

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



“EFICACIA ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE  
LA MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*) EN LA ESTABILIDAD DEL  
ACEITE DE LINAZA (*Linum usitatissimum* L.)”

Presentada por:

JORDAN PAOLO CHAN MOROMISATO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

LIMA – PERÚ

2015

*A mi familia y a Melissa  
por estar siempre a mi lado  
y apoyarme en todo momento*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora de tesis, Dra. Rosana Chirinos, por guiarme desde el inicio de la investigación, compartir conmigo sus conocimientos y el apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. David Campos, por darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del Área de Biotecnología Industrial, del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me apoyaron siempre, sobre todo en los análisis experimentales, y con quienes pasé gratos momentos, dentro y fuera del ambiente de trabajo.

A mi familia, mi enamorada y mis amigos por su constante apoyo.

A todas aquellas personas que, de una u otra manera, han hecho posible la realización del presente trabajo de investigación.

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1.	Semilla de linaza	3
2.1.1.	Generalidades	3
2.1.2.	Composición química y perfil de ácidos grasos	3
2.1.3.	El ácido alfa linolénico (ALA) en el aceite de linaza	4
2.2.	Oxidación de los lípidos	7
2.2.1.	Factores que influyen en la oxidación	7
2.2.2.	Mecanismos de oxidación	9
2.2.3.	Cinética y productos de la oxidación lipídica	12
2.3.	Métodos para evaluar la oxidación de aceites	14
2.3.1.	Composición de ácidos grasos	15
2.3.2.	Índice de peróxidos	16
2.3.3.	Dienos conjugados	17
2.3.4.	Índice de <i>p</i> -anisidina	18
2.3.5.	Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	19
2.4.	Los antioxidantes	20
2.4.1.	Clasificación	20
2.4.2.	Antioxidantes comúnmente utilizados en los alimentos	23
2.5.	La mashua	26
2.5.1.	Generalidades	26
2.5.2.	Composición química	27
2.5.3.	Compuestos bioactivos y actividad antioxidante	29
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
3.1.	Lugar de ejecución	31
3.2.	Materia prima	31
3.3.	Materiales, equipos y reactivos	31
3.3.1.	Materiales	31
3.3.2.	Equipos	31

3.3.3. Reactivos	32
3.4. Métodos de análisis	33
3.4.1. Contenido de compuestos fenólicos	33
3.4.2. Capacidad antioxidante ABTS	34
3.4.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa del aceite de linaza	34
3.4.4. Índice de peróxido	35
3.4.5. Índice de <i>p</i> -anisidina	36
3.4.6. Dienos conjugados	37
3.4.7. Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases	37
3.5. Metodología experimental	38
3.5.1. Extracción de los compuestos fenólicos de la mashua	39
3.5.2. Fraccionamiento de los compuestos fenólicos del extracto de mashua	39
3.5.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa del aceite de linaza	40
3.5.4. Pruebas aceleradas de almacenamiento	40
3.6. Diseño experimental	41
3.7. Análisis estadístico	41
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
4.1. Caracterización del extracto fenólico de la mashua	42
4.2. Determinación de la estabilidad oxidativa del aceite de linaza a 120 °C	44
4.3. Pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C	46
4.3.1. Índice de peróxido	46
4.3.2. Índice de <i>p</i> -anisidina	48
4.3.3. Dienos conjugados	51
4.3.4. Perfil de ácidos grasos	53
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>58</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición de ácidos grasos del aceite de linaza (%)	4
Cuadro 2: Antioxidantes primarios usados comúnmente en los alimentos	22
Cuadro 3: Composición química de 100 g de mashua (porción comestible)	28
Cuadro 4: Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante por ABTS del extracto de compuestos fenólicos de la fase acetato de etilo de la mashua	42
Cuadro 5: Balance de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante ABTS en el extracto inicial, fase acuosa y fase acetato de etilo	43
Cuadro 6: Tiempos de inducción obtenidos mediante CBD a 120 °C	44
Cuadro 7: Variación de cada ácido graso (%) entre las muestras a los 0 y a los 15 días	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del ácido linoleico y ácido linolénico	6
Figura 2: Mecanismo de oxidación del ácido linoleico con oxígeno triplete	11
Figura 3: Desarrollo teórico de los productos de oxidación primaria y secundaria en función del tiempo de la oxidación lipídica	13
Figura 4: Esquema general de la autooxidación de los lípidos	14
Figura 5: Reacción de los compuestos aldehídicos con el reactivo p-anisidina	19
Figura 6: Termograma de una muestra bajo nitrógeno (A) y de una muestra bajo oxígeno (B)	20
Figura 7: Estabilización por resonancia de un radical antioxidante	21
Figura 8: Principales antioxidantes utilizados por la industria alimentaria	25
Figura 9: Tubérculos andinos: oca ( <i>Oxalis tuberosa</i> Molina), ulluco ( <i>Ullucus tuberosus</i> Caldas) and mashua ( <i>Tropaeolum tuberosum</i> R. & P.)	27
Figura 10: Etapas de la investigación	41
Figura 11: Evolución del índice de peróxido durante los 15 días de almacenamiento a 55 °C	48
Figura 12: Evolución del índice de p-anisidina durante los 15 días de almacenamiento a 55 °C	49
Figura 13: Evolución de los dienos conjugados durante los 15 días de almacenamiento a 55 °C	51
Figura 14: Composición de ácidos grasos para los tres tratamientos a los 15 días de almacenamiento	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación de la curva estándar de compuestos fenólicos a 755 nm	69
Anexo 2. Determinación de la curva estándar de Trolox para la medida de la capacidad antioxidante ABTS a 734 nm	70
Anexo 3. Gráficas de los resultados de la estabilidad oxidativa mediante CBD a 120 °C	71
Anexo 4. Análisis estadístico	72
a. Estabilidad oxidativa mediante CBD	72
b. Índice de peróxido	74
c. Índice de <i>p</i> -anisidina	80
d. Dienos conjugados	86
e. Perfil de ácidos grasos	92

## ABSTRACT

In the present study the antioxidant effectiveness of phenolic extract from purple tuber mashua (*Tropaeolum tuberosum*) in linseed (*Linum usitatissimum* L.) was evaluated. To obtain the extract from lyophilized mashua, a methanol:acetone:water (45:45:10 v/v/v) mix acidified with 0.15 % of concentrated hydrochloric acid was used as solvent. Fractionation of the extract with ethyl acetate (extract:ethyl acetate, 1:2 v/v) was then performed to yield two phases, aqueous and ethyl acetate to which were evaluated for phenolic content and ABTS antioxidant capacity. Due to the good solubility of the ethyl acetate fraction in the oil, it was added to the linseed oil and differential scanning calorimetry at 120 °C and accelerated storage at 55 °C for 15 days were performed, to assess the antioxidant efficacy of this fraction. In both tests a negative blank (no antioxidant added oil) and a positive blank with BHT at 200 ppm were used. In differential scanning calorimetry, concentrations of phenolic compounds of 60, 120, 240 and 360 ppm were used; the concentrations of 240 and 360 ppm were the most efficient, presenting greater induction times. In accelerated storage test, the concentration of 240 ppm was used and the peroxide value, conjugated diene, *p*-anisidine index and fatty acids profile by gas chromatography were analyzed. It was found that the phenolic compounds at 240 ppm and 200 ppm BHT offered linseed oil protection substantially similar to the primary oxidation; however, the first offered better protection against secondary oxidation. On the other hand, by gas chromatography, it was found that the fatty acid involved in oxidation reactions was linolenic acid. The results conclude that the phenolic compounds soluble in ethyl acetate mashua can be considered good antioxidants in linseed oil.

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la eficacia antioxidante de un extracto de compuestos fenólicos procedentes del tubérculo de la mashua morada (*Tropaeolum tuberosum*) en aceite de linaza (*Linum usitatissimum* L.). Para obtener el extracto a partir de la mashua liofilizada, se utilizó como solvente una mezcla de metanol:acetona:agua (45:45:10 v/v/v) acidificada con 0.15 % de ácido clorhídrico concentrado. Luego se realizó el fraccionamiento del extracto con acetato de etilo (extracto:acetato de etilo, 1:2 v/v), obteniéndose dos fases: acuosa y acetato de etilo, a las cuales se les evaluaron su contenido de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante con el método ABTS. Debido a la buena solubilidad de la fracción acetato de etilo en el aceite, se incorporó al aceite de linaza y se realizaron las pruebas de calorimetría de barrido diferencial a 120 °C y de almacenamiento acelerado a 55 °C por 15 días, para evaluar la eficacia antioxidante de dicha fracción. En ambas pruebas se tuvo un blanco negativo (aceite sin antioxidantes añadidos) y un blanco positivo con BHT a 200 ppm. En la prueba de calorimetría de barrido diferencial, se utilizaron concentraciones de compuestos fenólicos de 60, 120, 240 y 360 ppm; siendo las concentraciones de 240 y 360 ppm las más eficientes, al presentar mayores tiempos de inducción. En la prueba de almacenamiento acelerado, se usó la concentración de 240 ppm y se analizaron el índice de peróxido, dienos conjugados, índice de *p*-anisidina y perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa. Se determinó que los compuestos fenólicos a 240 ppm y el BHT a 200 ppm ofrecieron al aceite de linaza una protección prácticamente similar ante la oxidación primaria; sin embargo, el primero ofreció una mejor protección ante la oxidación secundaria. Por otro lado, mediante la cromatografía gaseosa, se determinó que el ácido graso involucrado en las reacciones de oxidación fue el ácido linolénico. Los resultados concluyen que los compuestos fenólicos de la mashua solubles en acetato de etilo pueden ser considerados buenos agentes antioxidantes en el aceite de linaza.

## I. INTRODUCCIÓN

La oxidación de los lípidos es una de las causas principales del deterioro de los alimentos. Genera preocupaciones económicas en la industria alimentaria porque da lugar a la aparición de sabores y olores anómalos, generalmente denominados “a rancio”, en los alimentos que contienen grasas. Las reacciones oxidativas rebajan además la calidad nutritiva del alimento y generan ciertos productos de oxidación potencialmente tóxicos (Fennema, 2000).

Para retardar la oxidación de las grasas y aceites, se suelen utilizar antioxidantes. Los antioxidantes sintéticos más populares son: terbutil hidroquinona (TBHQ), butil hidroxitolueno (BHT) y butil hidroxianisol (BHA); sin embargo, actualmente se está cuestionando el uso de ellos ya que diversos estudios indican que su prolongado periodo de uso llevaría al desarrollo de problemas toxicológicos, aconsejándose revisar los valores actuales de ADI (Ingesta Diaria Aceptable, por sus siglas en inglés), según la European Food Safety Authority (2004, 2011, 2012) y el National Toxicology Program (2011). Por esta razón, se busca utilizar agentes naturales que eviten o retarden el proceso de oxidación.

Los compuestos fenólicos son el grupo de antioxidantes naturales más conocidos y estudiados por los investigadores debido a su gran potencial en diferentes campos de aplicación, ya sea en la salud, alimentación y cosmética (Cedano, 2009).

Se han realizado investigaciones acerca del potencial antioxidante de una variedad de materias primas nativas del Perú, como la tara (Chambi *et al.*, 2013), la oca (Chirinos *et al.*, 2009), la inca muña (Yapuchura, 2010; Chirinos *et al.*, 2011), la maca (Campos *et al.*, 2013), demostrando que son ricas en compuestos fenólicos y que tienen la capacidad de actuar como potentes antioxidantes. También se encuentra a la mashua, tubérculo de origen alto andino que posee una considerable capacidad antioxidante (Cedano, 2009), la cual también ha sido estudiada, por su contenido en compuestos fenólicos con potentes

características antioxidantes, por Cuya (2009), Betalleluz *et al.* (2012), Chirinos *et al.* (2008), entre otros.

De otro lado, el aceite de linaza es muy rico en ácidos grasos poliinsaturados, posee alrededor de un 53 % de ácidos grasos omega-3. El consumir alimentos ricos en omega-3 es muy beneficioso para la salud, puesto que disminuye el colesterol (*low density lipoprotein*, LDL) en la sangre, previene la formación de coágulos en las arterias, ayuda a disminuir la presión arterial, etc. (Ceballos *et al.*, 2011). Sin embargo, el aceite de linaza es todavía muy poco utilizado para la alimentación debido a que su alto grado de insaturación lo hace sea susceptible a reacciones de oxidación. Por esta razón, en la presente investigación, se busca aplicar un extracto de componentes fenólicos de la mashua en el aceite de linaza y evaluar su eficacia como antioxidante, con la finalidad de prolongar su tiempo de conservación. Los objetivos de la presente investigación fueron:

#### Objetivo principal

- Evaluar la eficacia antioxidante de un extracto de compuestos fenólicos de la mashua en la estabilidad del aceite de linaza.

#### Objetivos específicos

- Determinar la concentración que asegura la mayor estabilidad del aceite de linaza mediante calorimetría de barrido diferencial (CBD) a 120 °C.
- Evaluar la eficacia antioxidante del extracto de mashua en el aceite de linaza sometido a pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C, a través de las evaluaciones de índice de peróxido, *p*-anisidina, dienos conjugados y perfil de ácidos grasos.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. SEMILLA DE LINAZA**

#### **2.1.1. Generalidades**

La linaza corresponde a la semilla del lino (*Linum usitatissimum* L.) y se ha utilizado tradicionalmente como oleaginosa. La semilla posee de cuatro a seis mm de longitud, aplanada, de forma oval y con un extremo aguzado. La cubierta de la semilla es de apariencia suave y brillante y su color puede variar entre marrón oscuro y amarillo claro. El peso de 1,000 semillas es de cinco  $\pm$  un gramo y su peso del hectolitro fluctúa entre 55 y 70 kg (Figuerola *et al.*, 2008).

#### **2.1.2. Composición química y perfil de ácidos grasos**

La linaza es rica en grasas, proteínas y fibra dietética, presentando un 41 % de grasa, 20 % de proteína, fibra dietética total de 28 %, 7.7 % de humedad y 3.4 % de cenizas, según análisis realizado en lino marrón canadiense (Ganorkar y Jain, 2013).

La composición de la linaza puede variar con la genética, ambiente de crecimiento, procesamiento de semillas y método de análisis. El contenido de proteína de la semilla disminuye a medida que aumenta el contenido de aceite. El contenido de aceite de linaza puede ser alterada a través de métodos tradicionales de fitomejoramiento y se ve afectada por la geografía (Ganorkar y Jain, 2013).

En el Cuadro 1 se muestra el perfil de ácidos grasos del aceite de linaza, mediante cromatografía de gases, según diversas investigaciones:

**Cuadro 1: Composición de ácidos grasos del aceite de linaza (%)**

Ácidos grasos	El-Beltagi <i>et al.</i> (2007)	Hamed y Abo-Elwafa (2012)	Popa <i>et al.</i> (2012)	Guillén <i>et al.</i> (var. 1) (2003)	Guillén <i>et al.</i> (var. 2) (2003)
Ácido mirístico C14:0	0.7	-	-	-	-
Ácido palmítico C16:0	7.1	5.1	6.6	-	-
Ácido esteárico C18:0	3.7	4.8	4.4	-	-
Ácido oleico C18:1	22.0	17.0	18.5	21.7	19.2
Ácido linoleico C18:2	18.3	15.0	17.3	14.2	14.8
Ácido linolénico C18:3	48.2	58.1	53.2	57.8	58.3
AG saturados	11.5	9.9	11.0	6.2	7.7
AG monoinsaturados	22.0	17.0	18.5	21.7	19.2
AG poliinsaturados	66.5	73.1	70.5	72.0	73.1
AG insaturados	88.5	90.1	89.0	93.7	92.3
Ratio $\omega$ -6/ $\omega$ -3	0.38	0.26	0.32	0.25	0.25

### 2.1.3. El ácido alfa linolénico (ALA) en el aceite de linaza

En el aceite de linaza, hay dos grupos de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA): ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3) y omega-6 ( $\omega$ -6). El ácido linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) son tres tipos de ácidos grasos omega-3 y son nutricionalmente importantes. Los tres ácidos grasos han demostrado reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Hurteau, 2004 citado por Ganorkar y Jain, 2013).

Los seres humanos pueden usar el ALA para sintetizar el EPA, fuente de eicosanoides anti-inflamatorios. Los eicosanoides son compuestos implicados en el equilibrio y el control de la inflamación y la inmunidad. Nuevas investigaciones sugieren que el EPA podría influir en las vías de señalización celular, reduciendo el crecimiento del cáncer. Por el contrario, el ácido linoleico (LA) conduce a la producción de eicosanoides pro-inflamatorios; estudios *in vitro* y en animales sugieren que podría aumentar la proliferación de células cancerosas y la angiogénesis (Collins, 2010).

Al considerar el impacto del  $\omega$ -3 sobre el cáncer, es importante tener en cuenta que los efectos observados con una determinada cantidad de EPA y DHA no se deben esperar de una cantidad igual de ALA. La conversión de ALA a DHA es particularmente ineficiente, estimada en menos del 4 % en los hombres y hasta un 9 % en las mujeres en edad

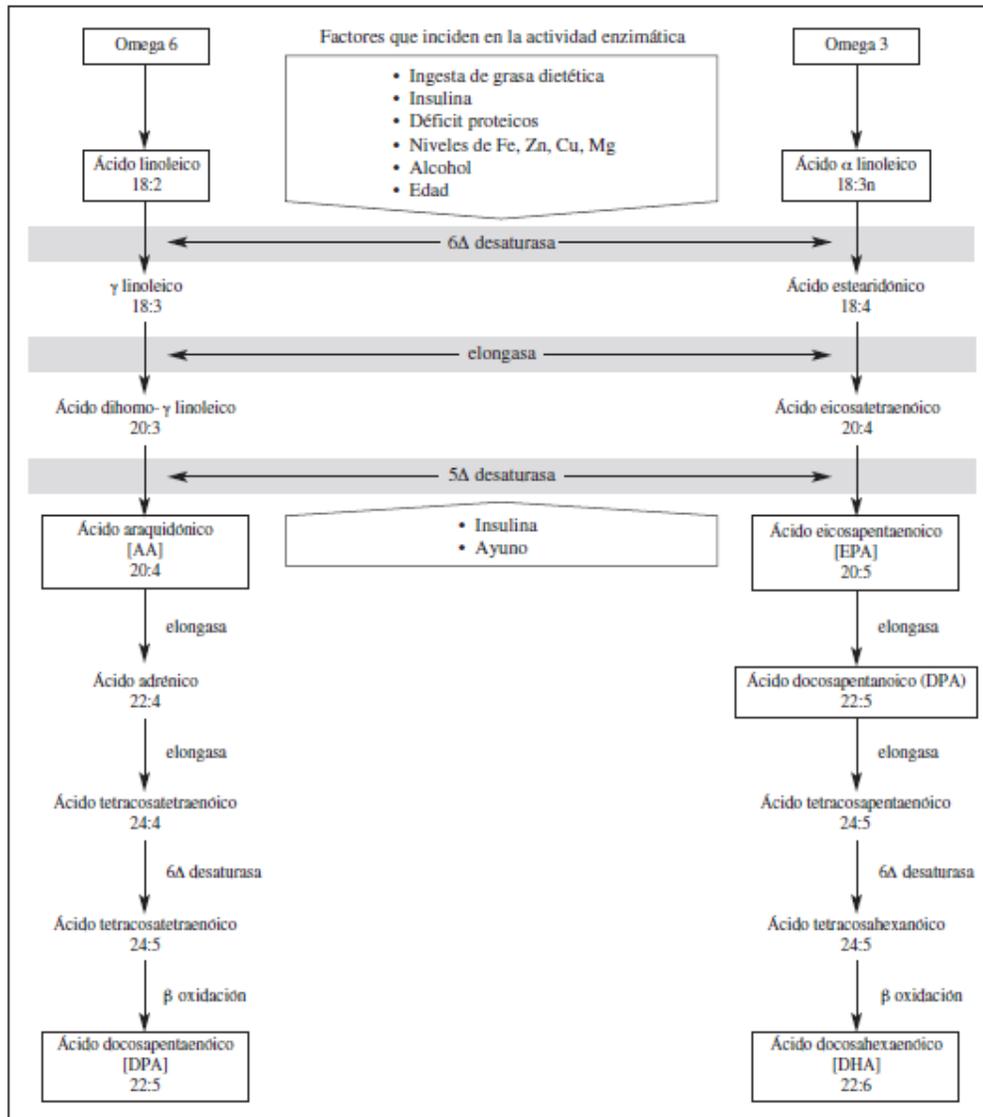
reproductiva. Las estimaciones de la conversión de ALA a EPA, la fuente de compuestos anti-inflamatorios y otros compuestos potencialmente inhibidores de cáncer, están en un intervalo de 0.3 a 8 % en los hombres y hasta un 21 % en las mujeres en edad fértil (Collins, 2010).

La conversión de ALA a EPA en el cuerpo es limitada, pero puede ser fisiológica y clínicamente importante. Varios factores influyen en la conversión a EPA. Se cree que el LA disminuye la conversión de ALA a los ácidos grasos omega-3 de cadena larga, al competir con ALA por la enzima limitante de la velocidad, la  $\Delta$ -6 desaturasa (Figura 1). Además, otros factores dietéticos como la proporción de ácidos grasos poliinsaturados / saturados, la cantidad de EPA dietética y ácidos grasos *trans* consumidos y la cantidad y el tipo de proteína consumida han sido implicados en afectar esta conversión. La eficiencia con la que se produce esta conversión y los factores que pueden modificarla podrían tener importantes implicaciones para la salud pública (Harper *et al.*, 2006).

Ganorkar y Jain (2013) resumen las recomendaciones de las principales organizaciones de salud en relación con la proporción adecuada de ingesta de omega-6 y omega-3. La mayoría de las organizaciones está de acuerdo en que se prefiere una relación de ácidos grasos omega-6/omega-3 de 5:1 – 10:1 (Institute of Medicine, 2002 y OMS / FAO, 2003 citados por Ganorkar y Jain, 2013). Sin embargo, una dieta típica tiene una relación de ácidos grasos omega-6/omega-3 más allá de 10:1; por lo tanto, la linaza puede ser una fuente de lípidos valiosa para mejorar la relación de ácidos grasos omega-6/omega-3 debido al alto contenido de omega-3 del aceite de linaza, presentando una relación de 0.25.

La linaza contiene una mezcla de ácidos grasos. Es rico en PUFA, particularmente ALA, el ácido graso esencial omega-3, y el ácido linoleico (LA), el ácido graso esencial omega-6. Estos dos ácidos grasos poliinsaturados son esenciales para los seres humanos, es decir, el cuerpo los necesita (Ganorkar y Jain, 2013).

El ALA de la linaza ejerce un efecto positivo sobre los lípidos sanguíneos. Se encontró que fue tan eficaz como el ácido oleico y ácido linoleico en la reducción de colesterol total en plasma, de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en hombres sanos de 20-34 años (Ganorkar y Jain, 2013).



**Figura 1: Metabolismo del ácido linoleico y ácido linolénico**

FUENTE: Sanz *et al.* (2012)

Oomah (2001) presenta una revisión de estudios clínicos en los que se utilizó aceite de linaza. A continuación se mencionan las conclusiones de algunos de ellos:

- Un incremento del ALA dietético elevó las concentraciones de EPA en los tejidos.
- Dietas altas en aceite de linaza y bajas en ácido linoleico elevó la concentración de EPA en plasma en un factor de 2.5, similar a lo que se obtiene con una suplementación de aceite de pescado.

- El uso de aceite de linaza en la preparación de comida casera inhibió la producción de interleucina en un 30 % y del factor de necrosis tumoral en un 74 %.
- Las funciones arteriales mejoraron en 15 personas obesas con una dieta alta en ALA y baja en grasa (20 g de productos con margarina a base de aceite de linaza).

Por otro lado, Ganorkar y Jain (2013) citan una serie de estudios realizados en animales. Estas son algunas conclusiones:

- El aceite de linaza o mezclas de aceite de linaza y de girasol promovieron la reducción de colesterol en ratas hipercolesterolémicas.
- El aceite de linaza podría ser responsable de la prevención de carcinogénesis de colon en ratones.
- El aceite de linaza previno el desarrollo de tumores en el colon en ratas.

## **2.2. OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS**

La oxidación de los lípidos es una de las causas principales del deterioro de los alimentos. Produce profundas preocupaciones económicas en la industria alimentaria porque da lugar a la aparición de sabores y olores anómalos, en los alimentos que contienen grasas. Las reacciones oxidativas rebajan además la calidad nutritiva del alimento y generan ciertos productos de oxidación potencialmente tóxicos (Fennema, 2000).

Recibe también el nombre de autooxidación, pues es un mecanismo que genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran la reacción (Badui, 1990).

### **2.2.1. Factores que influyen en la oxidación**

La oxidación de un aceite se ve influido por la composición de ácidos grasos del aceite, procesamiento del aceite, la energía de calor o la luz, la concentración y el tipo de oxígeno, y los ácidos grasos libres, mono y diacilgliceroles, metales de transición, peróxidos, compuestos oxidados térmicamente, pigmentos y antioxidantes. Estos factores afectan de forma interactiva la oxidación del aceite y no es fácil de diferenciar el efecto individual de los factores (Choe y Min, 2006). En las siguientes líneas se desarrolla cada factor:

### **a. Composición de ácidos grasos**

La autooxidación se favorece a medida que se incrementa la concentración de ácidos grasos insaturados (o el índice de yodo). Esto se ha comprobado en sistemas modelos de ésteres metílicos de los ácidos esteárico, oleico, linoleico y linolénico. Los más insaturados necesitan menos tiempo para absorber la misma cantidad de gas y por consiguiente, se oxidan más rápido (Badui, 1990). Por ejemplo, las velocidades de oxidación del éster de metilo del ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico se comportan con una proporción 1:12:24 (Baltes, 2006).

### **b. Procesamiento**

El método de procesamiento del aceite afecta a su estabilidad oxidativa. El aceite de soja crudo fue el más estable a la oxidación seguida del aceite desodorizado, desgomado, refinado y blanqueado durante 6 días de almacenamiento a 55 °C en la oscuridad. La alta estabilidad oxidativa del aceite crudo a comparación del aceite refinado se pudo haber debido en parte a una mayor concentración de tocoferoles en el aceite crudo (1,670 ppm) que en el aceite refinado (1,546 ppm). El tiempo de inducción de la oxidación del aceite de colza extraído con hexano a 90 °C fue de  $10.5 \pm 1.9$  h, en comparación con un tiempo de inducción de  $8.1 \pm 0.7$  h para el aceite de colza prensado. El tostado de semillas de cártamo y ajonjolí antes de la extracción del aceite mejoró su estabilidad oxidativa, en parte debido a los productos de Maillard producidos durante el tostado. Algunos productos de la reacción de Maillard se reportaron ser antioxidantes. La estabilidad oxidativa aumentó a medida que las temperaturas de tostado y extracción de las semillas aumentaron (Choe y Min, 2006).

### **c. Temperatura**

Las altas temperaturas aceleran la autooxidación especialmente por encima de 60 °C, de tal manera que la velocidad se duplica por cada 15 °C de aumento; cabe aclarar que la refrigeración y aun la congelación no necesariamente la inhiben ya que la presencia de catalizadores y la disponibilidad de los reactivos puede provocar que se lleve a cabo en estas condiciones (Badui, 1990).

#### **d. Oxígeno**

La oxidación del aceite aumenta con la cantidad de oxígeno disuelto, la cual aumenta con la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza. La velocidad de oxidación también depende del tipo de oxígeno: la velocidad de reacción del oxígeno singulete con los lípidos es mucho más alta que del oxígeno triplete, ya que el primero reacciona directamente con los lípidos (Choe y Min, 2006).

#### **e. Área superficial**

La velocidad de oxidación aumenta en proporción directa al área superficial del lípido expuesta al aire. Además, a medida que aumenta el cociente superficie – volumen, va disminuyendo la influencia de la presión parcial de oxígeno en la velocidad de la reacción (Fennema, 2000).

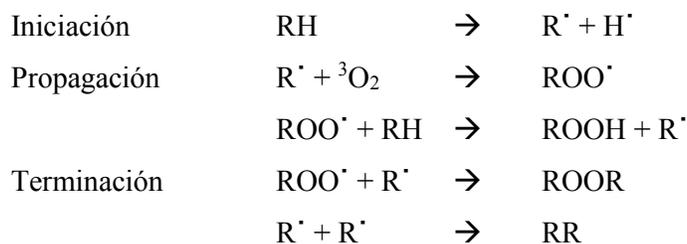
#### **f. Componentes minoritarios**

Por un lado se encuentran los ácidos grasos libres, mono y diacilglicerolos, metales, clorofila, componentes oxidados térmicamente, que actúan como pro-oxidantes; y por otro lado, tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, componentes fenólicos y esteroides, que actúan como antioxidantes. Los fosfolípidos podrían actuar como pro-oxidantes y antioxidantes, dependiendo de la concentración en la que se encuentren (Choe y Min, 2006).

### **2.2.2. Mecanismos de oxidación**

En los alimentos, las reacciones oxidativas de los lípidos son extremadamente complejas, por lo que se han utilizado modelos más simples, como el oleato, el linoleato y el linolenato para la clarificación de rutas y mecanismos. Aunque se han obtenido así informaciones útiles, su extrapolación a los complejos sistemas lipídicos constituidos por los alimentos exige gran cautela (Fennema, 2000).

La autooxidación de los lípidos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres (Alberto, 1997) e incluye las fases de iniciación, propagación y terminación (Choe y Min, 2006).



R: grupo alquilo

Como un ejemplo, en la Figura 2 se muestra el mecanismo de oxidación del ácido linoleico con oxígeno triplete.

#### a. Iniciación

En este primer paso, se presenta una abstracción de átomos de hidrógeno que puede ser un hidrógeno alílico de un ácido graso o cualquier otro hidrógeno que se encuentre débilmente enlazado cerca de una insaturación, dando lugar a un nuevo radical. Estos hidrógenos metilénicos ( $CH_2$ ) están activados por la vecindad de los dobles enlaces y son más reactivos que los otros, razón por la cual, los compuestos poliinsaturados de las grasas se oxidan más rápido que los saturados, en quienes únicamente sucede la oxidación cuando las condiciones son muy fuertes (Castillo, 2007).

Como la reacción " $RH + O_2 \rightarrow$  radicales libres" es termodinámicamente difícil (energía de activación: alrededor de 35 kcal o 146 kJ/mol), la producción de los primeros radicales libres necesarios para iniciar la reacción de propagación tiene que ser catalizada. Se ha propuesto que la etapa de iniciación puede producirse por descomposición de un hidroperóxido, mediante catálisis por metales o por exposición a la luz. Más recientemente, se ha postulado que la especie activa implicada es el oxígeno singulete (Fennema, 2000).

El oxígeno en su estado normal de triplete ( ${}^3O_2$ ) (sus dos electrones más externos tienen un spin igual) es muy poco electrófilo y por sí solo no actúa sobre los dobles enlaces; sin



libres  $R^{\cdot}$ . A continuación, se fija oxígeno en estas posiciones, dando lugar a la producción de radicales peroxi  $ROO^{\cdot}$ , que a su vez extraen átomos de hidrógeno de los grupos  $\alpha$  - metilénicos de otras moléculas (RH), para dar hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales libres ( $R^{\cdot}$ ). Los nuevos radicales  $R^{\cdot}$  reaccionan con el oxígeno y la secuencia de reacciones descritas se repite (Fennema, 2000). La secuencia de la reacción va generalmente acompañada de un desplazamiento de la posición de los dobles enlaces de los ácidos grasos, debido a la estabilización por resonancia de las especies  $R^{\cdot}$ , lo que conduce a la formación de hidroperóxidos isoméricos, que frecuentemente tienen grupos dieno conjugados (atípicos en los acilgliceroles naturales no oxidados) (Fennema, 2000).

### **c. Terminación**

El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación, en las cuales hay consumo de los radicales. Las interacciones bimoleculares de radicales libres originan productos no-radicales muy estables (Alberto, 1997).

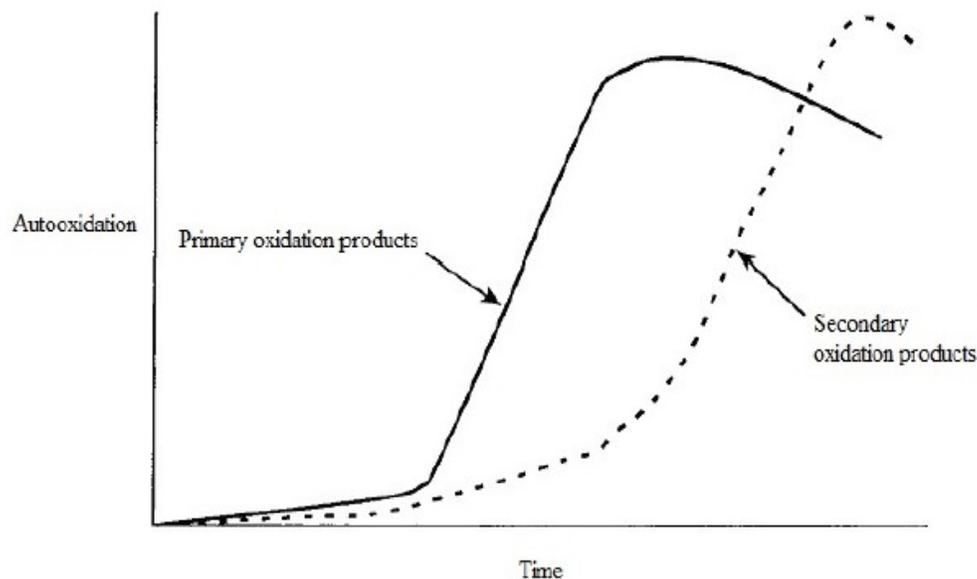
Los radicales formados pueden terminar la reacción por acoplamiento con otros radicales o por la incorporación al sistema graso de un antioxidante, el cual actúa como un atrapador de radicales libres, finalizando de esta manera la fase de propagación. Otra forma de finalizar el proceso de autooxidación es la reestructuración y la ciclación de los radicales peróxidos formando especies relativamente estables, no iniciadoras y no propagadoras, como compuestos volátiles y no volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, etc.) que, por posteriores autooxidaciones, se transforman en los polímeros y otros productos característicos de un sistema lipídico oxidado (Niki *et al.*, 2005 y Bermúdez, 2003 citados por Castillo, 2007).

#### **2.2.3. Cinética y productos de la oxidación lipídica**

En la oxidación de lípidos, el proceso de oxidación generalmente muestra una fase de retardo seguido por un aumento exponencial en la tasa de oxidación. Durante la fase de retardo, la oxidación es relativamente lenta y a un ritmo constante. Una vez alcanzada la fase exponencial, los productos de descomposición de los ácidos grasos se forman rápidamente (Norveel, 2012).

Los hidroperóxidos son los principales productos de oxidación primaria, acumulándose durante la etapa de iniciación y propagación del proceso de oxidación. El tiempo para alcanzar el nivel máximo de hidroperóxidos en el proceso de oxidación está relacionado con el grado de saturación, y se produce más tempranamente en los lípidos altamente insaturados porque sus hidroperóxidos se descomponen más fácilmente. Después de que se ha alcanzado el nivel máximo de hidroperóxidos, teóricamente se verá una caída en hidroperóxidos conforme se descomponen en una variedad de productos de oxidación secundarios (Norveel, 2012).

La caída de hidroperóxidos se observa cuando la velocidad de descomposición en productos secundarios supera la tasa de formación. En teoría, esto significa que los productos de oxidación primaria dominarán en la etapa temprana y los productos de oxidación secundaria dominarán en etapas posteriores del proceso de oxidación (Norveel, 2012). Este esquema se ilustra en la Figura 3.



**Figura 3: Desarrollo teórico de los productos de oxidación primaria y secundaria en función del tiempo de la oxidación lipídica**

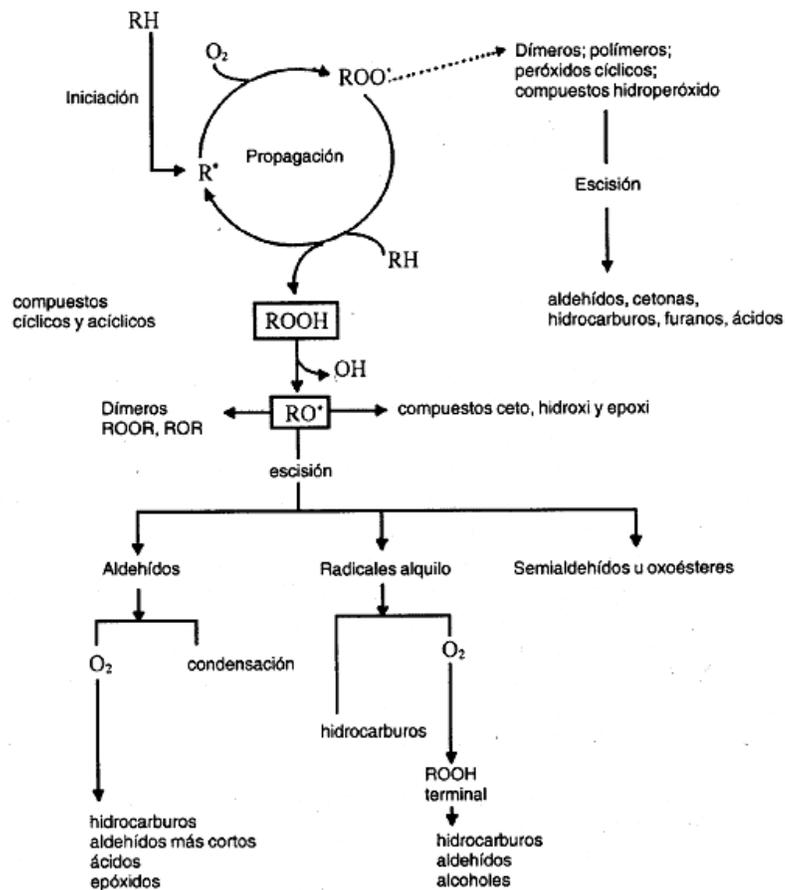
FUENTE: Norveel (2012)

Los hidroperóxidos, productos primarios de la autooxidación lipídica, son relativamente inestables. Participan en numerosas y complejas reacciones de degradación e interacción

que generan miríadas de compuestos de distintos pesos moleculares, variados umbrales de percepción y diferente significado biológico (Fennema, 2000).

La mayoría de los productos de descomposición de hidroperóxidos es responsable de los aromas extraños en el aceite oxidado. Los compuestos carbonílicos alifáticos tienen más influencia en dicho aroma debido a sus bajos valores de umbral (Choe y Min, 2006).

La Figura 4 constituye un esquema de la reacción global de autooxidación lipídica.



**Figura 4: Esquema general de la autooxidación de los lípidos**

FUENTE: Fennema (2000)

### 2.3. MÉTODOS PARA EVALUAR LA OXIDACIÓN DE ACEITES

Numerosos métodos de análisis se utilizan rutinariamente para medir la oxidación de lípidos en los alimentos. Sin embargo, no hay un método uniforme y estándar para la

detección de todos los cambios oxidativos en todos los sistemas de alimentos. Por lo tanto, es necesario seleccionar un método apropiado y adecuado para una aplicación particular. Los métodos disponibles para monitorear la oxidación de lípidos en los alimentos se pueden clasificar en cinco grupos en función de lo que miden: la absorción de oxígeno, la pérdida de los sustratos iniciales, la formación de radicales libres y la formación de productos de oxidación primarias (hidroperóxidos) y secundarias (aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y compuestos epoxi) (Shahidi, 2005).

- Absorción de oxígeno: ganancia de peso, consumo de oxígeno en espacio de cabeza
- Pérdida de sustratos iniciales: composición de ácidos grasos
- Formación de productos de oxidación primaria: índice de peróxidos, dienos y trienos conjugados
- Formación de productos de oxidación secundaria: test del ácido tiobarbitúrico, índice de *p*-anisidina, índice Totox, carbonilos, índice de estabilidad del aceite (OSI), hidrocarburos y ensayo de fluorescencia
- Formación de radicales libres: resonancia de spin electrónico (ESR)
- Otros métodos: calorimetría de barrido diferencial (DSC), resonancia magnética nuclear (NMR), evaluación sensorial

Existe una gran cantidad de métodos para evaluar la oxidación de los aceites. A continuación se explicarán las que fueron utilizadas en la presente investigación:

### **2.3.1. Composición de ácidos grasos**

La oxidación de lípidos también se puede evaluar mediante la medición cuantitativa de la pérdida de los sustratos iniciales. En los alimentos que contienen grasas o aceites, los ácidos grasos insaturados son los principales compuestos cuya composición cambia de manera significativa durante la oxidación. Los cambios en la composición de ácidos grasos proporcionan una medida indirecta de la medida de la oxidación de lípidos (Shahidi, 2005).

Normalmente, esta determinación se realiza mediante cromatografía de gases, previa interesterificación de los triglicéridos con el fin de obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Los ácidos libres presentan una polaridad excesiva que comportaría una elución demasiado lenta o incluso nula (Codony *et al.*, 2010).

La medición de los cambios en la composición de ácidos grasos es útil para la identificación de los ácidos grasos que están implicados en las reacciones de oxidación (Shahidi, 2005).

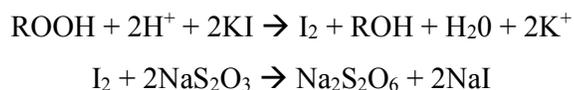
Es una manera insensible de evaluar el deterioro oxidativo. Como comparación, la oxidación del 0.4 % de ácidos grasos poliinsaturados a hidroperóxidos representaría un cambio de 16 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite en el índice de peróxido. Además, la aplicación de este método es limitada debido a su incapacidad para servir como un indicador de la oxidación de los lípidos más saturados. Sin embargo, su utilidad para medir la oxidación de los aceites altamente insaturados no puede ser subestimada (Shahidi, 2005).

En algunos casos se observan disminuciones superiores al 25 % en ácidos grasos poliinsaturados, por lo que algunos autores lo proponen como un índice muy sensible, especialmente para aceites con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Castillo, 2007).

### **2.3.2. Índice de peróxidos**

Es el método clásico para medir la oxidación de las grasas y aceites. Mediante este método se mide la concentración de los intermedios inestables, formados en la primera fase del proceso de oxidación, que posteriormente se descomponen para dar los compuestos secundarios de oxidación (Castillo, 2007).

El ensayo de valoración yodométrica, que se basa en la oxidación del ion yoduro (I<sup>-</sup>) por hidroperóxidos (ROOH), es la base de los métodos estándar actuales para la determinación del índice de peróxidos (PV). En este método, se añade una solución saturada de yoduro de potasio a las muestras de aceite para que reaccionen con los hidroperóxidos. El yodo liberado (I<sub>2</sub>) se valora luego con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio y se utiliza el almidón como indicador de punto final. El PV se obtiene por cálculo y se expresa como miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra (meq/kg). Las reacciones químicas que intervienen se dan a continuación (Shahidi, 2005):



A pesar de su gran aplicación, es un método que presenta una serie de dificultades que pueden conducir a resultados poco exactos y/o reproducibles. La primera es la escasa solubilidad del yoduro en cloroformo, lo que hace necesaria una continua y enérgica agitación durante toda la valoración para favorecer el contacto entre fase acuosa y orgánica. En relación con esta cuestión, el oxígeno en contacto con el yoduro se renueva de forma eficaz con la agitación, lo que puede provocar su oxidación, dando errores por exceso en la medida de los peróxidos. Otras fuentes de error son, la acción catalítica de la luz sobre la oxidación del yoduro, y la fijación de yodo por los dobles enlaces en grasas muy insaturadas. Así mismo, la reacción de oxidación del yoduro no es muy rápida, lo que puede provocar una imprecisión en la observación del punto final. Finalmente, la sensibilidad de la reacción no es muy grande (0.5 meq O<sub>2</sub>/ kg grasa). Todo ello, ha llevado a intentar introducir modificaciones que permitan hacer la medida más exacta y precisa (Codony *et al.*, 2010).

### **2.3.3. Dienos conjugados**

La formación del hidroperóxido en la cadena de un ácido graso poliinsaturado genera el desplazamiento de un doble enlace hacia el carbono del grupo metilénico anexo, con la consecuente formación de un dieno conjugado (Codony *et al.*, 2010).

Los dienos conjugados absorben luz ultravioleta con más intensidad que los dienos no conjugados (Castillo, 2007); por ello, la medida de la absorbancia al UV a 234 nm (correspondiente a dichos dienos conjugados) es, por lo tanto, un buen parámetro para evaluar el proceso oxidativo inicial de una grasa (Codony *et al.*, 2010). Se han obtenido buenas correlaciones entre dienos conjugados e índice de peróxidos (Shahidi, 2005).

El método es considerado muy simple y requiere equipos disponibles en la mayoría de los laboratorios. El método no depende de una reacción química o desarrollo de color y requiere cantidades relativamente pequeñas de muestra. La medición de dienos conjugados es un método sensible para seguir las primeras etapas del proceso de la oxidación, sin embargo en etapas posteriores, los productos de oxidación secundarios formados se superponen en el mismo rango de detección UV. Una limitación del método es la fuerte dependencia de la composición de los ácidos grasos en la muestra a ser investigada. Los aceites que contienen alta cantidad de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) tendrán un

aumento más rápido en dienos conjugados en comparación con los aceites con menos PUFA. En consecuencia, el método no puede ser utilizado para comparar la oxidación en aceites con diferente composición de ácidos grasos. Además, el método sólo es útil para la medición de los cambios en los aceites que contienen cantidades sustanciales de linoleato o ácidos grasos más altamente insaturados porque los sistemas de dieno se producen a partir de la abstracción de hidrógeno en ácidos grasos insaturados (Norveel, 2012).

#### **2.3.4. Índice de *p*-anisidina**

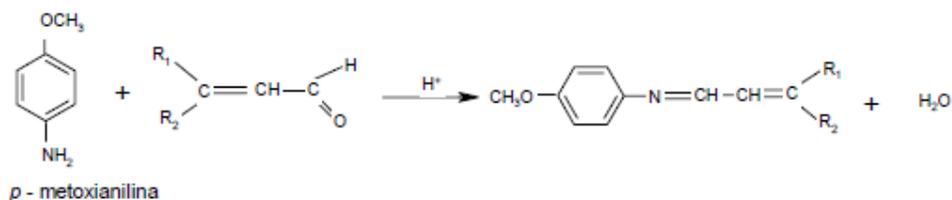
En presencia de ácido acético, la *p*-anisidina reacciona con los aldehídos produciendo un color amarillento. El coeficiente de extinción molar a 350 nm aumenta si el aldehído contiene un doble enlace; por ello este índice constituye fundamentalmente una medida de los 2-alquenas (Fennema, 2000).

La reacción no incluye el uso de ácidos fuertes o de alta temperatura y por lo tanto una ventaja del método es la mínima influencia sobre la descomposición del hidroperóxido. La principal limitación de este método es la baja sensibilidad. Otras limitaciones son el requisito de reactivos libres de agua ya que las reacciones no se completan totalmente en presencia de agua y que los reactivos deben ser libres de carbonilo para evitar la interferencia con carbonilos existentes en la muestra (Norveel, 2012).

Como el máximo de absorbancia se da a longitudes de onda más largas conforme aumenta la insaturación y como la intensidad del color es mayor con los dienes conjugados que con los 2-alquenas, el máximo de absorción varía de un aceite a otro. El valor de anisidina (AV) obtenido es sólo comparable dentro de cada tipo de aceite (Yildirim, 2009). Por ejemplo, los aceites con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados pueden tener un mayor AV incluso estando frescos (Shahidi, 2005).

Algunos autores sostienen que una ventaja de la medición de los productos secundarios de oxidación es la buena correlación con el análisis sensorial, ya que los compuestos medidos son la causa directa de los aromas extraños (Norveel, 2012). Se ha encontrado una correlación altamente significativa entre el índice de *p*-anisidina y las puntuaciones de sabor e índice de peróxido (Shahidi, 2005).

En la Figura 5 se muestra la reacción de los compuestos aldehídicos con el reactivo *p*-anisidina.



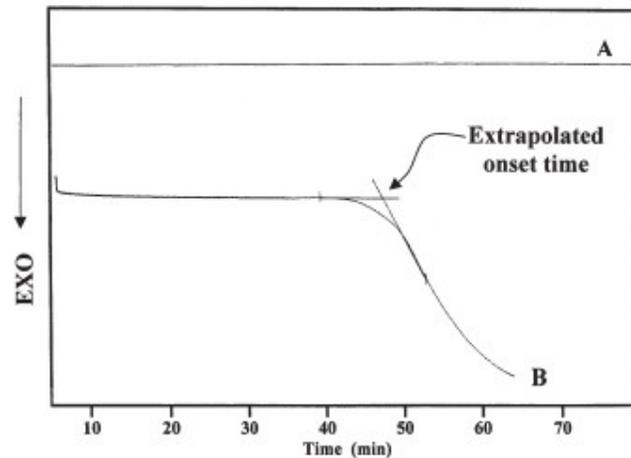
**Figura 5: Reacción de los compuestos aldehídicos con el reactivo *p*-anisidina**

FUENTE: Castillo (2007)

### 2.3.5. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Debido a que la oxidación y la descomposición térmica-oxidativa de los aceites y grasas son reacciones exotérmicas, los cambios entálpicos por calorimetría o por análisis térmico pueden ser aplicados para determinar la estabilidad oxidativa o la resistencia térmica-oxidativa de materiales grasientos (Pardauil *et al.*, 2011). El DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) es la técnica de análisis térmico más utilizado para los aceites y grasas (Tan *et al.*, 2001).

Este análisis proporciona información del perfil de energía único, que mide específicamente la temperatura y los flujos de calor asociados con la oxidación de los lípidos como una función del tiempo y la temperatura. El método utiliza condiciones isotérmicas o no isotérmicas y un flujo de oxígeno como gas de purga, con un calorímetro que mide el flujo de calor hacia (endotérmico) o desde (exotérmico) una muestra de aceite sometida a cambios oxidativos. Las curvas de oxidación de la muestra se obtienen con diferentes tiempos de calentamiento y se puede observar un aumento dramático del calor desprendido por la aparición de una curva exotérmica fuerte durante el inicio de la oxidación. El punto final se toma en el momento en que se produce una rápida reacción exotérmica entre el aceite y el oxígeno y el periodo de inducción (PI) es determinado automáticamente por la intersección de la línea de base extrapolada y la línea tangente de la reacción exotérmica (Shahidi, 2005). Esta determinación se muestra en la Figura 6.



**Figura 6: Termograma de una muestra bajo nitrógeno (A) y de una muestra bajo oxígeno (B)**

FUENTE: Tan *et al.* (2001)

Los resultados de DSC muestran excelentes correlaciones con otros métodos acelerados y análisis químicos (Shahidi, 2005). En comparación con los métodos convencionales, estos métodos son más ventajosas debido a que son más precisos y sensibles, requieren menos muestra y producen resultados rápidamente (Pardauil *et al.*, 2011).

## 2.4. LOS ANTIOXIDANTES

En un sistema biológico, un antioxidante puede ser definido como “cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, podría retrasar significativamente o prevenir la oxidación del sustrato”. Sin embargo, los organismos reguladores que vigilan el suministro de alimentos, como la FDA, categorizan a los antioxidantes como aditivos alimentarios y los definen como “sustancias utilizadas para conservar los alimentos, retardando el deterioro, la rancidez o la decoloración debido a la oxidación” (Shahidi, 2005).

### 2.4.1. Clasificación

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 (Sánchez, 2012).

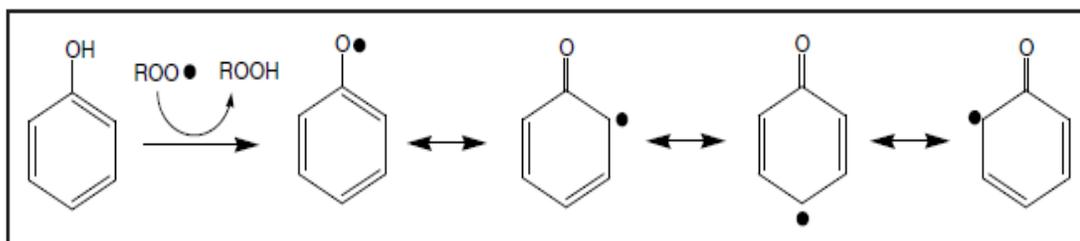
Los antioxidantes primarios incluyen a los compuestos fenólicos y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete (Gordon, 2001 citado por Zapata *et al.*, 2007).

### a. Antioxidante primario

El antioxidante primario, es conocido también como tipo 1, 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 (Shahidi, 2005). Los antioxidantes eliminan los radicales libres, tales como los radicales alquilo o radicales peróxido de los lípidos (Choe y Min, 2006).

En la autooxidación lipídica un radical intermedio ( $ROO\cdot$ ) se estabiliza cuando una molécula antioxidante (AH) dona un átomo de hidrógeno. El radical libre antioxidante ( $A\cdot$ ) se estabiliza mediante resonancia (Figura 7) y es, en consecuencia, insuficientemente reactivo para propagar la secuencia de autooxidación. Los radicales antioxidantes reaccionan entre sí (A-A) para terminar el proceso (Sánchez, 2012).

La eficacia antioxidante está influenciada por las propiedades químicas del compuesto, incluyendo la energía de los enlaces de hidrógeno, la resonancia y la susceptibilidad a la autooxidación. El requisito inicial es la capacidad del antioxidante primario de donar un átomo de hidrógeno al radical libre (Shahidi, 2005).



**Figura 7: Estabilización por resonancia de un radical antioxidante**

FUENTE: Choe y Min (2006)

Los antioxidantes primarios son mono o polihidroxi fenoles 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. Los antioxidantes primarios más comunes son de carácter sintético, aunque también existen componentes naturales que actúan como tales (Sánchez, 2012). En el Cuadro 2 se exponen algunos ejemplos de los antioxidantes primarios de uso en alimentos.

**Cuadro 2: Antioxidantes primarios usados comúnmente en los alimentos**

Naturales	Sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carotenoides</li> <li>- Flavonoides</li> <li>- Ácidos fenólicos</li> <li>- Tocoferoles y tocotrienoles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Butilhidroxianisol (BHA)</li> <li>- Butilhidroxitolueno (BHT)</li> <li>- Etoxiquina</li> <li>- Propilgalato (PG)</li> <li>- Terbutilhidroxiquinona (TBHQ)</li> </ul>

FUENTE: Shahidi (2005)

**b. Antioxidante secundario**

Los 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 quelatar el metal prooxidante y desactivarlo, además de que entrega hidrógeno al hidroperóxido sin que se forme una especie radical, desactiva el oxígeno singulete, 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, ascorbil palmitato, lecitina y ácido tartárico (Sánchez, 2012).

Agentes quelantes: quelantes de metales tales como el ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido ascórbico y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) disminuyen la oxidación del aceite de una manera indirecta. Pueden convertir los iones de hierro o de cobre en complejos insolubles o pueden obstaculizar la formación de los complejos entre metales y los hidroperóxidos lipídicos (Choe y Min, 2006).

Eliminadores de oxígeno: Como el oxígeno es esencial y es uno de los reactivos en el proceso de autooxidación, la eliminación de las especies moleculares de oxígeno es una forma de proporcionar actividad antioxidante. El ácido ascórbico actúa como un agente reductor y como un eliminador de oxígeno. Los carotenoides son capaces de inactivar compuestos fotoactivados mediante la absorción de su energía para formar el estado excitado del carotenoide. Luego, el carotenoide en estado excitado vuelve al estado fundamental mediante la transferencia de energía hacia el solvente que lo rodea. Otros compuestos que se encuentran en los alimentos, incluyendo aminoácidos, péptidos, proteínas, compuestos fenólicos, uratos y ascorbatos también pueden atrapar el oxígeno singulete (Shahidi, 2005).

#### **2.4.2. Antioxidantes comúnmente utilizados en los alimentos**

Existen cientos de compuestos, naturales y sintéticos, con propiedades antioxidantes, aunque para su empleo en los alimentos deben cumplir ciertas exigencias, entre ellas la de superar las pruebas de inocuidad (Fennema, 2000).

##### **a. Antioxidantes naturales**

El término alude a aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y los animales y aquéllos que se forman durante la cocción o el procesamiento de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales (Zapata *et al.*, 2007).

Los compuestos provenientes de las plantas cada vez más se han defendido como antioxidantes “naturales y seguros” teniendo en cuenta su existencia en los alimentos que normalmente se consumen. Gran parte del interés en los antioxidantes de origen natural se desarrolla debido a la tendencia a minimizar o evitar el uso de aditivos alimentarios sintéticos (Shahidi, 2005).

Los aceites comestibles naturales tienen en su composición antioxidantes tales como tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, compuestos fenólicos y esteroides. Cuando se

carece de ellos a veces son adicionados para darle una mejor estabilidad oxidativa al aceite (Choe y Min, 2006).

Tocoferoles: Son los antioxidantes más importantes presentes en el aceite. Entre los aceites vegetales, los aceites de soja, colza, girasol y maíz contienen cantidades relativamente altas de tocoferoles. El contenido de tocoferol en aceites se ve afectado por el cultivo, procesamiento, y el almacenamiento del aceite. El proceso de refinación, especialmente la desodorización, reduce el contenido de tocoferol. Los tocoferoles compiten con las grasas y los aceites insaturados por el radical peróxido de los lípidos. El tocoferol (T) dona un hidrógeno al radical peróxido ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) y produce un hidroperóxido lipídico ( $\text{ROOH}$ ) y un radical tocoperóxido ( $\text{T}^{\bullet}$ ). Este último es más estable que el radical peróxido de los lípidos debido a su estructura de resonancia. Esta última instancia ralentiza la tasa de oxidación del aceite en la etapa de propagación de la auto-oxidación (Choe y Min, 2006).

Carotenoides: Son un grupo de tetraterpenoides que constan de unidades isoprenoides. Los enlaces dobles en los carotenoides son formas conjugadas y por lo general se encuentran en su forma trans. El  $\beta$ -caroteno es uno de los carotenoides más estudiados. Los aceites comestibles, especialmente los no refinados, contienen  $\beta$ -caroteno. El  $\beta$ -caroteno puede reducir la velocidad de oxidación del aceite por filtración de la luz, atrapamiento del oxígeno  $^1\text{O}_2$  y eliminación de radicales libres (Choe y Min, 2006).

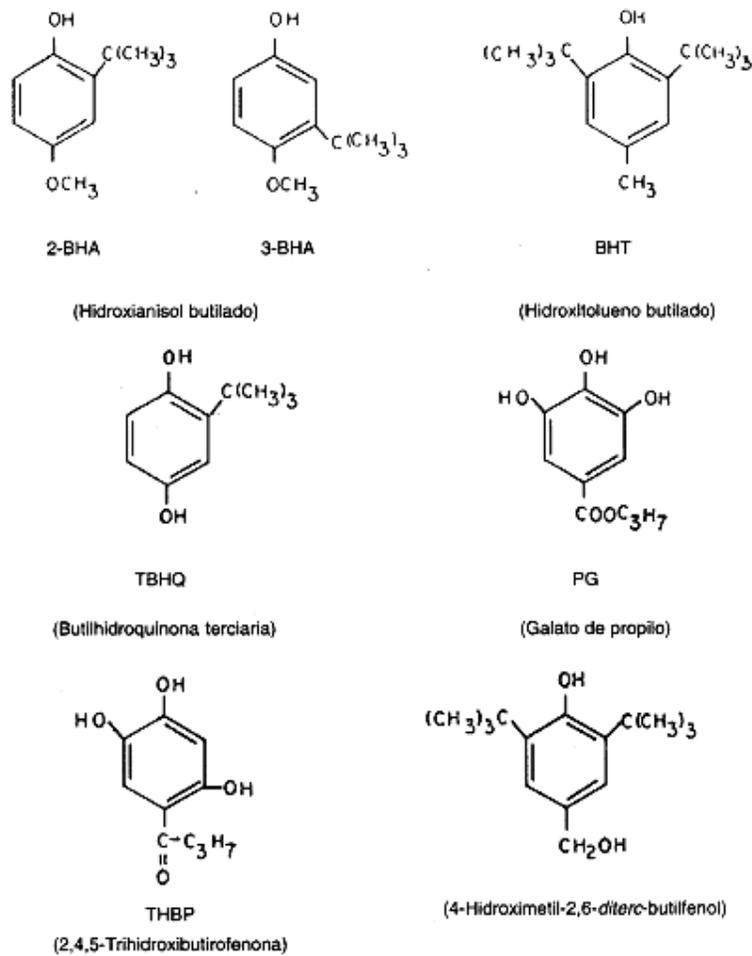
Otros compuestos fenólicos: Existen compuestos fenólicos, aparte de los tocoferoles, que también ejercen actividad antioxidante. La alta estabilidad oxidativa del aceite de ajonjolí es debido a la presencia de lignanos, así como de tocoferoles. El aceite de oliva, que es muy estable a la autooxidación, contiene compuestos fenólicos y tocoferoles. Los compuestos fenólicos en el aceite de oliva incluyen el tirosol, hidroxitirosol, ácido hidroxibenzoico, la oleuropeína, ácido cafeico, ácido vainílico, ácido *p*-cumárico, y derivados de tirosol e hidroxitirosol. El ácido clorogénico y el ácido cafeico son los principales fenoles que se encuentran en el aceite de girasol (Choe y Min, 2006).

#### **b. Antioxidantes sintéticos**

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. Los 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 citado por Sánchez, 2012).

Según Fennema (2000), los principales antioxidantes liposolubles ordinariamente utilizados en los alimentos son fenoles, monohídricos o polihídricos, con diversos sustituyentes en el anillo (Figura 8).



**Figura 8: Principales antioxidantes utilizados por la industria alimentaria**

FUENTE: Fennema (2000)

Según Sánchez (2012), los antioxidantes primarios sintéticos más comunes son el butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), propil galato (PG) y terbutil hidroxiquinona (TBHQ).

El BHA y el BHT son solubles en aceites y muy poco solubles en agua. El BHT se usa para preservar aceites vegetales y grasas animales; el BHA es particularmente útil en proteger el sabor y color de aceites esenciales, especialmente aceite de palma y coco que son muy usados en productos de confitería. El TBHQ, debido a su alto punto de fusión (126 – 128 °C), es muy utilizado para prevenir la oxidación de aceites, en el caso de frituras. El PG, se usa en aceites vegetales, grasas animales, productos cárnicos que contienen salsas y snacks (Alberto, 1997).

## **2.5. LA MASHUA**

### **2.5.1. Generalidades**

La mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) es uno de los tubérculos más importantes después de la papa, olluco y oca; se cultiva en los valles húmedos de la zona andina de Perú, Colombia, Argentina, Ecuador y Bolivia. Aunque ahora puede encontrarse en lugares tan lejanos como Canadá, Europa y Nueva Zelanda (National Research Council, 1989 citado por Cuya, 2009).

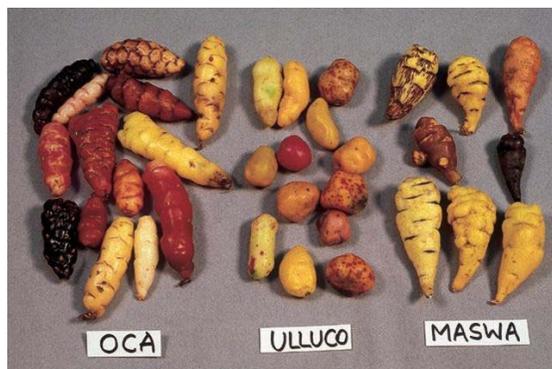
Este cultivo es el menos popular (entre los cuatro mencionados) debido a su sabor amargo causado por la presencia de isotiocianatos liberados por la hidrólisis de los glucosinolatos. Sus principales propiedades están relacionadas con el contenido de glucosinolatos así como el contenido de componentes fenólicos antioxidantes que son importantes para la salud (Chabur, 2012).

En cuanto a su rendimiento, este cultivo presenta una alta productividad, ya que una sola planta alcanza a producir unos 4 kg de tubérculos. En cultivo mixto, se estima un rendimiento de 4 a 12 TM/ha, mientras que en cultivo puro sin manejo se obtiene de 20 a 30 TM/ha y bajo condiciones experimentales se ha logrado hasta 70 TM/ha, el doble de producción de papa, en sistemas similares (Temoche, 2003).

Crece en alturas de 3,000 a 4,000 msnm, pero la planta produce sus mejores cosechas y alto rendimiento entre 3,500 y 3,800 msnm (Cuya, 2009). A pesar de que la mashua normalmente crece en altura, son las condiciones frías (8 – 11 °C) y no la altitud en sí, las que son requeridas por la planta. La cosecha se realiza a los 6 – 9 meses de la siembra (Grau *et al.*, 2003).

En el Perú, la mashua se siembra en los departamentos de Cajamarca, Cerro de Pasco, Ancash, Lima, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, Cusco, Arequipa, Puno y Tacna; con mayor frecuencia en el centro y sur del Perú, estimándose que alrededor de 6,000 hectáreas se siembran anualmente en el Perú (Gómez, 1998).

Pérez (2005) menciona que el consumo de mashua en las zonas de producción se da después de haber sometido la raíz a un proceso de soleado de aproximadamente 10 días. Al respecto, Grau *et al.* (2003) señalan que la práctica generalizada andina de exponer los tubérculos y raíces a la luz solar directa se utiliza también para mashua con el fin de aumentar la dulzura y reducir los niveles de cianuro antes de cocinarlos. En la Figura 9 se puede observar a la oca, el ulluco y la mashua.



**Figura 9: Tubérculos andinos: oca (*Oxalis tuberosa* Molina), ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. & P.)**

FUENTE: Grau *et al.* (2003)

### 2.5.2. Composición química

El contenido de agua de los tubérculos de mashua es comparativamente alta, que van desde 79 hasta 94 % de la materia fresca o comestible. La principal contribución nutricional es su

alto contenido de hidratos de carbono, en particular de almidón, aunque también de azúcares. El contenido de proteína en la materia fresca se acerca a los valores de la papa (Grau *et al.*, 2003). La mashua contiene una cantidad elevada de aminoácidos esenciales como lisina, aminoácido limitante en muchos cereales y leguminosas (Espinoza *et al.*, 2002).

El alto contenido de ácido ascórbico o vitamina C (77.5 mg por 100 g de materia fresca) es nutricionalmente importante también (Grau *et al.*, 2003). Posee niveles altos de calcio, fósforo, hierro y carotenos, en relación con la papa y los otros tubérculos andinos. El contenido de vitamina A es alto en las variedades amarillas (Urresta, 2010).

**Cuadro 3: Composición química de 100 g de mashua (porción comestible)**

Componente	Unidades	Cantidad
Energía	kcal	50
Agua	g	87.4
Proteínas	g	1.5
Grasa	g	0.7
Carbohidratos totales	g	9.8
Fibra cruda	g	0.9
Cenizas	g	0.6
Calcio	mg	12
Fósforo	mg	29
Hierro	mg	1.00
Tiamina	mg	0.10
Riboflavina	mg	0.12
Niacina	mg	0.67
Vitamina C	mg	77.50

FUENTE: Reyes *et al.* (2009)

Como otros *Tropaeolaceae*, la mashua contiene isotiocianatos como los glucosinolatos, componentes similares a este fueron encontrados en otras crucíferas. Los isotiocianatos son también conocidos por sus propiedades antibiótica, insecticida, nematocidal y diurética; que demuestran el uso extensivo de la mashua en la medicina tradicional andina (Grau *et al.*, 2003).

### 2.5.3. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Campos *et al.* (2006) encontraron que los tubérculos de mashua presentaron la mayor actividad antioxidante en comparación con otros cultivos andinos (papas coloreadas, olluco y oca). Por otro lado, Chirinos *et al.* (2007) encontraron que los extractos purificados de dos genotipos de mashua (ARB 5241 y DP 0224) presentaron un alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, lo cual indica que los extractos de mashua pueden ser considerados como una fuente potencial de nutraceuticos a futuro.

Chirinos *et al.* (2006) reportan que el contenido de antocianinas en la mashua morada con código DP 0224 corresponde a  $131.9 \pm 2.5$  mg de CGE/100 g de mashua en base húmeda (b.h), el contenido de fenólicos corresponde a  $275.5 \pm 3.9$  mg GAE/100 g de mashua (b.h), y actividad antioxidante de  $29.6 \pm 0.9$   $\mu\text{mol TE/g}$  de mashua (b.h). Las antocianinas detectadas fueron diez, de las cuales 3 han sido identificadas como: delfinidina-3 glucósido, cianidina-3 glucósido y cianidina-3 rutinósido; las demás antocianinas correspondieron a derivados de las antocianinas: delfinidina y cianidina. El 58.7 % de las antocianinas presentes en las mashua se encuentran aciladas con ácidos alifáticos y el 41.3 % son antocianinas no aciladas.

También, Chirinos *et al.* (2008) identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos no antocianínicos. Los compuestos encontrados en los diferentes genotipos fueron: ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, derivados de epigalocatequina y procianidina B<sub>2</sub>, diferentes derivados de ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico y derivados de miricetina y/o rutina. Las proantocianidinas contribuyeron significativamente a la actividad antioxidante total, pero otros compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, monómeros de flavan-3-oles, flavonoles y antocianinas también contribuyeron en la capacidad antioxidante de este tubérculo.

Ríos (2004) menciona que, entre los compuestos fenólicos y las antocianinas, los primeros tuvieron una mayor incidencia sobre la capacidad antioxidante hidrofílica; esto se demostró a través del índice de correlación, que para el caso de los compuestos fenólicos fue de 0.84, mientras que para las antocianinas este valor fue 0.74.

De otro lado, Betalleluz *et al.* (2012) demostraron el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos de la mashua, al retardar la oxidación del aceite de soya, durante el almacenamiento acelerado y la fritura. La eficacia de estos polifenoles fue casi igual o incluso mejor que los resultados obtenidos con antioxidantes sintéticos como BHT y TBHQ. La extracción con acetato de etilo fue la más conveniente para la recuperación de los antioxidantes fenólicos que pueden ser incorporados fácilmente en aceites y protegerlos de la oxidación.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

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

#### **3.2. MATERIA PRIMA**

- La mashua morada liofilizada (genotipo DP 0224) fue proporcionada por el Centro Internacional de la Papa (CIP).
- El aceite de linaza refinado (sin adición de agentes antioxidantes) fue proporcionado por la empresa belga Le Moulin.

#### **3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **3.3.1. Materiales**

- Materiales de vidrio: bagueta, balón de destilación, beakers, bureta, embudo de decantación, fiolas, matraces Erlenmeyer, pipetas, placas Petri, probetas, termómetro, tubos de ensayo.
- Micropipetas de 5 – 20  $\mu$ l, 5 – 50  $\mu$ l, 20 - 200  $\mu$ l, 100 - 1000  $\mu$ l y 500 – 5000  $\mu$ l.
- Otros: cronómetro, gradillas, magneto, papel de aluminio, Parafilm M, pinzas, soporte universal, tubos Eppendorf, tubos Falcon.

##### **3.3.2. Equipos**

- Agitador magnético (VELP Scientifica / Modelo AGE)
- Agitador vortex (VELP Scientifica)
- Balanza analítica (Ohaus Adventurer)

- Baño maría (GFL / Modelo 1085)
- Baño ultrasonidos (Branson / Modelo 3510)
- Calorímetro de barrido diferencial Pyris 6 (Perkin Elmer)
- Centrífuga (Hettich / Modelo Rotina 420)
- Centrífuga (Hettich / Modelo Rotofix 32)
- Congelador (Electrolux)
- Cromatógrafo de gases (Shimadzu / Modelo GC-2010)
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific / Modelo Genesys 10 UV)
- Estufa (Venticell)
- Estufa al vacío (VWR)
- Horno microondas (Samsung)
- Refrigerador (LG)
- Rotavapor (Heidolph / Modelo Laborota 4000)

### **3.3.3. Reactivos**

- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (Sigma)
- Acetato de etilo grado HPLC (J.T. Baker)
- Acetona grado HPLC (J.T. Baker)
- Ácido acético glacial (Fermont)
- Ácido clorhídrico fumante 37 % (J.T. Baker)
- Ácido undecanoico (Restek)
- Agua Milli-Q
- Alcohol etílico desnaturalizado (J.T. Baker)
- Almidón soluble de papa (J.T. Baker)
- Butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma)
- Carbonato de sodio (J.T. Baker)
- Cloroformo (J.T. Baker)
- Folin Ciocalteu 2 N (Merck)
- Hexano (J.T. Baker)
- Hidróxido de potasio (Mallinckrodt)
- Isooctano (Fermont)
- Metanol (J.T. Baker)
- Nitrógeno (AGA)

- Oxígeno (Praxair)
- *p*-anisidina (Sigma)
- Persulfato de potasio (Sigma)
- Tiosulfato de sodio (Merck)
- Yoduro de potasio (Fermont)

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.4.1. Contenido de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folin – Ciocalteu, el cual está formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, que se reduce, por acción de fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. Esta reacción es característica para compuestos que tienen un grupo hidroxilo unido a un anillo de benceno. El reactivo Folin – Ciocalteu tiene una coloración amarilla que en presencia de fenol se torna azul. La intensidad de color azul se mide espectrofotométricamente. Los resultados se expresan como equivalente de ácido gálico (Morillas y Delgado, 2012).

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó con el reactivo Folin – Ciocalteu, siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965). Para ello se procedió a colocar en un tubo de ensayo 500 µl del extracto diluido, 250 µl del reactivo de Folin – Ciocalteu 1 N y 1250 µl de carbonato de sodio (75 g/l). Los tubos fueron agitados en un vortex y luego se dejaron reposar durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a 755 nm. También se preparó un blanco, el cual contenía 500 µl de agua destilada en lugar de la muestra.

El contenido de compuestos fenólicos fue calculado a partir de una curva estándar (ANEXO 1), utilizando el ácido gálico como estándar. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente (AGE)/ml de muestra.

### **3.4.2. Capacidad antioxidante ABTS**

La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó por el método ABTS. Este método mide la capacidad relativa de los antioxidantes para neutralizar al radical ABTS•+ generado en fase acuosa y se compara con un estándar de Trolox (análogo de la vitamina E que es soluble en agua) (Ozgen *et al.*, 2006 citados por Pérez *et al.*, 2013).

Se siguió la metodología descrita por Arnao (2000). Se preparó la solución madre, con volúmenes iguales del reactivo 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) o ABTS y del reactivo persulfato de potasio. Esta solución madre fue preparada 12 horas antes de su uso y almacenada en un frasco ámbar y bajo condiciones de refrigeración. Al momento del análisis, se preparó la solución diluida de ABTS, la cual se obtuvo disolviendo la solución madre de ABTS con metanol (dilución aproximada de 1:60) hasta una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  a 734 nm. Por otro lado, se realizó una dilución de 1:300 (con metanol) del extracto bruto para que la absorbancia no sea menor a 0.2 ni mayor a la lectura del blanco. Seguidamente, se colocaron en un tubo de ensayo: 150  $\mu$ l del extracto diluido y 2,850  $\mu$ l de la solución diluida de ABTS. Los tubos fueron agitados en un vortex y luego se dejaron reposar durante dos horas y media bajo oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a 734 nm. Previamente, la lectura de éste fue llevada a cero utilizando metanol. También se preparó un blanco, el cual contenía 150  $\mu$ l de metanol en lugar de la muestra.

La capacidad antioxidante fue calculada a partir de una curva estándar (ANEXO 2), utilizando el Trolox como estándar. Los resultados fueron expresados como  $\mu$ mol de Trolox equivalente (TE)/ml de muestra.

### **3.4.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa del aceite de linaza**

La técnica de calorimetría de barrido diferencial es utilizada para estudiar ciertos fenómenos relacionados con calor en materiales mediante el monitoreo de cambios en la entalpía. La oxidación es un proceso exotérmico y el calor de la reacción hace posible usar esta técnica para la evaluación de la estabilidad oxidativa de aceites (Suja *et al.*, 2004).

La evaluación de la estabilidad oxidativa se realizó por el método de calorimetría de barrido diferencial, siguiendo el procedimiento de Michotte (2009). En primer lugar, se prepararon las muestras. Se pesaron  $3 \pm 0.01$  g de aceite en tubos de ensayo. Se adicionaron los extractos fenólicos en la concentración requerida para cada muestra (60, 120, 240 y 360 ppm), disueltos en 198  $\mu$ l de etanol. También se prepararon un blanco negativo y un blanco positivo, con el mismo volumen de etanol. El negativo no contenía ningún antioxidante. El positivo se preparó con 200 ppm del antioxidante sintético BHT.

Después de haber preparado las muestras y haberlas agitado en un vortex, se pesaron  $5.0 \pm 0.1$  mg en un crisol de aluminio y se colocaron en el horno del calorímetro (dentro de este se encuentra un crisol vacío, el cual se usa como referencia). Una vez que ambos crisoles se colocaron en su lugar, se dejaron transcurrir cinco minutos antes de correr el programa para que la muestra se oxigene adecuadamente. Luego se inició el calentamiento desde 30 hasta 120 °C, a una velocidad de calentamiento de 40 °C/min y bajo un flujo de oxígeno de 35 ml/min a una presión de 0.6 bar. Una vez alcanzada la temperatura programada, esta se mantuvo constante hasta obtener el termograma correspondiente, del cual se calculó el tiempo de inducción para cada muestra. Este tiempo se calculó por el método de las tangentes.

#### **3.4.4. Índice de peróxido**

Se siguió el método recomendado por la AOAC 965.33 (1995). Se pesaron  $5 \pm 0.05$  g de aceite en un matraz. Se adicionaron 30 ml de una solución de ácido acético/cloroformo (3:2 v/v) y 500  $\mu$ l de yoduro de potasio saturado. Se agitó manualmente durante un minuto. Luego se añadieron 30 ml de agua destilada y un mililitro de almidón al 1 %. Finalmente se procedió a titular, hasta la desaparición del color azul, con tiosulfato de sodio 0.01 N para las muestras de los días cero y cinco; y con tiosulfato de sodio 0.1 N para las muestras de 10 y 15 días. También se preparó un blanco, el cual contenía agua destilada en lugar de aceite, y se realizó el mismo procedimiento.

El índice de peróxido se expresó como miliequivalentes de  $O_2$ /kg de aceite y se calculó con la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{(S - B) \times N \times 1000}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

De donde:

N: Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio (N)

S: Gasto de tiosulfato de sodio para titular la muestra (ml)

B: Gasto de tiosulfato de sodio para titular el blanco (ml)

### 3.4.5. Índice de *p*-anisidina

Se siguió el método recomendado por la IUPAC (1987). Se pesó un gramo de aceite en un tubo Falcon, o una menor cantidad según la oxidación del aceite iba aumentando, se añadieron siete mililitros de isooctano y se agitó en un vortex hasta la disolución de la muestra. Se tomó la medida de la absorbancia de la solución a 350 nm ( $A_b$ ). Luego se tomaron cinco mililitros de dicha solución en un tubo de ensayo, se añadió un mililitro de solución de *p*-anisidina (2.5 g/l de ácido acético glacial), se agitó en un vortex para homogeneizar y se dejó reposar por 10 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se tomó la lectura de la absorbancia a 350 nm ( $A_s$ ). También se preparó un blanco, siguiendo el mismo procedimiento pero utilizando cinco mililitros de isooctano en lugar de la muestra.

El valor de *p*-anisidina se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Valor de } p\text{-anisidina} = \frac{7 \times (1.2 A_s - A_b)}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

De donde:

$A_s$ : Absorbancia de la muestra luego de la reacción

$A_b$ : Absorbancia de la muestra antes de la reacción

Los resultados se expresaron como valores absolutos de *p*-anisidina al no presentar unidades.

### 3.4.6. Dienos conjugados

Se siguió el método recomendado por la AOAC 957.13 (1995). Se pesaron  $6 \pm 0.5$  mg de aceite en un tubo Falcon y se diluyó con isooctano a volúmenes adecuados para las mediciones; posteriormente se agitó el conjunto en un vortex. Se tomó la lectura de la absorbancia a 233 nm.

Para realizar los cálculos, primero se determinaron las absortividades (a):

$$a = A / bc$$

De donde:

A: absorbancia de la muestra

b: longitud de la celda (cm)

c: concentración del aceite en el solvente (g/l)

Luego:

$$a_D = a_{233} - a_0$$

De donde:

$a_D$ : absortividad para los dienos conjugados

$a_0$ : 0.03 (coeficiente para ácidos grasos)

$a_{233}$ : absortividad de la muestra a 233 nm

### 3.4.7. Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases

Se siguió la metodología que utilizó Michotte (2009), con ligeras modificaciones. Este análisis solamente se realizó para las muestras iniciales y finales de las pruebas de almacenamiento acelerado (0 y 15 días de almacenamiento a 55°C). En primer lugar se realizó la metilación de los ácidos grasos. Para ello, se pesaron  $500 \pm 0.1$  mg en tubos de ensayo de pìrex de 70 ml (protegidos de la luz). Luego se adicionaron 10 ml de hidróxido de potasio (0.1 M en metanol), se cerraron los tubos herméticamente y se agitaron. Estos fueron colocados en un baño maría a 70 °C durante 60 minutos. Se agitaron a los 5, 20 y

40 minutos. Después de los 60 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 4 ml de ácido clorhídrico (1.2 N en metanol) y se agitó. Seguidamente, se colocaron en un baño maría a 70 °C durante 20 minutos, agitando a los 10 y 20 min. Pasado este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 20 ml de hexano y 10 ml de agua Milli-Q y se agitaron, para luego colocarlos en refrigeración durante una noche.

Al día siguiente, se tomaron 150 µl de la fase superior (hexano) de cada tubo y se llevaron a una fiola de 10 ml. Se añadió un mililitro del ácido undecanoico (estándar interno C11:0) (0.4 mg/ml) y se enrasó con hexano. De cada fiola se tomaron 1.3 ml aproximadamente para luego colocarlos en los viales para el análisis cromatográfico. Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama (Shimadzu). La temperatura del horno se programó de la siguiente manera:

- Temperatura inicial de 80 °C durante 1 minuto
- Aumento a 175 °C a 25 °C/min
- Período isotérmico a 175 °C por 25 minutos
- Aumento a 205 °C a 10 °C/min
- Período isotérmico a 205 °C por 4 minutos
- Aumento a 225 °C a 10 °C/min
- Período isotérmico a 225 °C por 20 minutos

Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 225 °C. Se utilizó H<sub>2</sub> de alta pureza como gas transportador. Los ácidos grasos esterificados fueron identificados y cuantificados mediante la comparación de sus tiempos de retención con los estándares. La concentración de cada ácido graso se obtuvo mediante una proporción de la concentración de cada uno de ellos y la concentración total de ácidos grasos. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

### **3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

A continuación se describen cada una de las etapas desarrolladas:

### **3.5.1. Extracción de los compuestos fenólicos de la mashua**

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se siguió el procedimiento optimizado por Chirinos *et al.* (2007). Se pesaron 10 g de mashua liofilizada que fueron combinados con 600 ml de una solución de metanol/acetona/agua (45:45:10 v/v/v) acidificada con 0.15 % de ácido clorhídrico. La extracción se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante, por 60 minutos. Después de este tiempo, se centrifugó a 4,000 RPM por 10 minutos. Se separó el sobrenadante, y se utilizó la torta para una segunda extracción. En este caso, se añadieron 300 ml del solvente mencionado; se realizó a temperatura ambiente, con agitación y por 15 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó con las mismas condiciones. Se mezclaron los sobrenadantes de las dos extracciones en un matraz y se almacenó hasta el día siguiente, en oscuridad, bajo una atmósfera de nitrógeno y en refrigeración. Posteriormente, se realizó una concentración en el rotavapor a una temperatura entre 40 y 45 °C, hasta obtener un extracto acuoso. Luego se procedió con la etapa del fraccionamiento, la cual se describe a continuación.

### **3.5.2. Fraccionamiento de los compuestos fenólicos del extracto de mashua**

Para el fraccionamiento de los compuestos fenólicos, se siguió la metodología reportada por Kennedy (2002) citado por Cedano (2009). Esta última menciona que la finalidad del fraccionamiento es obtener un extracto de compuestos fenólicos libres de la presencia de antocianinas (compuestos coloreados), y a la vez obtener fenólicos de baja polaridad (fenólicos recuperados en la fase acetato de etilo) que vean favorecida su solubilidad en aceite.

El extracto centrifugado de la etapa previa se colocó en un matraz y se mezcló con acetato de etilo (extracto acuoso:acetato de etilo, 1:2 v/v). Para homogeneizar la mezcla, el matraz fue sometido a ultrasonido durante 10 minutos. Luego de este tiempo, se trasvasó el contenido a una pera de decantación, se cerró y homogeneizó. Se dejó reposar por 30 minutos bajo oscuridad. Pasado este tiempo, se procedió a separar la fase acuosa de la fase acetato de etilo. Esta última se recibió en un matraz; mientras que con la primera, se realizó el mismo procedimiento dos veces más. La última decantación se dejó reposar durante una noche, en oscuridad y refrigeración. Al final, se mezclaron las tres fases de acetato de etilo y se procedió a una concentración en el rotavapor a 40 – 45 °C hasta sequedad. El residuo

fue recuperado con etanol. Este se conservó bajo una atmósfera de nitrógeno y a -20 °C hasta su posterior empleo. A este extracto se le determinó el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante.

### **3.5.3. Evaluación de la estabilidad oxidativa del aceite de linaza**

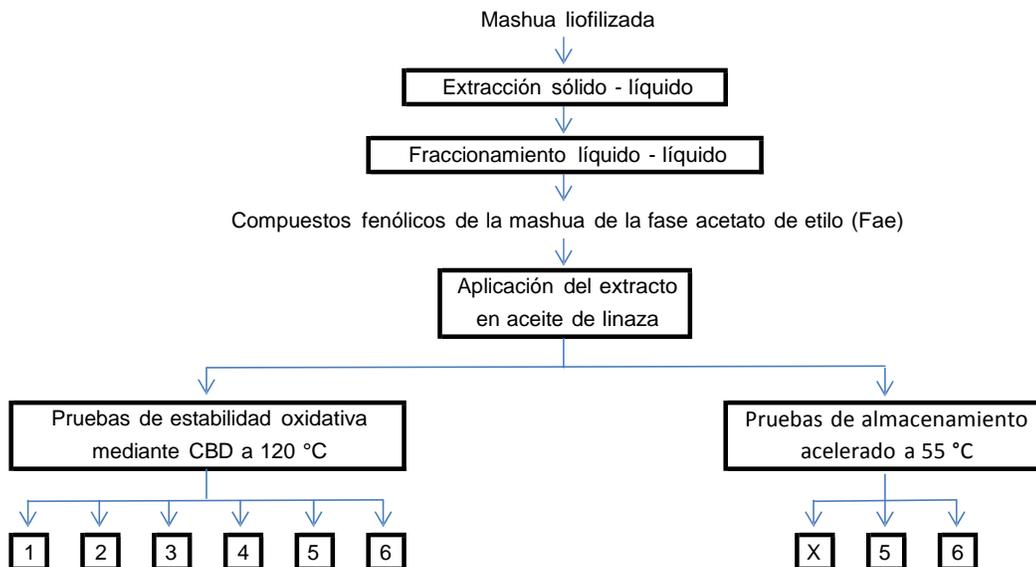
La evaluación de la estabilidad oxidativa se realizó por el método de calorimetría de barrido diferencial, siguiendo el procedimiento de Michotte (2009), como se explicó en el punto 3.4.3. Para esta etapa se procedió a realizar mezclas de los extractos purificados de la mashua con el aceite de linaza a las concentraciones en compuestos fenólicos de 60, 120, 240 y 360 ppm; además de considerar un blanco negativo (sin adición de antioxidantes) y un blanco positivo con la adición del antioxidante sintético BHT a 200 ppm. Luego de ser sometidos a las condiciones del método, se procedió a determinar los tiempos de inducción. Las pruebas fueron realizadas por duplicado. La concentración de compuestos fenólicos óptima (alto tiempo de inducción a la menor concentración de los compuestos fenólicos de la mashua) fue seleccionada para pasar a la siguiente etapa.

### **3.5.4. Pruebas aceleradas de almacenamiento**

Se tomaron 180 g de aceite de linaza en un beaker, al cual se le adicionaron los extractos de compuestos fenólicos en etanol a la concentración seleccionada de la etapa anterior. Para cada uno de los blancos, también se utilizaron 180 g de aceite; para el blanco negativo se añadió la misma cantidad de etanol (sin ningún antioxidante) y para el blanco positivo, BHT a 200 ppm, con la misma cantidad de etanol. Se agitó mediante ultrasonido por 10 minutos para la homogeneización del aceite con los antioxidantes. Se dividió el aceite en botellas color ámbar (15 g en cada una) y se llevaron a estufa a 55 °C por 15 días. Cada 5 días se procedió a tomar las muestras y se procedió a realizar las evaluaciones de índice de peróxido, *p*-anisidina, dienos conjugados y perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases. Las pruebas aceleradas fueron realizadas por triplicado.

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se presenta en la Figura 10.



**Figura 10: Etapas de la investigación**

(1) Fenólicos 60 ppm; (2) Fenólicos 120 ppm; (3) Fenólicos 240 ppm; (4) Fenólicos 360 ppm; (5) BHT 200 ppm; (6) Control; (X): Mejor concentración de compuestos fenólicos. Para las pruebas de estabilidad oxidativa en el CBD (DCS), se determinaron los tiempos de inducción (1-6).

Para las pruebas de almacenamiento acelerado, para cada tratamiento (X, 5 y 6) y cada cinco días (0, 5, 10 y 15 días), se realizaron los siguientes controles: índice de peróxido, índice de *p*-anisidina y dienos conjugados. El perfil de ácidos grasos se realizó solamente a las muestras de los días 0 y 15.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prueba de estabilidad oxidativa se realizó por duplicado; los demás análisis (índice de peróxido, índice de *p*-anisidina, dienos conjugados y perfil de ácidos grasos) se realizaron por triplicado. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para detectar la existencia de diferencias significativas entre las medias. Luego se realizó el test de Duncan para comparar dichas medias. Para ambos se utilizó un nivel de confianza del 95 %. Las evaluaciones se hicieron con el programa Statgraphics Centurion XV.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO FENÓLICO DE LA MASHUA

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y en los últimos años han ganado mucha atención, debido a su actividad antioxidante y secuestradora de radicales libres (Chirinos *et al.*, 2010). Córdova (2012) obtuvo una alta correlación ( $r^2 = 0.836$ ) entre el contenido de compuestos fenólicos de la mashua y su capacidad antioxidante por ABTS. Por esta razón, estos dos análisis se tomaron en cuenta para la caracterización del extracto de compuestos fenólicos de la mashua; los resultados se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4: Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante por ABTS del extracto de compuestos fenólicos de la fase acetato de etilo de la mashua**

Compuestos fenólicos (mg AGE/100 g mashua b.s)	Compuestos fenólicos (mg AGE/ml)	Capacidad antioxidante ( $\mu$ mol TE/ml)
195.1 $\pm$ 3.9	5.6 $\pm$ 0.1	62.0 $\pm$ 6.1

Chirinos *et al.* (2008) reportó un valor de 23.5 mg AGE/100 g mashua fresca, para la fracción acetato de etilo del extracto de la mashua DP 0224 obtenida bajo las mismas condiciones; pero hay que considerar que la humedad inicial de la materia prima influye sobre la medición (en la presente investigación se partió de mashua liofilizada).

Por otro lado, Betalleluz *et al.* (2012) obtuvo un contenido de compuestos fenólicos de 13.4 mg AGE/ml para la fracción de acetato de etilo; Cedano (2009) obtuvo valores más altos, al reportar 22.2 mg AGE/ml para los compuestos fenólicos y 220.2  $\mu$ mol TE/ml para la capacidad antioxidante por ABTS. Sin embargo, las unidades con las que se reporta no permiten una buena comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que el volumen final del extracto influye en dicho valores.

Un balance de masa fue realizado durante el proceso de purificación, con la finalidad de evaluar la distribución de los compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS, entre las dos fracciones obtenidas luego de la purificación de los fenólicos extraídos a partir del tubérculo de la mashua. Los resultados se presentan en el Cuadro 5.

**Cuadro 5: Balance de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante ABTS en el extracto inicial, fase acuosa y fase acetato de etilo**

	<b>Compuestos fenólicos (mg GAE)</b>	<b>Capacidad antioxidante (<math>\mu</math>M TE)</b>
Extracto total	234 $\pm$ 12.3	1920 $\pm$ 179
Fase acuosa	249 $\pm$ 24.2	2074 $\pm$ 249
Fase acetato de etilo	27 $\pm$ 0.1	292 $\pm$ 14.2

Como se puede observar, los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la fracción acetato de etilo es inferior a la presentada por la fracción acuosa, ello concuerda con lo encontrado previamente por Chirinos *et al.* (2008). De otro lado, la suma de los compuestos fenólicos de la fase acuosa y de la fase acetato de etilo es mayor a la obtenida en el extracto total; ocurre lo mismo con la capacidad antioxidante (debida a los compuestos fenólicos); esto haría suponer que las fracciones, cuando están mezcladas, poseen cierto efecto antagónico en ambas mediciones lo que hace que los valores en lugar de aditivos tiendan a ser menores.

Por otro lado, a pesar de que los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de la fase acetato de etilo son menores a los de la fase acuosa, su utilización como antioxidante ha sido más efectiva para retardar procesos oxidativos en los aceites; tal como lo indican Betalleluz *et al.* (2012), quienes al trabajar con la fracción de fenólicos solubles en acetato de etilo, ejercieron un mejor efecto protector (a comparación de la fase acuosa) sobre la oxidación del aceite de soja. La identificación de los compuestos fenólicos de la mashua, presentes en la fracción de acetato de etilo, ha sido realizada en investigaciones previas (Chirinos *et al.*, 2008). Entre estos compuestos se encontraron al: ácido gálico, galocatequina, procianidina B<sub>2</sub>, epigalocatequina, derivados del ácido hidroxicinámico e hidroxibenzoico y derivados de miricetina y/o rutina, por tanto, ellos serían los responsables directos de la característica capacidad antioxidante.

El ácido gálico, el ácido hidroxicinámico y el ácido hidroxibenzoico son ácidos fenólicos; su actividad antioxidante se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y captadores de oxígeno (Miranda *et al.*, 2010). La galocatequina y la epigallocatequina son flavanoles; este tipo de compuestos poseen actividad antioxidante, anticancerígena, antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana y vasodilatadora. La miricetina y la rutina son flavonoles; destacan por su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana (Mercader, 2010).

#### 4.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE LINAZA A 120 °C

En el Cuadro 6 se observan los tiempos de inducción (en minutos), obtenidos de los termogramas (ANEXO 3), para cada uno de los tratamientos realizados en la prueba de estabilidad oxidativa utilizando el calorímetro de barrido diferencial (CBD).

**Cuadro 6: Tiempos de inducción obtenidos mediante CBD a 120 °C**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo de inducción (min)*</b>
Control (sin antioxidantes)	22.7 ± 0.1 a
BHT 200 ppm	36.6 ± 1.7 d
Fenólicos 60 ppm	28.6 ± 0.4 b
Fenólicos 120 ppm	31.3 ± 0.2 c
Fenólicos 240 ppm	35.4 ± 0.3 d
Fenólicos 360 ppm	36.9 ± 0.2 d

\*Los tiempos de inducción son el promedio de dos repeticiones.

a-d: Los valores medios que presentan la misma letra no presentan diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ( $p > 0.05$ ).

Como se puede observar, el tratamiento más efectivo para retardar la oxidación del aceite de linaza fue aquel conseguido con la dosis de 360 ppm de compuestos fenólicos (36.9 min), aunque no se encontraron diferencias significativas entre éste y la obtenida a la dosis de 240 ppm y con el BHT a 200 ppm (36.6 min).

Por otro lado, entre los demás tratamientos sí se encontraron diferencias significativas (ANEXO 4), siendo el control (sin antioxidantes) el que presentó menor estabilidad oxidativa (22.7 min), seguido de los fenólicos a 60 ppm (28.6 min) y luego los fenólicos a

120 ppm (31.3 min). Así, se puede observar que a mayor concentración de los compuestos fenólicos, mayor es el tiempo de inducción y que, a una dosis determinada, muestra a mantenerse constante su efecto protector.

Otro aspecto que se puede destacar es la eficacia de los compuestos fenólicos de la mashua en el aceite de linaza como antioxidantes, ya que todos los tratamientos mostraron un tiempo de inducción mayor a la muestra control, lo cual se puede corroborar con las investigaciones realizadas por Cedano (2009) y Betalleluz *et al.* (2012), en las cuales aplicaron dichos compuestos en aceite de sacha inchi y de soya, obteniendo resultados satisfactorios.

Sin embargo, hay ciertos factores que influyen en el tiempo de inducción. Betalleluz *et al.* (2012) obtuvieron tiempos de inducción más altos, incluso para la muestra control (36.7 min), a pesar de trabajar con temperaturas más altas (140 °C). Un factor que podría influir es el contenido de antioxidantes naturales presentes en los aceites. Rafalowski *et al.* (2008) reportan concentraciones de 2.73 y 72.26 mg por 100 g aceite de soya, de  $\beta$ -caroteno y tocoferoles, respectivamente; para el aceite de linaza, 15.01 y 29.84 mg por 100 g aceite. Según Choe y Min (2006), los tocoferoles son los antioxidantes más importantes de los aceites, principalmente porque reaccionan con los radicales libres; una molécula puede proteger entre  $10^3$  y  $10^8$  moléculas de ácidos grasos poliinsaturados. En el caso del  $\beta$ -caroteno, este puede actuar filtrando la luz, reaccionando con el oxígeno o con los radicales libres; una molécula de  $\beta$ -caroteno puede reaccionar con 250 – 1000 moléculas de oxígeno. Aunque un factor más importante podría ser la composición de ácidos grasos del aceite. Según Pardahuil *et al.* (2011), comúnmente, los aceites comestibles con altos grados de insaturación son más susceptibles a la oxidación de lípidos. El aceite de soya, según Limachi *et al.* (2009), está compuesto por 10.1 % de ácido palmítico, 3.6 % de ácido esteárico, 21.2 % de ácido oleico, 51.0 % de ácido linoleico y 6.8 % de ácido linolénico; siendo así menos insaturado que el aceite de linaza. Cedano (2009) también reportó tiempos mayores para todos los casos, incluso para la muestra control (60.6 min a 120 °C), a pesar de que el aceite de sacha inchi tiene un grado de insaturación bastante similar al del aceite de linaza. El aceite de sacha inchi, según Limachi *et al.* (2009), está compuesto por 6.9 % de ácidos grasos saturados, 9.0 % de ácido oleico, 36.2 % de ácido linoleico y 47.1 % de ácido linolénico. Por otro lado, Michotte (2009), que trabajó con aceite de linaza,

obtuvo un tiempo de inducción de 35 min (a 120 °C) para la muestra control (sin antioxidante), siendo también mayor que el obtenido en la presente investigación.

Para los casos citados arriba, es muy probable que el tipo de aceite haya influido en la estabilidad del mismo; en esta ocasión se utilizó un aceite refinado. Según Mataix y Ochoa (2002) citados por Sayago *et al.* (2007), durante el procesado (desodorización, refinado, etc.) y almacenamiento de los aceites y a lo largo de la preparación de los alimentos, ocurren pérdidas considerables en el contenido de vitamina E (incluye tocoferoles) que causan su desestabilización. Los tocoferoles son formidables agentes antioxidantes naturales y confieren estabilidad a la grasa o aceite que los posee (Lozano *et al.*, s.f.). Por ejemplo, el aceite de semillas de algodón no refinado resiste mejor a la oxidación que su homólogo refinado, debido a su mayor contenido en gossipol y tocoferoles (Fennema, 2000). Por esta razón, el hecho de que el aceite de linaza haya sido refinado pudo haber influido en la estabilidad del mismo, conllevando a un menor tiempo de inducción. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos sí tuvieron un efecto antioxidante.

En función a los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad oxidativa mediante el CBD, se utilizaron los compuestos fenólicos a 240 ppm para las pruebas de almacenamiento acelerado, ya que no se encontraron diferencias significativas entre estos y los compuestos fenólicos a 360 ppm.

### **4.3. PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO A 55 °C**

#### **4.3.1. Índice de peróxido**

La oxidación de lípidos implica la formación continua de hidroperóxidos como productos de oxidación primaria que pueden degradarse a una variedad de productos secundarios no volátiles y volátiles. La tasa de formación de hidroperóxidos es superior a su velocidad de descomposición durante la etapa inicial de la oxidación, y esto se invierte en las etapas posteriores. Por lo tanto, el índice de peróxido (IP) es un indicador muy importante de la estabilidad en las primeras etapas de la oxidación (Hamed y Abo-Elwafa, 2012).

En la Figura 11 se muestra la evolución de la formación de peróxidos para los tres tratamientos, durante los 15 días de almacenamiento acelerado a 55 °C. Se puede notar claramente una tendencia creciente en la formación de peróxidos para los tres tratamientos. En todos los casos, se observan dos fases, una con una tasa de oxidación relativamente baja (cero – 10 días) y la otra con una tasa de oxidación un poco más alta (10 – 15 días). También se puede notar que el incremento en el contenido de peróxidos en la muestra control se dio más rápidamente que con el BHT (200 ppm) y con los compuestos fenólicos de la mashua (240 ppm), lo que nos indica que estos dos últimos tienen un efecto protector frente a la oxidación del aceite.

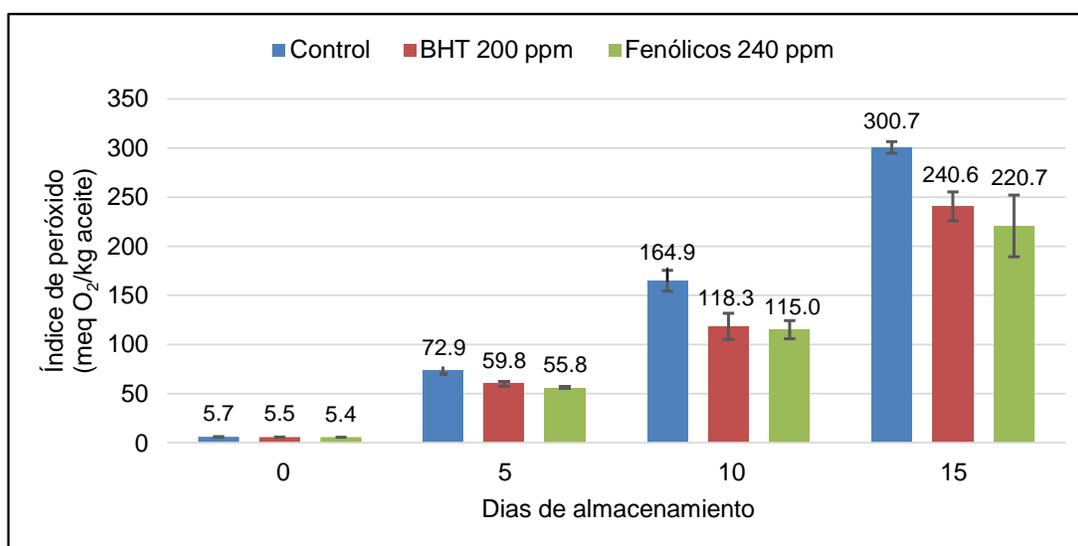
Según el Codex Alimentario (1999), el límite máximo de índice de peróxido (IP) para los aceites refinados es de 10 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite. Se estaría cumpliendo con el límite solamente con las muestras del día cero, en donde se tiene un promedio de 5.5 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite para los tres tratamientos. A partir del día cinco, en todos los casos se tienen valores de IP mayores a 50 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite.

Al día 0, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, partir del día cinco hasta el día 15, sí existieron diferencias significativas entre la muestra control y las muestras con BHT y con los compuestos fenólicos (ANEXO 4). A los 15 días, se obtuvieron índices de peróxido de 300.7, 240.6 y 220.7 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite, respectivamente. Entre el BHT y los compuestos fenólicos, el IP siempre fue ligeramente mayor para el primero, aunque en ningún momento se encontraron diferencias significativas entre estos, con lo cual se podría decir que el efecto antioxidante de estos es prácticamente similar.

Betalleluz *et al.* (2012) sí encontraron mejores resultados al utilizar los compuestos fenólicos de la fase acetato de etilo de la mashua a 300 ppm (11.5 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite), a comparación del BHT a 200 ppm (33.6 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite), luego de 15 días a 55 °C. En este caso, la diferencia en los resultados se podría deber principalmente a que se utilizó una mayor concentración de compuestos fenólicos que en la presente investigación.

Cedano (2009) reportó un valor de IP de 106.4 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite de sacha inchi, a los 15 días de almacenamiento a 55 °C para la muestra control; Michotte (2009), 97.74 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite de linaza, a los 12 días de almacenamiento a 60 °C. Como se puede

observar, en todos los casos, los IP son menores a los obtenidos en este trabajo. Las razones pueden ser las mismas que las mencionadas en la prueba de estabilidad oxidativa mediante CBD: el refinado del aceite. Esto se puede corroborar con los resultados reportados por Hamed y Abo-Elwafa (2012), quienes obtuvieron un valor aproximado de IP de 100 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite de linaza crudo y un valor aproximado de 500 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite de linaza refinado, a 16 días de almacenamiento a 60 °C. Así, sus resultados demostraron el buen efecto antioxidante de los componentes polares minoritarios (incluyendo compuestos fenólicos, esteroides, tocoferoles y carotenoides), los cuales fueron separados del aceite de linaza mediante el proceso de refinado.



**Figura 11: Evolución del índice de peróxido durante los 15 días de almacenamiento a 55 °C**

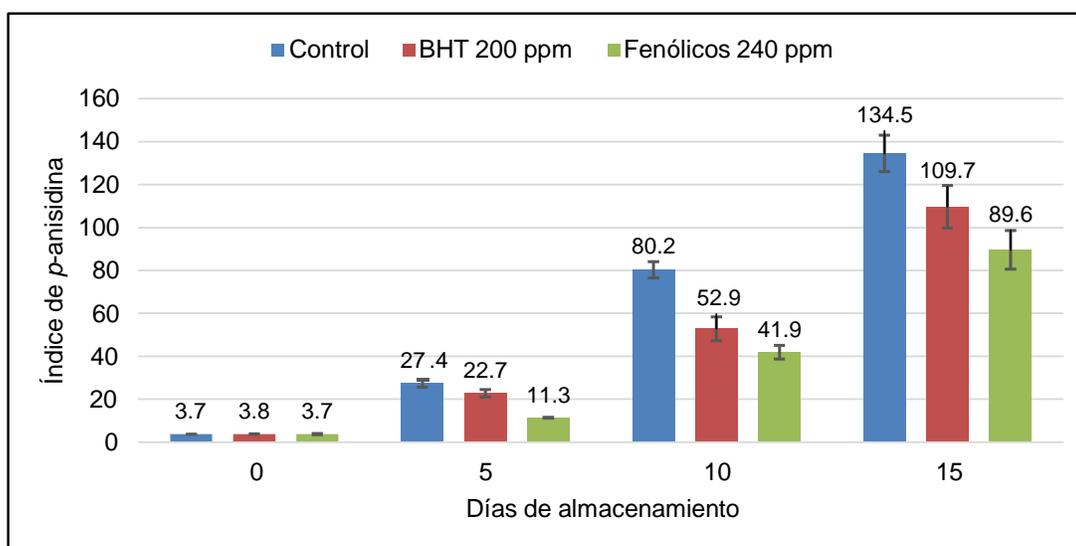
#### 4.3.2. Índice de *p*-anisidina

A pesar de que el IP es una medida común de la oxidación de los lípidos, su uso está limitado a las etapas iniciales de dicha reacción. Como los peróxidos pueden sufrir descomposiciones posteriores, la historia oxidativa completa del aceite no se conoce por ellos. Se considera que el índice de anisidina, una medida de los productos de la oxidación secundaria, es muy útil para evaluar la oxidación del aceite (Grompone, 1991).

En la Figura 12 se muestra la evolución del índice de *p*-anisidina para los tres tratamientos, durante los 15 días de almacenamiento acelerado a 55 °C. Al igual que con el IP, desde el

inicio se observa una tendencia creciente en todos los tratamientos conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. Según Shahidi (2005), existe una alta correlación entre el índice de peróxido e índice de *p*-anisidina.

La tendencia creciente del índice de *p*-anisidina desde el inicio, a pesar de que este es un indicador de oxidación secundaria, se puede deber a lo mencionado por Choe y Min (2006). Según estos autores, el tiempo para la formación de productos secundarios a partir del producto de oxidación primaria (hidroperóxido), varía con los diferentes aceites. Los productos de oxidación secundarios se forman inmediatamente después de la formación de hidroperóxidos en los aceites de oliva y de colza. Sin embargo, en los aceites de girasol y de cártamo, los productos de oxidación secundarios se forman cuando la concentración de hidroperóxidos es apreciable. En este caso, se podría agrupar el aceite de linaza con el aceite de oliva y de colza.



**Figura 12: Evolución del índice de *p*-anisidina durante los 15 días de almacenamiento a 55 °C**

En el Codex Alimentario (1999) no se menciona al índice de *p*-anisidina como un factor de calidad para los aceites vegetales. En este caso se podría tomar como referencia al aceite de pescado, por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (mayor a 30 %) (Conchillo *et al.*, 2006). Según el Codex Alimentario (2013), el aceite de pescado debe tener un índice de *p*-anisidina menor a 20 para considerarse de buena calidad. Al día 5, solamente el aceite

con los compuestos fenólicos se encontraría dentro del rango aceptable. Después de este tiempo, ninguna muestra cumpliría con los límites.

Al igual que con el índice de peróxido, en el día cero, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, a partir del día cinco hasta el día 15, sí existieron diferencias significativas entre los tres tratamientos (ANEXO 4). A los 15 días, se obtuvieron índices de *p*-anisidina de 134.5, 109.7 y 89.6, para las muestras control, BHT a 200 ppm y compuestos fenólicos de 240 ppm, respectivamente. Hamed y Abo-Elwafa (2012) reportaron índices aproximados de 300 y 50 para el aceite de linaza refinado y no refinado, respectivamente, a 16 días de almacenamiento a 60 °C.

A diferencia del índice de peróxido, en esta prueba sí se encontraron diferencias significativas entre el BHT a 200 ppm y los compuestos fenólicos a 240 ppm, entre los 5 y 15 días de almacenamiento a 55 °C. Esto podría sugerir que los compuestos fenólicos de la fase acetato de etilo de la mashua protegen mejor al aceite de linaza que el BHT, una vez iniciada la oxidación secundaria. Esto se puede corroborar con los resultados obtenidos por Cedano (2009), al reportar un valor aproximado de 45 para el BHT a 200 ppm y 26 para los compuestos fenólicos a 200 ppm, a los 15 días de almacenamiento a 55 °C para el aceite de sachu inchi.

Es importante resaltar las conclusiones obtenidas por Grompone (1991); este autor utilizó aceites que tenían IP bajos y similares inicialmente, pero con índices de *p*-anisidina diferentes, concluyendo que, cuanto menor era el índice de *p*-anisidina inicial, más días demoraba el aceite para que su IP aumentara de manera significativa; es decir, el periodo de inducción dependía del índice de *p*-anisidina de partida, remarcando el papel que tenía este índice sobre el comportamiento posterior del aceite.

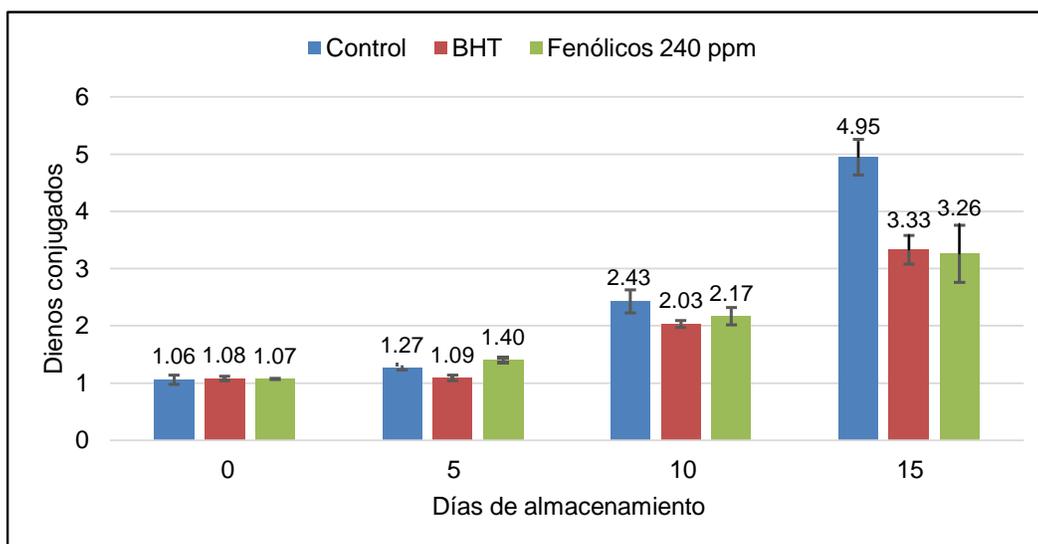
Según Norveel (2012), la principal limitación del método de *p*-anisidina es la baja sensibilidad. Sin embargo, Hamed y Abo-Elwafa (2012) mencionan que esta prueba es más sensible con los aldehídos insaturados que con los saturados debido a que los productos coloreados del primero absorben con mayor intensidad a 350 nm. Por ello, el índice de *p*-anisidina es solo comparable entre un mismo tipo de aceite (Yildirim, 2009); así, aceites con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados probablemente tengan un mayor índice

de *p*-anisidina que los saturados, aun estando frescos (Shahidi, 2005). En este caso no habría problema, al haber trabajado con aceite de linaza, el cual es altamente insaturado.

### 4.3.3. Dienos conjugados

En los primeros estadios de la oxidación se produce una reordenación de los dobles enlaces de los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) que da lugar a la formación de dienos conjugados, término que se refiere a una estructura con dos dobles enlaces carbono-carbono separados por un enlace simple carbono-carbono (-CH=CH-CH=CH-). Los dienos conjugados no se encuentran normalmente en los ácidos grasos, y por tanto, su presencia es indicativa de un proceso oxidativo (Navas, 2005).

En la Figura 13 se muestra la evolución los dienos conjugados para los tres tratamientos, durante los 15 días de almacenamiento acelerado a 55 °C.



**Figura 13: Evolución de los dienos conjugados durante los 15 días de almacenamiento a 55 °C**

El contenido de dienos conjugados aumentó con el tiempo, aunque no con la misma tendencia de la evolución de los peróxidos, al no observarse diferencias significativas entre las muestras a los días cero y cinco (ANEXO 4). Estos dos análisis deberían presentar una tendencia similar ya que la cantidad de dienos conjugados está estrechamente relacionada con la cantidad de hidroperóxidos (Campos, 2010).

Lo anterior podría ser explicado por lo que menciona Codony *et al.*, (2010). Según dichos autores, debe tenerse en cuenta que el proceso sigue la misma curva descrita para el índice de peróxido ya que, cuando aumenta la velocidad de destrucción de peróxidos, el nivel de dienos conjugados llega a estabilizarse e incluso disminuir con el tiempo. Además determinados compuestos secundarios de oxidación, procedentes de la destrucción de peróxidos, pueden también tener estructuras de dieno conjugado (aldehídos monoinsaturados), que también participarían en la lectura espectrofotométrica. Probablemente, en este caso, en el día cero también se incluyeron en la medición algunos compuestos de oxidación secundaria, según los resultados obtenidos en la prueba de índice de *p*-anisidina.

Adicionalmente, el mismo autor menciona que algunos procesos, como la refinación de las grasas, pueden dar origen a la formación de dienos y trienos conjugados. Probablemente, por estas dos razones no se obtuvo la misma tendencia para el IP y los dienos conjugados entre los días cero y cinco.

A los 15 días de almacenamiento, se obtuvieron valores de dienos conjugados de 4.95, 3.33 y 3.26, para la muestra control, BHT a 200 ppm y compuestos fenólicos a 240 ppm, respectivamente. Al igual que en la prueba de índice de peróxido, se obtuvieron diferencias significativas entre la muestra control y las muestras con BHT y compuestos fenólicos, pero entre estos dos últimos no se encontraron diferencias significativas. Luego de los 15 días de almacenamiento, los resultados sí estarían de acuerdo a lo que menciona Shahidi (2005); según este autor, se han encontrado buenas correlaciones entre el índice de peróxido y los dienos conjugados.

Hamed y Abo-Elwafa (2012) reportaron un valor aproximadamente de 8.1 y 1.8 para aceite de linaza refinado y no refinado, respectivamente, a 16 días de almacenamiento a 60 °C. Por otro lado, Sánchez (2012) reportó valores de 8.7 y 6.4, luego de 15 días de almacenamiento, para los aceites de linaza y sacha inchi. Sin embargo, Norveel (2012) menciona que los aceites que contienen una alta cantidad de AGPI tendrán un aumento más rápido en dienos conjugados en comparación con los aceites con menos AGPI. En consecuencia, el método no puede ser utilizado para comparar la oxidación en aceites con diferente composición de ácidos grasos.

#### 4.3.4. Perfil de ácidos grasos

La oxidación de lípidos también se puede evaluar mediante la medición cuantitativa de la pérdida de los sustratos iniciales. En los alimentos que contienen grasas o aceites, los ácidos grasos insaturados son los principales compuestos cuya composición cambia de manera significativa durante la oxidación. Los cambios en la composición de ácidos grasos proporcionan una medida indirecta de la medida de la oxidación de lípidos (Shahidi, 2005).

En el Cuadro 7 se tiene la variación porcentual que sufrió cada ácido graso del aceite de linaza para cada tratamiento entre los 0 y 15 días; se puede observar que todos los ácidos grasos sufrieron un cambio apreciable, excepto el ácido linoleico, que para todos los tratamientos, tuvo una variación menor al 1 %. Por otro lado, se puede notar que el tratamiento con mayor variación entre la composición inicial y final de ácidos grasos es el control, seguido del BHT a 200 ppm y finalmente los compuestos fenólicos a 240 ppm.

**Cuadro 7: Variación de cada ácido graso (%) entre las muestras a los 0 y a los 15 días**

Ácido graso	Control	BHT 200 ppm	Fenólicos 240 ppm
Palmítico (C16:0)	12.41	10.86	2.95
Esteárico (C18:0)	12.66	10.05	3.12
Oleico (C18:1)	10.51	5.47	4.09
Linoleico (C18:2)	0.06	0.46	0.93
Linolénico (C18:3)	-7.64	-5.37	-2.79

En general, la oxidación de grasas y aceites conduce a un aumento proporcional de ácidos grasos saturados y una disminución proporcional en ácidos grasos insaturados (Si *et al.*, 2012). En los resultados obtenidos se puede apreciar que esto se cumple para los ácidos palmítico y esteárico (que son dos ácidos grasos saturados) ya que el contenido de éstos aumenta luego de los 15 días de almacenamiento a 55 °C. Por otro lado, también se cumple para el ácido linolénico (ácido graso insaturado), ya que el contenido de éste disminuye. Sin embargo, esto no se da para el ácido oleico y linoleico ya que el contenido de estos aumenta, cuando debería disminuir porque también son ácidos grasos insaturados.

Según Shahidi (2005), la medición de los cambios en la composición de ácidos grasos es útil para la identificación de los ácidos grasos que están implicados en las reacciones de oxidación. A partir de esto, se podría deducir que el único ácido graso que participó en las

reacciones de oxidación fue el ácido linolénico. Esto último estaría relacionado con lo que menciona Badui (1990). Según dicho autor, la autooxidación se favorece a medida que se incrementa la concentración de ácidos grasos insaturados. Esto se ha comprobado en sistemas modelo de ésteres metílicos de los ácidos esteárico, oleico, linoleico y linolénico. Los más insaturados necesitan menos tiempo para absorber la misma cantidad de gas y, por consiguiente, se oxidan más rápido. Por ejemplo, las velocidades de oxidación del éster de metilo de ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico se comportan con una proporción 1:12:24 (Baltes, 2006).

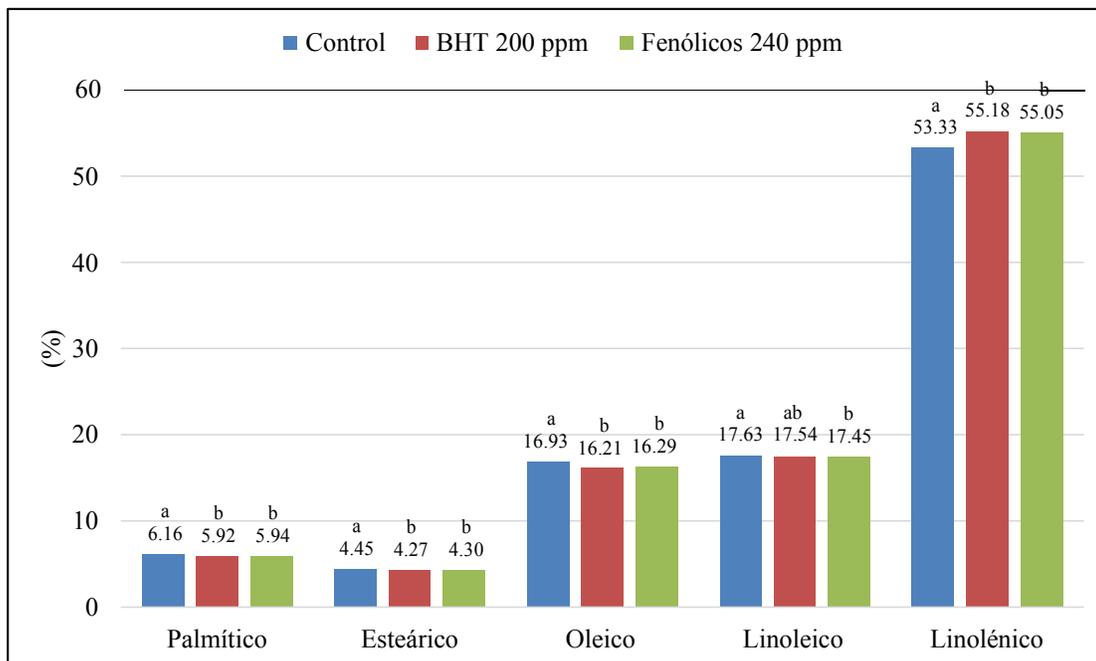
Con esto se estarían obteniendo resultados diferentes a los reportados por Michotte (2009), quien también utilizó aceite de linaza. En dicha investigación, los ácidos grasos que se oxidaron fueron el ácido linoleico y linolénico, a 12 días de almacenamiento a 60 °C, al disminuir su concentración en 1.7 y 3.3 %, respectivamente; mientras que los demás ácidos grasos variaron muy poco. Esto se podría relacionar con los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad oxidativa a 120 °C, donde Michotte (2009) obtuvo un tiempo de 35 minutos para la muestra control, mientras que en la presente investigación fue de 22.7 minutos. Es decir, a mayor estabilidad oxidativa (mayor tiempo de inducción), menor es la variación en la composición de ácidos grasos. Los factores que pudieron haber influido ya fueron explicados en los puntos anteriores (refinación del aceite de linaza).

Con respecto al perfil de ácidos grasos, en la Figura 14 se puede observar la composición de ácidos grasos para los tres tratamientos luego de los 15 días de almacenamiento a 55 °C.

Se puede observar que, para todos los ácidos grasos, no hay diferencias significativas entre el BHT a 200 ppm y los compuestos fenólicos a 240 ppm. En cambio, sí existen diferencias significativas entre estos dos últimos y la muestra control, excepto para el ácido linoleico (ANEXO 4). Para este ácido graso, las diferencias, independientemente de si sean significativas o no, no son importantes ya que son muy pequeñas.

Cabe mencionar que este análisis es más útil para identificar qué ácidos grasos son los que se oxidan con mayor facilidad, y no tanto para medir el grado de oxidación en sí. Shahidi (2005) menciona que la oxidación del 0.4 % de ácidos grasos poliinsaturados a hidroperóxidos representaría un cambio de 16 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite en el índice de peróxido.

Es decir, sería mucho más sensible y preciso medir la oxidación mediante el índice de peróxido que mediante el perfil de ácidos grasos.



**Figura 14: Composición de ácidos grasos para los tres tratamientos a los 15 días de almacenamiento**

## V. CONCLUSIONES

1. La concentración de compuestos fenólicos de la fase acetato de etilo del extracto de mashua fue de 195.1 mg AGE/100 g mashua (b.s) ó 5.6 mg GAE/ml; su capacidad antioxidante por el método ABTS fue de 62.0  $\mu\text{mol TE/ml}$ .
2. En la prueba de estabilidad oxidativa del aceite de linaza a 120 °C utilizando el calorímetro de barrido diferencial, se encontró que las concentraciones de compuestos fenólicos más eficientes fueron a 240 y 360 ppm (no existiendo diferencias significativas entre ellos), ya que demostraron un buen efecto antioxidante respecto al control (aceite sin antioxidante). No se encontraron diferencias significativas entre ambas concentraciones de fenólicos con el BHT a 200 ppm.
3. El índice de peróxido (IP) demostró que los compuestos fenólicos a 240 ppm y el BHT a 200 ppm tienen un efecto antioxidante prácticamente similar, con valores de IP de 220.7 y 240.6 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite, respectivamente; ambos resultaron ser significativamente mejor que la muestra control.
4. En cuanto a los dienos conjugados, a los 15 días de almacenamiento, se obtuvieron valores de 4.95, 3.33 y 3.26, para la muestra control, BHT a 200 ppm y compuestos fenólicos a 240 ppm, respectivamente. Al igual que en la prueba de IP, se obtuvieron diferencias significativas entre la muestra control y las muestras con BHT y compuestos fenólicos, pero entre estos dos últimos no se encontraron diferencias significativas.
5. Para la evaluación de la oxidación secundaria del aceite, se evaluó el índice de *p*-anisidina. A diferencia del IP y dienos conjugados, en este caso sí se encontraron diferencias significativas entre el BHT a 200 ppm (valor *p*-anisidina de 109.7) y los compuestos fenólicos a 240 ppm (valor *p*-anisidina de 89.6), entre los 5 y 15 días de almacenamiento a 55 °C. Esto podría sugerir que los compuestos fenólicos de la fase

acetato de etilo de la mashua protegen mejor al aceite de linaza que el BHT, frente a la oxidación secundaria.

6. Respecto al perfil de ácidos grasos determinados por cromatografía gaseosa a los aceites sometidos a los diferentes tratamientos durante almacenamiento acelerado a 55 °C, se observó que las concentraciones del ácido palmítico, esteárico y oleico aumentaron; la del ácido linoleico se mantuvo prácticamente similar y la del ácido linolénico disminuyó. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de cada uno de los ácidos grasos, al comparar el BHT a 200 ppm y los compuestos fenólicos a 240 ppm.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar la eficacia antioxidante de la fase acuosa del extracto de compuestos fenólicos de la mashua en alimentos no grasos, ya que se ha comprobado que la mayor parte de los compuestos fenólicos, y por ende, la capacidad antioxidante, se encuentran en la fase acuosa.
- Como se pudo revisar en la literatura, puede existir un efecto sinérgico entre diferentes antioxidantes. Se recomienda utilizar antioxidantes naturales como el ácido ascórbico o el palmitato de ascorbilo en combinación con los fenólicos de la mashua y evaluar su efecto antioxidante en diferentes aceites.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberto, B. 1997. Oxidación de Lípidos y Antioxidantes. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
2. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
3. Arnao, M. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science and Technology. Vol. 11(11): 419-421.
4. Badui, S. 1990. Química de los Alimentos. Segunda edición. Editorial Alhambra Mexicana. México, D.F., México.
5. Baltes, W. 2006. Química de los Alimentos. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
6. Betalleluz, I.; Chirinos, R.; Rogez, H.; Pedreschi, R.; Campos, D. 2012. Phenolic compounds from Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum*) tubers display protection against soybean oil oxidation. Food Science and Technology International. Vol. 18(3): 271-280.
7. Campos, D. 2010. Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (*Caesalpinia spinosa*) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales. Perú Biodiverso. Lima, Perú.
8. Campos, D.; Chirinos, R.; Barreto, O.; Noratto, G.; Pedreschi, R. 2013. Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic

compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*). *Industrial Crops and Products*. Vol. 49: 747-754.

9. Campos, D.; Noratto, D.; 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 y Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) y olluco (*Ollucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 86(10): 1481- 1488.
10. Castillo, J. 2007. Evaluación de la estabilidad oxidativa de grasas interesterificadas enzimáticamente. Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia.
11. Ceballos, C.; Contreras, K.; Villaroel, M.; Morales, E.; Acevedo, F.; Rubilar, M. 2011. Desarrollo de una sopa en polvo enriquecida con aceite de linaza microencapsulado como fuente de omega-3. CIBIA 8. Lima, Perú.
12. Cedano, I. 2009. Estudio de la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos obtenidos a partir de mashua (*Tropaeolum tuberosum*, Ruiz y Pavón) en la estabilidad del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis (Mg Sc en Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
13. Chabur, M. 2012. Evaluación del efecto de liofilizado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) en las poblaciones microbianas de suelo como estrategia de manejo de rizoctonias en cultivo de papa. Tesis (Magíster en Ciencias – Bioquímica). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
14. Chambi, F.; Chirinos, R.; Pedreschi, R.; Betalleluz, I.; Debaste, F.; Campos, D. 2013. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*. Vol. 47: 168:175.
15. Chirinos, R.; Betalleluz, I.; Huamán, A.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Campos, D. 2009. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*. Vol. 113: 1243-1251.

16. Chirinos, R.; Campos, D.; Betalleluz, I.; Giusti, M.; Schwartz, S.; Tian, Q.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y. 2006. High- Performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD)/HPLC-Mass Spectrometry (MS) profiling of anthocyanins from Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón) and their contribution to the overall antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 54(19): 7089-7097.
17. Chirinos, R.; Campos, D. Costa, N.; Arbizu, C.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y. 2008. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry*. Vol. 106: 1285-1298.
18. Chirinos, R.; Galarza, J.; Betalleluz, I.; Pedreschi, R.; Campos, D. 2010. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*. Vol. 120: 1019-1024.
19. Chirinos, R.; Huamán, M.; Betalleluz, 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*. Vol. 128: 711-716.
20. Chirinos, R.; Rogez, H.; Campos, D.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*. Vol. 55: 217-225.
21. Choe, E.; Min, D. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 5: 169-186.
22. Codex Alimentarius. 1999. Norma del Codex para aceites vegetales especificados. En línea: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>. Consulta: 17 de abril del 2014.

23. Codex Alimentarius. 2013. Proposed draft standard for fish oils. En línea: [ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccfo/ccfo23/fo23\\_03e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccfo/ccfo23/fo23_03e.pdf). Consulta: 27 de diciembre del 2014.
24. Codony, R.; Guardiola, F.; Bou, R.; Tres, A. 2010. Valoración Analítica y Nutricional de las Grasas. XXVI Curso de Especialización FEDNA. Madrid, España.
25. Collins, K. 2010. Flaxseed and Breast Cancer. American Institute for Cancer Research. USA.
26. Conchillo, A.; Valencia, I.; Puente, A.; Ansorena, D.; Astiasarán, I. 2006. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. Revista Nutrición Hospitalaria. Vol. 21(3): 369-373.
27. Córdova, C. 2012. Evaluación del efecto del secado a dos temperaturas en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de la mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón). Tesis (Ingeniero en Industrias Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
28. Cuya, R. 2009. Efecto de secado en bandeja y atomización sobre la actividad antioxidante de la mashua (*Tropaeolum tuberosum* R & P). Tesis (Mg Sc en Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
29. El-Beltagi, H.; Salama, Z.; El-Hariri, D. 2007. Evaluation of fatty acids profile and the content of some secondary metabolites in seeds of different flax cultivars (*Linum usitatissimum* L.). General and Applied Plant Physiology. Vol. 33(3-4): 187-202.
30. Espinoza, S.; Monteghirfo, M.; Álvarez, J.; Arnao, I. 2002. Análisis electroforético unidimensional y bidimensional de las proteínas de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua). Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Laboratorio de Química Bioorgánica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

31. European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to tertiary-Butylhydroquinone (TBHQ). EFSA Journal. Vol. 84: 1-50.
32. European Food Safety Authority. 2011. Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive. EFSA Journal. Vol. 9(10): 23-92.
33. European Food Safety Authority. 2012. Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA Journal. Vol. 10(3): 25-88.
34. Fennema, O. 2000. Química de los Alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
35. Figuerola, F.; Muñoz, O.; Estévez, A. 2008. La linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos. Revista Agro Sur. Vol. 36(2): 49-58.
36. Ganorkar, P.M.; Jain, R.K. 2013. Flaxseed – a nutritional punch. International Food Research Journal. Vol. 20(2): 519-525.
37. Gómez, D. 1998. Efectos de la nutrición mineral sobre el crecimiento y rendimiento de la mashua (*Tropaeolum tuberosum* B.). Tesis (Ingeniería Agrónoma). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
38. Grau, A.; Ortega, R.; Nieto, C.; Hermann, M. 2003. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 25. International Potato Center, Lima, Peru / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
39. Grompone, M. 1991. El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. Grasas y Aceites. Vol. 42(1): 8-13.

40. Guillén, M.; Ruiz, A.; Cabo, N.; Chirinos, R.; Pascual, G. 2003. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR. Comparison with Linseed Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. Vol. 80(8): 755-762.
41. Hamed, S.; Abo-Elwafa, G. 2012. Enhancement of oxidation stability of flax seed oil by blending with stable vegetable oils. Journal of Applied Sciences Research. Vol. 8(10): 5039-5048.
42. Harper, C.; Edwards, M.; DeFilipis, A.; Jacobson, T. 2006. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. The Journal of Nutrition: 83-87.
43. IUPAC. 1987. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7<sup>th</sup> edition. Blackwell Scientific Publications Editorial. Oxford, England.
44. Limachi, I.; Farfán, O.; Sterner, O.; Giménez, A. 2009. Estudios preliminares de la caracterización química de ácidos grasos del aceite de frutos de *Bertholletia excelsa* por cromatografía de gases. Revista Científica BIOFARBO. Vol. 17(1): 47-53.
45. Lozano, J.; Segura, A.; Fernández, A. Composición del aceite de oliva. En línea: [http://www.economiaandaluza.es/sites/default/files/capitulo%207\\_0.pdf](http://www.economiaandaluza.es/sites/default/files/capitulo%207_0.pdf). Consulta: 10 de enero del 2014.
46. Mercader, M. 2010. Encapsulación de flavonoles en ciclodextrinas: Efecto en su actividad antioxidante. Tesis Doctoral (Tecnología de la Alimentación y Nutrición). Universidad Católica San Antonio. Murcia, España.
47. Michotte, D. 2009. Etude de la stabilité oxydative de l'huile de lin en présence de composés phénoliques naturels. Memoria para la obtención de Grado (Bioingeniería en Agronomía, Ciencias de la Orientación, Tecnología y Calidad de los Alimentos). Université Catholique de Louvain. Lovaina, Bélgica.

48. Miranda, M.; Vega-Gálvez, A.; López, J.; Parada, G.; Sandersa, M.; Arandab, M.; Uribea, E.; Di Scala, K. 2010. Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Industrial Crops and Products*. Vol. 32: 258-263.
49. Morillas, J.; Delgado, J. 2012. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. Vol. 32(2): 8-20.
50. National Toxicology Program. 2011. Butylated hydroxyanisole. En línea: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/ButylatedHydroxyanisole.pdf>. Consulta: 24 de diciembre del 2013.
51. Navas, J. 2005. Optimización y control de la calidad y estabilidad de aceites y productos de fritura. Memoria (Doctor en Medicamentos, Alimentación y Salud). Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
52. Norveel, T. 2012. Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils. Norwegian University of Science and Technology. Norway.
53. Oomah, B.D. 2001. Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 81: 889-894.
54. Pardauil, J.; Souza, L.; Molfetta, F.; Zamian, J.; Rocha, G.; da Costa, C. 2011. Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. *Bioresource Technology*. Vol. 102: 5873-5877.
55. Pérez, L.; Chávez, K.; Medina, L.; Gámez, N. 2013. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. Vol. 15(1): 51-56.
56. Pérez, M. 2005. Evaluación de las características funcionales de diez cultivares de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) en 6 estados de crecimiento y

diferentes períodos de soleado. Tesis (Ing. en Industrias Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

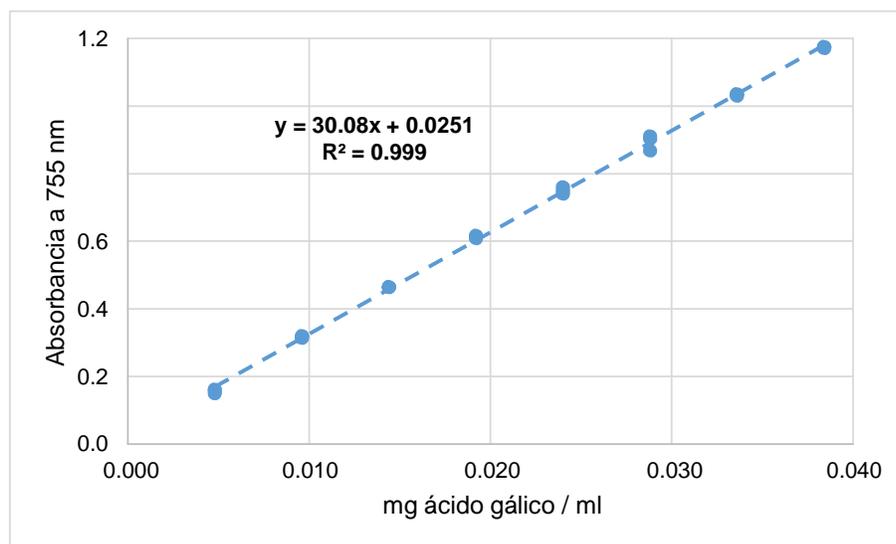
57. Popa, V.; Gruia, A.; Raba, D.; Dumbrava, D.; Moldovan, C.; Bordean, D.; Mateescu, C. 2012. Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from Romania. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. Vol. 18(2): 136-140.
58. Rafalowski, R.; Zegarska, Z.; Kuncewicz, A.; Borejszo, Z. 2008. Fatty acid composition, tocopherols and  $\beta$ -carotene content in Polish commercial vegetable oils. *Pakistan Journal of Nutrition*. Vol. 7(2): 278-282.
59. Reyes, M.; Gómez-Sánchez, I.; Espinoza, C.; Bravo, F.; Ganoza, L. 2009. Tablas peruanas de composición de alimentos. Ministerio de Salud / Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
60. Ríos, L. 2004. Contribución al estudio de algunos compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante presente en diez genotipos de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) y a la evaluación de su estabilidad. Tesis (Ing. en Industrias Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
61. Sánchez, G. 2012. Caracterización y cuantificación de los ácidos grasos omega 3 y omega 6 presentes en el aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis (Maestría en Ciencias Químicas). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
62. Sanz, A.; Marí, A.; García, K.; García, M. 2012. Propuesta de perfil de ácidos grasos omega 3 en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 27(6): 1782-1802.
63. Sayago, A.; Marín, M.I.; Aparicio, R.; Morales, M.T. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*. Vol. 58(1): 74-86.
64. Shahidi, F. 2005. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Sixth edition. Wiley – Interscience Publication. USA.

65. Si, W.; Liang, Y.; Ma, K.; Chung, H.; Chen, Z. 2012. Antioxidant activity of capsaicinoid in canola oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 60: 6230-6234.
66. Singleton, V.; Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 16: 144-158.
67. Suja, K.; Abraham, J.; Thamizh, S.; Jayalekshmy, A.; Arumugan, C. 2004. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*. Vol. 84: 393-400.
68. Tan, C.; Che Man, Y.; Selamat, J.; Yusoff, M. 2001. Application of Arrhenius kinetics to evaluate oxidative stability in vegetable oils by isothermal differential scanning calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 78(11): 1133-1138.
69. Temoche, C. 2003. Evaluación de algunas características funcionales de 30 clones de mashua (*Tropaeolum tuberosum*, Ruiz y Pavón). Tesis (Ing. en Industrias Alimentarias). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
70. Urresta, B. 2010. Evaluación del valor nutricional de la harina de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) en dietas para pollos de engorde. Proyecto de Titulación (Ingeniero Agroindustrial). Escuela Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
71. Yapuchura, R. 2010. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) e inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze). Tesis (Magister Scientiae en Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
72. Yildirim, G. 2009. Effect of storage time on olive oil quality. Thesis (Mg Sc. in Food Engineering). Izmir Institute of Technology. Izmir, Turkey.

73. Zapata, L.; Gerard, L.; Davies, C.; Schwab, M. 2007. Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. Ciencia, Docencia y Tecnología. Vol. 35: 173-193.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1. DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS A 755 nm



**Figura 1: Curva estándar de compuestos fenólicos a 755 nm**

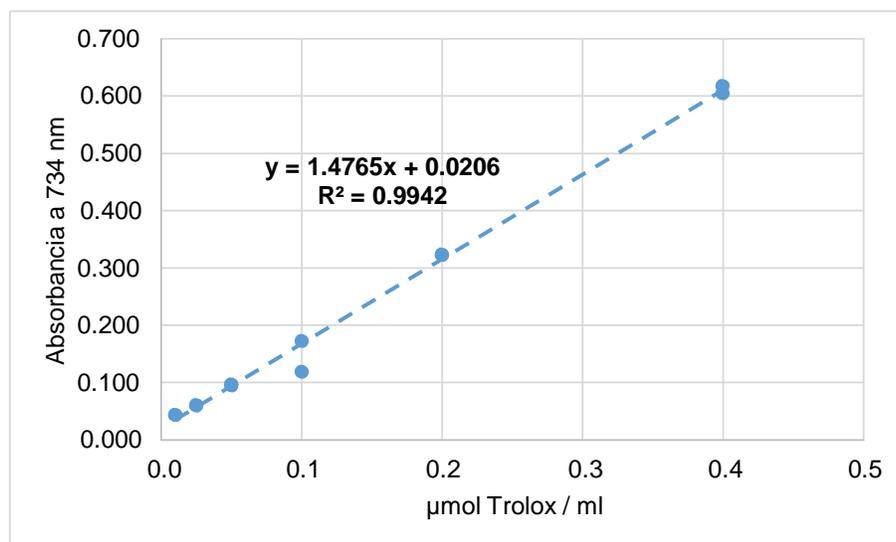
Ecuación:  $y = 30.08x + 0.0251$

Donde:

y: absorbancia a 755 nm

x: mg ácido gálico/ml

**ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE TROLOX PARA LA MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS A 734 nm**



**Figura 2: Curva estándar de capacidad antioxidante ABTS a 734 nm**

Ecuación:  $y = 1.4765x + 0.0206$

Donde:

y: absorbancia a 734 nm

x:  $\mu\text{mol Trolox / ml}$

### ANEXO 3. GRÁFICAS DE LOS RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA MEDIANTE CBD A 120 °C

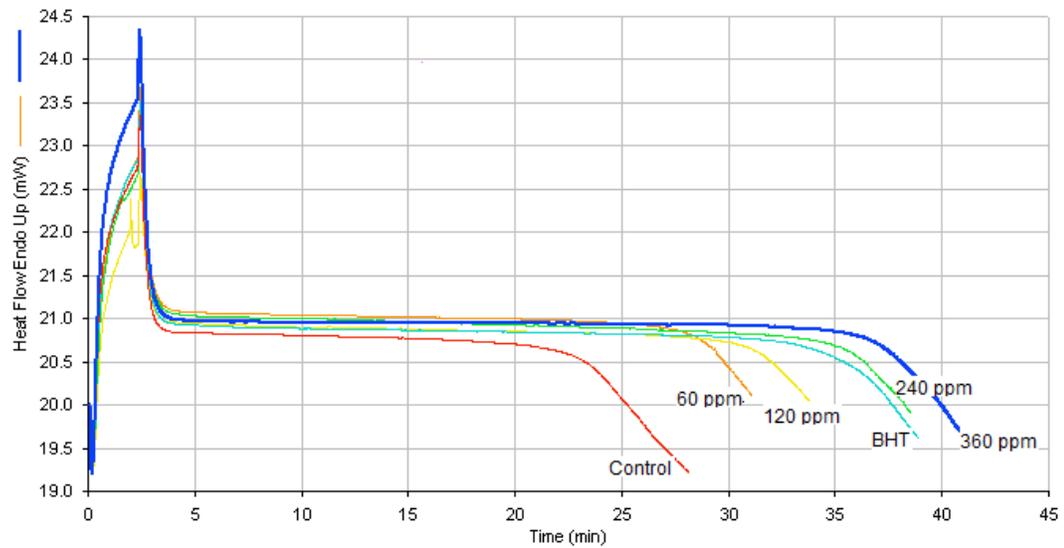


Figura 3: Termograma del aceite de linaza sometido a 120 °C

## ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### a. Estabilidad oxidativa mediante CBD

#### ANOVA simple – Tiempo de inducción por Tratamiento

Variable dependiente: Tiempo de inducción

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 6

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 6 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

#### **Tabla ANOVA para Tiempo de inducción por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	309.464	5	61.8928	113.74	0.0000
Intra grupos	3.265	6	0.544167		
Total (Corr.)	312.729	11			

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 113.739, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Tiempo de inducción por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	2	22.7	X
Fenólicos 60 ppm	2	28.6	X
Fenólicos 120 ppm	2	31.3	X
Fenólicos 240 ppm	2	35.4	X
BHT 200 ppm	2	36.6	X
Fenólicos 360 ppm	2	36.85	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	13.9
BHT 200 ppm - Fenólicos 120 ppm	*	5.3
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		1.2
BHT 200 ppm - Fenólicos 360 ppm		-0.25
BHT 200 ppm - Fenólicos 60 ppm	*	8.0
Control - Fenólicos 120 ppm	*	-8.6
Control - Fenólicos 240 ppm	*	-12.7
Control - Fenólicos 360 ppm	*	-14.15
Control - Fenólicos 60 ppm	*	-5.9
Fenólicos 120 ppm - Fenólicos 240 ppm	*	-4.1
Fenólicos 120 ppm - Fenólicos 360 ppm	*	-5.55
Fenólicos 120 ppm - Fenólicos 60 ppm	*	2.7
Fenólicos 240 ppm - Fenólicos 360 ppm		-1.45
Fenólicos 240 ppm - Fenólicos 60 ppm	*	6.8
Fenólicos 360 ppm - Fenólicos 60 ppm	*	8.25

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 12 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del

5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

## b. Índice de peróxido

### ANOVA simple – Índice de peróxido (día cero) por Tratamiento

Variable dependiente: Índice de peróxido

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

#### **Tabla ANOVA para Índice de peróxido por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0733556	2	0.0366778	2.06	0.2080
Intra grupos	0.106667	6	0.0177778		
Total (Corr.)	0.180022	8			

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2.06313, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

## ANOVA simple – Índice de peróxido (día 5) por Tratamiento

Variable dependiente: Índice de peróxido

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### **Tabla ANOVA para Índice de peróxido por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	481.751	2	240.876	23.27	0.0015
Intra grupos	62.1097	6	10.3516		
Total (Corr.)	543.861	8			

### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 23.2694, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Índice de peróxido por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	55.8033	X
BHT 200 ppm	3	59.83	X
Control	3	72.94	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-13.11
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		4.02667
Control - Fenólicos 240 ppm	*	17.1367

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### [ANOVA simple – Índice de peróxido \(día 10\) por Tratamiento](#)

Variable dependiente: Índice de peróxido

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla

ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Índice de peróxido por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4682.05	2	2341.02	18.64	0.0027
Intra grupos	753.618	6	125.603		
Total (Corr.)	5435.67	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 18.6383, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Índice de peróxido por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	114.993	X
BHT 200 ppm	3	118.287	X
Control	3	164.94	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-46.6533
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		3.29333
Control - Fenólicos 240 ppm	*	49.9467

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### ANOVA simple – Índice de peróxido (día 15) por Tratamiento

Variable dependiente: Índice de peróxido

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Índice de peróxido por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	10387.5	2	5193.75	12.55	0.0072
Intra grupos	2483.56	6	413.926		
Total (Corr.)	12871.0	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 12.5475, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Índice de peróxido por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	220.747	X
BHT 200 ppm	3	240.623	X
Control	3	300.667	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-60.0433
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		19.8767
Control - Fenólicos 240 ppm	*	79.92

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### c. Índice de *p*-anisidina

#### ANOVA simple – Índice de *p*-anisidina (día cero) por Tratamiento

Variable dependiente: Índice de *p*-anisidina

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

#### **Tabla ANOVA para Índice de *p*-anisidina por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00328889	2	0.00164444	0.09	0.9149
Intra grupos	0.109333	6	0.0182222		
Total (Corr.)	0.112622	8			

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.0902439, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

## ANOVA simple – Índice de p-anisidina (día 5) por Tratamiento

Variable dependiente: Índice de *p*-anisidina

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### **Tabla ANOVA para Índice de p-anisidina por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	409.92	2	204.96	98.15	0.0000
Intra grupos	12.5297	6	2.08829		
Total (Corr.)	422.45	8			

### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 98.1475, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Índice de p-anisidina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Fenólicos 240 ppm	3	11.3267	X
BHT 200 ppm	3	22.73	X
Control	3	27.3933	X

Contraste	Sig.	Diferencia
BHT 200 ppm - Control	*	-4.66333
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm	*	11.4033
Control - Fenólicos 240 ppm	*	16.0667

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### [ANOVA simple – Índice de p-anisidina \(día 10\) por Tratamiento](#)

Variable dependiente: Índice de *p*-anisidina

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla

ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Índice de p-anisidina por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2338.32	2	1169.16	62.74	0.0001
Intra grupos	111.806	6	18.6343		
Total (Corr.)	2450.12	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 62.7422, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Índice de p-anisidina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	41.91	X
BHT 200 ppm	3	52.86	X
Control	3	80.2367	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-27.3767
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm	*	10.95
Control - Fenólicos 240 ppm	*	38.3267

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### ANOVA simple – Índice de p-anisidina (día 15) por Tratamiento

Variable dependiente: Índice de *p*-anisidina

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Índice de p-anisidina por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3042.5	2	1521.25	18.11	0.0029
Intra grupos	503.977	6	83.9961		
Total (Corr.)	3546.48	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 18.1109, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Índice de p-anisidina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	89.5733	X
BHT 200 ppm	3	109.773	X
Control	3	134.533	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-24.76
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm	*	20.2
Control - Fenólicos 240 ppm	*	44.96

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

#### d. Dienes conjugados

##### ANOVA simple – Dienes conjugados (día cero) por Tratamiento

Variable dependiente: Dienes conjugados

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

##### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

##### **Tabla ANOVA para Dienes conjugados por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.000822222	2	0.000411111	0.15	0.8630
Intra grupos	0.0163333	6	0.00272222		
Total (Corr.)	0.0171556	8			

##### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.15102, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

### ANOVA simple – Dienes conjugados (día 5) por Tratamiento

Variable dependiente: Dienes conjugados

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

#### **Tabla ANOVA para Dienes conjugados por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.151089	2	0.0755444	39.30	0.0004
Intra grupos	0.0115333	6	0.00192222		
Total (Corr.)	0.162622	8			

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 39.3006, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Dienes conjugados por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT 200 ppm	3	1.09	X
Control	3	1.26667	X
Fenólicos 240 ppm	3	1.40667	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-0.176667
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm	*	-0.316667
Control - Fenólicos 240 ppm	*	-0.14

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### [ANOVA simple – Dienes conjugados \(día 10\) por Tratamiento](#)

Variable dependiente: Dienes conjugados

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla

ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Dienes conjugados por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.264289	2	0.132144	6.34	0.0331
Intra grupos	0.125	6	0.0208333		
Total (Corr.)	0.389289	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 6.34293, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Dienes conjugados por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT 200 ppm	3	2.02333	X
Fenólicos 240 ppm	3	2.16667	XX
Control	3	2.43667	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-0.413333
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		-0.143333
Control - Fenólicos 240 ppm		0.27

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### [ANOVA simple – Dienes conjugados \(día 15\) por Tratamiento](#)

Variable dependiente: Dienes conjugados

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Dienes conjugados por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5.44002	2	2.72001	19.79	0.0023
Intra grupos	0.824733	6	0.137456		
Total (Corr.)	6.26476	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 19.7883, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Dienes conjugados por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	3.26667	X
BHT 200 ppm	3	3.33	X
Control	3	4.94667	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-1.61667
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		0.0633333
Control - Fenólicos 240 ppm	*	1.68

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

## e. Perfil de ácidos grasos

### ANOVA simple – Concentración % (ácido palmítico) por Tratamiento

Variable dependiente: Concentración %

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

#### **Tabla ANOVA para Concentración % por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.1064	2	0.0532	13.08	0.0065
Intra grupos	0.0244	6	0.00406667		
Total (Corr.)	0.1308	8			

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 13.082, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración % por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT 200 ppm	3	5.92	X
Fenólicos 240 ppm	3	5.94	X
Control	3	6.16	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-0.24
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		-0.02
Control - Fenólicos 240 ppm	*	0.22

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### ANOVA simple – Concentración % (ácido esteárico) por Tratamiento

Variable dependiente: Concentración %

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla

ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Concentración % por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0572222	2	0.0286111	11.55	0.0088
Intra grupos	0.0148667	6	0.00247778		
Total (Corr.)	0.0720889	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 11.5471, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración % por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT 200 ppm	3	4.26667	X
Fenólicos 240 ppm	3	4.3	X
Control	3	4.45	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-0.183333
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		-0.0333333
Control - Fenólicos 240 ppm	*	0.15

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### ANOVA simple – Concentración % (ácido oleico) por Tratamiento

Variable dependiente: Concentración %

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

### Tabla ANOVA para Concentración % por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.925356	2	0.462678	21.68	0.0018
Intra grupos	0.128067	6	0.0213444		
Total (Corr.)	1.05342	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 21.6767, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración % por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT 200 ppm	3	16.21	X
Fenólicos 240 ppm	3	16.29	X
Control	3	16.9267	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	-0.716667
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		-0.08
Control - Fenólicos 240 ppm	*	0.636667

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### ANOVA simple – Concentración % (ácido linoleico) por Tratamiento

Variable dependiente: Concentración %

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

#### **El StatAdvisor**

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

**Tabla ANOVA para Concentración % por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0504667	2	0.0252333	5.75	0.0403
Intra grupos	0.0263333	6	0.00438889		
Total (Corr.)	0.0768	8			

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 5.74937, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración % por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fenólicos 240 ppm	3	17.45	X
BHT 200 ppm	3	17.5367	XX
Control	3	17.6333	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control		-0.0966667
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		0.0866667
Control - Fenólicos 240 ppm	*	0.183333

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

### [ANOVA simple – Concentración % \(ácido linolénico\) por Tratamiento](#)

Variable dependiente: Concentración %

Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

### El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si le preocupa la presencia de valores atípicos, puede elegir la Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias. Las diferentes gráficas le ayudarán a juzgar la significancia práctica de los resultados, así como le permitirán buscar posibles violaciones de los supuestos subyacentes en el análisis de varianza.

**Tabla ANOVA para Concentración % por Tratamiento**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	6.38462	2	3.19231	14.63	0.0049
Intra grupos	1.30933	6	0.218222		
Total (Corr.)	7.69396	8			

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 14.6287, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

## Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración % por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	53.3333	X
Fenólicos 240 ppm	3	55.0533	X
BHT 200 ppm	3	55.18	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
BHT 200 ppm - Control	*	1.84667
BHT 200 ppm - Fenólicos 240 ppm		0.126667
Control - Fenólicos 240 ppm	*	-1.72

\* indica una diferencia significativa.

### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los

2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del

5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.