de α -tocoferol y podría desempeñar un papel específico en efectos secundarios de prevención de algunos radicales como el peroxinitrilo (Hunter, 2001).

El aceite de sacha inchi, en su composición, también presenta fitosteroles, siendo los principales el campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Variaciones a nivel de cultivares en rangos entre 7.1 - 8.8, 21.2 - 25.8 y 45.4 - 53.2 mg/100 g de semilla, para el campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, han sido determinados respectivamente (Chirinos *et al.*, 2013).

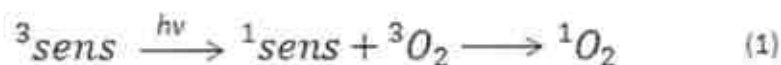
Frecuentemente, el aceite de sacha inchi es obtenido por prensado en frío y comercializado como aceite crudo. El prensado en frío permite recuperar parcialmente al aceite. De otro lado, la extracción por métodos convencionales, como la extracción con hexano, podría dar lugar a problemas de deterioro a los ácidos grasos poliinsaturados, a causa de las altas temperaturas empleadas en el procesamiento, así como también la rancidez oxidativa, la producción de malos olores y sabores. En consecuencia estos son factores críticos en el proceso de extracción (Follegatti-Romero *et al.*, 2009).

Estudios realizados para evaluar la estabilidad oxidativa del aceite de sacha inchi, a través de pruebas de almacenamiento acelerado en estufa a 65 °C con flujo de aire constante durante 20 días, determinaron que en el aceite de sacha inchi comercial los ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados no sufrieron ningún deterioro, manteniéndose en valores alrededor de 80, 10.6, 8.2 g/100 g de aceite, respectivamente y el valor peróxido alcanzó un valor de 104.6 meq O₂/kg de aceite a los 20 días de almacenamiento (Maurer *et al.*, 2012). Para el aceite de linaza, evaluado bajo las mismas condiciones descritas para el aceite de sacha inchi comercial, tampoco se encontró variaciones a nivel de sus ácidos grasos, pero el valor de peróxido incremento de 9.06 hasta 81.6 g/100 g de aceite al cabo de 20 días de almacenamiento.

2.4. MECANISMOS DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación de lípidos es un fenómeno complejo inducido por el oxígeno en presencia de iniciadores tales como el calor, los radicales libres, luz, pigmentos fotosensibilizantes e iones metálicos. Se produce a través de tres vías de reacción: (i) autooxidación no enzimática de la cadena mediada por los radicales libres, (ii) fotooxidación no enzimática y no radical, y (iii) oxidación enzimática. Los dos primeros tipos de oxidación consisten en una combinación de reacciones que involucran el oxígeno triplete 3O_2 , que podría ser considerado como un estado fundamental birradical $\bullet OO \bullet$, y el oxígeno singlete 1O_2 , que corresponde a un estado excitado de la molécula. El mecanismo de fotooxidación depende del tipo de fotosensibilizador.

En las reacciones de tipo II, un fotosensibilizador triplete (3sens , reacción (1) abajo presentada) absorbe fotones y se convierte en oxígeno singlete, y a partir de entonces la transmisión de su energía al oxígeno molecular, que a su vez se excita y forma oxígeno singlete que es alrededor de 1.500 veces más reactivo que el oxígeno triplete:



El oxígeno singlete formado a través de la reacción (1) es electrofílico y por lo tanto se puede unir directamente a los dobles enlaces C=C, dando lugar a la formación de hidroperóxidos. Sin embargo esto, llamado foto-oxidación no radical, parece ser una reacción menor en comparación a la inducida por 3O_2 en la autooxidación en cadena de los radicales. Así, se ha sugerido que la foto-oxidación genera principalmente hidroperóxidos que se descomponen en radicales libres que podrían iniciar reacciones de auto-oxidación. Por lo tanto, la autooxidación parece ser un mecanismo clave en la oxidación de los lípidos. Se genera principalmente hidroperóxidos y compuestos volátiles, generalmente a través de un proceso de tres fases (iniciación, propagación y terminación) (Laguerre *et al.*, 2007).

2.4.1. INICIACIÓN

La fase de iniciación implica la descomposición homolítica del hidrógeno en una posición relativa α al doble enlace de la cadena del ácido graso poliinsaturado. Es poco probable que la reacción (2) (abajo presentada) se produzca de forma espontánea con $^3\text{O}_2$ debido a la muy alta energía de activación que surge de la barrera de giro entre los lípidos y $^3\text{O}_2$.



La reacción puede, sin embargo, ser iniciada a través de los agentes físicos externos, tales como calor, radiación ionizante o un impacto fotónico en el espectro ultravioleta y también por agentes químicos tales como iones metálicos, radicales libres y metaloproteínas (reacción (3) abajo indicada), a través de un mecanismo aún controversial. De hecho, la etapa de iniciación de la auto-oxidación es difícil de definir debido a la baja concentración de los radicales y la probabilidad de que haya más de un proceso.



Esto resulta en la formación de radicales libres (L_1), es decir, especies químicas con un electrón desapareado. Estos son productos intermedios altamente inestables, de corta vida que estabilizan abstrayendo un hidrógeno de otras especies químicas. El proceso de oxidación sigue siendo lento durante esta fase. Al final del periodo de iniciación, la oxidación se acelera de repente, el consumo de oxígeno se hace alto y el contenido de peróxido aumenta sustancialmente. La oxidación de lípidos se inicia principalmente por radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) e hidroperoxilo ($\text{HOO}\bullet$), así como radicales alcoxilo ($\text{LO}\bullet$) y peroxilo ($\text{LOO}\bullet$) de lípidos. Los radicales hidroxilos tienen velocidades de reacción más alta que los de lípidos.

2.4.2. PROPAGACIÓN

En ambientes aeróbicos, el radical L_1 centrada en la molécula de carbono y formado durante la fase de iniciación reacciona muy rápidamente con el oxígeno triplete para generar diferentes especies de radicales, incluyendo peróxiradicales ($\text{LiOO}\bullet$) (reacción (4) abajo).



Reacción (4) tiene muy baja energía de activación y una alta tasa constante, por lo que la concentración $LiOO\dot{O}$ se convierte en mucho más alto que el contenido de Li en todos los sistemas de soporte de oxígeno (Gordon, 1990). El peroxiradical entonces sustrae un átomo de hidrógeno de otra molécula de lípido insaturado para formar hidroperóxido (compuesto de oxidación primaria) y otro radical (reacción (5) abajo), por lo tanto la reposición de la reacción (4).



Por tanto, esta llamada reacción en cadena de radicales 'auto-sostenida' se propaga a una velocidad alta, como se muestra claramente por un marcado aumento en la cinética de la formación de hidroperóxidos. Esta es una reacción irreversible alcanzando un máximo rápidamente. Se ha calculado que alrededor de 25 moléculas de ácidos grasos se oxidan durante la fase de propagación después de la oxidación iniciada por radicales (Barclay, 1981). Muchos isómeros de hidroperóxido se forman de este modo durante esta fase. La formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados generalmente se acompaña de una estabilización del estado del radical a través de reordenamiento del doble enlace (deslocalización electrónica), lo que da lugar a dienos y trienos conjugados.

2.4.3. FINALIZACIÓN

El proceso de oxidación continúa con la transformación de hidroperóxidos en compuestos no radicales de la oxidación secundaria. El principal mecanismo de la descomposición del hidroperóxido, implica la escisión del doble enlace adyacente al grupo hidroperoxilo, que conduce a la formación de hidrocarburos, aldehidos, alcoholes y cetonas volátiles.

Otros compuestos secundarios no volátiles también se forman, incluyendo aldehidos no volátiles, triglicéridos oxidados y sus polímeros. La descomposición de compuestos de oxidación primarios es un mecanismo complejo en el que un solo

hidroperóxido puede generar varios tipos de moléculas volátiles o no volátiles. El tipo de subproductos obtenidos después de la oxidación de ácidos grasos es determinado por la composición de hidroperóxido y por el tipo de escisión de dobles enlaces en la cadena de ácido graso. La reacción puede entonces también terminará después de la formación de polímeros (Laguerre *et al.*, 2007).

2.5. USO DE CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL EN LA DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES

La aplicación del análisis térmico, para ensayos acelerados de estabilidad de aceite, han sido estudiadas por Cruz (1970) y Hassel (1976), quienes utilizaron la calorimetría diferencial de barrido diferencial (CBD) a modos isotérmicos con una purga de oxígeno, para medir la estabilidad de los aceites. El punto final de CBD fue tomada en el momento en que se produjo una reacción exotérmica rápida del aceite y oxígeno.

Las técnicas de CBD tienen el potencial para ser utilizado como un método no químico para determinar los parámetros de calidad del aceite. La CBD proporciona una única información de perfil de energía, que mide específicamente las temperaturas y los flujos de calor asociados con las transiciones materiales como cristalización, fusión y evaporación, o con reacciones químicas como la hidrólisis y oxidación, como una función del tiempo y la temperatura (Jiménez *et al.* 2003; Chiavaro *et al.* 2008).

El proceso de autooxidación de los lípidos es un proceso de tipo exotérmico, en el que el calor de reacción generado puede ser medido en función de la temperatura y del tiempo.

Las altas correlaciones encontradas (Chiavaro *et al.*, 2008), entre los valores del tiempo de inducción (T_0) ofrecidas por el CBD y las mediciones de estabilidad oxidativa, indican que es un método objetivo apropiado evaluar la estabilidad a condiciones de oxidación de aceites comestibles de diferente composición química y a diferentes temperaturas de mantenimiento. Un ejemplo de la determinación del T_0 se aprecia en la Figura 5.

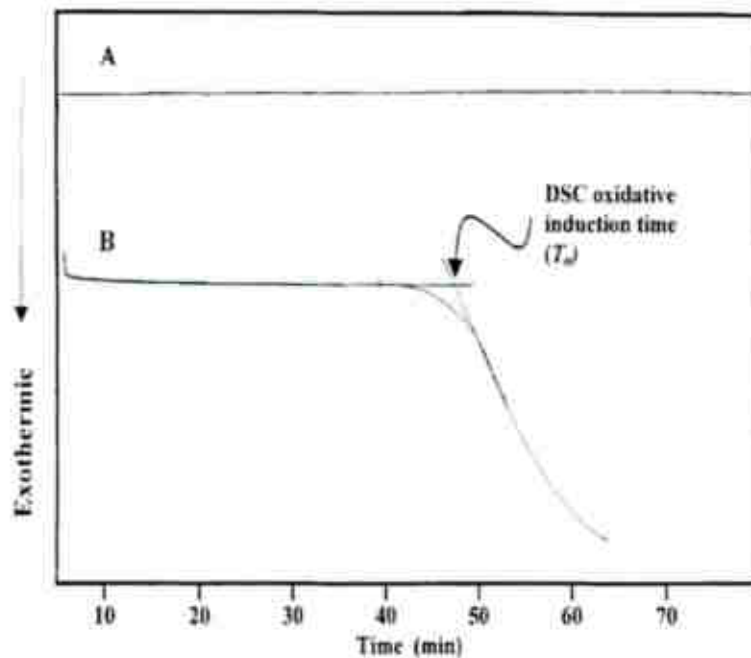


Figura 5. Curva de oxidación obtenida mediante calorimetría de barrido diferencial para el aceite de maíz. (A) Curva isotérmica a 130 °C con nitrógeno (99.999%) y (B) Curva isotérmica a 130 °C con oxígeno (99.8%)

Fuente: Tan *et al.* (2002)

Generalmente, los aceites comestibles con mayor grado de insaturación son más susceptibles a la oxidación de lípidos. Por lo tanto, aceite de pepas de uva, de soja, cártamo o girasol (índice de yodo > 130 g de I₂/100 g de aceite) mostraron significativamente ($p < 0.05$) bajos tiempos de inducción que el aceite de coco, oleína de palma refinado-blanqueado-decolorado. Algunos aceites como el aceite de ajonjolí rico en ácidos grasos insaturados presentan tiempos de inducción mayores que aceites con menores contenidos de ácidos grasos insaturados, esto posiblemente a la presencia de antioxidantes endógenos (Chiavaro *et al.*, 2008). En el Cuadro 3 se muestran algunos tiempos de inducción medidos por el CBD obtenidos para diferentes tipos de aceites.

Cuadro 3. Tiempos de inducción para diferentes aceites obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido a la temperatura de 120 °C

Aceite	Periodos de inducción (minutos)
Maiz	83.57
Oliva	51.00
Mani	67.36
Soya	65.55
Girasol	70.50

Fuente: Tan *et al.* (2002)

2.6. LOS ANTIOXIDANTES

Los aceites comestibles naturales tienen en su composición antioxidante como los: tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, compuestos fenólicos y esteroides. Cuando se carece de ellos a veces son adicionados para darle una mejor estabilidad oxidativa al aceite. Los antioxidantes son sustancias que bloquean la etapa de iniciación en la oxidación, minimizan la velocidad de oxidación, inactivan los radicales libres, controlan los metales de transición, eliminan al oxígeno singlete (O_2), inactivan la sensibilidad a la luz.

Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno al radical libre y convertirlo en un producto no radical más estable. Pueden clasificarse de acuerdo con su mecanismo de acción como antioxidante primario y antioxidante secundario. Hay antioxidantes que exhiben más de un mecanismo de acción y se conocen como antioxidantes múltiples.

Antioxidantes primarios conocidos también como tipo I, o antioxidante de rompimiento de cadena, son aceptores de radicales libres por lo tanto inhiben la etapa de iniciación o interrumpen la etapa de propagación en la autooxidación, reducen o retardan el ataque de las especies reactivas el oxígeno (EROS) sobre el sustrato, usualmente interrumpiendo la segunda etapa de la cadena de propagación, atrapando los radicales libres con centros de oxígeno (Wright *et al.*, 2001); los antioxidantes fenólicos transfieren un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo ($ROO\cdot$), convirtiéndolos en hidroperóxidos.

Los antioxidantes primarios son mono o polihidroxifenoles con varios sustituyentes en los anillos. La sustitución con grupos donadores de electrones en posición *orto* y *para* con respecto al grupo hidroxilo del fenol, aumenta la actividad antioxidante del compuesto; por efecto inductivo, los más comunes y de mayor uso en la industria alimentaria son los de carácter sintético como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propil galato (GP) y terbutilhidroxiquinona (TBHQ) (Duran y Borja, 1993). Sin embargo, algunos componentes naturales de los alimentos también actúan como antioxidantes primarios y comúnmente se añaden a los alimentos o están presentes, entre ellos tenemos los tocoferoles y los carotenoides; difieren de los antioxidantes sintéticos por su mecanismo de acción (Duran y Borja, 1993).

Los antioxidantes sintéticos se usan industrialmente como aditivos; específicamente retrasan o previenen los procesos oxidativos que causan el deterioro de los alimentos; para su utilización debe tenerse en cuenta su estabilidad y volatilidad y, en resumen su capacidad para resistir los tratamientos térmicos de los alimentos y permanecer ejerciendo su acción protectora en el producto terminado. Estos antioxidantes se usan en proporción máxima de 0.2 g/Kg, en conjunto, cuando se usan mezclas sinérgicas, sin que ningún componente pase de 0.1 g/Kg (Primo, 1998).

La vitamina E también pertenece al grupo de antioxidantes primarios y solubles en lípidos. La actividad biológica de la vitamina E se exhibe a los tocoferoles y tocotrienoles, especialmente α -tocoferol. La reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la donación de átomo de hidrógeno, donde se forma un radical tocoferoxilo (Lampi *et al.*, 2002). La vitamina E muestra efectos protectores contra la enfermedad coronaria del corazón debido a la inhibición de la oxidación de LDL (Stampfer y Rimm, 1995).

Los tocoferoles compiten con las aceites insaturados por los radicales peroxil lipídicos. Estos radicales reaccionan con los tocoferoles mucho más rápido, que con los lípidos. Una molécula de tocoferol puede proteger alrededor de 10^3 a 10^8 moléculas de ácidos grasos poli-insaturados. Los tocoferoles pueden transferir el átomo de hidrógeno del grupo 6-hidroxil en su anillo cromano al radical peroxil lipídico, y extraer el radical peroxilo. Los tocoferoles donan hidrógeno al radical peroxil lipídico y producen hidroperóxido lipídico (ROOH) y radicales tocoferoxil.

La efectividad de los tocoferoles como antioxidante, depende de los isómeros y la concentración del tocoferol. La Figura 6 muestra las estructuras de los tocoferoles (Choe y Min, 2006).

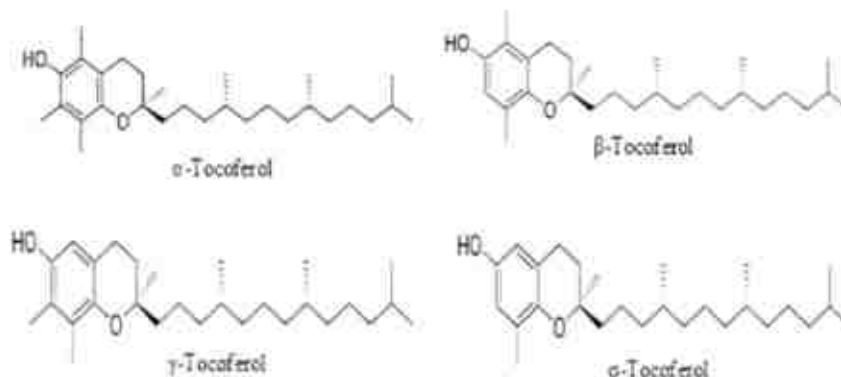


Figura 6: Estructura química de los tocoferoles

Fuente: Kamal-Eldin y Lars (1996)

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son de color amarillo, de color naranja, y pigmentos rojos presentes en muchas frutas y verduras. Varios de ellos son precursores de la vitamina A (β -caroteno, γ -caroteno y β -criptoxantina), y debido a los dobles enlaces conjugados son ambos captadores de radicales y extintores de oxígeno singlete (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Antioxidantes secundarios conocidos como preventivos o del tipo 2, actúan a través de varios mecanismos posibles, ellos no convierten el radical libre en un producto más estable. El antioxidante secundario puede quelar el metal pro-oxidante y desactivarlo, además de que entrega hidrógeno al hidroperóxido sin que se forme una especie radical, desactiva el oxígeno singlete, absorbe la radiación ultravioleta, o actúa como un eliminador de oxígeno. Estos antioxidantes causan un efecto sinérgico porque activan a los antioxidantes del tipo I. Los más conocidos son el ácido cítrico, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, lecitina y ácido tartárico (Akoh, 2008).

La vitamina C, que incluye ácido ascórbico y su ácido dehidroascórbico producto de la oxidación, tiene muchas actividades biológicas en el cuerpo humano. Se ha encontrado que la vitamina C puede reducir los niveles de la Proteína C-Reactiva, un marcador de inflamación y, posiblemente, un predictor de enfermedades del corazón (Block *et al.*, 2004).

Más del 85% de la vitamina C en la dieta humana se suministra por las frutas y verduras. La función biológica del ácido L-ascórbico se puede definir como un cofactor enzimático, un eliminador de radicales, y como donante / aceptor en el transporte de electrones en la membrana plasmática. El ácido ascórbico es capaz de eliminar el radical superóxido e hidroxilo, así como regenerar la α -tocoferol (Davey *et al.*, 2000; citado por Podsedek, 2007).

El palmitato de ascorbilo presenta una actividad potencial donando hidrógenos, lo que le permite actuar como un antioxidante rompiendo la cadena oxidativa. Puede actuar como un antioxidante independiente atrapando radicales libres, pero también puede regenerar tocoferoles de radicales tocoferilo producidos durante la oxidación (Let *et al.*, 2007).

Marinova y Yanishlieva (1992) señalan que el efecto antioxidante de palmitato de ascorbilo (PA) en lípidos que contienen tocoferol es debido a la regeneración de la molécula de tocoferol (In_1H) por el palmitato de ascorbilo (In_2H) de acuerdo con la reacción:



Al ser un inhibidor eficiente, el tocoferol es el primero en interactuar con el radical peróxido. El radical tocoferilo (In_1^*) formado es relativamente activo y participa en varias reacciones secundarias que conducen a la propagación de la cadena, debido a que la velocidad de oxidación inhibida por α -tocoferol es relativamente alta.

En presencia del palmitato de ascorbilo, el producto de la reacción (i), conlleva a asumir que los radicales tocoferilo son sustituidos por radicales de baja actividad del palmitato de ascorbilo, como resultado ello conlleva a una disminución en la velocidad de oxidación.

Los principales mecanismos antioxidantes necesarios para proteger los sistemas de alimentación de la oxidación son la captación de radicales, la quelación de metales, y la eliminación de oxígeno. Algunos antioxidantes son capaces de contribuir más de un modo de acción. Además, la polaridad y la solubilidad de un antioxidante, permite determinar la ubicación real del antioxidante en una matriz de alimento dado, que a su

vez influye en la eficacia antioxidante del antioxidante. En general, hay muchos factores que complican la predicción de la eficacia antioxidante en sistemas reales de los alimentos (Frankel, 2005). Se han propuesto varios mecanismos de acción para el palmitato de ascorbilo y ácido ascórbico, estos incluyen bloqueo del oxígeno singlete, quelación de metales, así como potencial captación de radicales libres, que, además permite la regeneración de tocoferoles oxidados (Jacobsen *et al.*, 2001).

2.7. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes pueden prevenir o disminuir el proceso de oxidación causado por los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ERO) en alimentos y sistemas biológicos (Heo *et al.*, 2007). Los fenólicos, son metabolitos secundarios de las plantas y muestras. Varias propiedades biológicas, tales como efecto antioxidante, antiproliferativo, antibacterial, anti-inflamatorio y antialérgico (Park *et al.*, 2001; Liu, 2003; Kim y Kim, 2006).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que juegan un rol importante en la absorción y neutralización de radicales libres, quelando al oxígeno singlete y triplete o descomponiendo peróxidos (Zheng y Wang, 2001).

La efectividad de los antioxidantes está relacionada a su energía de activación, constante de velocidad, potencial oxido-reducción, facilidad con que algunos antioxidantes se pierden o destruyen (Brewer, 2011).

2.8. INTERACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Compuestos antioxidantes pueden actuar en conjunto para reducir niveles de especies reactivas del oxígeno de manera más eficaz que los mismos antioxidantes individualmente, ya que pueden funcionar como agentes sinérgicos. Además, una mezcla que contiene antioxidantes tanto solubles en agua y solubles en lípidos es capaz de eliminar los radicales libres en las dos fases acuosas y de lípidos (Chen y Tappel, 1996; citado por Podsędek, 2007).

La capacidad antioxidante de frutas, vegetales y otros productos procesados es atribuida a los compuestos antioxidantes presentes en ellos y que pueden propiciar tres diferentes tipos de interacción: efecto sinérgico, sinergismo negativo (antagonismo) y efecto aditivo.

La combinación de antioxidantes puede aumentar su eficacia. Se ha propuesto que los aceptores de radicales libres mezclados implican dos antioxidantes: uno que reacciona con el radical peróxido y una segunda que regenera al primero. Antioxidantes fenólicos y el ácido ascórbico (AA) parecen actuar sinérgicamente de la siguiente manera (Brewer, 2011).



Algunos compuestos ácidos, tales como AA y ácido cítrico, pueden ejercer un efecto sinérgico cuando son adicionados junto a antioxidantes polifenólicos. Estos sinergistas forman un complejo radical antioxidante sinergista (A:S) tal que ni el radical antioxidante (A*) ni el radical sinergista (S*) pueden catalizar reacciones de oxidación. Esta asociación química suprime la capacidad del radical antioxidante para ayudar en la descomposición de peróxidos lipídicos (Aurand y Woods, 1979). La adición de antocianinas puede prevenir la oxidación del ácido ascórbico por iones metálicos tales como el cobre. Las antocianinas no solamente quelan iones metálicos, sino también forman un complejo ácido ascórbico (copigmento-metal-antocianina) que pueden ser la base para esta actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2005).

Trabajos donde se evaluaron la interacción de diferentes tipos de antioxidantes, se exponen a continuación. Un incremento sinérgico de capacidad antioxidante ha sido reportada entre la vitamina C y E (Moison *et al.*, 2002). Heo *et al.* (2007) evaluaron el efecto interacción de mezclas binarias de compuestos fenólicos. La adición de ácido clorogénico a la cianidina, peonidina 3-glucósido, quercetina y quercetina 3-galactósido mostraron una disminución en la capacidad antioxidante comparado a la sumatoria de la capacidad antioxidante. También, Knez y Bauman (2000) evaluaron la actividad antioxidante de cuatro antioxidantes naturales: extracto de rosemary, α -tocoferol,

palmitato de ascorbilo y ácido cítrico; la actividad antioxidante la evaluaron mediante la formación del valor peróxido y *p*-anisidina en aceite de girasol almacenado a 60 °C. Evaluaron también el efecto sinérgico de α -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico con el extracto de rosemary, en mezclas binarias. El extracto de rosemary retardó la formación de hidroperóxidos significativamente, alcanzando después de 11 días un valor peróxido de 120 meq/Kg, respecto al control (200 meq/Kg). También, reportaron que el α -tocoferol mostró un efecto pro-oxidativo. Cuando fueron evaluadas mezclas de extracto de rosemary con α -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico a 60 °C, la velocidad de oxidación fue reducida por las tres mezclas de antioxidantes evaluados. Los valores peróxidos de muestras de aceite de girasol con adición de extracto de romero + ácido cítrico, extracto de rosemary + palmitato de ascorbilo, fueron menores que los obtenidos para la muestra con adición de extracto de rosemary.

La actividad antioxidante de combinaciones de extractos de plantas y antioxidantes primarios y ácido cítrico, fueron evaluados en manteca de cerdo almacenados a 75 °C (Banias *et al.*, 1992). Se emplearon extractos metanólicos de orégano, tomillo, mejorana, dittany, romero y salvia. Estos extractos metanólicos cuando fueron combinados con BHT, BHA o palmitato de ascorbilo, mostraron un efecto antioxidante aditivo; mientras que cuando los extractos cuando fueron combinados con galato de propilo no incrementaron el periodo de inducción obtenidos por los antioxidantes fenólicos. Se observó un efecto sinérgico negativo cuando los extractos fueron combinados con DL- α -tocoferol; mientras que el ácido cítrico mostró mayor efecto sinérgico con el extracto de mejorana y un menor efecto sinérgico con extracto de tomillo y un efecto negativo con los otros extractos fenólicos. Finalmente, mezclas ternarias de los extractos fenólicos con ácido cítrico y palmitato de ascorbilo, presentaron una baja actividad que la correspondiente a combinaciones binarias, a excepción de la mezcla con el extracto de mejorana.

De otro lado, Lee *et al.* (2005) encontraron que las combinaciones de quelantes (tripolifosfato de sodio o citrato de sodio) con reductores (eritorbato), y/o eliminadores de radicales libres (BHA y extracto de romero) eran antioxidantes efectivos. La combinación de romero y eritorbato fue más efectiva para retardar la oxidación en la carne molida. La combinación de romero/citrato/eritorbato fue más efectiva en estabilizar el color y retardar la oxidación lipídica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se desarrolló en el Instituto de Biotecnología (IBT) - Área de Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIA PRIMA

Se utilizó vainas de tara molidas y liofilizadas, con tamaño de partícula inferior a 1 mm. Las muestras fueron almacenadas a -20°C en bolsas de polietileno de alta densidad y bajo oscuridad, hasta el momento de su uso.

Aceite de sacha inchi crudo, fue utilizado para el presente estudio. El aceite fue obtenido por prensado en frío a partir de las semillas de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), previamente tostados a 100°C y pelados.

3.2.2. REACTIVOS

ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Ácido gálico, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid), reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, BHT, metanol grado HPLC 99,8%, etanol 95%, nitrógeno gaseoso, oxígeno (Praxair), α -Tocoferol, Palmitato de Ascorbilo, Ácido Cítrico, fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, tiosulfato de sodio y ácido acético glacial, fueron adquiridos de Merck. El cloroformo de Fermont y el almidón soluble de J. T. Baker.

3.2.3. MATERIALES

Balones de 250 y 500 ml, matraces de 250 ml, pipetas de 1 y 5 ml, vasos de precipitados de 50, 100 ml, microbureta de 5 ml y bureta de 25 ml, probetas de 25, 50, 100 ml, tubos de ensayo de 5, 10 y 15 ml, peras de decantación de 500 ml, frascos color ámbar de 30 ml, fiolas de 5, 25, 100 ml, micropipetas de 5-50 μ l (Hirschmann Laborgerate); 50-250 μ l (Brand), 5 – 20 μ l (Gilson); 5 – 50 μ l (Wheaton), gradillas, cronometro, soporte universal, papel aluminio y otros necesarios para los análisis.

3.2.4. EQUIPOS

Calorimetro de barrido diferencial (Perkin Elmer PYRYS IV), concentrador centrifugo al vacio (tipo speed-vac) (LABCONCO), centrifuga (Heltich Zentrifugen), equipo de ultrasonido (Ultrasonic Cleaners 2510 Branson), espectrofotómetro UV-VIS (Genesys 20), agitador magnético (Ceramic midi Polimax 2010, Ika), rotavapor (Laborota 4000, Heidolph), potenciómetro (410 Aplus Termo, Orion), balanza analítica (Ohaus Adventurer), HPLC-DAD ((Waters, Milford, MA), cromatógrafo de gases incluye detector FID (Shimadzu), autoclave (Beltes Scientific), liofilizador (Labconco).

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

a. Determinación de ácido gálico y galotaninos: Se determinaron de acuerdo al método reportado por Inoue y Hagerman (1988). Para ello se tomaron 1 ml de extracto hidrolizado de tara, al cual se le añadió 1.5 ml de rodhanina 0.667% (en MeOH), transcurrido un tiempo de 5 minutos se adicionó 1 ml de KOH (0.5 N), posteriormente se añadió agua destilada hasta completar 25 ml. El periodo de reposo fue de 5-10 minutos. El blanco se corrió sustituyendo el extracto hidrolizado de tara por agua destilada. La lectura se realizó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a 520 nm. El análisis fue desarrollado bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente.

El contenido de ácido gálico fue calculado a partir de una curva estándar, utilizando como estándar al ácido gálico (Anexo 1). Los resultados para ambos análisis fueron reportados como mg de ácido gálico equivalente (AGE)/ml o mg AGE/100 g muestra en base seca (b.s).

El contenido de galotaninos fue calculado como la diferencia del contenido de ácido gálico antes y después de una hidrólisis química completa y expresado como mg EAG/ml o 100 g de muestra (b.s). El grado de hidrólisis de los galotaninos (GH) en los extractos de tara sometidos a tratamiento térmico se determinó de acuerdo a la ecuación reportada por Chambi *et al.* (2013).

$$GH (\%) = \frac{AG_{EH} - AG_{IN}}{AG_{HC} - AG_{IN}} \times 100\%$$

- GH (%): Grado de hidrólisis de galotaninos de tara
AG_{EH}: Contenido de ácido gálico en los extractos hidrolizados de tara
AG_{IN}: Contenido de ácido gálico en extractos iniciales (sin hidrolizar) de tara
AG_{HC}: Contenido de ácido gálico en los extractos de tara, después de una hidrólisis química completa.

b. Contenido de compuestos fenólicos: Se determinaron de acuerdo al método de Singleton y Rossi (1965). Brevemente se procedió de la siguiente forma, a 500 µl de muestra (extractos) se le adicionaron 250 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y 1,250 µl de carbonato de sodio (75 g/l). Los tubos fueron agitados en un vortex y se dejaron en reposo por 30 minutos bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro UV-VIS a 755 nm. Se trabajó un blanco utilizando agua destilada en lugar de muestra bajo el mismo procedimiento descrito.

El contenido de compuestos fenólicos fue calculado a partir de una curva estándar utilizando como estándar al ácido gálico (Anexo 2). Los resultados fueron expresados como mg AGE/ml o 100 g de muestra (b.s).

c. Capacidad antioxidante *in vitro*: Se determinó mediante la metodología ABT+ descrito por Campos *et al.* (2006).

Para el análisis de capacidad antioxidante ABTS, se procedió a reaccionar 150 μ l de extracto fenólico con 2,850 μ l del radical ABTS^{•+}. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 90 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción se realizaron las lecturas de absorbancias a 734 nm. Se corrió un blanco utilizando agua destilada, bajo el mismo procedimiento descrito. Los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados en μ mol de trolox equivalente (TE)/ml a partir de una curva estándar utilizando como estándar al trolox (Anexo 2).

d. Determinación de la estabilidad oxidativa por calorimetría de barrido diferencial: Por medio de esta técnica se determinó el periodo de inducción haciendo uso de un calorímetro de barrido diferencial (CBD) (Pyris 6), siguiendo la metodología reportada por Chirinos *et al.* (2011).

Se procedió de la siguiente forma, se pesaron 5.00 ± 0.01 miligramos de aceite de sacha inchi en una cubeta de aluminio y fue colocado en la cámara del CBD. La temperatura isotérmica fue programado a 120 °C y se inyectó oxígeno puro al 99.8% sobre la muestra a un flujo de 35 ml/minuto.

El tiempo de inicio de la reacción de oxidación, denominado periodo de inducción (PI), correspondió estrechamente a la intersección de la línea base extrapolada y la línea tangente (borde principal) de la función exotérmica (Tan *et al.*, 2002). Los resultados expresados en minutos fueron directamente obtenidos del CBD. Adicionalmente, se corrió un control negativo (aceite sin antioxidante) y un control positivo (aceite con adición de 200 ppm de BHT).

A partir de los resultados obtenidos del periodo de inducción se calcularon los factores de estabilización (Farhoosh *et al.*, 2007) y los grados de protección (Lampi *et al.*, 1999) del aceite de sacha inchi por efecto de la adición de extractos fenólicos y otros antioxidantes, de la forma como está descrita en las siguientes expresiones matemáticas.

$$\text{factor de estabilización} = \frac{PI_{\text{tnA}}}{PI_0}$$

$$\text{Grado de protección} = \frac{PI_{inh} - PI_e}{PI_e} \times 100\%$$

Dónde: PI_{inh} es el periodo de inducción obtenido en presencia de un inhibidor (antioxidante) y PI_e es el periodo de inducción obtenido en un sistema no inhibido (sin antioxidantes).

e. Análisis de fitosteroles: El análisis de fitosteroles fue realizado mediante cromatografía de gases, siguiendo el método reportado por Chirinos *et al.* (2013). En resumen, se procedió a saponificar 100 mg de muestras de aceite con 1 ml de una solución etanólica de KOH a 60 °C por 1.5 horas, previamente se añadió 1 ml de estándar interno (1 ml de β -colestanol, 0.02 mg/ml). La fracción insaponificable fue separada utilizando una partición líquido-líquido con la adición de 1 ml de agua destilada y 5 ml de n-heptano. La fase orgánica fue transferida a un tubo conteniendo Na_2SO_4 y la extracción fue completada con la adición de 5 y 4 ml de n-heptano, progresivamente. Los extractos de n-heptano fueron combinados y homogenizados para su posterior concentración a 1 ml de volumen. Posteriormente el homogenizado fue inyectado al cromatógrafo de gases.

Los fitosteroles fueron separados por la inyección de 2 μ l del extracto en el cromatógrafo de gases GC-2010 plus Shimadzu equipado con un detector de ionización de flama (FID-2010) y un auto inyector (AOC-20i). La columna utilizada fue una Supelco SACTM-5 (0.2 μ m, 30m x 0.25 mm DI). La temperatura del horno fue programado como sigue: inicialmente a 250 °C (por 2 minutos), se incrementó a 285 °C a 25 °C/minutos, un periodo isotérmico a 285 °C por 32 minutos. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron a 300 °C. El helio fue utilizado como gas portador. Los fitosteroles fueron identificados y comparados con los tiempos de retención de los estándares conocidos previamente inyectados.

Las curvas estándares de los diferentes fitosteroles fueron determinados utilizando un rango de concentraciones de 5-100 mg/l (Anexo 6). Los resultados fueron expresados en mg/100 g de aceite.

f. **Análisis de tocoferoles:** La composición de tocoferoles fue determinado por HPLC, siguiendo la metodología reportada por Chirinos *et al.* (2013). Se procedió pesando 50.00 ± 0.05 mg de cada muestra del aceite de sacha inchi en fioles de 5 ml y posteriormente fueron aforados con hexano (grado HPLC), luego filtrados a través de un filtro Millipore de $0.22 \mu\text{m}$, previo a su inyección en el HPLC. Los tocoferoles fueron separados usando una columna HPLC en fase normal (4.0×2.0 mm), en un módulo de separación Waters 2695 equipado con un autoinyector y un detector de multifuorescencia (Waters 2475) y el software Empower.

La fase móvil estuvo compuesta de n-hexano/2-propanol/ácido acético (1000:6:5, v/v/v). La elución se desarrolló a una velocidad de flujo del solvente de 1.4 ml/min bajo un programa isocrático. Se inyectó 10 μl de muestra. Los eluidos fueron monitoreados con el detector de fluorescencia, programado a la longitud de onda de excitación y emisión de 290 y 330 nm, respectivamente. Los tocoferoles fueron identificados y cuantificados por comparación con los tiempos de retención de estándares conocidos previamente inyectados.

Las curvas estándar para los diferentes tocoferoles fueron construidas dentro del rango de concentraciones de 3-60 mg/L (Anexo 4). Los resultados fueron expresados como mg de tocoferoles/100 g de aceite.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente investigación se dividió en tres etapas, para lo cual previamente se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos de la tara (galotaninos); en la primera etapa se llevó a cabo la optimización de la hidrólisis de los galotaninos de la tara en función a la capacidad antioxidante *in vitro* y mediante pruebas de evaluación de la efectividad del antioxidante utilizando el CBD (Calorimetria de Barrido Diferencial) en aceite de sacha inchi, en la segunda etapa se optimizó la mezcla de antioxidantes en función de la capacidad antioxidante y mediante la evaluación de la eficacia del antioxidante empleando CBD en aceite de sacha inhchi y finalmente en la tercera etapa se evaluó la eficacia del antioxidante optimizado en el aceite de sacha inchi mediante pruebas de almacenamiento acelerado a 55°C por 30 días.

3.4.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los extractos fenólicos (galotaninos) de tara se obtuvieron siguiendo la metodología optimizada por Bravo (2010). Se emplearon dos etapas adicionales que involucró la purificación de los extractos en columnas Sep-Pak® C₁₈, para eliminar algunos componentes indeseables (sustancias hidrofílicas diferentes a los compuestos fenólicos). El protocolo seguido se expone en la Figura 7.

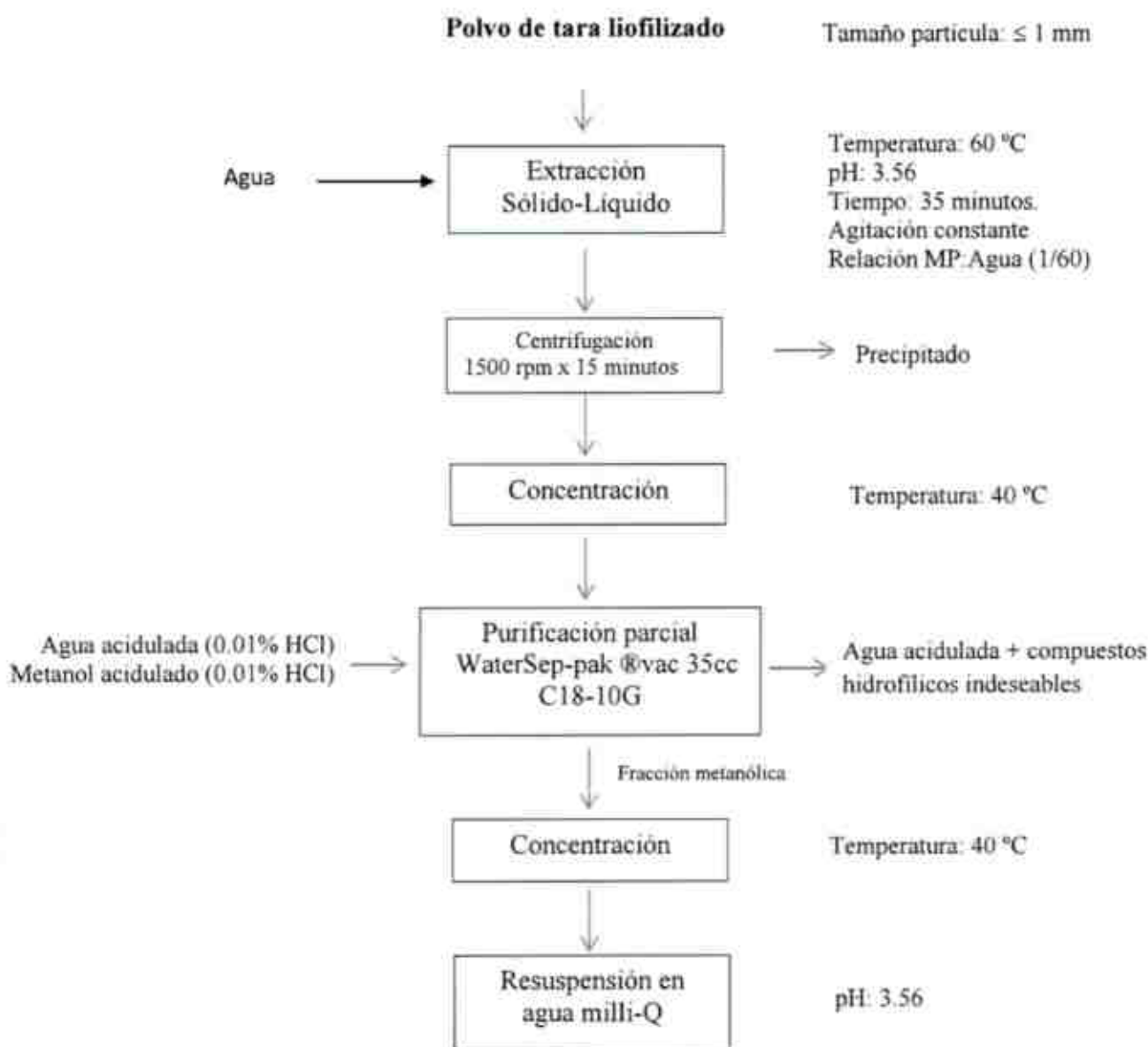


Figura 7: Extracción, purificación e hidrólisis de galotaninos presentes en el extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*)

3.4.2. HIDROLISIS TÉRMICA DE LOS GALOTANINOS DE TARA

Los extractos fenólicos de tara purificados fueron hidrolizados a $121.1 \pm 1^\circ\text{C}$ y 105 KPa de presión en un autoclave con vapor por 60, 120 y 180 minutos; para cada tiempo establecido se determinó el grado de hidrólisis (%) alcanzado, y el contenido en ácido gálico mediante HPLC-DAD.

3.4.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS HIDROLIZADOS

Los extractos hidrolizados de tara por diferentes tiempo también fueron analizados respecto a su actividad antioxidante *in vitro* (ABTS+), y la eficacia antioxidante de los extractos hidrolizados contra la oxidación del aceite de sachá inchi empleando calorimetría de barrido diferencial CBD a 120°C .

3.4.4. DISEÑO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES

Se diseñó mezclas de antioxidantes en función a su capacidad antioxidante. Se estableció una mezcla antioxidante de la combinación de extracto fenólico de tara con los antioxidantes como ácido cítrico, palmitato de ascorbilo y α -tocoferol; considerando los periodos de inducción evaluados sobre el aceite de sachá inchi haciendo usos de la calorimetría de barrido diferencial (CBD). Para ello se procedió a mezclar 200 ppm del extracto hidrolizado de tara (180 minutos a $121.1 \pm 1^\circ\text{C}$ y 105 KPa) con 100 ppm de ácido cítrico (T200 + AC100); 200 ppm del extracto hidrolizado de tara con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (T200 + AP100), 200 ppm del extracto hidrolizado de tara con 100 ppm de α -tocoferol (T200 + α -T100).

Adicionalmente se determinó los periodos de inducción de antioxidantes (palmitato de ascorbilo, ácido cítrico e α -tocoferol) independientemente a una concentración de 100 ppm sobre el aceite de sachá inchi. Los periodos de inducción fueron comparados con el periodo de inducción obtenido para la muestra control (sin adición de antioxidante). Los resultados fueron expresados en minutos y a partir de estos fueron calculados los factores de estabilización y grados de protección.

Finalmente, en función a los resultados se procedió a realizar mezclas binarias, utilizando los extractos hidrolizado de tara a concentraciones de 200 ppm, 300 ppm y 400 ppm con palmitato de ascorbilo a dosis de 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm y 100 ppm, evaluándose los periodos de inducción determinados por CBD empleando al aceite de sachá inchi. Los resultados fueron comparados con el control (sin antioxidante).

3.4.5. PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO

Las pruebas de almacenamiento acelerado fueron realizadas a 55°C por 30 días. Se evaluó la estabilidad del aceite de sachá inchi en presencia de antioxidantes como palmitato de ascorbilo (100 ppm), BHT (200 ppm), extracto hidrolizado de tara (400 ppm), mezcla del extracto hidrolizado de tara con palmitato de ascorbilo (400 ppm + 100 ppm), los cuales fueron comparados con el control (aceite de sachá inchi sin adición de antioxidante). Los aceites de sachá inchi, previamente mezclados y homogenizados con los respectivos antioxidantes, fueron almacenados por 30 días a 55 °C, bajo distribución homogénea de flujo de aire en la estufa.

Se procedieron a retirar muestras de aceite almacenados a 55 °C cada 5 días y fueron almacenados en congelación para sus posteriores análisis respectivos. Se evaluaron como variables de respuesta el contenido de tocoferoles y fitoesteroles.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. HIDRÓLISIS TÉRMICA DE LOS GALOTANINOS DE TARA

En la Figura 8 se muestra el incremento en el contenido de ácido gálico en los extractos de tara y el grado de hidrólisis alcanzado de los galotaninos para diferentes tiempos estudiados. El ácido gálico libre determinado en el extracto no hidrolizado de tara fue 1.50 mg AGE/ml, equivalente a 2.13 g AGE/100 g b.s de tara, estos resultados son acorde a los reportados por Garro *et al.* (1997) y Chambi *et al.* (2013) quienes determinaron un contenido de ácido gálico libre entre 1.50 a 2.6 mg AGE/ml. Además durante la hidrólisis de los galotaninos de la tara se observó que el grado de hidrólisis y la producción de ácido gálico aumentó con el tiempo, obteniéndose a los 180 minutos un máximo contenido de ácido gálico de 12.30 mg AGE/ml que correspondió a un grado de hidrólisis de 29.8%.

Los bajos niveles de hidrólisis alcanzados en nuestro estudio se deben a que las condiciones establecidas de temperatura y presión fueron insuficientes para romper los enlaces depsídicos y éster alifáticos de la estructura de los galotaninos, que según estudios reportados por Kim *et al.* (2011) se consigue una hidrólisis completa (100%) de ácido tánico en ácido gálico a temperatura de 150 °C y una completa conversión en pirogalol a 200 °C.

Comparando nuestros resultados con procesos que involucran tratamientos químicos catalizados por una base o un ácido (Lu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010), son relativamente bajos y requieren de condiciones de temperatura y presión más severas para lograr una alta conversión de galotaninos de tara en ácido gálico; sin embargo el proceso empleado en nuestro estudio presenta una ventaja al no generar residuos peligrosos que contaminen el medio ambiente y el producto final obtenido. Los tiempos empleados en nuestro estudio también fueron menores a los empleados para procesos de hidrólisis químico de galotaninos de diferentes fuentes por Ossipov *et al.* (1997), Inoue y Hagerman (1998), Chambi *et al.* (2013); por lo tanto, el grado de hidrólisis de los diferentes galotaninos es dependiente de la estructura, fuente vegetal de donde provienen y del método de hidrólisis empleado.

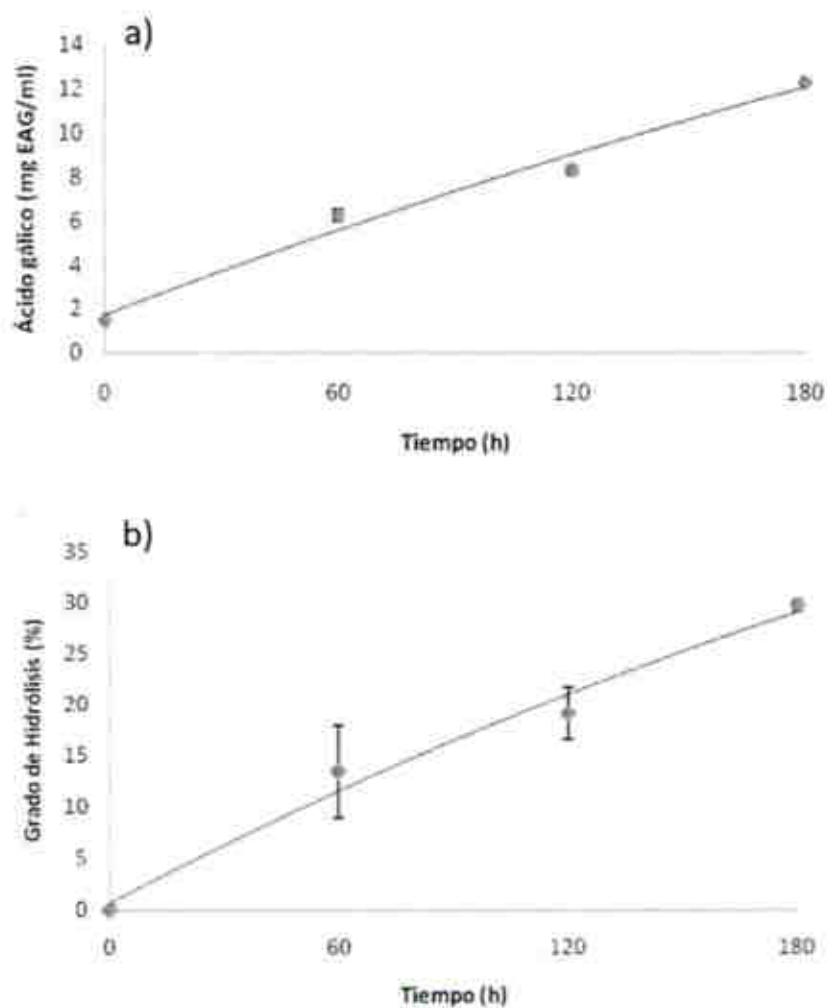


Figura 8: Evolución del contenido de ácido gálico libre (a) y grado de hidrólisis (b) durante el tratamiento de hidrólisis de los extractos de tara

El contenido de ácido gálico (AG) obtenido a diferentes tiempos de hidrólisis térmica (TH), fue ajustado a un modelo polinomial de segundo orden, encontrándose la siguiente ecuación ($AG \text{ (mg EAG/ml)} = -6E-05*TH^2 + 0.067*TH + 1.699$; $R^2 = 0.981$), del mismo modo el grado de hidrólisis (GH) también fue ajustado a un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación respecto al tiempo de hidrólisis ($GH(\%) = -0.0001*TH^2 + 0.193*TH + 0.63$; $R^2 = 0.982$).

En la Figura 9 se presenta los cromatogramas obtenidos para extracto no hidrolizado y extractos con grados de hidrólisis de 13.2%, 18.7% y 29.8%. En el cromatograma correspondiente al extracto no hidrolizado se observa diversos picos, siendo los más representativos los picos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 13 y de acuerdo a su espectro de absorción corresponderían a galotaninos de diferentes pesos moleculares. Los cromatogramas con grados de hidrólisis de 13.2, 18.7 y 29.8%, corresponden a los extractos de tara hidrolizados por tiempos de 60, 120 y 180 minutos, respectivamente, donde se observan la aparición de los picos 16 y 17 y el incremento del área de los picos 2, 3 y 4; así mismo se nota una disminución en el área de los picos 5, 7, 8, 9, 10 y 13.

Comparando los cromatogramas obtenidos se observa un incremento en la concentración de ácido gálico (pico 16) a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis. Estos resultados son similares a los encontrados por Chambi *et al.* (2013) sobre la hidrólisis química (ácido sulfúrico 2N a 100 °C) de los galotaninos de la tara, donde se encontró un incremento del ácido gálico a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis. Los mismos autores, también observaron en los cromatogramas obtenidos para los extractos de tara no hidrolizados, la presencia de varios picos que correspondían a los galotaninos de la tara mas no se encontró la presencia de ácido gálico, mientras que a un tiempo de hidrólisis de 4 horas (38.8% de hidrólisis) observaron la aparición de ácido gálico y a las 20 horas de hidrólisis (100% de grado de hidrólisis) sólo encontraron ácido gálico en el extracto.

El cromatograma obtenido en nuestro estudio es acorde a lo reportado por González *et al.* (2010), quienes sostienen que los galotaninos de *Hamamelis virginiana* al ser sometidos a un proceso hidrólisis a 100 °C por 6 minutos presentan modificaciones significativas en su perfil cromatográfico, produciéndose una disminución en galotaninos de alto grado de galoilación (mayores a 6) y

consecuentemente un incremento en galotaninos de bajos grados de galoilación y ácido gálico. Además, los mismo autores mencionan que un tratamiento térmico a 100 °C por 120 minutos, producen efectos más severos a nivel estructural, dando lugar a una extensa hidrólisis de los galotaninos los que son transformados de moléculas de 6-10 unidades de galoil a galotaninos con tres a cinco unidades de galoil.

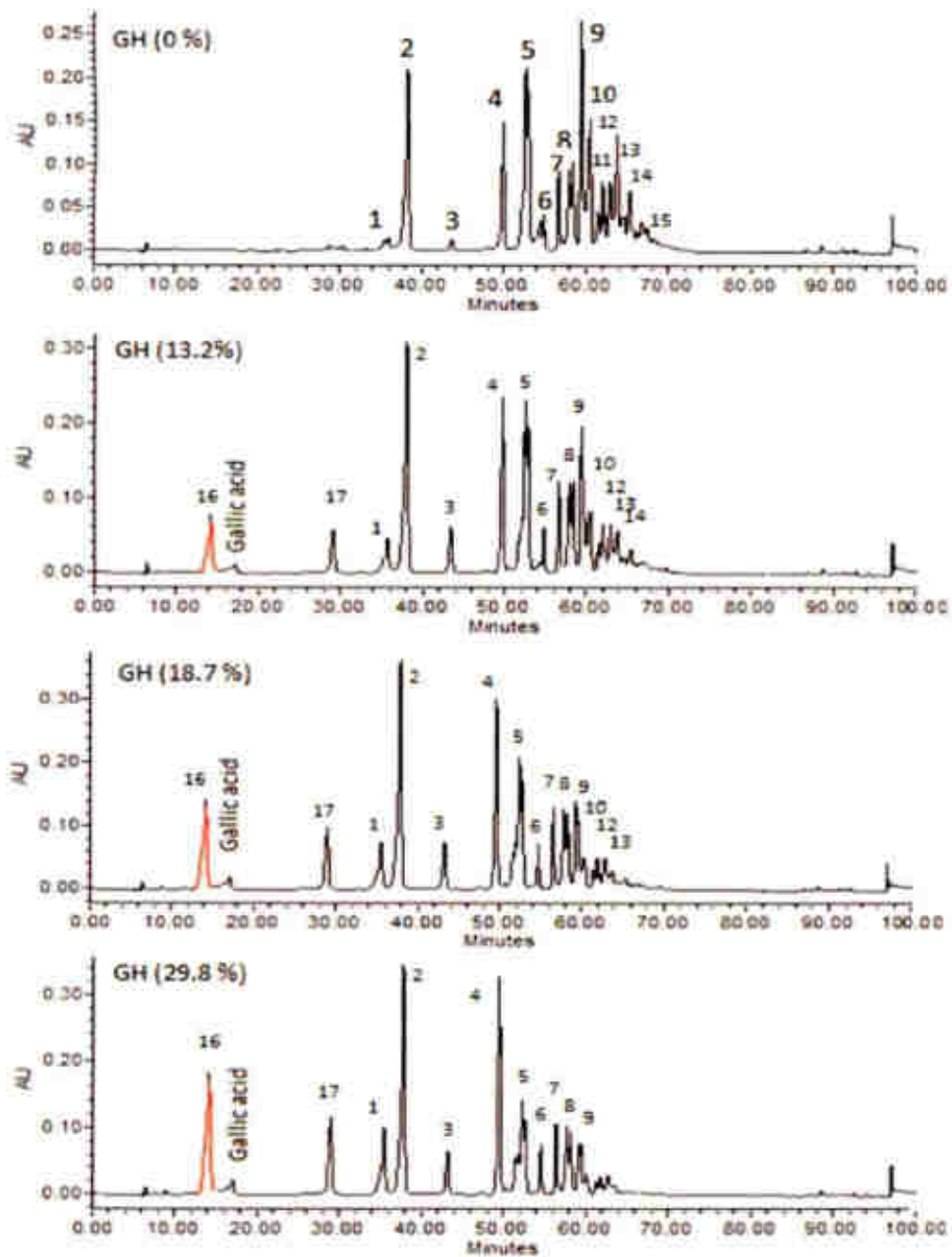


Figura 9: Perfiles cromatográfico de extractos de tara con diferentes grados de hidrólisis (GH).

Por lo tanto se puede mencionar que el tratamiento térmico evaluado demostró ser efectivo en la hidrólisis de algunos galotaninos, pero fue insuficiente para hidrolizar la totalidad de galotaninos a ácido gálico. Las limitaciones para una hidrólisis completa pueden ser explicadas por temperaturas y tiempos de hidrólisis insuficientes para romper los enlaces estéricos que son más difíciles de romper que los enlaces depsídicos (Mueller-Harvey, 2001), así bajo estas condiciones se estaría liberando en mayor cantidad una mezcla de galotaninos (penta-, tetra-, y tri-galoil glucosa) de bajo peso molecular.

4.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro*

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante "*in vitro*" de los extractos de tara sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis se muestran en el Cuadro 4. La capacidad antioxidante *in vitro* se incrementó durante el proceso de hidrólisis térmica (121.1 °C y 105 kPa), alcanzando un máximo valor de ~ 941 µmol TE/ml mediante ABTS+. La capacidad antioxidante específica también se incrementó, donde los valores más altos se obtuvieron a los 180 minutos de hidrólisis, siendo estos de 26.5, 26.5 µmol TE/mg AGE, por el método ABTS+. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores como Pyla *et al.* (2010); Kim *et al.* (2010) y Chambi *et al.* (2013), todos ellos sostienen que la hidrólisis de los galotaninos de tara favorece un incremento en la actividad biológica (antimicrobiana y antioxidante).

El incremento en la capacidad antioxidante en los extractos hidrolizados de tara, pueden explicarse por la naturaleza de los taninos de la tara. En los taninos hidrolizables con un grupo poliol (compuestos con múltiples grupos hidroxilos) sustituido con 10 a 12 residuos de ácido gálico, las uniones se dan través enlaces *meta*-depsídicos entre residuos de ácido gálico, estas uniones son más lábiles que el enlace éster alifático entre el poliol céntrico y la molécula de ácido gálico (Vermerris-Nicholson, 2009; Mueller-Harvey, 2001). Por lo tanto estos enlaces depsídicos involucran un grupo funcional hidroxilo, que al hidrolizarse queda libre para atrapar radicales libres, esto permitió incrementar la capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados de tara.

Cuadro 4: Evolución del contenido de ácido gálico, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los galotaninos de tara hidrolizados a diferentes tiempos*

Tiempo (minutos)	Ácido gálico (mg EAG/ml)	Fenólicos totales (mg EAG/ml)	Ácido gálico/fenoles totales (%)	Capacidad antioxidante ABTS ⁺ (μmol TE/ml)	Capacidad antioxidante específica ABTS ⁺ (μmol TE/mg AGE)
0	1.46 ± 0.01 ^a	35.20 ± 0.46 ^a	4.17 ± 0.06 ^a	575.73 ± 13.85 ^a	16.37 ± 0.21 ^a
60	6.27 ± 0.27 ^b	34.66 ± 0.27 ^a	18.10 ± 0.87 ^b	808.40 ± 17.52 ^b	23.30 ± 0.66 ^b
120	8.29 ± 0.20 ^c	34.20 ± 0.47 ^a	24.23 ± 0.90 ^c	850.39 ± 22.41 ^c	24.87 ± 0.35 ^c
180	12.30 ± 0.02 ^d	35.46 ± 0.08 ^a	34.70 ± 0.00 ^d	941.07 ± 21.50 ^d	26.50 ± 0.61 ^d

*Resultados: promedio de tres repeticiones ± SD. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas, prueba de Duncan ($P < 0.05$).

Los altos niveles de capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados de tara también pueden ser explicados posiblemente a la presencia de galotaninos conteniendo entre 8 a 10 unidades galoil, seguido de galotaninos hepta-, hexa-, penta-, tri-, tetra-, mono-, y di-galoil glucopiranosos producidos durante el tratamiento térmico, esto se ve reforzado por los estudios realizados por Tian *et al.* (2009) quienes reportaron diferentes capacidades antioxidantes para los galotaninos fraccionados de la *Galla chinensis*.

En la Figura 10 se muestra el modelo de ajuste de la capacidad antioxidante de los extractos hidrolizados a 121.1 °C en función de los tiempos de hidrólisis (TH). Se ajustó los resultados a modelo polinomial de segundo orden. El coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue 0.96, obteniéndose el siguiente modelo: $ABTS = -0.009*TH^2 + 3.687*TH + 587.7$, este modelo nos permite determinar la capacidad antioxidante alcanzada a un determinado tiempo de hidrólisis térmica, dentro de los tiempos evaluados (0-180 minutos).

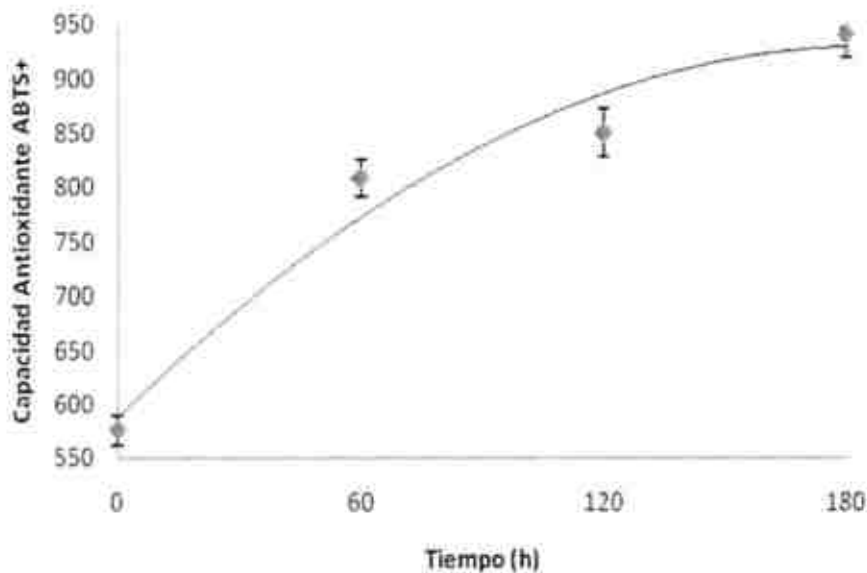
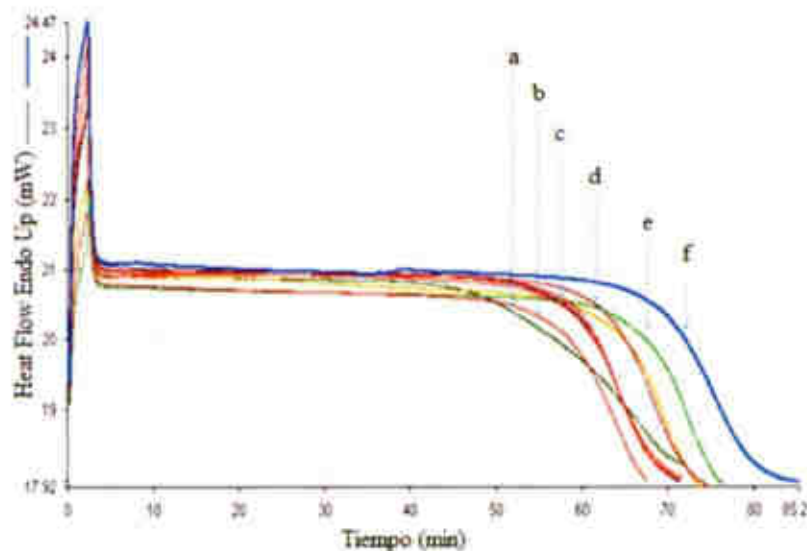


Figura 10: Modelo de ajuste de capacidad antioxidante de extractos hidrolizados de tara con diferentes tiempos de hidrólisis.

4.3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIOXIDANTE DE LOS GALOTANINOS DE TARA HIDROLIZADOS POR DIFERENTES TIEMPOS EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE SACHA INCHI

En el Cuadro 5 se presenta los resultados obtenidos de la evaluación de la eficacia antioxidante de los galotaninos de tara hidrolizados por diferentes tiempos a 121.1 °C sobre la estabilidad oxidativa del aceite de sacha inchi y los respectivos termogramas obtenidos por CBD a 120 °C, se presentan en la Figura 11. De los resultados obtenidos se puede notar que el periodo de inducción (PI) aumenta significativamente ($p < 0.05$) a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis (TH). Resultados similares fueron observados para los valores de factor de estabilización (FS) ($p < 0.05$). Los Valores de PI para todos los extractos hidrolizados de tara aplicados en el aceite de sacha inchi fueron mayores que los obtenidos para el aceite de sacha inchi sin antioxidante (control negativo) y con aceite de sacha inchi con BHT (200 ppm) (control positivo). Se alcanzó un PI máximo de 68.58 minutos para el extracto hidrolizado de tara sometido a la hidrólisis térmica de 180 minutos, alcanzándose a esta misma condición la máxima protección del aceite de sacha inchi (18.10%).



(a) BHT (200 ppm), (b) control (sin antioxidante), (c) extracto de tara no hidrolizado, (d) extracto de tara hidrolizado por 60 min, (e) extracto de tara hidrolizado de tara por 120 min, (f) extracto de tara hidrolizado por 180 min.

Figura 11: Termograma obtenido para el aceite de sacha inchi a 120 °C conteniendo extractos hidrolizados de tara por diferentes tiempos.

Los resultados concuerdan con lo mencionado por Kim *et al.* (2010) quienes encontraron que el ácido tánico tratado térmicamente, incrementó la estabilidad oxidativa del aceite de soya, ello debido al ácido gálico liberado luego de la hidrólisis y a los grupos hidroxilo formados sobre los grupos galoil como resultado de la hidrólisis térmica.

Cuadro 5: Periodos de inducción y grado de protección del aceite de sachá inchi en presencia de extractos de tara con diferentes grados de hidrólisis a concentración de 200 ppm.

Tiempo de Hidrolisis (minutos)	Grado de hidrólisis (%)	Periodo de Inducción (minutos)	Grado de Protección (%)
0	0.00 ± 0.00a	57.45 ± 0.49 a	1.47 ± 0.49 a
60	13.19 ± 0.82b	62.82 ± 0.07 b	10.30 ± 0.10 b
120	18.73 ± 0.61c	64.59 ± 0.28 c	13.43 ± 0.50 c
180	29.76 ± 0.21d	68.58 ± 0.54 d	18.10 ± 0.53 d
Control negativo (aceite sin antioxidante)	-	56.93 ± 0.06 a	-
BHT (control positivo)	-	55.82 ± 0.27 a	-

Resultados promedio de tres repeticiones ± SD. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan.

En la Figura 12 se observa el grado de protección del aceite de sachá inchi obtenido por adición de los extractos hidrolizados por diferentes tiempos. Donde el grado de protección (GP) del aceite de sachá inchi respecto al tiempo de hidrólisis (TH) de los galotaninos de tara se ajustó a una ecuación polinomial ($GP (\%) = -0,0001 \cdot TH^2 + 0,140 \cdot TH + 1,832$; $R^2 = 0,982$). Al respecto, los resultados indican que la adición de los extractos hidrolizados de tara (a 200 ppm) incrementa el grado de protección hasta en un 18.1 % respecto al control (sin antioxidante) y al BHT (200 ppm). El máximo grado de protección se debería posiblemente a la alta concentración de galotaninos compuestos de 5 a 9 unidades galoil, obtenidos mediante la hidrólisis térmica; mientras que los bajos niveles de protección obtenidos con la adición de extractos hidrolizados por 15 y 30 minutos se deberían a la presencia de galotaninos con 10 a 12 unidades galoil. Cuando los extractos de tara son hidrolizados por periodos prolongados, posiblemente también se obtenga bajos niveles de protección debido a una alta hidrólisis y consecuentemente alta concentración de galotaninos con 1 a 4 unidades galoil, esto acorde a estudios reportados por Tian *et al* (2009).

Finalmente los diferentes grados de protección obtenidos por adición de extractos hidrolizados de tara fueron comparados mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia del 95%, encontrándose diferencias significativas entre todos los tratamientos.

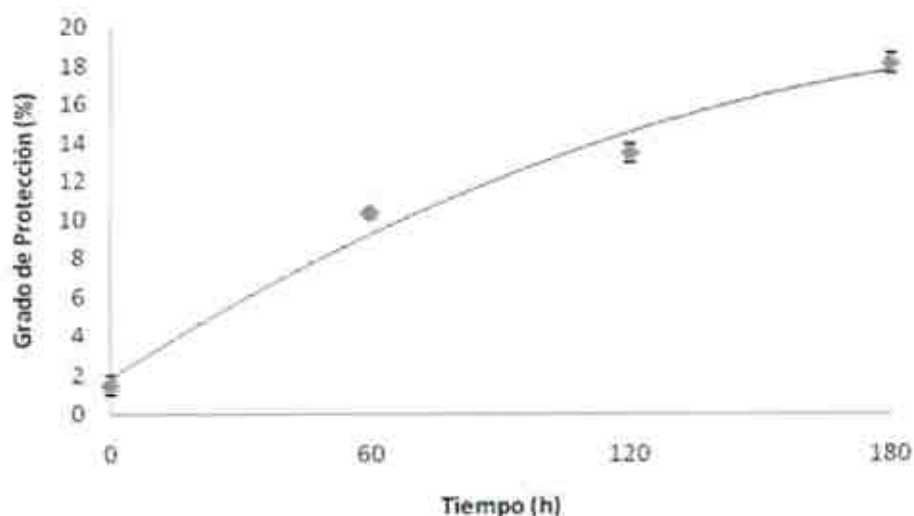


Figura 12: Grado de protección del aceite de sachá inchi obtenida por efecto de la adición de extractos de tara hidrolizados.

4.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MEZCLAS DE EXTRACTOS FENÓLICOS

4.4.1. EXTRACTOS HIDROLIZADOS DE TARA EN COMBINACIÓN CON PALMITATO DE ASCORBILO, ÁCIDO CÍTRICO Y α -TOCOFEROL

La eficacia antioxidante de las diversas mezclas binarias desarrolladas sobre la estabilidad oxidativa del aceite de sacha inchi se muestran en el Cuadro 6. Los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla del extracto de tara hidrolizado por 180 minutos (EHT) con palmitato de ascorbilo (PA) en cantidades de 200 y 100 ppm, respectivamente, lo que permitió obtener un periodo de inducción de 87.8 minutos. Las mezclas conformadas por extracto de tara (200 ppm) con ácido cítrico (AC, a 100 ppm) o con α -tocoferol (α -T, a 100 ppm) dieron lugar a bajos periodos de inducción de 73.6 y 65.0 minutos, respectivamente; con grados de protección (porcentaje de inhibición de la oxidación del aceite de sacha inchi con adición de la mezcla antioxidante en relación al control (aceite de sacha inchi sin adición de antioxidante)) de 15.2 y 30.4%, respectivamente.

Los factores de estabilización mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todas las mezclas evaluadas. El sinergismo calculado (interacción en la cual el efecto antioxidante de una o más sustancias es mayor que la suma de los efectos antioxidantes de cada elemento solo) para la mezcla EHT-200 + PA-100, fue de 24.7 %.

Cuando el extracto hidrolizado de tara fue combinado con α -Tocoferol, se observó efectos antagónicos. Cuando se adicionó 100 ppm de α -tocoferol al aceite de sacha inchi se alcanzó un periodo de inducción de 56.6 minutos, no difiriendo significativamente del encontrado para el aceite de sacha inchi sin antioxidantes (control, 56.4 minutos).

Cuadro 6: Periodo de inducción, grado de protección del aceite de sachá inchi obtenidos en presencia de antioxidantes.

Antioxidante	Periodo de Inducción (minutos)	Grado de protección (%)
Control (sin antioxidante)	56.46 ± 0.14 a	0.00 ± 0.00 a
α-T-100	56.63 ± 0.06 a	0.30 ± 0.36 a
AC-100	63.19 ± 0.33 b	11.93 ± 0.85 b
PA-100	70.33 ± 0.56 d	24.56 ± 1.42 d
EHT-200	66.23 ± 0.48 c	17.33 ± 1.12 c
EHT-200 + α-T-100	65.07 ± 0.09 c	15.23 ± 0.45 c
EHT-200 + AC-100	73.67 ± 0.44 e	30.47 ± 0.45 e
EHT-200 + PA-100	87.86 ± 0.35 f	55.61 ± 0.26 f

EHT: extracto hidrolizado de tara. α-T: alfa tocoferol. AC: ácido cítrico. PA: palmitato ascórbilo.

Resultados promedio de tres repeticiones ± SD. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p > 0.05$).

El α-tocoferol a 100 ppm en combinación con el extracto hidrolizado de tara, alcanzó un periodo de inducción de 65.0 minutos; siendo este valores inferiores a los encontrados cuando se empleó sólo el extracto de tara (a 200 ppm) en el aceite con valores de 66.2, respectivamente; esto indicaría que se produjeron efectos antagónicos cuando el α-tocoferol fue adicionado a los diferentes extractos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Knez y Bauman *et al.* (2000) quienes determinaron efectos antagónicos para mezclas de extractos de romero y α-tocoferol, mientras que las mezclas de extractos de romero con palmitato de ascórbilo presentaron altos valores de sinergismo (56.0 %) y con la adición de ácido cítrico se alcanzó un menor efecto sinergista (2.61 %). Al respecto, se puede afirmar que el α-tocoferol reduce el efecto antioxidante de algunos extractos fenólicos como el romero, según lo reportado por Hopia *et al.* (1996) y Banias *et al.* (1992).

Finalmente, se observa que el mejor grado de protección de la oxidación del aceite de sachá inchi se dio por adición de mezclas binarias de antioxidantes, determinándose que la mezcla de extracto hidrolizado de tara a 200 ppm (EHT200) con palmitato de ascórbilo a 100 ppm (PA100), permite incrementar en un 55.61% más de protección respecto al control (aceite de sachá inchi sin adición de antioxidante).

4.4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HIDROLIZADO DE TARA Y DEL PALMITATO DE ASCORBILO SOBRE LA EFICACIA ANTIOXIDANTE EN EL ACEITE DE SACHA INCHI

De la prueba anterior se observó que los mejores resultados fueron obtenidos con los extractos hidrolizados de la tara (EHT) y con la mezcla binaria de extracto hidrolizado de tara con palmitato de ascorbilo (PA), por esta razón se decidió evaluar la influencia de la concentración de los mismos, sobre la eficacia antioxidante en el aceite de sachá inchi, dichos resultados se presentan en el Cuadro 7.

Se observó que conforme se incrementó la concentración del extracto hidrolizado de tara, se obtuvo mayores tiempos de inducción, factores de estabilización y grados de protección sobre el aceite de sachá inchi, este efecto fue mayor al incorporar a los extractos hidrolizados de tara el palmitato de ascorbilo y el efecto fue más pronunciado aún cuando se incrementaron las concentraciones de palmitato de ascorbilo. El mayor tiempo de inducción alcanzado fue el correspondiente a la mezcla de 400 ppm de extracto hidrolizado de tara con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (EHT-400 + PA-100) siendo este de 96.6 minutos, mientras que la mezcla de 400 ppm de extracto hidrolizado de tara con 25 ppm de palmitato de ascorbilo (EHT-400 + PA-25) alcanzó 78.1 minutos. Con la adición de 100 ppm de palmitato de ascorbilo, se observó un incremento en el periodo de inducción en un 18.53 minutos respecto al periodo de inducción obtenido para el extracto hidrolizado de tara a 400 ppm y un incremento en 40.17 minutos, respecto a la muestra control (aceite de sachá inchi sin adición de antioxidante). Las concentraciones de PA empleados en los ensayos fueron inferiores a la dosis máxima permitida de 200 mg/Kg de aceite establecido por la FDA (Food and Drug Administration) (Yi *et al.*, 2011).

Cuadro 7. Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección determinados para el aceite de sachá inchi, en presencia de mezclas antioxidantes de extracto hidrolizado de tara y palmitato de ascorbilo.

Antioxidante	Periodo de Inducción (minutos)	Factor de estabilización	Grado de protección (%)
Control	56.46 ± 0.14 a	1.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
EHT-200	66.23 ± 0.48 b	1.17 ± 0.01 b	17.30 ± 0.60 b
EHT-200+PA-25	70.85 ± 0.43 c	1.25 ± 0.01 c	25.48 ± 1.06 c
EHT-200+PA-50	73.96 ± 0.52 d	1.31 ± 0.01 d	30.99 ± 1.23 d
EHT-200+PA-75	78.03 ± 0.29 e	1.38 ± 0.00 e	38.19 ± 0.18 e
EHT-200+PA-100	85.80 ± 0.33 f	1.52 ± 0.01 f	51.95 ± 0.95 f
EHT-300	70.09 ± 1.13 c	1.24 ± 0.02 c	24.14 ± 1.69 c
EHT-300+PA-25	74.83 ± 0.82 g	1.33 ± 0.01 g	32.52 ± 1.13 g
EHT-300+PA-50	84.89 ± 1.02 f	1.50 ± 0.01 f	50.34 ± 1.44 f
EHT-300+PA-75	88.90 ± 0.56 h	1.57 ± 0.01 h	57.44 ± 0.60 h
EHT-300+PA-100	92.63 ± 0.59 i	1.64 ± 0.01 i	64.05 ± 1.45 i
EHT-400	73.65 ± 0.48 d	1.30 ± 0.01 d	30.43 ± 1.16 d
EHT-400+PA-25	78.10 ± 0.22 e	1.38 ± 0.00 e	38.31 ± 0.06 e
EHT-400+PA-50	88.91 ± 0.30 h	1.57 ± 0.01 h	57.47 ± 0.91 h
EHT-400+PA-75	91.68 ± 0.34 j	1.62 ± 0.01 j	62.36 ± 0.99 j
EHT-400+PA-100	96.63 ± 0.40 k	1.71 ± 0.00 k	71.13 ± 0.29 k

EHT: Extracto hidrolizado de tara por 180 minutos a 200, 300 y 400 ppm. PA: Palmitato de ascorbilo a 25, 50, 75 y 100 ppm. Resultados promedio de tres repeticiones ± SD. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p > 0.05$).

4.5. PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO

4.5.1. CONTENIDO DE TOCOFEROLES

El contenido de tocoferoles (α , β , γ y δ) en el aceite de sachá inchi sometido a pruebas de almacenamiento acelerado se presentan en el Cuadro 13; también en el Cuadro 8 se presenta entre paréntesis resultados en porcentajes respecto al valor inicial.

El tiempo cero de almacenamiento se encontró un contenido tocoferoles totales 194.4 mg/100 g de aceite, lo que correspondió a un 55.0, 41.5, 1.7 y 1.6 % de participación para el γ -, δ -, α - y β -tocoferol; respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Follegatti-Romero *et al.* (2009), quienes encontraron entre 57.4 - 68.2% de γ -tocoferol, 30.9 - 40.3% de δ -tocoferol, mientras que α - y β -tocoferol representan menos del 3% del total. Liu *et al.* (2014) determinaron el contenido de tocoferoles en aceite de sachá inchi obtenidos de semillas provenientes de china y obtenidas mediante prensado en frío y determinaron γ - y δ -tocoferol en concentraciones de 105.2 y 56.6 mg/100 g de aceite, no siendo detectados el α - y β - tocoferol; mientras que Fanali *et al.* (2011) en semillas de sachá provenientes de Perú determinaron α -, γ - y δ -tocoferol en concentraciones de 0.4, 105.2, 86.9 mg/100 de aceite, resultados cercanos a los obtenidos en nuestro estudio.

Los tocoferoles tienen efectos antioxidantes y pueden retardar el proceso oxidativo. Se espera que los aceites con altos contenidos de tocoferoles presenten una mayor estabilidad oxidativa. En el aceite de sachá inchi el más importante isómero, tal como se ha encontrado en este estudio, es el γ -tocoferol, mientras que el α -tocoferol es predominante en el aceite de oliva (16.08 mg/100 g de aceite) y girasol (59.13 mg/100 g de aceite). Fanali *et al.* (2011) sostiene que la actividad antioxidante disminuye en el orden $\gamma > \delta > \beta > \alpha$ tocoferol, donde las mayores cantidades de γ - y δ -tocoferol con respecto a α -tocoferol podrían atribuirse a su mayor capacidad antioxidante *in vitro*, esto permite que el aceite sea más estable a la oxidación.

En el Cuadro 12 se observa en el aceite de sachá inchi, sin adición de antioxidantes (control), una notable disminución en el contenido de todos los isómeros de tocoferoles respecto a la muestra de aceite con adición de la mezcla de antioxidantes extracto hidrolizado de tara más palmitato de ascorbilo (EHT-400 + PA-100). Al cabo de 30 días se observa que en la muestra control las pérdidas de α -, β -, γ - y δ -tocoferol fueron 94.0, 94.1, 98.9 y 91.7 % respectivamente; mientras que para el aceite de sachá inchi con adición de la mezcla de antioxidantes (EHT-400 +PA-100) disminuyeron en un 87.7, 90.1, 80.9 y 72.0 %, respectivamente.

Cuadro 8. Variación en el contenido de tocoferoles en mg/100 g de aceite de sachá inchi durante las pruebas de almacenamiento acelerado.

Accite de sachá inchi	Tiempo de oxidación (Días)	Alfa tocoferol	Beta tocoferol	Gamma tocoferol	Delta tocoferol
Sin Antioxidante	0	3.34 ± 0.06e* (100)**	3.24 ± 0.13d (100)	107.10 ± 3.59d (100)	80.72 ± 1.20f (100)
	10	1.53 ± 0.02d (45.95)	1.52 ± 0.01c (46.98)	21.58 ± 3.49b (20.15)	51.08 ± 2.88d (63.29)
	20	0.42 ± 0.01b (12.61)	0.31 ± 0.02a (9.69)	3.03 ± 0.04a (2.83)	18.61 ± 0.23b (23.05)
	30	0.20 ± 0.04a (5.99)	0.19 ± 0.04a (5.87)	1.16 ± 0.23a (1.08)	6.61 ± 0.35a (8.26)
	a***			100	100
	b***			-2.66	-2.36
	r ²			0.999	0.979
Con Antioxidante (EHT-400+PA-100)	0	3.34 ± 0.06e (100)	3.24 ± 0.13d (100)	107.10 ± 3.59d (100)	80.72 ± 1.20f (100)
	10	1.59 ± 0.18d (47.63)	1.67 ± 0.02c (51.53)	79.43 ± 9.20c (74.17)	72.87 ± 5.09e (90.28)
	20	0.70 ± 0.00c (20.84)	0.67 ± 0.02b (20.67)	50.94 ± 0.01b (47.57)	41.03 ± 2.22c (50.83)
	30	0.41 ± 0.01b (12.28)	0.32 ± 0.02a (9.83)	20.36 ± 0.03a (19.01)	22.53 ± 0.30b (27.91)
	a***			100	100
	b***			-0.159	-0.08
	R ²			0.983	0.992

Resultados promedio de tres repeticiones ± SD.

*Diferentes letras significan diferencias significativas dentro de la misma columna mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan a 5% de nivel de significancia.

**Retención (%) basado sobre el valor del día 0.

***Parámetros de la regresión lineal ($y=bx+a$) y exponencial ($y=a*(e^{bx})$) para la retención de tocoferoles (%) en función del tiempo de oxidación (días) sin adición y adición de antioxidante, respectivamente, r=coeficiente de correlación. (EHT400 + PA100) corresponde a 400 ppm de EHT más 100 ppm de PA.

Se observó que la adición de la mezcla de antioxidantes ofreció una gran estabilidad al γ - y δ -tocoferol, esta efectividad se ve reflejada en una disminución de 25.8 y 9.7 % respectivamente al cabo de 10 días de almacenamiento, mientras que en el sistema sin antioxidante se registró una disminución de 79.8 y 36.7 % respectivamente. En cuanto a los isómeros α - y β -tocoferol mostraron una buena estabilidad y se conservaron en más del 50% respecto al sistema sin antioxidante. Por lo tanto se demuestra que la mezcla antioxidante EHT-400 +PA-100 incrementan en 3 a 4 veces la estabilidad de los tocoferoles del aceite de sacha inchi cuando son sometidos a pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C por 30 días.

Nuestros resultados obtenidos para α -tocoferol al cabo de 10 días presento una estabilidad de 45.95%, mientras que γ -tocoferol presento una estabilidad de 20.15%, respecto al valor inicial; comparando estos resultados con los reportados por Koski *et al.* (2002) en aceite de oliva, presentaron una buena estabilidad en el aceite de sacha inchi, posiblemente se debe a la alta concentración de tocoferoles (α -, β -, γ - y δ -tocoferol) y la naturaleza del aceite.

En la Figura 13 se presenta la cinética de degradación del (a) γ - y (b) δ -tocoferol, se observó que las muestras con la mezcla de antioxidantes (EHT-400 + PA-100) presentan una cinética de degradación lineal, mientras que en aquellas muestras sin antioxidante la degradación fue exponencial

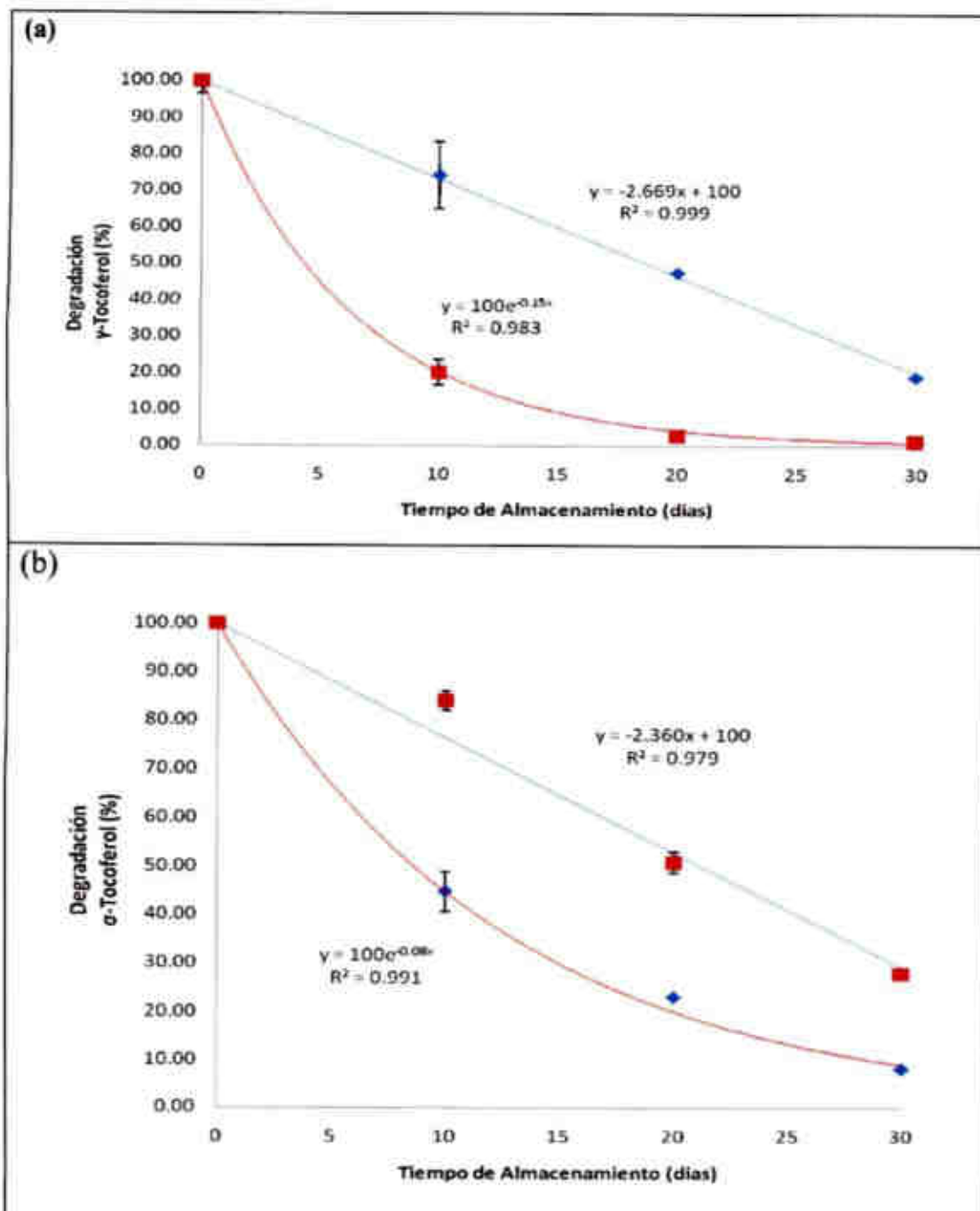


Figura 13. Cinética de degradación para el γ - y δ -tocoferol en el aceite de sachá inchi con y sin adición de antioxidantes.

4.5.2. CONTENIDO DE FITOESTEROLES

El contenido de fitosteroles en el aceite de sachá inchi en presencia y ausencia de antioxidantes se muestra en el Cuadro 9. De acuerdo a los resultados, el almacenamiento a 55 °C por 30 días no influye en el contenido fitosteroles del aceite de sachá inchi. Este aceite presenta fitosteroles como el campesterol, stigmasterol y β -sitosterol, variando su concentración de acuerdo al cultivar (Chirinos *et al.*, 2013). El β -sitosterol fue el fitosterol más importante que representa más del 60%, seguido del stigmasterol y finalmente el campesterol, lo que concuerda con los reportado por Chirinos *et al.* (2013) y Thanh *et al.* (2006).

Cuadro 9. Variación del contenido de fitosteroles en el aceite de sachá inchi sometidos a pruebas de almacenamiento acelerado.

Aceite de sachá inchi	Tiempo de oxidación (días)	Variación en el nivel de fitosteroles en aceite de sachá inchi		
		Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	β -Sitosterol (%)
EHT (400 ppm) + PA (100 ppm)	0	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	10	98.33 \pm 13.23a	100.00 \pm 2.89a	98.00 \pm 8.00a
	20	94.00 \pm 2.23a	100.33 \pm 4.77a	99.33 \pm 10.46 ^b
	30	96.33 \pm 16.60a	99.67 \pm 3.85a	99.67 \pm 1.01 ^b
Sin antioxidante	0	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a	100.00 \pm 0.00a
	10	92.67 \pm 1.15a	89.67 \pm 1.15a	97.33 \pm 7.46 ^b
	20	98.67 \pm 5.17 ^b	99.00 \pm 10.62a	99.67 \pm 4.66 ^b
	30	95.33 \pm 11.55a	96.33 \pm 9.92a	99.67 \pm 4.48 ^b

Resultados promedio de tres repeticiones \pm SD. Letras iguales dentro de la misma columna indica que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$)

Según los resultados los fitosteroles, presentes en el aceite de sachá inchi, muestran una gran estabilidad cuando son almacenados durante 30 días a 55 °C. Estos resultados son avalados por los estudios realizados por Thanh *et al.* (2006) quienes evaluaron la estabilidad de los fitosteroles mediante pruebas aceleradas a 55 °C por 5 semanas, en aceites vegetales de girasol, oliva y una mezcla de aceites (aceite de girasol enriquecido con ácido oleico: aceite de colza: aceite de pepas de uva, 75:5:20); los autores encontraron que el campesterol, stigmasterol y β -sitosterol permanecieron estables. Los fitoesteroles presentes en los aceites de oliva y girasol sometidos a calentamiento a 100 °C por 1 hora no vieron afectada su concentración (Thanh *et al.*, 2006), es más cuando estándares de fitosteroles (campesterol, stigmasterol y β -sitosterol) fueron sometidos a 100 °C por 1 hora tampoco sufrieron modificación alguna. Sin embargo cuando fueron sometidos a 200 °C por 1 hora, la concentración disminuyó en 60.0, 61.1 y 58.3% para el campesterol, stigmasterol y β -sitosterol, respectivamente. Por lo tanto los fitosteroles presentan una gran estabilidad a la temperatura.

Los fitosteroles y los ésteres de ácidos grasos son compuestos muy estables y sufren solo una limitada degradación durante el procesamiento del aceite y solamente en condiciones muy duras, tales como temperaturas muy altas (>100 °C) en presencia de oxígeno pueden ocasionar oxidación. Los fitosteroles son compuestos mono-insaturados (doble enlace en el anillo B), que son mucho más estables que los ácidos grasos mono-insaturados (ácido oleico). Se indica que bajo condiciones de fritura (160 a 200 °C, por 5-10 minutos) la formación de productos de oxidación de esteroides es lenta (Cantrill, 2008).

V. CONCLUSIONES

- Los galotaninos presentes en las vainas de tara (*Caesalpinia spinosa*) fueron hidrolizados a ácido gálico y galotaninos de bajo peso molecular mediante tratamiento térmico a 121.1 °C y 105 kPa, alcanzándose en un tiempo de 180 minutos de tratamiento térmico un grado de hidrólisis de 29.8% y un incremento en la capacidad antioxidante *in vitro* mediante metodologías ABTS+ de hasta 941 μmol TE/ml.
- El empleo de galotaninos de tara hidrolizados por tratamiento térmico por 180 minutos con un grado de hidrólisis de 29.8%, tiene potencial efecto protector en el aceite de sacha inchi frente a la oxidación, permitiendo un incremento en la estabilidad oxidativa en un 20% respecto al control (aceite de sacha inchi sin adición de antioxidante) cuando la evaluación fue realizado por calorimetría de barrido diferencial a 120 °C.
- El extracto hidrolizado de tara en combinación con palmitato de ascorbilo mostró un efecto antioxidante sinérgico en la conservación del aceite de sacha inchi determinado mediante calorimetría de barrido diferencial a 120 °C.
- El almacenaje del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) a 55 °C por 30 días, con o sin adición de antioxidantes, estableció pérdidas importantes en γ - y σ -tocoferol, observándose principalmente en el caso de las muestras almacenadas sin antioxidantes. Respecto al contenido de fitosteroles durante el almacenaje no fueron significativamente afectados.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de fraccionamiento e identificación de los diferentes galotaninos obtenidos producto de la hidrólisis térmica a 121.1 °C por 180 minutos.
- Estudiar el efecto antioxidante de los extractos hidrolizados de tara por tratamiento térmico en diferentes aceites vegetales empleando pruebas de almacenamiento acelerado.
- Realizar hidrólisis térmica de los galotaninos de tara a temperaturas superiores a 121.1°C para lograr una hidrólisis completa en ácido gálico.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. AGUILAR-GALVEZ, A., NORATTO, G., CHAMBI, F., DEBASTE, F., & CAMPOS, D. 2014. Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry*, 156(2013), 301–4.
2. AOAC (1995). Official methods of analysis Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists
3. AKIYAMA, H., FUJII, K., YAMASAKI, O., OONO, T., & IWATSUKI, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 487–491.
4. AMAROWICZ, R., & SHAHIDI, F. (1995). Antioxidant activity of green tea catechins in a beta-carotene-linoleate model system. *Journal of Food Lipids*, 2, 47–56.
5. BANIAS, C., OREOPOULOU, V., & THOMOPOULOS, C. D. 1992. The Effect of Primary Antioxidants and Synergists on the Activity of Plant Extracts in Lard, 69(6), 520–524.
6. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

7. BARCLAY, F. ANTUNES, Y. EGAWA, K.L. MCALLISTER, K. MUKAI, T. NISHI, M.R. VINQVIST. 1981. The efficiency of antioxidants delivered by liposomal transfer, *Biochim. Biophys. Acta* 1328, 1–12.
8. BREWER, M. S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
9. CAMPOS, D., NORATTO, G., CHIRINOS, R., ARBIZU, C., ROCA, W., CISNEROS-ZEVALLOS, L. 2006. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and olluco (*Ullucus tuberosum*). *J. Sci. Food Agric.* 86, 1481–1488.
10. CHAMBI, F., CHIRINOS, R., PEDRESCHI, R., BETALLELUZ-PALLARDEL, I., DEBASTE, F., & CAMPOS, D. 2013. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*, 47, 168–175.
11. CHIAVARO, E., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., BARNABA, C., VITTADINI, E., CERRETANI, L., & BENDINI, A. 2008. Differential scanning calorimetry: a potential tool for discrimination of olive oil commercial categories. *Analytica Chimica Acta*, 625(2), 215–26.
12. CHIRINOS, R., HUAMÁN, M., BETALLELUZ-PALLARDEL, I., PEDRESCHI, R., & CAMPOS, D. 2011. Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*, 128(3), 711–716. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.093

13. CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y., & CAMPOS, D. 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141(3), 1732–9.
14. CHOE, E., & MIN, D. B. 2006. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation, 5, 169–186.
15. FANALI, C., DUGO, L., CACCIOLA, F., BECCARIA, M., GRASSO, S., DACHÀ, M., ... MONDELLO, L. 2011. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13043–9.
16. FOLLEGATTI-ROMERO, L. A., PIANTINO, C. R., GRIMALDI, R., & CABRAL, F. A. 2009. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 323–329.
17. FARHOOSH, R., GOLMOVAHHED, G. A., & KHODAPARAST, M. H. H. 2007. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chemistry*, 100,231-236.
18. GARRO, J., RIEDL, B., CONNER, A., 1997. Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung* 51, 235–243.
19. GONZÁLEZ, M. J., TORRES, J. L., & MEDINA, I. 2010. Impact of thermal processing on the activity of gallotannins and condensed tannins from *Hamamelis virginiana* used as functional ingredients in seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4274–83.
20. HARBONE JB. 1998. Phenolic compounds, in *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, ed. by Harbone JB. Thomson Science, London, pp. 40–106.

21. HERTOOG, M. G. L., HOLMAN, P. C. H., & VENEMA, D. P. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591–1598.
22. HEO, H. J., KIM, Y. J., CHUNG, D., & KIM, D.-O. 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87–92.
23. HOPIA, A., S.-W. HUANG, And E.N. FRANKEL. 1996. Effect of α -Tocopherol and Trolox on the Decomposition of Methyl Linoleate Hydroperoxides, *Ibid.* 31:357–365.
24. INOUE, K.H., HAGERMAN, A.E., 1988. Determination of gallotannin with rhodanine. *Anal. Biochem.* 169, 363–369.
25. IUPAC. 1987. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives (7th ed.) Palo Alto, CA: Blackwell Scientific Pub. Ltd.
26. JACOBSEN, C., HARTVIGSEN, K., THOMSEN, M. K., HANSEN, L. F., LUND, P., SKIBSTED, L. H., MEYER, A. S. 2001. Lipid Oxidation in Fish Oil Enriched Mayonnaise : Calcium Disodium Ethylene diamine tetra acetate , but Not Gallic Acid , Strongly Inhibited Oxidative Deterioration.
27. JEONG, S.M., KIM, S.Y., KIM, D.R., JO, S.C., NAM, K.C., AHN, D.U., ET AL., 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3389–3393.
28. KING, J. W., & GRABIEL, R. D. (2007). Isolation of polyphenolic compounds from fruits or vegetables utilizing subcritical water. Espacenet, US7208181. United States.

29. KIM, T. J., SILVA, J. L., KIM, M. K., & JUNG, Y. S. 2010. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chemistry*, 118(3), 740–746.
30. KIM, T. J., SILVA, J. L., & JUNG, Y. S. 2011. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. *Food Chemistry*, 126(1), 116–120.
31. KNEZ, I., & BAUMAN, D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil, 71, 229–233.
32. KOSKI, A., PSOMIADOU, E., TSIMIDOU, M., HOPIA, A., KEFALAS, P., WÄHÄLÄ, K., & HEINONEN, M. 2002. Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *European Food Research and Technology*, 214(4), 294–298.
33. LAMPI, A., DIMBERG, L. H., & KAMAL-ELDIN, A. 1999. A study on the influence of fucosterol on thermal polymerisation of purified high oleic sunflower triacylglycerols, 579(July 1998), 573–579.
34. LERCKER, G., RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T., 2002. Cholesterol oxidation mechanism. In: Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P. (Eds.), Cholesterol and Phyto-sterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 1–26
35. LAGUERRE, M., LECOMTE, J., & VILLENEUVE, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–82.

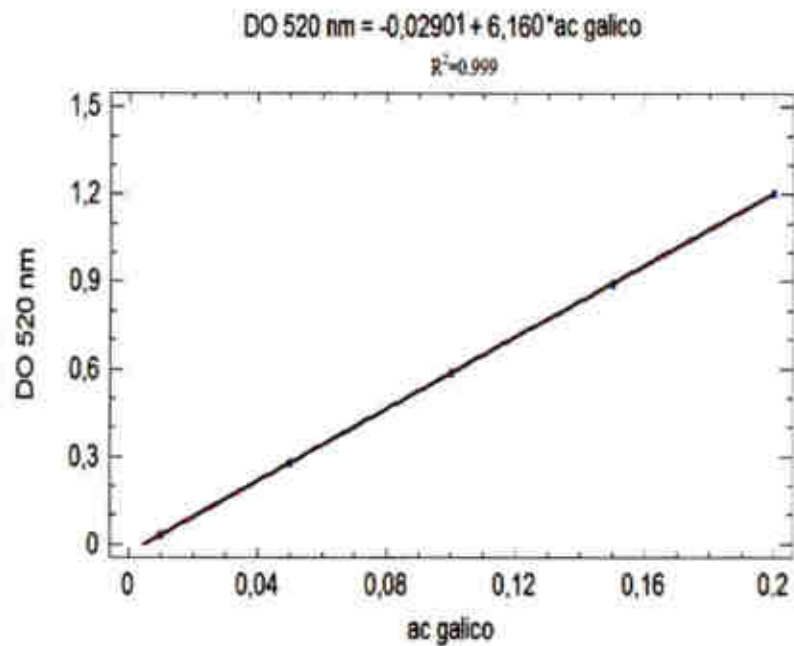
36. LET, M. B., JACOBSEN, C., & MEYER, A. S. 2007. Ascorbyl palmitate, gamma-tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2369–75.
37. LIU, Q., XU, Y. K., ZHANG, P., NA, Z., TANG, T., & SHI, Y. X. 2014. Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil from Xishuangbanna (China), 65(March), 1–9.
38. MAURER, N. E., HATTA-SAKODA, B., PASCUAL-CHAGMAN, G., & RODRIGUEZ-SAONA, L. E. 2012. Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry*, 134(2), 1173–80.
39. MUELLER-HARVEY, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 3–20.
40. OSSIPOV, V., LOPONEN, J., OSSIPOVA, S., HAUKIOJA, E., PIHLAJA, K., 1997. Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 493–504.
41. PYLA, R., KIM, T.-J., SILVA, J. L., & JUNG, Y.-S. 2010. Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 154–60.
42. PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4290–4302.
43. PORTER, L. J., HRSTICH, L. N., CHAN, B. C. 1989. The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.

44. RICE-EVANS, C. A., & MILLER, N. J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790–795.
45. ROBARDS, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000, 657–691.
46. SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A., 1965. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
47. TAN CP, CHE MAN YB, SELAMAT J AND YUSOFF MSA. (2002). Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chemistry* 76(3): 385–389.
48. THANH, T. T., VERGNES, M.-F., KALOUSTIAN, J., EL-MOSELHY, T. F., AMIOT-CARLIN, M.-J., & PORTUGAL, H. 2006. Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined by GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 220–225.
49. TIAN, F., LI, B., JI, B., YANG, J., ZHANG, G., CHEN, Y., & LUO, Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113(1), 173–179.
50. VERMERRIS, W., & NICHOLSON, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. USA: Springer. New York, ISBN-10 1-4020-5164-6.
51. Yi, J., ANDERSEN, M. L., & SKIBSTED, L. H. 2011. Interactions between tocopherols, tocotrienols and carotenoids during autoxidation of mixed palm olein and fish oil. *Food Chemistry*, 127(4), 1792–1797.

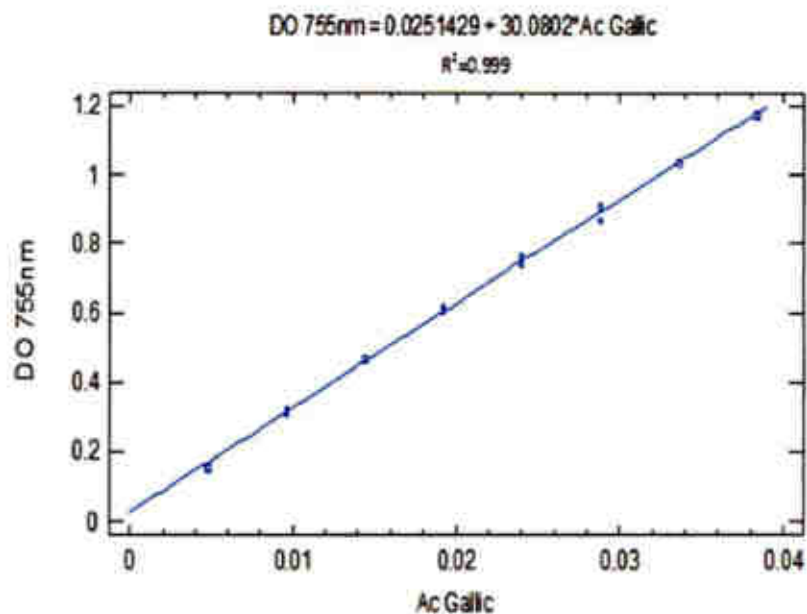
52. ZHANG, Y., YANG, L., ZU, Y., CHEN, X., WANG, F., & LIU, F. 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662.

VIII. ANEXOS

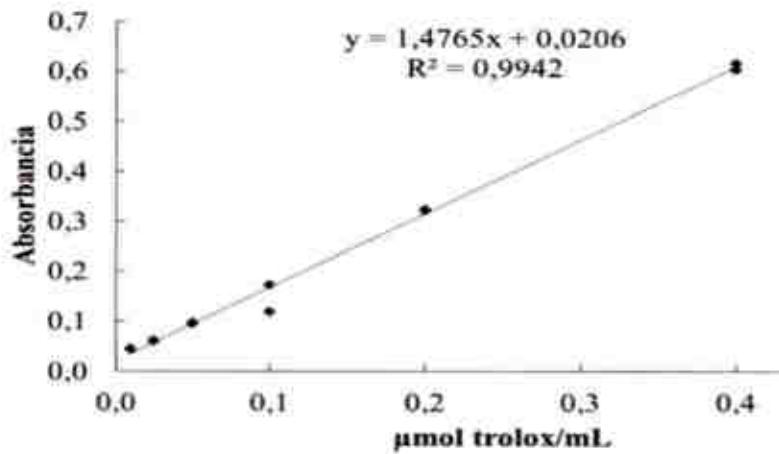
1. Curva estándar para determinación de ácido gálico



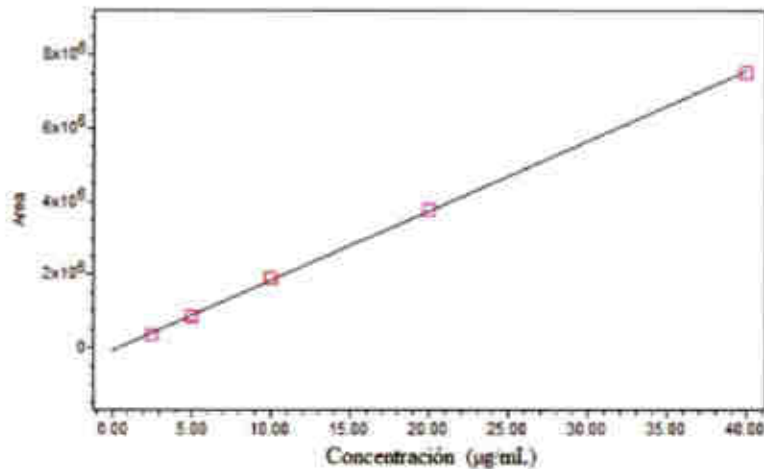
2. Curva estándar para la determinación de compuestos fenólicos



3. Curva estándar para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*
 a) Método ABTS+



4. Curva estándar para la cuantificación de tocoferoles en aceite de sacha inchi



Ecuaciones empleadas:

Alfa-Tocoferol:

$$Y = 1.91 \times 10^5 (X) - 7.64 \times 10^4 \quad R^2 = 0.999$$

Beta-Tocoferol:

$$Y = 1.94 \times 10^5 (X) - 3.50 \times 10^4 \quad R^2 = 0.999$$

Gama-Tocoferol:

$$Y = 2.32 \times 10^5 (X) - 1.01 \times 10^4 \quad R^2 = 0.999$$

Delta-Tocoferol: $Y = 2.54 \times 10^5 (X) - 1.97 \times 10^4 \quad R^2 = 0.999$

5. Cromatograma correspondiente a los estándares de fitosteroles

