

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“DISEÑO DE MEZCLAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN
FUNCIÓN A SU EFICACIA ANTIOXIDANTE EN EL ACEITE DE
SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*)”**

Presentado por:

RULY TERAN HILARES

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“DISEÑO DE MEZCLAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN
FUNCIÓN A SU EFICACIA ANTIOXIDANTE EN EL ACEITE DE
SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE**

Presentado por:

RULY TERAN HILARES

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Gladys Tarazona Reyes
PRESIDENTE

Dr. David Campos Gutiérrez
PATROCINADOR

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
CO-PATROCINADOR

M.S. Francisco Salas Valerio
MIEMBRO

Mg.Sc. Beatriz Hatta Sakoda
MIEMBRO

AGRADECIMIENTO

Al Dr. David Campos por su asesoría y constante apoyo para la ejecución del presente trabajo.

A la Dra. Rosana Chirinos por su apoyo incondicional y su apoyo para la ejecución del presente trabajo.

A mis compañeros del IBT-UNALM, por su apoyo y sus consejos a diario para un buen desempeño.

...A dios y a mi familia

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	
Índice	
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	4
2.1. Compuestos fenólicos	4
2.1.1. Clasificación de compuestos fenólicos	4
2.1.2. Relación estructura-actividad de compuestos fenólicos	7
2.2. Taninos	8
2.3. Aceite de sachá inchi	10
2.4. Mecanismos de oxidación de lípidos	12
2.4.1. Iniciación	13
2.4.2. Propagación	14
2.4.3. Finalización	15
2.5 Métodos de evaluación de la estabilidad oxidativa de aceites	16
2.5. Antioxidantes	20
2.5.1. Antioxidantes primarios	21
2.5.2. Antioxidantes secundarios	23
2.6. Compuestos fenólicos como antioxidantes	25
2.7. Interacción de antioxidantes en la oxidación de alimentos	25
III. Materiales y métodos	28
3.1. Lugar de ejecución	28
3.2. Materiales y métodos	28
3.2.1. Materia prima	28
3.2.2. Reactivos	28
3.2.3. Materiales	29
3.2.4. Equipos	29
3.3. Métodos de análisis	29
3.4. Metodología experimental	37
3.4.1. Extracción de compuestos fenólico	37
3.4.2. Hidrólisis térmica de galotaninos de Tara	41
3.4.3. Diseño de mezclas antioxidantes	41

3.4.4. Pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C	43
IV. Resultados y discusiones	45
4.1. Hidrólisis de galotaninos de tara	45
4.2. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	49
4.3. Evaluación de la eficacia antioxidante de galotaninos hidrolizados en la estabilidad del aceite de sachá inchi	52
4.4. Capacidad antioxidante de mezclas de extractos fenólicos	56
4.4.1. Diseño de mezclas antioxidantes a partir de extractos fenólicos de tara, inca muña y mashua	56
4.4.2. Evaluación del efecto sinérgico de mezclas antioxidantes de extractos fenólicos de tara, inca muña y mashua con PA, ácido cítrico y α -tocoferol	62
4.4.3. Evaluación del efecto de la concentración del extracto hidrolizado de tara y del palmitato de ascorbilo sobre la eficacia antioxidante en el aceite de sachá inchi	65
4.5. Pruebas de almacenamiento acelerado	67
4.5.1. Índice de peróxidos	67
4.5.2. Valor p-anisidina	68
4.5.3. Dienos conjugados	70
4.5.4. Perfil de ácidos grasos	71
4.5.5. Contenido de tocoferoles	72
4.5.5. Contenido de fitosteroles	78
V. Conclusiones	80
VI. Recomendaciones	82
VII. Referencias bibliográficas	83
VIII. Anexos	91

Índice de cuadros

Cuadro		Pág.
1	Clasificación de compuestos fenólicos	5
2	Porcentaje de ácidos grasos de diferentes aceites vegetales.	11
3	Tiempos de inducción para diferentes aceites obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido (CBD) a una temperatura de 120 °C.	20
4	Mezclas de extractos fenólicos obtenidas para la evaluación de la actividad antioxidante mediante pruebas <i>in vitro</i> y eficacia antioxidante en aceite de sachá inchi.	42
5	Evolución del contenido de ácido gálico, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los galotaninos de tara hidrolizados a diferentes tiempos.	50
6	Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección del aceite de sachá inchi en presencia de extractos de tara de diferentes grados (tiempo de hidrólisis) a una concentración de 200 ppm.	54
7	Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los tres componentes empleados para la preparación de las diferentes mezclas.	57
8	Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante específica, periodos de inducción, y factor de estabilización de mezclas de extractos hidrolizados de tara, fenólicos de inca muña y mashua.	58
9	Periodo de inducción, grado de protección y factor de estabilización del aceite de sachá inchi obtenidos en presencia de antioxidantes.	64
10	Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección determinados para el aceite de sachá inchi en presencia de mezclas de extractos hidrolizados de tara y palmitato de ascorbilo.	66
11	Perfil de ácidos grasos (g/100 g de aceite) del aceite de sachá inchi con y sin antioxidante a diferentes tiempos de almacenamiento.	73
12	Variación en el contenido de tocoferoles en mg/100 g de aceite de sachá inchi durante las pruebas de almacenamiento acelerado.	75
13	Variación del contenido de fitosteroles en el aceite de sachá inchi sometidos a pruebas de almacenamiento acelerado.	78

Índice de figuras

Figura		Pág.
1	Estructura de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámicos.	6
2	Estructura general de una molécula de flavonoide.	6
3	Enlace característico en galotaninos (<i>meta</i> -depsídico) y estructura del pentagaloil glucosa.	8
4	Hidrólisis de ácido tánico.	9
5	Curva de oxidación obtenida mediante calorimetría de barrido diferencial del aceite de maíz. (A) Curva isotérmica a 130°C con nitrógeno (99.9%) y (B) curva isotérmica a 130°C con oxígeno (98.0%).	19
6	Estructura química de los tocoferoles.	22
7	Extracción, purificación parcial e hidrólisis de galotaninos presentes en extracto de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>).	38
8	Extracción de extractos antioxidantes de mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>) liofilizada.	39
9	Extracción de extractos antioxidantes de hojas de inca muña (<i>Clinopodium bolivianum</i>).	40
10	Evolución del contenido de ácido gálico libre (a) y grado de hidrólisis (b) durante el tratamiento de los extractos de tara a 121.1°C y 105 kPa.	46
11	Perfiles cromatográfico de extractos de tara con diferentes grados de hidrólisis.	48
12	Modelos de ajuste de la capacidad antioxidante de extractos hidrolizados de tara con diferentes tiempos de hidrolisis.	52
13	Termograma obtenido para el aceite de sachá inchi a 120 °C conteniendo diferentes antioxidantes.	53
14	Grado de protección del aceite de sachá inchi obtenida por efecto de la adición de extractos de tara hidrolizados.	56
15	Capacidad antioxidante específica de las mezclas de compuestos fenólicos.	60
16	Superficie de respuesta para periodo de inducción del aceite de sachá inchi en presencia de mezclas de compuestos fenólicos.	62

17	Evolución del índice de peróxido en el aceite de sachá inchi con diferentes antioxidantes durante el periodo de almacenamiento.	67
18	Evolución del valor <i>p</i> -anisidina en el aceite de sachá inchi durante las pruebas de almacenamiento acelerado.	69
19	Incremento en dienos conjugados en el aceite de sachá inchi.	71
20	Cinética de degradación de γ y δ -tocoferol en aceite de sachá inchi con y sin adición de antioxidantes.	77

Índice de Anexos

Anexo		Pág.
1	Curva estándar para la determinación de ácido gálico	92
2	Curva estándar para la determinación de fenólicos totales	93
3	Curva estándar para la determinación de capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	94
4	Curva estándar para la cuantificación de tocoferoles en el aceite de sachá inchi	95
5	Cromatograma obtenido para los estándares de ácidos grasos	96
6	Cromatograma correspondiente a los estándares de fitosteroles	97

RESUMEN

Los aceites vegetales con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a la oxidación, siendo necesaria la adición de antioxidantes. El objetivo fue diseñar un antioxidante que actúe eficientemente en la conservación del aceite de sachá inchi. Para lo cual se estudió la hidrólisis térmica de extractos de galotaninos de tara a 121.1°C y 105 KPa por seis tiempos (15, 30, 60, 90, 120 y 180 min.) evaluando la capacidad antioxidante *in vitro*; posteriormente el extractos hidrolizados de tara por 180 minutos (EHT) se mezclaron con palmitato de ascorbilo (PA), ácido cítrico y α -tocoferol, se evaluó la eficacia antioxidante empleando calorimetría de barrido diferencial (CBD) y pruebas de almacenamiento acelerado a 55 °C por 30 días. El tratamiento a 121.1°C y 105 KPa por 180 min de los galotaninos de tara, permiten un grado de hidrólisis de 29.8% y capacidades antioxidantes ABTS, FRAP y ORAC de 941, 940 y 703 $\mu\text{mol ET/ml}$, respectivamente; en adición la eficacia antioxidante de 200 ppm de EHT, fue más eficiente que BHT para evitar la oxidación del aceite de sachá inchi, cuando fueron evaluados mediante CBD. Se encontró un efecto sinérgico de 24% cuando fueron mezclados 400 ppm de EHT con 100 ppm de PA, alcanzando periodos de inducción de 96.63 min y se demostró la efectividad respecto al BHT en la estabilidad oxidativa del aceite de sachá inchi durante el almacenamiento acelerado a 55°C, reduciendo significativamente la velocidad de formación de peróxidos, valor *p*-anisidina y dienos conjugados; permitiendo además la conservación de γ - y σ -Tocoferol en 47.6 y 50.8% al cabo de 20 días.

Palabras claves: *Caesalpinia espinosa*, *Tropaeolum tuberosum*, *Clinopodium bolivianum*, hidrólisis, mezclas antioxidantes, aceite de sachá inchi.

SUMMARY

Vegetable oils high in polyunsaturated fatty acids are susceptible to oxidation, being the necessary addition of antioxidants. The objective was to design an antioxidant that works efficiently in conservation of Sacha Inchi oil. Thermal hydrolysis of gallotannin extracts from tara pods (121.1 °C and 105 KPa) was evaluated at 15, 30, 60, 90, 120 and 180 min. It was determined the antioxidant capacity *in vitro*, after that gallotannin extracts from tara pods hydrolysed for 180 minutes (EHT) were mixed with ascorbyl palmitate (AP), citric acid and α -tocopherol. Antioxidant efficacy was evaluated using differential scanning calorimetry (DSC) and it was tested an accelerated storage at 55 °C for 30 days. Treatment at 121.1 °C and 105 KPa for 180 min of gallotannin extracts from tara pods, had a hydrolysis of 29.8% and ABTS, FRAP and ORAC antioxidant capacities of 941, 940 and 703 $\mu\text{mol ET/ml}$, respectively; the antioxidant efficacy of EHT 200 ppm was more efficient than BHT to prevent oxidation of Sacha Inchi oil, when tested using DSC. A synergistic effect of 24% was found when were mixed 400 ppm of EHT and 100 ppm of PA reaching induction periods of 96.63 min and the effectiveness was demonstrated compared to BHT in the oxidative stability of Sacha Inchi during accelerated storage at 55 °C, significantly reduced the rate of formation of peroxides, *p*-anisidine value and conjugated dienes, also allowing the retention of γ - and σ -tocopherol in 47.6 and 50.8% after 20 days.

Key words: *Caesalpinia espinosa*, *Tropaeolum tuberosum*, *Clinopodium bolivianum*, hydrolysis, antioxidant mixtures, Sacha Inchi oil.

I. INTRODUCCIÓN

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

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

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

De otro lado, se tiene a la inca muña, los compuestos fenólicos identificados en ella son principalmente del tipo de ácidos hidroxicinámicos y flavanoles (Yapuchura, 2012), extractos fenólicos de este producto han sido evaluados como antioxidante en procesos de fritura continua de papas (a 180°C) con muy buenos resultados (Chirinos *et al.*, 2013); finalmente extractos fenólicos obtenidos a partir de la mashua, conformados principalmente por flavanoles, ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos también fueron evaluados como antioxidantes en aceite de soya crudo durante almacenamiento acelerado (60°C por 15 días) demostrándose sus efectos antioxidantes, en ambos casos los extractos fenólicos presentaron iguales o superiores efectos antioxidantes respecto el BHT

Finalmente indicar que, es conocido que los antioxidantes pueden conservar y evitar la oxidación de las grasas y aceites, cuando son empleados bajo la forma de mezcla, respecto a cuándo son empleados independientemente, dado a al efecto sinérgico o aditivo que se produce entre ellos; así como también podrían presentarse efectos antagónicos. Bajo las consideraciones mencionadas, en la presente investigación se propuso evaluar el efecto de la combinación de los extractos fenólicos de la tara, inca muña y mashua, con perfiles de compuestos fenólicos diferentes, en la protección frente a la oxidación de un aceite altamente insaturado, como es el sachá inchi, en especial sobre sus constituyentes bioactivos: ácidos grasos omega-3 y -6; tocoferoles y fitoesteroles. Así los objetivos de la presente tesis fueron:

- Evaluar el proceso de hidrólisis térmica de los galotaninos de la tara para obtener extractos con alta capacidad antioxidante *in vitro*, así como evaluar su eficacia antioxidante en el aceite de sachá inchi.

- Diseñar una mezcla antioxidante empleando extractos fenólicos naturales procedentes de la tara (galotaninos hidrolizados), inca muña y mashua y con antioxidantes sintéticos (palmitato de ascorbilo, ácido cítrico y α -tocoferol) para alcanzar una alta eficacia antioxidante que permita conservar al aceite de sachu inchi de la oxidación y de la degradación de sus compuestos bioactivos naturales propios como tocoferoles y fitoesteroles.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

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

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de la estructura, en particular, el número y las posiciones de los grupos hidroxilo y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos (Balasundram *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos presentan una amplia gama de propiedades fisiológicas, tales como anti-alérgico, anti-inflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, anti-trombótico, cardioprotector y efecto vasodilatador. Se han asociado con los beneficios para la salud por el alto consumo de frutas y verduras (Hertog *et al.*, 1993; Parr y Bolwell, 2000).

2.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

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

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

Cuadro 1: Clasificación de compuestos fenólicos

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

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

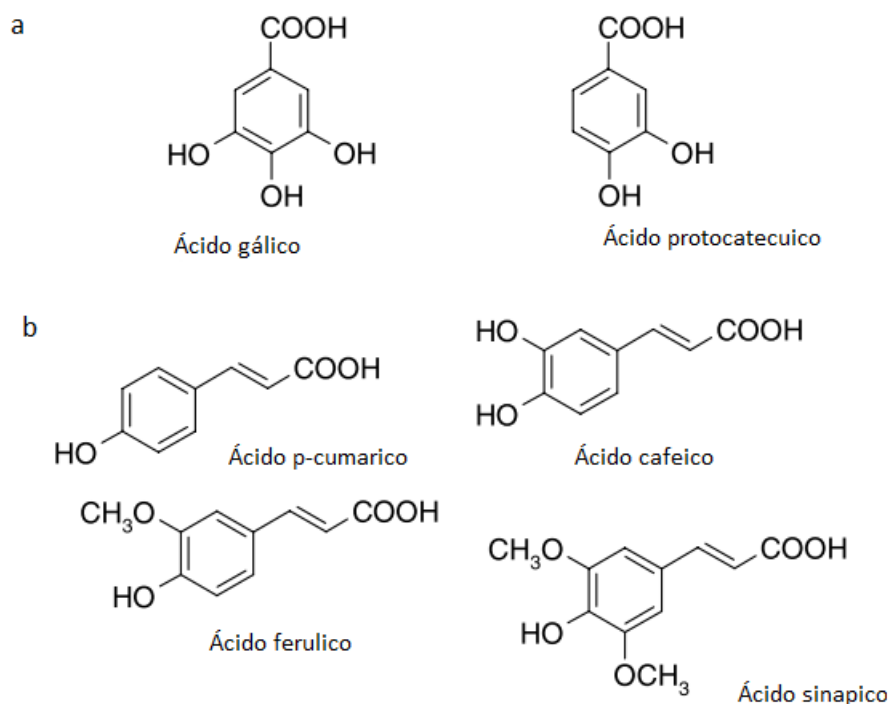


Figura 1: Estructura de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinámicos (b)

Fuente: Vermerris y Nicholson (2009)

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

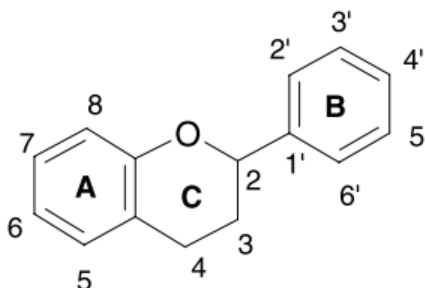


Figura 2. Estructura general de una molécula de flavonoide

Fuente: Vermerris y Nicholson (2010)

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

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

2.1.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar a los radicales libres, átomos de hidrógeno o donar electrones, o quelar metales catiónicos (Amarowicz *et al.*, 2004).

La estructura de los compuestos fenólicos es un determinante clave de su actividad de captación de radicales y quelación de metales, y esto se conoce como relaciones estructura-actividad (SAR). En el caso de los ácidos fenólicos, por ejemplo, la actividad antioxidante depende de los números y posiciones de los grupos hidroxilo en relación con el grupo funcional carboxilo (Rice-Evans *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999).

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

asociado al anillo fenólico que posee, lo que asegura una mayor capacidad de donar hidrógenos y estabilizar radicales que el grupo -COOH presente en los ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans *et al.*, 1996).

2.2. LOS TANINOS

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

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

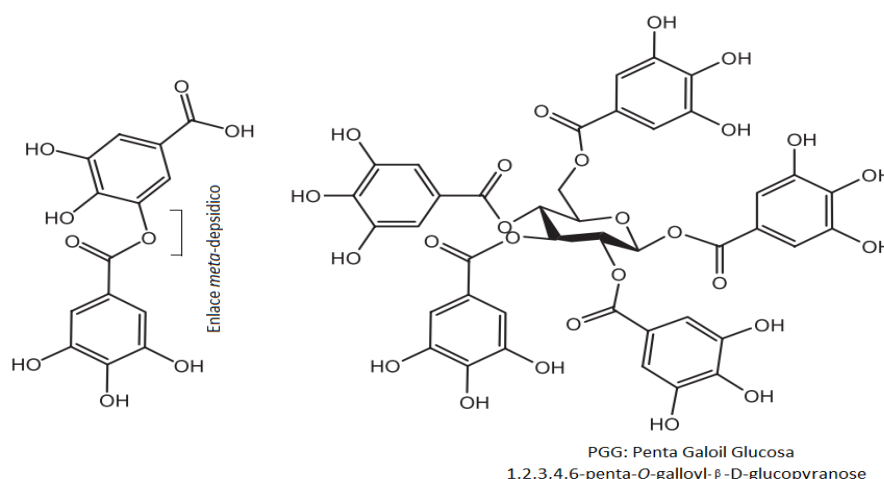


Figura 3. Enlace característico en galotaninos (*meta*-depsídico) y estructural del penta galoil glucosa

Fuente: González *et al.* (2010)

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

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

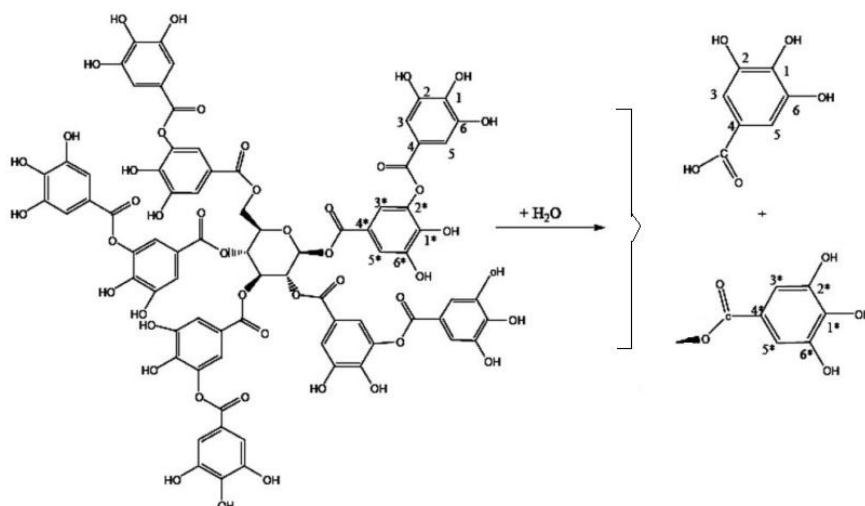


Figura 4. Hidrólisis de ácido tánico

Fuente: Kim *et al.* (2010)

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

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

2.3. ACEITE DE SACHA INCHI

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

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

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

Chirinos *et al.* (2013) encontraron porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados, en 16 cultivares de semillas de sacha inchi, en rangos entre 78.0 - 81.1%; 10.8 - 13.2% y 7.9 - 9.1%, respectivamente.

La ingesta dietaria óptima del ALA parece ser alrededor de 2 g/día o 0.6-1% de la ingesta total de energía (Follegatti-Romero *et al.*, 2009). Estos ácidos grasos poliinsaturados pueden ser alargados y desaturados en sus derivados de cadena más larga a ácidos araquidónico y eicosapentanoico (EPA, 20:5 omega-3) y a ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 omega-3). Varios estudios han sugerido fuertemente que estos ácidos grasos son importantes en relación a la patogénesis (y prevención) de enfermedades cardíaca coronarias y la hipertensión, además de mostrar un efecto

hipocolesterolémico cuando se usan como suplementos alimenticios (Follegatti-Romero *et al.*, 2009). Una comparación entre el perfil de ácidos grasos encontrados en el aceite de sachá inchi y otros aceites vegetales se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje de ácidos grasos de diversos aceites vegetales

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

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

Adicionalmente a la presencia de los ácidos grasos omegas, el sachá inchi presenta tocoferoles. Chirinos *et al.* (2013) reportaron la presencia de α -, β -, γ - y δ -tocoferol en 16 diferentes cultivares de sachá inchi, en rangos entre 1.13 - 1.27, 0.67 - 0.95, 56.8 -81.4 y 29.2 - 54.6 mg/100 g de semilla, respectivamente. En estudios realizados por Fanali *et al.* (2011) se determinaron α -, γ -, δ -tocoferol, en concentraciones de 0.004, 1.257 y 0.869 g/Kg de aceite, respectivamente. Se ha reportado que la actividad antioxidante evaluada *in vitro* disminuye en el siguiente orden γ - > δ - > β - > α -tocoferol (Fanali *et al.*, 2011). Desde un punto de vista nutricional, la absorción intestinal de γ -tocoferol es similar al de α -tocoferol y podría desempeñar un papel específico en efectos secundarios de prevención de algunos radicales como el peroxinitrilo (Hunter, 2001).

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

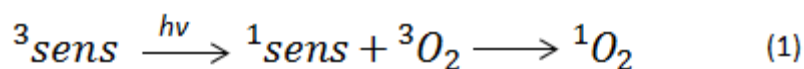
Frecuentemente, el aceite de sacha inchi es obtenido por prensado en frío y comercializado como aceite crudo. El prensado en frío permite recuperar parcialmente al aceite. De otro lado, la extracción por métodos convencionales, como la extracción con hexano, podría dar lugar a problemas de deterioro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

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

2.4. MECANISMOS DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación de lípidos es un fenómeno complejo inducido por el oxígeno en presencia de iniciadores tales como el calor, los radicales libres, luz, pigmentos fotosensibilizantes e iones metálicos. Se produce a través de tres vías de reacción: (i) autooxidación no enzimática de la cadena mediada por los radicales libres, (ii) fotooxidación no enzimática y no radical, y (iii) oxidación enzimática. Los dos primeros tipos de oxidación consisten en una combinación de reacciones que involucran el oxígeno triplete $^3\text{O}_2$, que podría ser considerado como un estado fundamental birradical

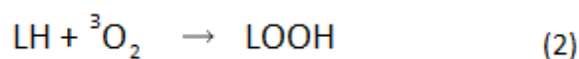
•OO•, y el oxígeno singlete 1O_2 , que corresponde a un estado excitado de la molécula. El mecanismo de fotooxidación depende del tipo de fotosensibilizador. En las reacciones de tipo II, un fotosensibilizador triplete (3sens , reacción (1) abajo presentada) absorbe fotones y se convierte en oxígeno singlete, y a partir de entonces la transmisión de su energía al oxígeno molecular, que a su vez se excita y forma oxígeno singlete que es alrededor de 1.500 veces más reactivo que el oxígeno triplete:



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

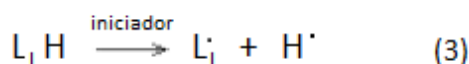
2.4.1. INICIACIÓN

La fase de iniciación implica la descomposición homolítica del hidrógeno en una posición relativa α al doble enlace de la cadena del ácido graso LH. Es poco probable que la reacción (2) (abajo presentada) se produzca de forma espontánea con 3O_2 debido a la muy alta energía de activación que surge de la barrera de giro entre los lípidos y 3O_2 .



La reacción puede, sin embargo, ser iniciada a través de los agentes físicos externos, tales como calor, radiación ionizante o un impacto fotónico en el espectro ultravioleta y también por agentes químicos tales como iones metálicos, radicales libres

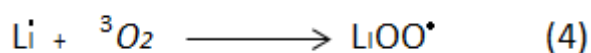
y metaloproteínas (reacción (3) abajo indicada), a través de un mecanismo aún controversial. De hecho, la etapa de iniciación de la auto-oxidación es difícil de definir debido a la baja concentración de los radicales y la probabilidad de que haya más de un proceso.



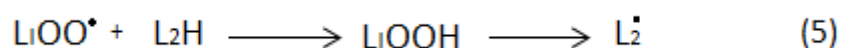
Esto resulta en la formación de radicales libres (Li), es decir, especies químicas con un electrón desapareado. Estos son productos intermedios altamente inestables, de corta vida que estabilizan abstrayendo un hidrógeno de otras especies químicas. El proceso de oxidación sigue siendo lento durante esta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

2.4.2. PROPAGACIÓN

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



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



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

2.4.3. FINALIZACIÓN

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

Otros compuestos secundarios no volátiles también se forman, incluyendo aldehídos no volátiles, triglicéridos oxidados y sus polímeros. La descomposición de compuestos de oxidación primarios es un mecanismo complejo en el que un solo hidroperóxido puede generar varios tipos de moléculas volátiles o no volátiles. El tipo de subproductos obtenidos después de la oxidación de ácidos grasos es determinado por la composición de hidroperóxido y por el tipo de escisión de dobles enlaces en la cadena de ácido graso. La reacción puede entonces también terminará después de la formación de polímeros (Laguerre *et al.*, 2007).

2.5. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITES

La calidad y estabilidad del aceite comestible son los principales factores que influyen en la aceptabilidad y el valor del aceite. Por lo tanto, el mantenimiento de la calidad del aceite y la aceptabilidad por parte del consumidor, es una importante función del control de calidad en los aceites y grasas.

La estabilidad de una grasa o aceite, es decir su resistencia a la autooxidación, es una cualidad apreciada que supone la capacidad para mantener su calidad organoléptica durante el almacenamiento y el tiempo de vida útil, depende de su composición en ácidos grasos insaturados, temperatura y exposición a la luz, durante el almacenamiento, metales de transición durante la extracción, peróxidos, pigmentos, presencia de componentes menores, y de sus propiedades antioxidantes (Primo, 1998).

La estabilidad a la oxidación es uno de los indicadores más importantes para mantener la calidad de los aceites comestibles. Se ha demostrado que la oxidación de los aceites comestibles se lleva a cabo a través de una reacción en cadena que esencialmente consiste en una etapa de inducción. El tiempo antes de un aumento dramático en la velocidad de oxidación de lípidos es una medida de la estabilidad a la oxidación y se conoce como el tiempo de inducción (Coppin y Pike, 2001).

Hoy en día, a menudo nos basamos en varias pruebas de estabilidad aceleradas para evaluar rápidamente la estabilidad de los aceites y grasas. Puesto que la oxidación es la principal causa de la degradación del aceite, la mayor parte de los ensayos acelerados están diseñados para acelerar el proceso de oxidación mediante la exposición de muestras de aceite a temperaturas elevadas en la presencia de cantidades excesivas de aire u oxígeno. Históricamente, el ensayo en horno Schaal y el Método de Oxígeno Activo (AOM) han sido las pruebas más utilizadas para evaluar la estabilidad del aceite (Wan, 1995).

Actualmente, la estabilidad oxidativa de los aceites y grasas se puede determinar de forma automática por dos instrumentos disponibles en el mercado, el Rancimat y el instrumento de Estabilidad Oxidativa.

Entre los métodos de análisis físico-químicos empleados para la medida del grado de oxidación de los aceites y grasas se tienen a los siguientes:

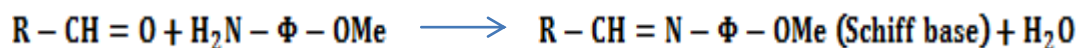
a. Índice de Peróxido

El grado de oxidación en aceites ha sido con frecuencia evaluado por la medición del índice de peróxido. Este índice se relaciona con los hidroperóxidos, productos de oxidación primaria, que son inestables y se descomponen fácilmente para formar principalmente mezclas de compuestos de aldehído volátiles. Los compuestos de degradación oxidativa que derivan de la degradación de hidroperóxidos, son productos secundarios de oxidación que se determinan en los aceites y grasas por el método denominado *p*-anisidina (Mohdaly *et al.*, 2011).

El índice de peróxido es una de las pruebas más utilizadas para la medición de la rancidez oxidativa en aceites y grasas (Zhang *et al.*, 2010).

b. Valor *p*-anisidina

Este valor desempeña un papel importante en el proceso de oxidación de aceites y grasas comestibles, se utiliza ampliamente para medir los productos de la oxidación secundaria, principalmente carbonilos no volátiles, formados durante la degradación oxidativa de los lípidos (Sultana *et al.*, 2007). Los cálculo del valor *p*-anisidina es uno de los métodos más antiguos para la evaluación de la oxidación secundaria de lípidos. Se basa en la reactividad del enlace carbonilo aldehído sobre el grupo amina de *p*-anisidina, que conduce a la formación de una base de Schiff que absorbe a 350 nm (Laguerre *et al.*, 2007). La siguiente reacción describe lo mencionado:



Los aldehídos en el aceite y el reactivo *p*-anisidina reaccionan entre sí, bajo condiciones ácidas dando como resultado la formación de producto de color amarillento, la concentración de los cuales es determinado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 350 nm (Anwar *et al.*, 2004). Este ensayo genera información útil sobre los compuestos carbonilo, especialmente aldehídos α -insaturados. Otros

productos de descomposición de alto peso molecular, tales como dímeros de triglicéridos, también pueden ser medidos con esta metodología.

c. Dienes y trienos conjugados

Medición de dienos conjugados (DC) y trienos conjugados (TC) son buenos parámetros para la determinación de la estabilidad oxidativa de los aceites. Los lípidos que contienen dienos presentan intensa absorción a 232 nm, de manera similar los trienos conjugados absorben a 270 nm. El aumento en el contenido del DC y TC es proporcional a la absorción de oxígeno. Mayores niveles de DC y TC menor será la estabilidad oxidativa de los aceites (Sultana *et al.*, 2007).

d. Calorimetría de barrido diferencial

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

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

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

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

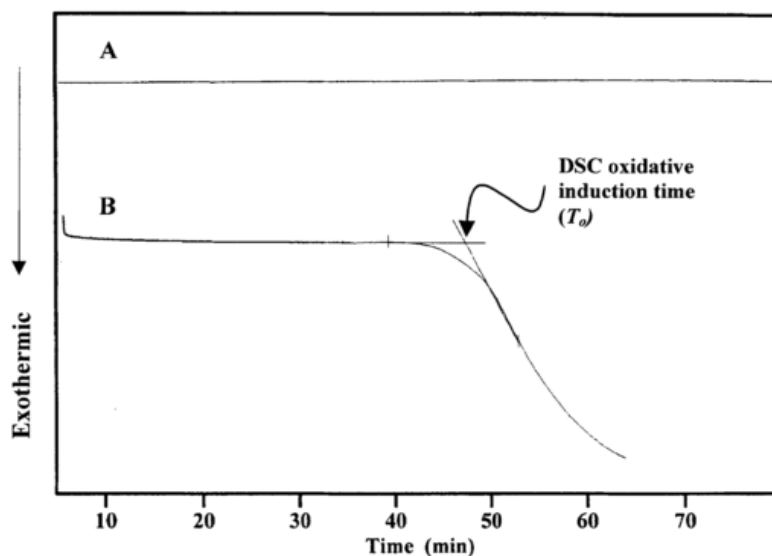


Figura 5. Curva de oxidación obtenida mediante calorimetría de barrido diferencial para el aceite de maíz. (A) Curva isotérmica a 130 °C con nitrógeno (99.999%) y (B) Curva isotérmica a 130 °C con oxígeno (99.8%)

Fuente: Tan *et al.* (2002)

Generalmente, los aceites comestibles con mayor grado de insaturación son más susceptibles a la oxidación de lípidos. Por lo tanto, aceite de pepas de uva, de soja, cártamo o girasol (índice de yodo > 130 g de $I_2/100$ g de aceite) mostraron significativamente ($p < 0.05$) bajos tiempos de inducción que el aceite de coco, oleína de palma refinado-blanqueado-decolorado. Algunos aceites como el aceite de ajonjolí rico en ácidos grasos insaturados presentan tiempos de inducción mayores que aceites con menores contenidos de ácidos grasos insaturados, esto posiblemente a la presencia de antioxidantes endógenos (Chiavaro *et al.*, 2008). En el Cuadro 3 se muestran algunos tiempos de inducción medidos por el CBD obtenidos para diferentes tipos de aceites.

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

Aceite	Periodos de inducción (minutos)
Canola	126.41
Coco	168.28
Maíz	83.57
Semilla de uva	36.29
Oliva	51.00
Maní	67.36
Semilla de palma	273.36
Cártamo	39.50
Soya	65.55
Girasol	70.50

Fuente: Tan *et al.* (2002)

2.6. LOS ANTIOXIDANTES

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

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

2.6.1. ANTIOXIDANTE PRIMARIO

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

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

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

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

Los tocoferoles compiten con las aceites insaturados por los radicales peroxil lipídicos. Estos radicales reaccionan con los tocoferoles mucho más rápido, que con los lípidos. Una molécula de tocoferol puede proteger alrededor de 10^3 a 10^8 moléculas de ácidos grasos poli-insaturados. Los tocoferoles pueden transferir el átomo de hidrógeno del grupo 6-hidroxil en su anillo cromano al radical peroxil lipídico, y extraer el radical peroxilo. Los tocoferoles donan hidrógeno al radical peroxil lipídico y producen hidroperóxido lipídico (ROOH) y radicales tocoferoxil. La efectividad de los tocoferoles como antioxidante, depende de los isómeros y la concentración del tocoferol. La Figura 6 muestra las estructuras de los tocoferoles (Choe y Min, 2006).

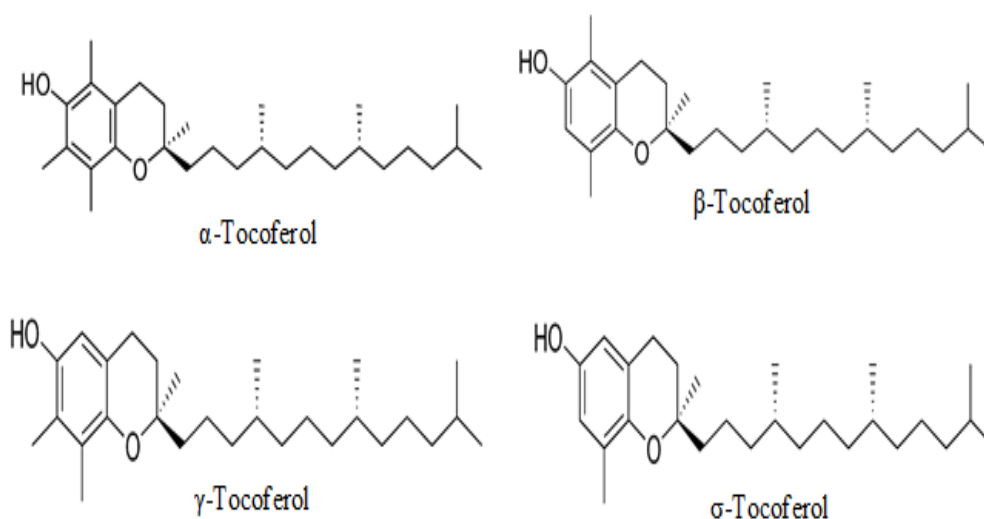


Figura 6: Estructura química de los tocoferoles

Fuente: KamaI-Eldin y Lars (1996)

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

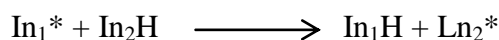
2.6.2. ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS

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

La vitamina C, que incluye ácido ascórbico y su ácido dehidroascórbico producto de la oxidación, tiene muchas actividades biológicas en el cuerpo humano. Se ha encontrado que la vitamina C puede reducir los niveles de la Proteína C-Reactiva, un marcador de inflamación y, posiblemente, un predictor de enfermedades del corazón (Block *et al.*, 2004). Más del 85% de la vitamina C en la dieta humana se suministra por las frutas y verduras. La función biológica del ácido L-ascórbico se puede definir como un cofactor enzimático, un eliminador de radicales, y como donante / aceptor en el transporte de electrones en la membrana plasmática. El ácido ascórbico es capaz de eliminar el radical superóxido e hidroxilo, así como regenerar la α -tocoferol (Davey *et al.*, 2000; citado por Podsędek, 2007).

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

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



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

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

Los principales mecanismos antioxidantes necesarios para proteger los sistemas de alimentación de la oxidación son la captación de radicales, la quelación de metales, y la eliminación de oxígeno. Algunos antioxidantes son capaces de contribuir más de un modo de acción. Además, la polaridad y la solubilidad de un antioxidante, permite determinar la ubicación real del antioxidante en una matriz de alimento dado, que a su vez influye en la eficacia antioxidante del antioxidante. En general, hay muchos factores que complican la predicción de la eficacia antioxidante en sistemas reales de los alimentos (Frankel, 2005). Se han propuesto varios mecanismos de acción para el palmitato de ascorbilo y ácido ascórbico, estos incluyen bloqueo del oxígeno singlete, quelación de metales, así como potencial captación de radicales libres, que, además permite la regeneración de tocoferoles oxidados (Jacobsen *et al.*, 2001).

2.7. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES

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

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

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

2.8. INTERACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

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

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

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



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

Trabajos donde se evaluaron la interacción de diferentes tipos de antioxidantes, se exponen a continuación. Un incremento sinérgico de capacidad antioxidante ha sido reportada entre la vitamina C y E (Moison *et al.*, 2002). Heo *et al.* (2007) evaluaron el efecto interacción de mezclas binarias de compuestos fenólicos. La adición de ácido clorogénico a la cianidina, peonidina 3-glucósido, quercetina y quercetina 3-galactósido mostraron una disminución en la capacidad antioxidante comparado a la sumatoria de la capacidad antioxidante. También, Knez y Bauman (2000) evaluaron la actividad antioxidante de cuatro antioxidantes naturales: extracto de rosemary, α -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico; la actividad antioxidante la evaluaron mediante la formación del valor peróxido y *p*-anisidina en aceite de girasol almacenado a 60 °C. Evaluaron también el efecto sinérgico de α -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico con el extracto de rosemary, en mezclas binarias. El extracto de rosemary retardó la formación de hidroperóxidos significativamente, alcanzando después de 11 días un

valor peróxido de 120 meq/Kg, respecto al control (200 meq/Kg). También, reportaron que el α -tocoferol mostró un efecto pro-oxidativo. Cuando fueron evaluadas mezclas de extracto de rosemary con α -tocoferol, palmitato de ascorbilo y ácido cítrico a 60 °C, la velocidad de oxidación fue reducida por las tres mezclas de antioxidantes evaluados. Los valores peróxidos de muestras de aceite de girasol con adición de extracto de romero + ácido cítrico, extracto de rosemary + palmitato de ascorbilo, fueron menores que los obtenidos para la muestra con adición de extracto de rosemary.

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

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

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

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

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIA PRIMA

Se utilizó vainas de tara liofilizadas, así como también el tubérculo de la mashua genotipo ARB 5241 y las hojas de inca muña también liofilizados. Todos los productos liofilizados se molieron para obtener un producto en polvo de tamaño de partícula inferior a 1 mm. Las muestras fueron almacenadas a -20°C en bolsas de polietileno de alta densidad y bajo oscuridad, hasta el momento de su uso.

3.2.2. REACTIVOS

El Ácido gálico, pirogálico, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), AAPH (2, 2'-azino-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride), sal sódica de fluoresceína, rhodanina (2-thio-4-ketothiazolidine), reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, BHT, metanol grado HPLC 99,8%, etanol 95%, nitrógeno gaseoso, oxígeno (Praxair), etanol 95%, fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, tiosulfato de sodio y ácido acético glacial, fueron adquiridos de Merck. El cloroformo de Fermont y el almidón soluble de J. T. Baker.

3.2.3. MATERIALES

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

3.2.4. EQUIPOS

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

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

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

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

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

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

AG_{EH} : Contenido de ácido gálico en los extractos hidrolizados

AG_{IN}: Contenido de ácido gálico en extractos iniciales (sin hidrolizar)

AG_{HC}: Contenido de ácido gálico en los extractos después de una hidrólisis química completa.

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

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

c. Capacidad antioxidante *in vitro*: Se determinó por tres metodologías: el método del ABTS descrito por Campos *et al.* (2006), el método FRAP reportado por Benzie y Strain (1996) y el método ORAC descrito por Ou *et al.* (2001).

Para el análisis de capacidad antioxidante ABTS, se procedió a reaccionar 150 μ l de extracto fenólico con 2,850 μ l del radical ABTS⁺. La reacción se llevó a cabo por 90 minutos para los extractos hidrolizados de tara, 60 minutos para extractos fenólicos de inca muña y 165 minutos para extractos fenólicos de mashua. Transcurrido el tiempo de reacción se realizaron las lecturas de absorbancias a 734 nm. Se corrió un blanco utilizando agua destilada, bajo el mismo procedimiento descrito. Los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados en μ mol de trolox equivalente (TE)/ml a partir de una curva estándar utilizando como estándar al trolox (Anexo 3).

La capacidad antioxidante FRAP fue determinado después de una reacción de 150 μ l de extracto fenólico con 2,850 μ l de la solución de trabajo FRAP (que consiste de la mezcla de buffer acetato 300 mM/L pH 3.6, solución TPTZ 10 mM/l en 40 mM/l de HCl y solución de FeCl₃.6H₂O). Las lecturas de absorbancia fueron realizadas a 593 nm. Se trabajó un blanco utilizando agua destilada en lugar de muestra bajo el mismo procedimiento descrito. Los resultados de capacidad antioxidante fueron expresados en μ mol ET/ml a partir de una curva estándar determinada utilizando como estándar al trolox (Anexo 3).

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

Se procedió de la siguiente forma, se pesaron individualmente 5.00 ± 0.05 mg de aceite de sacha inchi en cubetas de aluminio y fueron colocados en la cámara del CBD. La temperatura isotérmica fue programado a 120 °C y se inyectó oxígeno puro al 99.8% sobre la muestra a un flujo de 35 ml/min.

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

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

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

$$\text{Grado de protección} = \frac{PI_{inh} - PI_0}{PI_0} \times 100\%$$

Dónde: PI_{inh} es el periodo de inducción obtenido en presencia de un inhibidor (antioxidante) y PI_0 es el periodo de inducción obtenido en un sistema no inhibido (sin antioxidantes).

e. Índice de peróxidos (IP): Se determinó de acuerdo al método oficial de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995). Para ello, se pesaron 5.00 ± 0.05 g de aceite y fueron disueltos con 30 ml de una solución de ácido acético: cloroformo (3:2; v/v). Posteriormente se añadieron 0.5 ml de yoduro de potasio y seguidamente fue sometido a una agitación vigorosa por 1 minuto; transcurrido este tiempo se añadió 30 ml de agua destilada y se procedió a titulación con tiosulfato de sodio 0.01N, utilizando como indicador almidón al 1%. Se trabajó con un blanco, reemplazando a la muestra por agua destilada y se siguió el mismo procedimiento de análisis, descrito para la muestra.

El índice de peróxido (IP) fue reportado como meq O_2/Kg de aceite y fueron calculados de acuerdo a la siguiente expresión.

$$\text{Índice de Peróxido} = \frac{(S - B) \cdot N}{W} \cdot 1000$$

Dónde:

S: Volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra (ml)

B: Volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación del blanco (ml)

W: Peso del aceite (g).

f. Valor *p*-anisidina (VPA): Se determinó según el método 2.504 de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987). Brevemente, a 2.50 ± 0.05 g de aceite se adicionó 7 ml de isooctano y se agitó la solución en un vortex hasta conseguir la disolución completa del aceite, posteriormente se realizó las lecturas de las absorbancias a 350 nm (A_b). Posteriormente se tomó una alícuota de 5 ml, a la cual se le adicionó 1 ml del reactivo *p*-anisidina, el conjunto fue homogenizado y se dejó reposar por 10 minutos, finalmente se tomó las lecturas de las absorbancias a 350 nm. Se procedió con un blanco siguiendo el mismo procedimiento descrito para la muestra. Los cálculos correspondientes se realizaron de acuerdo a la siguiente expresión.

$$\text{Valor } p - \text{anisidina} = \frac{V * (1.2 A_S - A_b) * d}{g \text{ de muestra}}$$

Dónde:

A_b : Absorbancia de la muestra sin reaccionar

A_S : Absorbancia de la muestra después de 10 minutos de reacción

V: Volumen de isooctano empleado para disolver el aceite (ml)

g. Dienos y trienos conjugados: Se determinaron siguiendo el método de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987) citado por Chirinos *et al.* (2011).

Para los dienos y trienos conjugados se pesaron 15.00 ± 0.05 mg y 100.00 ± 0.05 mg de aceite, respectivamente y cada uno de ellos fue disuelto en 6 y 5 ml de isooctano, respectivamente. Para dienos conjugados las lecturas de absorbancia fueron realizados a 233 nm y para trienos conjugados a 262, 268 y 274 nm.

Los cálculos se realizaron de acuerdo al procedimiento indicado abajo y los resultados fueron expresados como valores absolutos al no presentar unidades.

Se determinaron las absorptividades (a):

$$a = \frac{A}{b * c}$$

Dónde: A es la absorbancia según la longitud de onda, b es la longitud de la celda en cm y c es la concentración en g de aceite/l de solvente.

Para los dienos conjugados, se calculó:

$$a_D = a_{233} - 0.33$$

Dónde: a_D es la absorptividad para los dienos conjugados, el valor de 0.33 es el coeficiente para ácidos grasos, a_{233} es la absorptividad determinada a 233 nm.

Para los trienos conjugados, se calculó:

$$a_T = 2.8 \left(a_{268} - \frac{1}{2} (a_{262} + a_{274}) \right)$$

Dónde: a_T es la absorptividad para los trienos conjugados, a_{262} es la absorptividad determinada a 262 nm, a_{268} es la absorptividad determinada a 268 nm y a_{274} es la absorptividad determinada a 274 nm.

h. Perfil de ácidos grasos: Fue determinado mediante cromatografía de gases (CG) acorde al método propuesto por Meurens *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Se procedió según se detalla a continuación.

En un tubo pyrex de 70 ml se pesó exactamente 500.00 ± 0.05 mg de aceite, al cual se le adicionó 10 ml de KOH (0.1 N en MeOH), el conjunto fue cerrado herméticamente y colocado en un baño maría a 70 °C por 60 minutos; posteriormente los tubos fueron enfriados a temperatura ambiente y se procedió a la metilación adicionando 4 ml de una solución de HCl (1.2 N en MeOH). Los tubos fueron agitados y colocados en baño maría a 70 °C por 20 minutos. La extracción de los ácidos grasos se realizó adicionando 20 ml de hexano y 10 ml de agua MilliQ a los tubos previamente enfriados. Los tubos nuevamente fueron agitados y colocados en refrigeración durante una noche.

Se tomó una alícuota de 150 μ l de la fase superior (hexano) en una fiola de 10 ml, al cual se le adicionó 1 ml de estándar interno C11:0 (0.4 mg/ml) (éste ácido graso sintético permite corregir el volumen de inyección), luego se enrasó con hexano a 10 ml. Posteriormente fueron trasvasados a viales para su inyección en el equipo de cromatografía de gases. Los esteres metílicos de ácidos grasos formados, fueron

separados por inyección de 1 µl de la solución dentro del cromatógrafo de gases el cual tenía acoplado el detector de ionización de llama, que permitió la detección de los picos.

La columna usada fue una Restek Rt-2560 (Bellefonte, PA) (0.2 µM, 100 m x 0.25 mm ID). La temperatura del horno para la corrida se programó como sigue: inicialmente a 100 °C (por 4 minutos), se incrementó la temperatura hasta 240 °C a 3 °C/min y un periodo isotérmico de 25 min a 240 °C. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron en 225 y 250 °C, respectivamente. Se utilizó Helio de alta pureza como gas portador. Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron identificados y cuantificados mediante la comparación de sus tiempos de retención con los estándares conocidos previamente inyectados. Las curvas de calibración para los ácidos grasos fueron construidos con diferentes concentraciones de ésteres metílicos de ácidos grasos dentro del rango de 6-90 mg/l (Anexo 5). Los resultados fueron expresados como % respecto al total de ácidos grasos poli-insaturados presentes en el aceite.

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

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

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

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

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

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

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

3.4.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

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

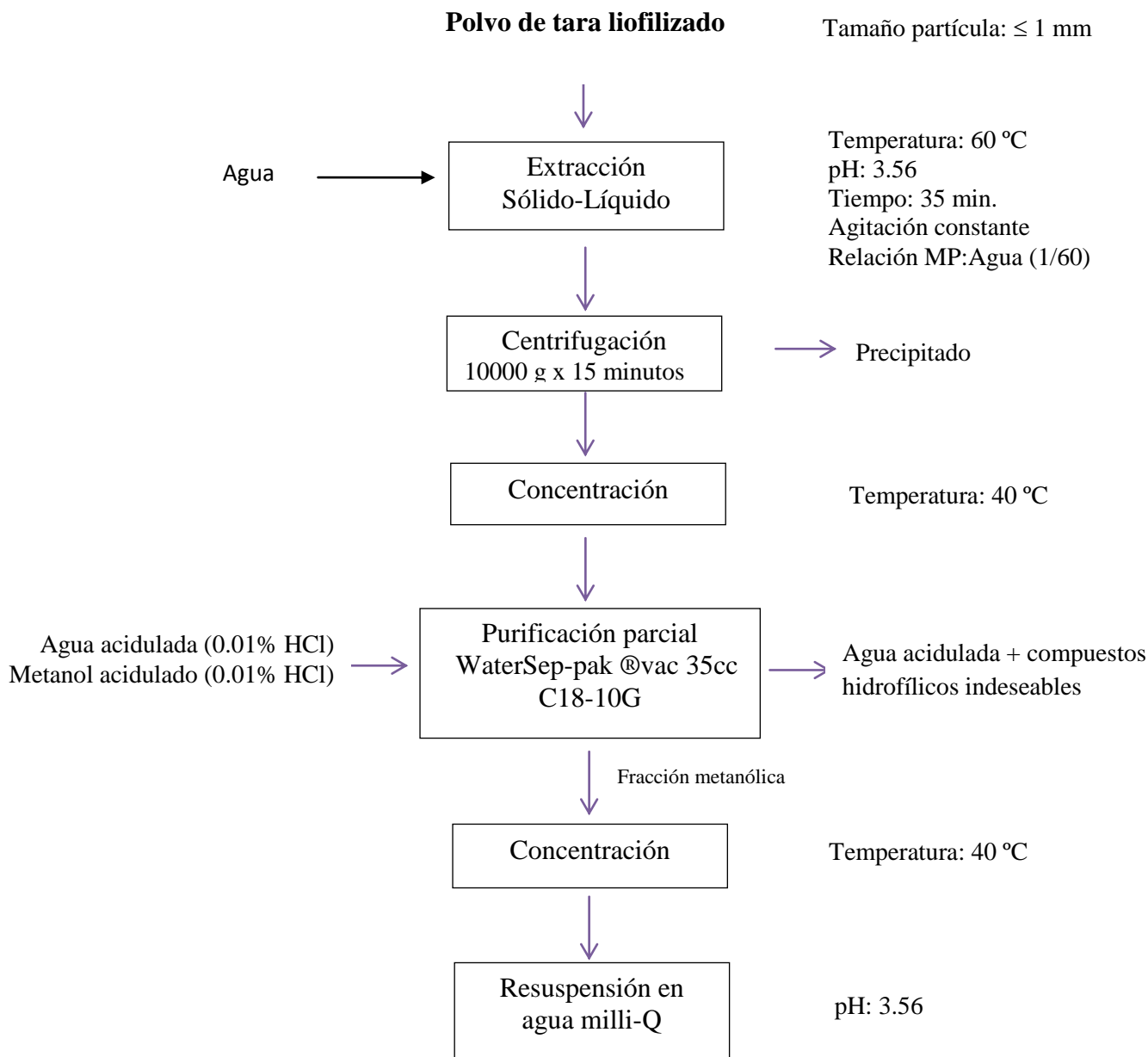


Figura 7: Extracción, purificación parcial e hidrólisis de galotaninos presentes en el extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*)

La extracción de los antioxidantes fenólicos de mashua se realizó de acuerdo a la metodología optimizada por Chirinos *et al.* (2007), con algunas modificaciones que involucran la purificación parcial de los compuestos fenólicos (Figura 8).

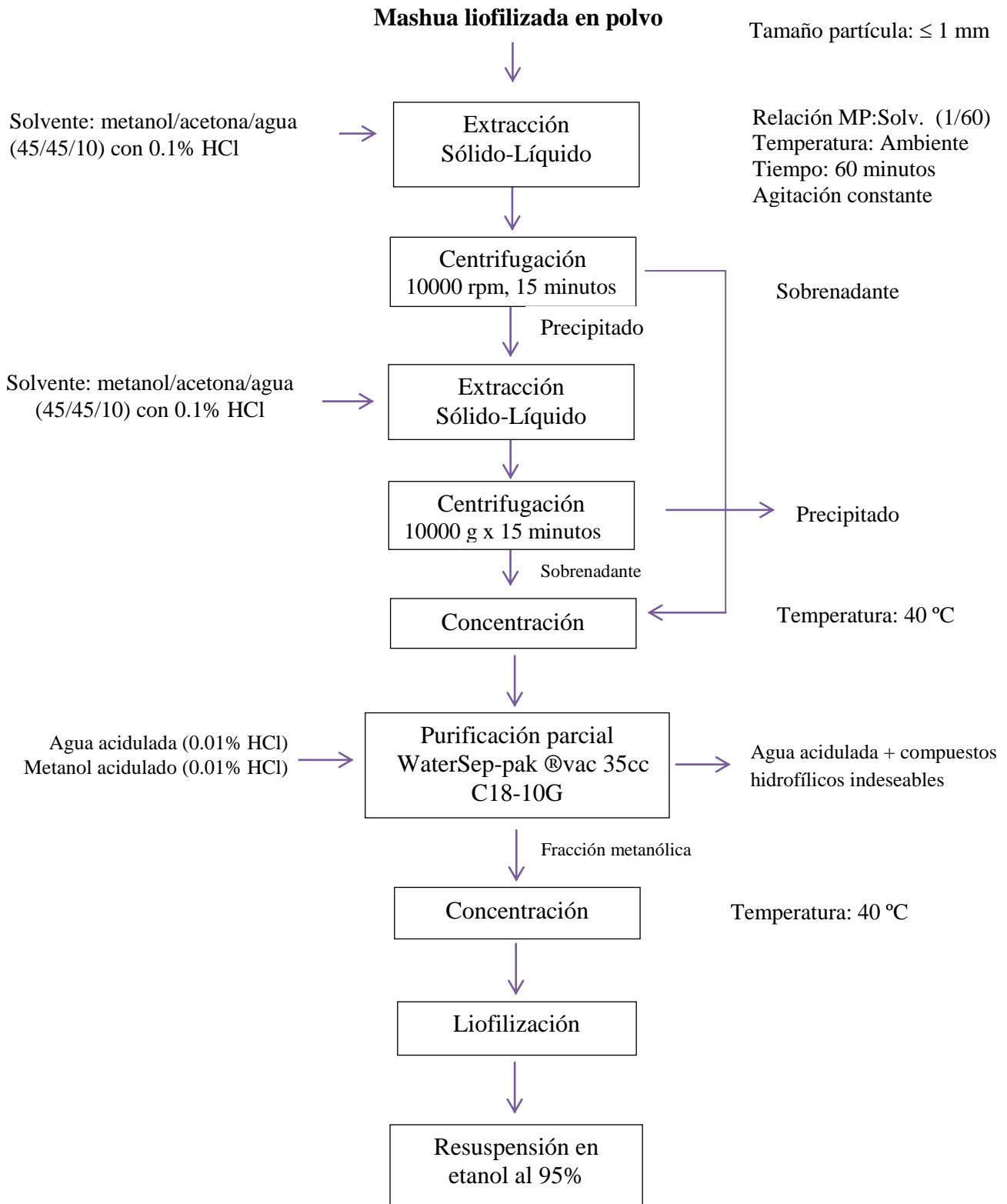


Figura 8: Extracción de extractos antioxidantes de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) liofilizada

Los extractos fenólicos de inca muña fueron extraídos siguiendo la metodología optimizada por Ramos (2014), con algunas modificaciones referentes al proceso de purificación parcial (Figura 9), a continuación se describe el proceso.

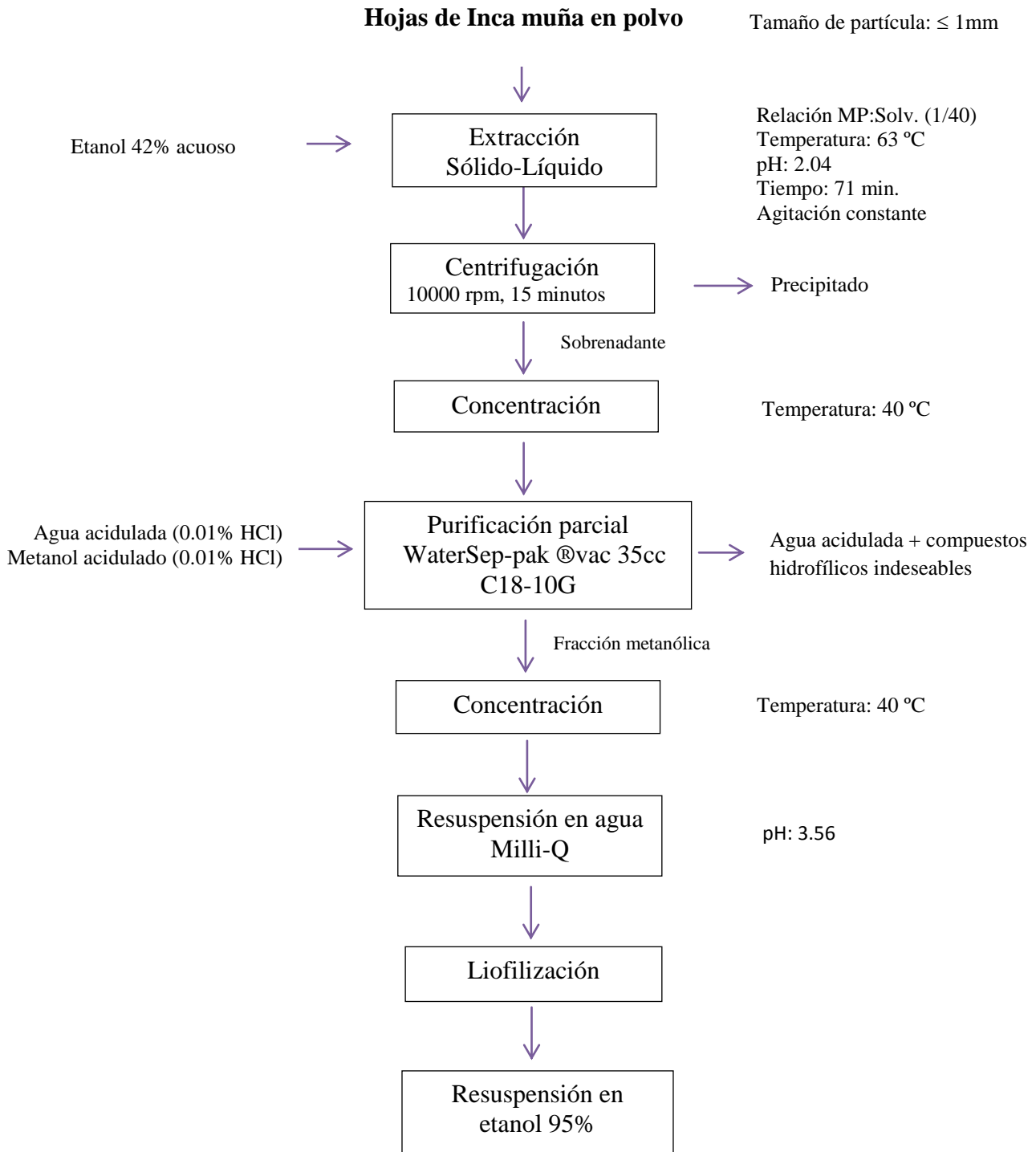


Figura 9. Extracción de extractos antioxidantes de hojas de inca muña (*Clinopodium bolivianum*).

3.4.2. HIDROLISIS TÉRMICA DE LOS GALOTANINOS DE TARA

Los extractos fenólicos de tara parcialmente purificados fueron hidrolizados a $121.1 \pm 1^\circ\text{C}$ y 105 KPa de presión en un autoclave con vapor por 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos; para cada tiempo establecido se determinó el grado de hidrólisis (%) alcanzado, la determinación de ácido gálico y de pirogalol mediante HPLC-DAD, la actividad antioxidante *in vitro* (ABTS, FRAP, ORAC), y la eficacia antioxidante de los extractos hidrolizados en aceite de sacha inchi empleando calorimetría de barrido diferencial CBD a 120°C .

3.4.3. DISEÑO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES

Se diseñó mezclas de extractos fenólicos en función a su capacidad antioxidante. En primera instancia se buscó la optimización del empleo de los extractos fenólicos de tara previamente hidrolizados (180 minutos a $121.1 \pm 1^\circ\text{C}$ y 105 KPa), extractos fenólicos de la mashua e inca muña. La concentración de cada extracto fenólico fue estandarizado a 20 mg EAG/ml, los cuales fueron mezclados de acuerdo al diseño de mezclas presentado en el Cuadro 4, el mismo que fue obtenido mediante el empleo del Software STATGRAPHICS Centurión año 2006. Para cada mezcla de fenólicos, se determinó la capacidad antioxidante empleando métodos *in vitro* (ABTS⁺, FRAP, ORAC) y se evaluó la eficacia antioxidante sobre el aceite de sacha inchi mediante el empleo de calorimetría de barrido diferencial CBD programado a 120°C .

En función de los resultados obtenidos en la evaluación de las mezclas de extractos fenólicos, se procedió a optimizar mezclas binarias de los extractos fenólicos de tara, mashua e inca muña con los antioxidantes naturales: ácido cítrico, palmitato de ascorbilo y α -tocoferol; considerando los periodos de inducción evaluados sobre el aceite de sacha inchi haciendo usos de la calorimetría de barrido diferencial. Para ello se procedió a mezclar 200 ppm del extracto hidrolizado de tara (180 minutos a $121.1 \pm 1^\circ\text{C}$ y 105 KPa) con 100 ppm de ácido cítrico (T200 + AC100); 200 ppm del extracto hidrolizado de tara con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (T200 + AP100), 200 ppm del extracto hidrolizado de tara con 100 ppm de α -tocoferol (T200 + α -T100); 200 ppm del extracto fenólico de la mashua con 100 ppm de ácido cítrico (M200 + AC100), 200 ppm del extracto fenólico de la mashua con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (M200 +

AP100) y 200 ppm del extracto fenólico de la mashua con 100 ppm de α -tocoferol (M200 + α -T100); También se procedió a evaluar la mezcla de 200 ppm del extracto fenólico de inca muña con 100 ppm de ácido cítrico (IM200 + AC100), 200 ppm del extracto fenólico de inca muña con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (IM200 + AP100) y 200 ppm del extracto fenólico de inca muña con 100 ppm de α -tocoferol (IM200 + α -T100).

Cuadro 4. Mezclas de extractos fenólicos obtenidas para la evaluación de la actividad antioxidante mediante pruebas *in vitro* y eficacia antioxidante en aceite de sachá inchi.

Número de mezcla	Componentes de la mezcla (%)		
	Galotaninos hidrolizados de tara (A)	Compuestos fenólicos de inca muña (B)	Compuestos fenólicos de mashua (C)
	EHT	EFIM	EFM
1	33.33	33.33	33.33
2	66.67	16.67	16.67
3	0.00	100.00	0.00
4	41.67	41.67	16.67
5	66.67	33.33	0.00
6	50.00	50.00	0.00
7	100.00	0.00	0.00
8	41.67	16.67	41.67
9	66.67	0.00	33.33
10	50.00	0.00	50.00
11	0.00	50.00	50.00
12	16.67	41.67	41.67
13	16.67	66.67	16.67
14	16.67	16.67	66.67
15	0.00	33.33	66.67
16	33.33	66.67	0.00
17	0.00	0.00	100.00
18	33.33	0.00	66.67
19	0.00	66.67	33.33

También se consideró evaluar la mezcla del tratamiento constituido por un 66.67% de extracto hidrolizado de tara y 33.33% de extracto de inca muña ambos llevados a la dosis de 200 ppm con 100 ppm de ácido cítrico (MO200 + AC100), así como la misma mezcla con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (MO200 + AP100) y finalmente la misma mezcla con 100 ppm de α -tocoferol (MO200 + α -T100).

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

Posteriormente a la optimización de las mezclas binarias en función de la eficacia antioxidante evaluado mediante CBD, se determinó la mezcla con mayor efecto sinérgico y ella se consideró para la siguiente etapa, donde se procedió a realizar mezclas binarias, utilizando los extractos de mejor efecto antioxidante evaluados a dosis de 200 ppm, 300 ppm y 400 ppm con palmitato de ascorbilo a dosis de 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm y 100 ppm, evaluándose los periodos de inducción determinados por CBD empleando al aceite de sachá inchi. Los resultados fueron comparados con el control (sin antioxidante).

3.4.4. PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO

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

Se procedieron a retirar muestras de la estufa cada 5 días y fueron almacenados en congelación hasta los análisis respectivos. Se evaluaron como factores de estabilidad el índice de peróxido, valor ρ -anisidina, formación de dienos y trienos conjugados, perfil de ácidos grasos, contenido de tocoferoles y fitoesteroles.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. HIDRÓLISIS DE LOS GALOTANINOS DE TARA

En la Figura 10 se muestra el incremento en el contenido de ácido gálico en los extractos de tara y el grado de hidrólisis alcanzado de los galotaninos para diferentes tiempos estudiados. El ácido gálico libre determinado en el extracto no hidrolizado de tara fue 1.50 mg AGE/ml, equivalente a 2.13 g AGE/100 g de vainas de tara, estos resultados son acorde a los reportados por Garro *et al.* (1997) y Chambi *et al.* (2013) quienes determinaron un contenido de ácido gálico libre entre 1.50 a 2.6 mg AGE/ml. Además durante la hidrólisis de los galotaninos de la tara se observó que el grado de hidrólisis y la producción de ácido gálico aumentó con el tiempo, obteniéndose a los 180 minutos un máximo contenido de ácido gálico de 12.30 mg AGE/ml que correspondió a un grado de hidrólisis de 29.8%.

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

Comparando nuestros resultados con procesos que involucran tratamientos químicos catalizados por una base o un ácido (Lu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010), son relativamente bajos y requieren de condiciones de temperatura y presión más severas para lograr una alta conversión de galotaninos de tara en ácido gálico; sin embargo el proceso empleado en nuestro estudio presenta una ventaja al no generar residuos peligrosos que contaminen el medio ambiente y el producto final obtenido. Los tiempos

empleados en nuestro estudio también fueron menores a los empleados para procesos de hidrólisis químico de galotaninos de diferentes fuentes por Ossipov *et al.* (1997), Inoue y Hagerman (1998), y Chambi *et al.* (2013); por lo tanto es de suponer que el grado de hidrólisis es dependiente de la estructura de los diferentes taninos hidrolizables, provenientes de diferentes especies vegetales y del método de hidrólisis empleado.

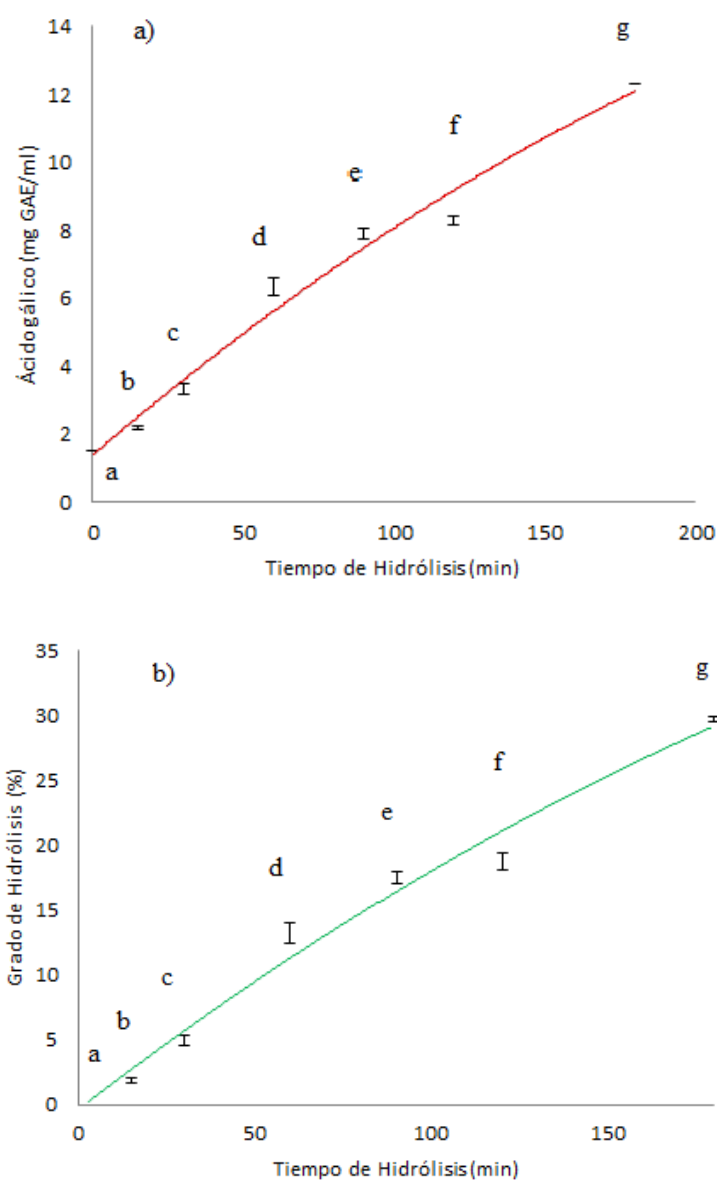


Figura 10: Evolución del contenido de ácido gálico libre (a) y grado de hidrólisis (b) durante el tratamiento de hidrólisis de los extractos de tara

El contenido de ácido gálico (AG) obtenido a diferentes tiempos de hidrólisis térmica (TH), fue ajustado a un modelo polinomial de segundo orden, encontrándose la siguiente ecuación ($AG = -0.00005*TH^2 + 0.0759*TH + 1.3682$; $R^2=0.981$); del mismo modo el grado de hidrólisis (GH) también fue ajustado a un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación respecto al tiempo de hidrolisis ($GH (\%) = -0.0002*TH^2 + 0.2089*TH - 0.356$; $R^2=0.982$).

En la Figura 11 se presenta los cromatogramas obtenidos para extracto no hidrolizado y extractos con grados de hidrólisis de 13.2%, 18.7% y 29.8%. En el cromatograma correspondiente al extracto no hidrolizado se observa diversos picos, siendo los más representativos los picos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 13 y que de acuerdo a su espectro de absorción corresponderían a galotaninos de diferentes pesos moleculares. Los cromatogramas con grados de hidrólisis de 13.2, 18.7 y 29.8%, corresponden a los extractos de tara hidrolizados por tiempos de 60, 120 y 180 minutos, respectivamente, donde se observan la aparición de los picos 16 y 17 y el incremento del área de los picos 2, 3 y 4; así mismo se nota una disminución en el área de los picos 5, 7, 8, 9, 10 y 13.

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

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

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

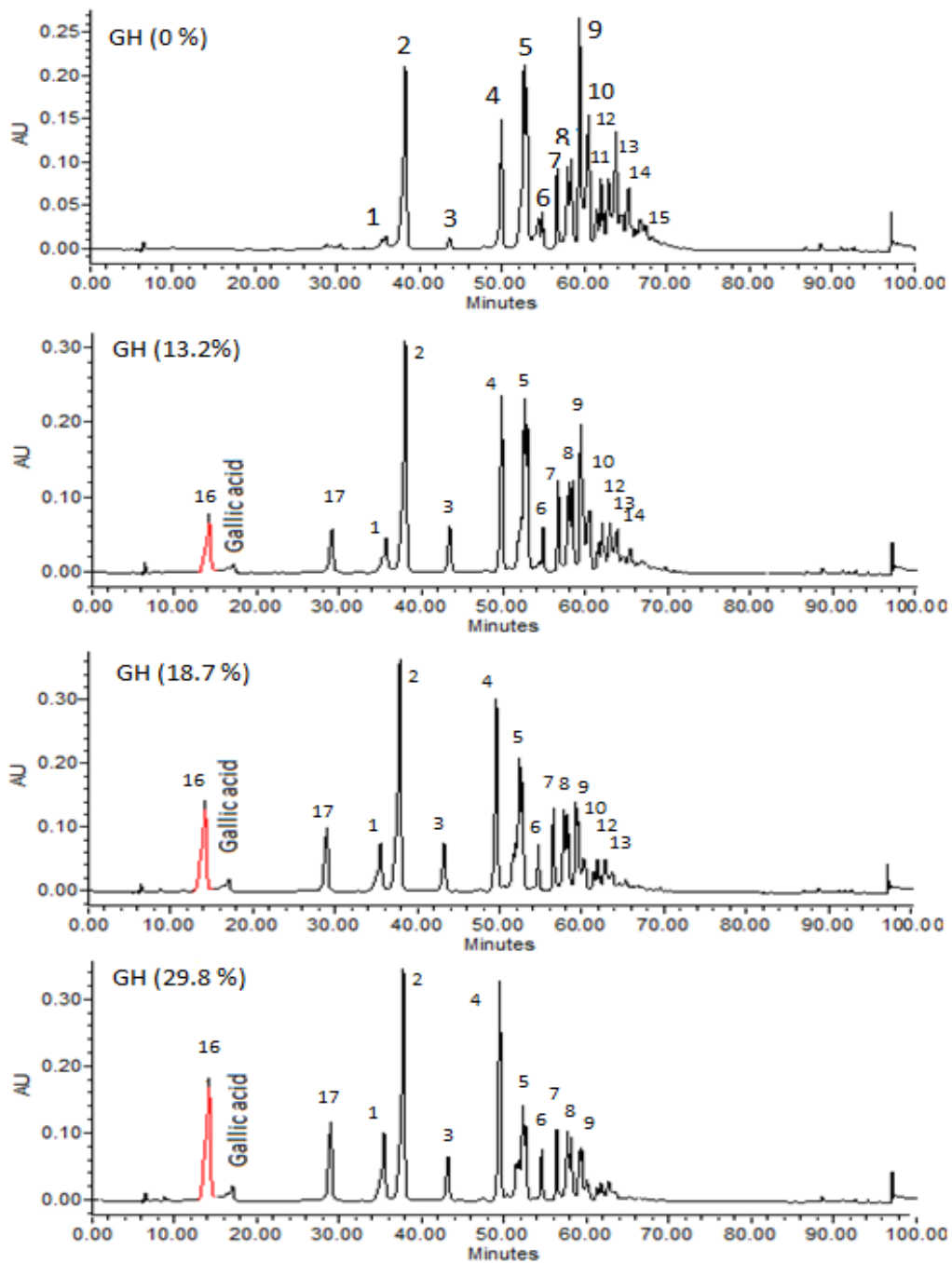


Figura 11: Perfiles cromatográfico de extractos de tara con diferentes grados de hidrólisis.

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

4.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro*

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante “*in vitro*” de los extractos de tara sometidos a diferentes tiempos de hidrólisis se muestran en el Cuadro 5. La capacidad antioxidante *in vitro* se incrementó durante el proceso de hidrólisis térmica (121.1 °C y 105 kPa), alcanzando un máximo valor de ~ 941 µmol TE/ml, ~940.40 µmol TE/ml y ~703 µmol TE/ml de ABTS, FRAP y ORAC, respectivamente. La capacidad antioxidante específica también se incrementó, donde los valores más altos se obtuvieron a los 180 min de hidrólisis, siendo estos de 26.5, 26.5 y 19.8 µmol TE/mg AGE, para los métodos ABTS, FRAP y ORAC, respectivamente. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores como Pyla *et al.* (2010); Kim *et al.* (2010) y Chambi *et al.* (2013), todos ellos sostienen que la hidrólisis de los galotaninos de tara favorece un incremento en la actividad biológica (antimicrobiana y antioxidante).

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

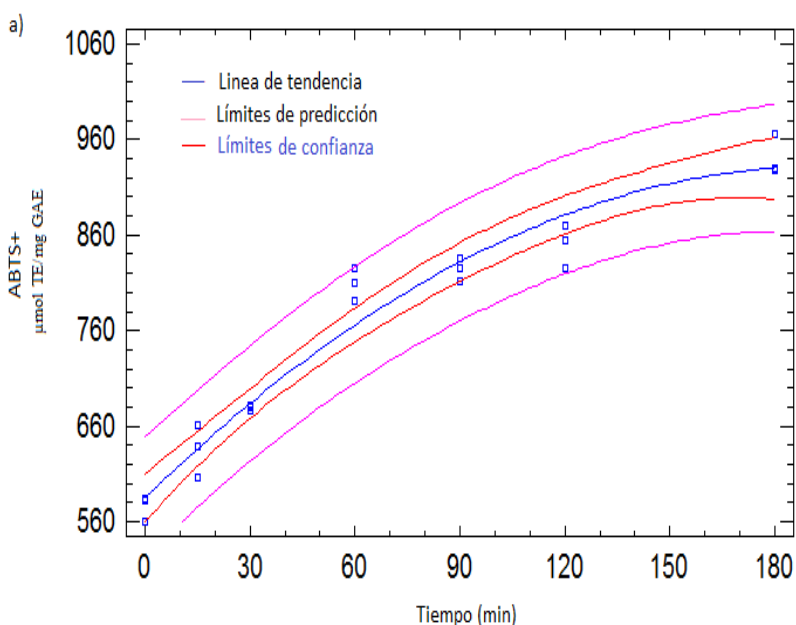
Cuadro 5: Evolución del contenido de ácido gálico, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los galotaninos de tara hidrolizados a diferentes tiempos*

Tiempo (minutos)	Ácido gálico (mg EAG/ml)	Fenólicos totales (mg EAG/ml)	Ácido gálico/fenoles totales (%)	Capacidad antioxidante (μmol TE/ml)			Capacidad antioxidante específica (μmol TE/mg AGE)		
				ABTS ⁺	FRAP	ORAC	ABTS ⁺	FRAP	ORAC
0	1.46 ± 0.01a	35.20 ± 0.46a	4.17 ± 0.06a	575.73 ± 13.85a	670.28 ± 4.24a	312.82 ± 19.60a	16.37 ± 0.21a	19.07 ± 0.31a	8.87 ± 0.55a
15	2.15 ± 0.05b	34.74 ± 1.13a	6.20 ± 0.36b	635.63 ± 8.45b	706.28 ± 3.63b	393.96 ± 12.14b	18.30 ± 1.14b	20.30 ± 0.70b	11.33 ± 0.06b
30	3.28 ± 0.16c	34.19 ± 0.83a	9.57 ± 0.67c	678.85 ± 2.82c	758.31 ± 14.95c	456.85 ± 12.68c	19.87 ± 0.51c	22.17 ± 0.76c	13.37 ± 0.25c
60	6.27 ± 0.27d	34.66 ± 0.27a	18.10 ± 0.87d	808.40 ± 17.52d	809.11 ± 3.47d	546.42 ± 22.53d	23.30 ± 0.66c	23.33 ± 0.31d	15.77 ± 0.57d
90	7.83 ± 0.14e	35.27 ± 0.53a	22.20 ± 0.10e	824.39 ± 12.16de	847.56 ± 4.90e	565.33 ± 23.86d	23.37 ± 0.55c	24.03 ± 0.47d	16.03 ± 0.59d
120	8.29 ± 0.20f	34.20 ± 0.47a	24.23 ± 0.90f	850.39 ± 22.41e	884.83 ± 8.35f	631.74 ± 14.31e	24.87 ± 0.35d	25.90 ± 0.62e	18.47 ± 0.15e
180	12.30 ± 0.02g	35.46 ± 0.08a	34.70 ± 0.00g	941.07 ± 21.50f	940.87 ± 6.66g	703.86 ± 19.57f	26.50 ± 0.61e	26.50 ± 0.17e	19.83 ± 0.57f

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

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

En la Figura 12 se muestra los modelos de ajuste de la capacidad antioxidante en función de los tiempos de hidrólisis (TH). Para los tres métodos empleados se ajustaron los resultados a modelos polinomiales de segundo orden. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos fueron 0.956, 0.989, 0.965 para los métodos ABTS+, FRAP y ORAC, respectivamente. Los modelos obtenidos para la capacidad antioxidante fueron: ABTS ($ABTS = 585.116 + 3.56437*TH - 0,0091524*TH^2$), FRAP ($FRAP = 675.672 + 2.4757*TH - 0.00566*TH^2$) y ORAC ($ORAC = 335.058 + 3.6707*TH - 0.009248*TH^2$); estos modelos, nos permiten determinar la capacidad antioxidante alcanzada a un determinado tiempo de hidrólisis térmica, dentro de los tiempos evaluados.



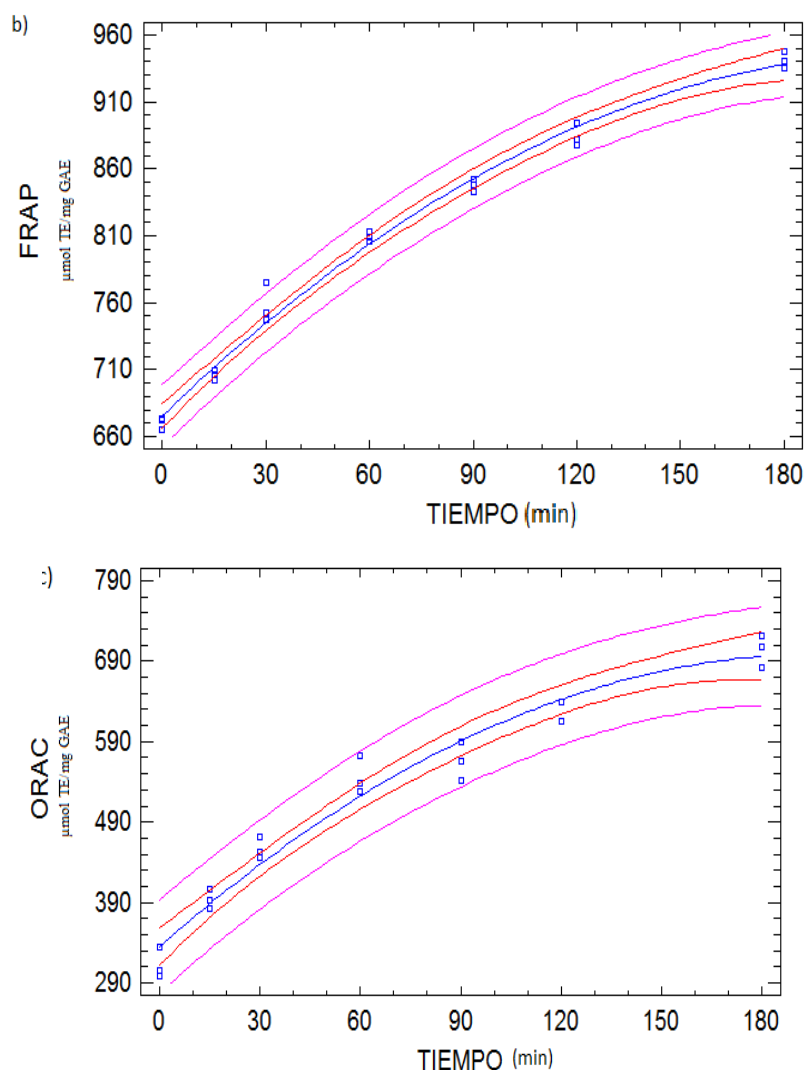
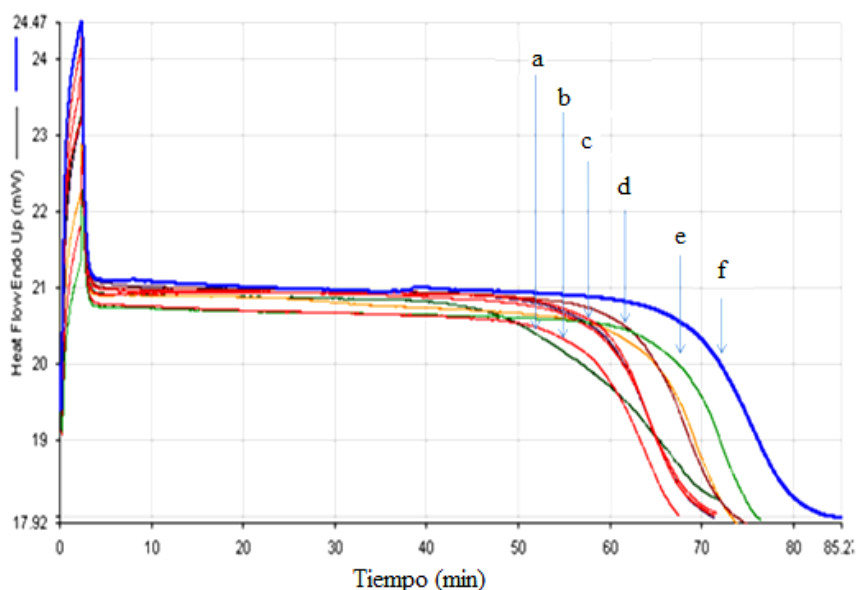


Figura 12: Modelos de ajuste de capacidad antioxidante de extractos hidrolizados de tara con diferentes tiempos de hidrólisis.

4.3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS GALOTANINOS DE TARA HIDROLIZADOS EN LA ESTABILIDAD DEL ACEITE DE SACHA INCHI

En el Cuadro 6 se presenta los resultados obtenidos de la evaluación de la eficacia antioxidante de los galotaninos de la tara hidrolizados sobre el aceite de sachá inchi y los respectivos termogramas obtenidos se presentan en la Figura 13. De los resultados obtenidos se puede notar que el periodo de inducción (PI) aumenta significativamente ($p < 0.05$) a medida que aumenta el tiempo (grado) de hidrólisis. Resultados similares fueron observados para los valores de factor de estabilización (FS) ($p < 0.05$). Los Valores de PI para todos los extractos hidrolizados de tara aplicados en el aceite de sachá inchi fueron mayores que los obtenidos para el aceite de sachá inchi

sin antioxidante (control negativo) y con aceite de sachu inchi con BHT (200 ppm) (control positivo). Se alcanzó un PI máximo de 68.58 min para el extracto hidrolizado de tara sometido a la hidrólisis térmica de 180 min, alcanzándose a esta misma condición la máxima protección del aceite de sachu inchi (18.10%). Los resultados concuerdan con lo mencionado por Kim *et al.* (2010) quienes encontraron que el ácido tánico tratado térmicamente, incrementó la estabilidad oxidativa del aceite de soya, ello debido al ácido gálico liberado luego de la hidrólisis y a los grupos hidroxilo formados sobre los grupos galoil como resultado de la hidrólisis térmica.



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

Figura 13: Termograma obtenido para el aceite de sachu inchi a 120 °C conteniendo diferentes antioxidantes.

Cuadro 6: Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección del aceite de sachá inchi en presencia de extractos de tara de diferentes grados (tiempo de hidrólisis) a una concentración de 200 ppm.

Tiempo de Hidrolisis (min)	Grado de hidrólisis (%)	Periodo de Inducción (min)	Factor de Estabilización	Grado de Protección (%)
0	0.00 ± 0.00a	57.45 ± 0.49 b	1.01 ± 0.01 b	1.47 ± 0.49 a
15	1.88 ± 0.13b	58.48 ± 0.35 c	1.03 ± 0.01 c	2.70 ± 0.60 b
30	4.98 ± 0.45c	59.45 ± 0.40 d	1.04 ± 0.01 d	4.40 ± 0.70 c
60	13.19 ± 0.82d	62.82 ± 0.07 e	1.10 ± 0.00 e	10.30 ± 0.10 d
90	17.48 ± 0.51e	63.33 ± 0.11 e	1.11 ± 0.00 e	11.20 ± 0.20 e
120	18.73 ± 0.61f	64.59 ± 0.28 f	1.13 ± 0.01 f	13.43 ± 0.50 f
180	29.76 ± 0.21g	68.58 ± 0.54 g	1.20 ± 0.01 g	18.10 ± 0.53 g
Control negativo	-	56.93 ± 0.06 b	1.00 ± 0.00 b	-
BHT (control positivo)	-	55.82 ± 0.27 a	0.98 ± 0.06 a	-

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

Una correlación polinomial de segundo orden se encontró entre el factor de estabilización (FE) y el grado de hidrólisis (GH) de los galotaninos de tara, el modelo polinomial está dado por la ecuación $FE = 1E-05 GH^2 + 0,0058 GH + 1,0137$; ($R^2=0.99$), estos resultados son acorde a Chambi *et al.* (2013) quienes ajustaron el factor de estabilización a un modelo polinomial de segundo orden. El factor de estabilización con respecto al GH dió lugar a una ecuación polinomial de segundo orden con un $R^2 = 0.979$.

En la Figura 14 se observa el grado de protección del aceite de sachá inchi obtenido por adición de los extractos hidrolizados por diferentes tiempos. Donde el grado de protección (GP) del aceite de sachá inchi respecto al tiempo de hidrólisis (TH) de los galotaninos de tara se ajustó a una ecuación polinomial ($GP = -0.0003 TH^2 + 0.1386 TH + 1.1701$); ($R^2=0.98$). Al respecto, los resultados indican que la adición de los extractos hidrolizados de tara (a 200 ppm) incrementa el grado de protección hasta en un 18.1 % respecto al control (sin antioxidante) y al BHT (200 ppm). El máximo grado de protección se debería posiblemente a la alta concentración de galotaninos compuestos de 5 a 9 unidades galoil, obtenidos mediante la hidrólisis térmica; mientras que los bajos niveles de protección obtenidos con la adición de extractos hidrolizados por 15 y 30 minutos se deberían a la presencia de galotaninos con 10 a 12 unidades galoil. Cuando los extractos de tara son hidrolizados por periodos prolongados, posiblemente también se obtenga bajos niveles de protección debido a una alta hidrólisis y consecuentemente alta concentración de galotaninos con 1 a 4 unidades galoil, esto acorde a estudios reportados por Tian *et al* (2009). Finalmente los diferentes grados de protección obtenidos por adición de extractos hidrolizados de tara fueron comparados mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia del 95%, encontrándose diferencias significativas entre todos los tratamientos.

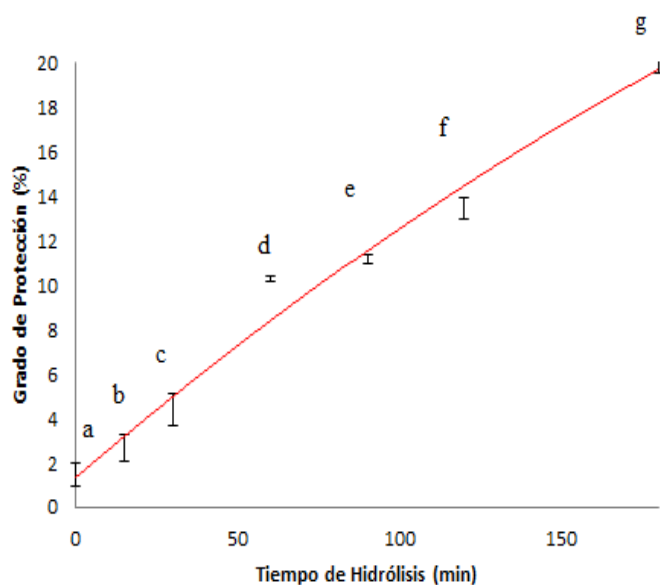


Figura 14: Grado de protección del aceite de sachá inchi obtenida por efecto de la adición de extractos de tara hidrolizados.

4.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MEZCLAS DE EXTRACTOS FENÓLICOS

4.4.1. DISEÑO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE TARA, INCA MUÑA Y MASHUA

Los resultados de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante *in vitro*, de los componentes empleados para el desarrollo de las mezclas, se presentan en el Cuadro 7.

Se observa que el extracto de tara hidrolizado por 180 min, presenta una capacidad antioxidante superior respecto a los extractos fenólicos de mashua e inca muña, cuando fueron evaluados por el método ABTS, FRAP y ORAC, a un mismo nivel de contenido de fenólicos totales (20 mg EAG/ml),

Cuadro 7: Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los tres extractos fenólicos empleados para la preparación de las diferentes mezclas

Componentes	Fenólicos totales (mg EAG/ml)	Capacidad antioxidante (μmol TE/ml)		
		ABTS+	FRAP	ORAC
Extracto de tara hidrolizado a 121 °C durante 180 min (EHT)	20.45 ± 0.14 a	420.78 ± 15.01a	400.94 ± 3.58 ^a	374.41 ± 1.71a
Extracto fenólico de mashua (EFM)	20.64 ± 0.12 a	238.58 ± 4.46b	280.42 ± 9.76b	223.50 ± 8.21b
Extracto fenólico de Inca muña (EFIM)	20.56 ± 0.36 a	180.22 ± 10.96c	235.45 ± 20.11c	324.36 ± 10.05c

En el Cuadro 8 se presenta los resultados obtenidos de fenólicos totales de las diferentes mezclas preparadas, demostrándose que estas fueron desarrolladas correctamente, debido a que los valores de fenólicos totales no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

La capacidad antioxidante específica ABTS+, FRAP y ORAC para el extracto hidrolizado de tara (correspondiente al 100% tara); para los fenólicos de la mashua (100% mashua) y para la Inca muña (100 % inca muña) alcanzaron valores de 21.91, 20.21, 18.7 μmol TE/mg AGE; 11.56, 13.58, 10.83 μmol TE/mg AGE y 8.76, 11.45, 15.78 μmol TE/mg AGE respectivamente. El análisis estadístico indica que las capacidades antioxidantes determinadas para las muestras independientes fueron significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan a un 95% de nivel de significancia, además la capacidad antioxidante del extracto de tara hidrolizado fue superior al resto de los extractos fenólicos y de las mezclas desarrolladas.

Cuadro 8. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante específica, periodos de inducción, y factor de estabilización de mezclas de extractos hidrolizados de tara (EHT), fenólicos de inca muña (EFIM) y fenólicos de mashua (EFM)

Número de mezcla	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/ml)	Capacidad antioxidante específica(μmol ET/mg EAG)			Periodo de Inducción (min)	Factor de Estabilización
		ABTS+	FRAP	ORAC		
1	20.49 ± 0.42ab	13.22 ± 0.22fg	16.13 ± 0.17e	11.40 ± 1.12cd	64.32 ± 0.13cde	1.13 ± 0.00cd
2	20.47 ± 0.43ab	19.41 ± 0.36l	20.53 ± 0.72h	13.91 ± 0.28ef	65.29 ± 0.44f	1.15 ± 0.01ef
3	20.56 ± 0.36ab	8.76 ± 0.43a	11.45 ± 0.91a	15.78 ± 0.58h	66.65 ± 0.4gh	1.17 ± 0.01hi
4	20.94 ± 0.06b	14.57 ± 0.59h	16.85 ± 0.47ef	13.21 ± 0.33e	65.49 ± 0.42f	1.15 ± 0.01fg
5	20.44 ± 0.28ab	19.22 ± 0.24l	19.58 ± 0.46i	17.70 ± 0.23j	67.25 ± 0.22hi	1.18 ± 0.00ij
6	20.43 ± 0.08ab	16.51 ± 0.37j	16.61 ± 0.74ef	14.83 ± 0.33g	66.61 ± 0.23gh	1.17 ± 0.00hi
7	20.45 ± 0.14ab	21.91 ± 0.68m	20.21 ± 0.34j	18.07 ± 0.22k	67.66 ± 0.38ij	1.19 ± 0.01jk
8	20.47 ± 0.47ab	15.31 ± 0.15i	17.41 ± 0.57f	10.63 ± 0.43bc	64.79 ± 0.34cdef	1.14 ± 0.01cdef
9	20.21 ± 0.23a	19.86 ± 0.66l	21.11 ± 0.40h	12.00 ± 0.56d	65.17 ± 0.17ef	1.15 ± 0.00ef
10	20.38 ± 0.42ab	17.74 ± 0.25k	19.22 ± 0.38g	9.92 ± 0.27b	64.63 ± 0.61cdef	1.14 ± 0.01cdef
11	20.33 ± 0.14a	10.72 ± 0.43c	13.44 ± 0.28bc	15.03 ± 0.25gh	64.12 ± 0.76cd	1.13 ± 0.01c
12	20.63 ± 0.50ab	13.73 ± 0.42g	14.09 ± 0.22c	13.40 ± 0.55e	64.82 ± 0.32cdef	1.13 ± 0.01cde
13	20.64 ± 0.22ab	10.21 ± 0.23bc	13.55 ± 0.42c	14.81 ± 0.35g	65.18 ± 0.16if	1.15 ± 0.00ef
14	20.27 ± 0.04a	12.02 ± 0.51de	15.17 ± 0.17d	10.57 ± 0.48bc	63.97 ± 0.42c	1.13 ± 0.01c
15	20.66 ± 0.25ab	9.74 ± 0.25b	13.20 ± 0.30bc	14.47 ± 0.22fg	63.18 ± 0.85b	1.11 ± 0.02b
16	20.62 ± 0.14ab	12.25 ± 0.25e	13.41 ± 0.58bc	13.75 ± 0.64ef	66.33 ± 0.28g	1.16 ± 0.00gh
17	20.65 ± 0.12ab	11.56 ± 0.28d	13.58 ± 0.52c	10.83 ± 0.44c	64.83 ± 0.78cdef	1.14 ± 0.01cdef
18	20.77 ± 0.24ab	14.47 ± 0.21h	17.03 ± 0.17f	9.03 ± 0.07a	64.08 ± 0.65cd	1.13 ± 0.01c
19	20.57 ± 0.14ab	12.63 ± 0.41ef	12.60 ± 0.59b	16.71 ± 0.29i	64.92 ± 0.28def	1.14 ± 0.00def
Control					56.95 ± 0.02a	1.00 ± 0.00a

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

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante específica ABTS, para extractos fenólicos de inca muña fue de 8.76 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$, esta capacidad antioxidante debiéndose a la presencia principalmente de flavanonas, flavonas y ácidos hidroxycinámicos, estos resultados son similares a los reportados por Chirinos *et al.* (2011) quienes reportaron una capacidad antioxidante específica ABTS de 8.58 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$, siendo además inferior a valores reportados en estudios posteriores realizados por Chirinos *et al.* (2013), quienes reportan valores de 11.3 y 22.2 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$ para capacidades antioxidantes específicas ABTS y FRAP, respectivamente. Esta diferencia posiblemente se debe a las condiciones de extracción, purificación y la calidad de la materia prima.

Con respecto al extracto fenólico de la mashua, en nuestro estudio se obtuvo una capacidad antioxidante específica ABTS de 8.7 $\mu\text{mol TE/mg EAG}$, siendo este resultado inferior al obtenido por Chirinos *et al.* (2013); mientras que la capacidad antioxidante específica ORAC en nuestro estudio fue de 15.7 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$, siendo este resultado similar al reportado por Chirinos *et al.* (2013), atribuyéndose esta variabilidad a las condiciones de extracción y purificación, así como la calidad de la materia prima.

En la Figura 15 se observa las superficies de respuesta para capacidades antioxidantes específicas ABTS, FRAP y ORAC, respectivamente, de las 19 diferentes mezclas desarrolladas. Se observa que las mezclas desarrolladas no presentaron efectos sinérgicos, en lo que concierne a la capacidad antioxidante ABTS+. Los compuestos fenólicos de la inca muña (100%, mezcla 3) tuvieron menor capacidad antioxidante respecto a las diferentes mezclas desarrolladas y respecto a la mashua (100%, mezcla 17) y el extracto hidrolizado de tara (100%, mezcla 7). Resultados similares fueron obtenidos en el caso de la capacidad antioxidante específica FRAP. Los resultados de capacidad antioxidante específica ABTS y FRAP fueron ajustados a un modelo cuadrático ($\text{ABTS} = 9.02*\text{EHT} + 11.00*\text{EFM} + 26.36*\text{EFIM} + 3.65*\text{EHT}*\text{EFM} - 8.64*\text{EHT}*\text{EFIM} + 6.69*\text{EFM}*\text{EFIM}$; $\text{FRAP} = 10.86*\text{EHT} + 13.73*\text{EFM} + 27.00*\text{EFIM} + 2.89*\text{EHT}*\text{EFM} - 5.47*\text{EHT}*\text{EFIM} - 5.95*\text{EFM}*\text{EFIM}$) con coeficiente de determinación (R^2) de 0.95 y 0.94, respectivamente.

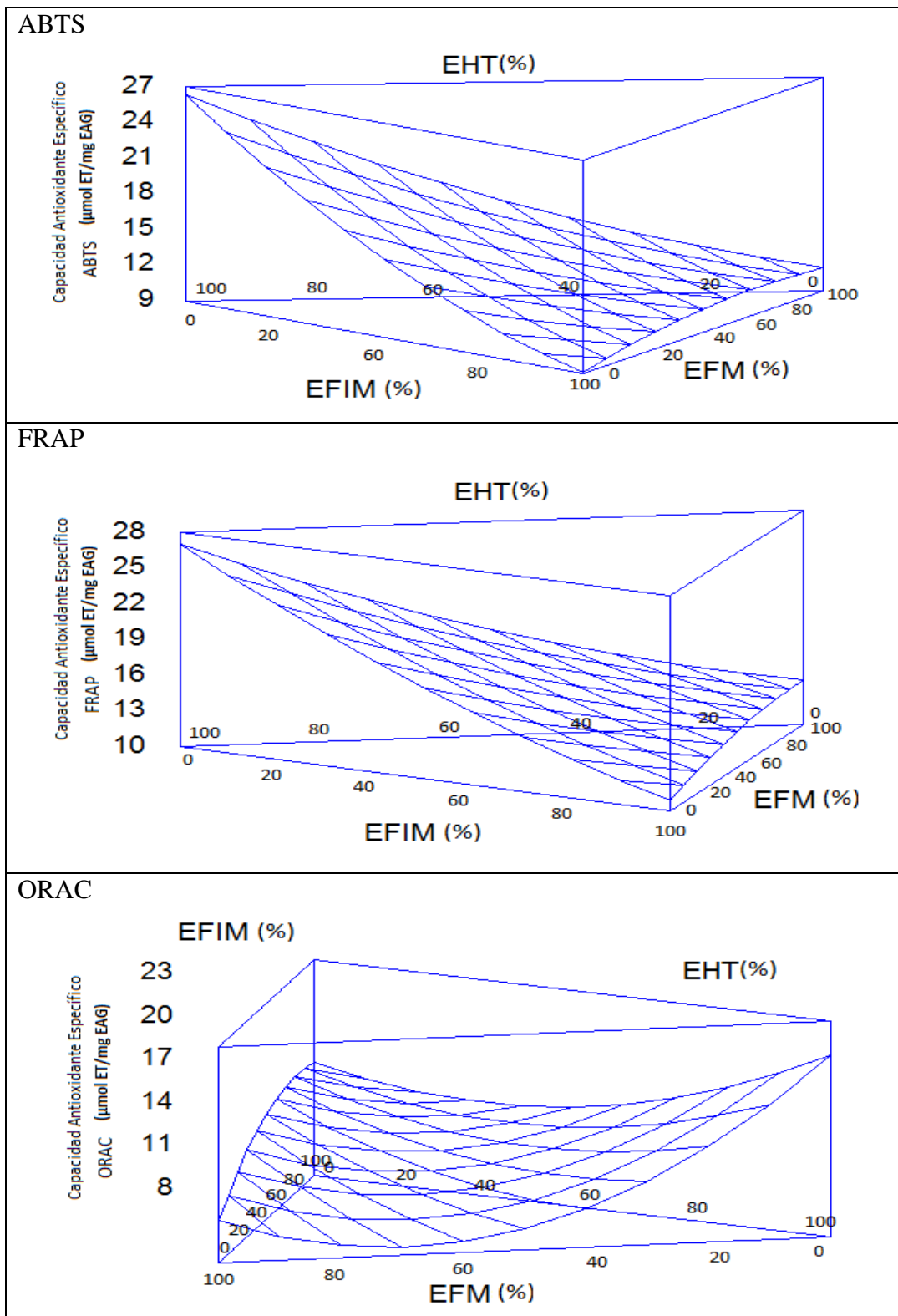


Figura 15. Capacidad antioxidante específica de las mezclas de compuestos fenólicos.

La capacidad antioxidante específica ORAC de las mezclas fue inferior a los obtenidos para el extracto hidrolizado de tara (100%, mezcla 7). Los valores más bajos fueron obtenidos para la mezcla 18, representada por un 33.3% de extracto hidrolizado de tara + 66.6% de extracto fenólico de mashua y para la mezcla 10, compuesta por un 50% de extracto hidrolizado de tara + 50% de extracto fenólico de mashua; mientras que la capacidad antioxidante específica ORAC mas alto (18.07 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$) se obtuvo con para el extracto hidrolizado de tara 100%, seguido por la mezcla 5, compuesta por 66.6% de extracto hidrolizado de tara + 33.3 de extracto fenólico de inca muña, que alcanzó 17.70 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$. Los resultados mostrados, fueron ajustados a un modelo cuadrático ($\text{ORAC} = 15.89 \cdot \text{EHT} + 10.91 \cdot \text{EFM} + 20.62 \cdot \text{EFIM} + 7.59 \cdot \text{EHT} \cdot \text{EFM} - 13.38 \cdot \text{EHT} \cdot \text{EFIM} - 25.12 \cdot \text{EFM} \cdot \text{EFIM}$) con coeficiente de determinación (R^2) de 0.94.

La mezcla de los tres componentes en proporciones iguales (Mezcla 1, 33.33% de extracto hidrolizado de tara + 33.33% de extracto fenólico de mashua + 33.33% de extracto fenólico de inca muña) presentaron valores de capacidad antioxidante específica ABTS, FRAP y ORAC de 13.22, 16.13 y 11.40 $\mu\text{mol TE/mg AGE}$, respectivamente.

En la Figura 16 se muestra la superficie de respuesta para los periodos de inducción (PI). Los mejores resultados se obtuvieron con las mezclas 5 y 7 compuestas de 66.67% de extracto hidrolizado de tara + 33.33% de extracto fenólico de inca muña y extracto de tara hidrolizado (100%) las que dieron como resultados periodos de inducción de 67.2 y 67.6 minutos, respectivamente, siendo estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Para las mezclas 14 y 15 se obtuvieron periodos de inducción de 63.9 y 63.1 minutos, siendo estos valores menores respecto a los obtenidos para las otras mezclas. De los resultados mostrados se concluye que las mezclas desarrolladas no presentaron en ningún caso efectos sinérgicos. Pero los periodos de inducción obtenidos para todas las mezclas fueron superiores respecto al periodo de inducción obtenido para la muestra control (sin adición de antioxidante). El mejor ajuste fue obtenido a un modelo cuadrático ($\text{PI} = 20.62 \cdot \text{EHT} + 10.91 \cdot \text{EFM} + 15.89 \cdot \text{EFIM} - 25.11 \cdot \text{EHT} \cdot \text{EFM} - 13.38 \cdot \text{EHT} \cdot \text{EFIM} + 7.59 \cdot \text{EFM} \cdot \text{EFIM}$) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.89

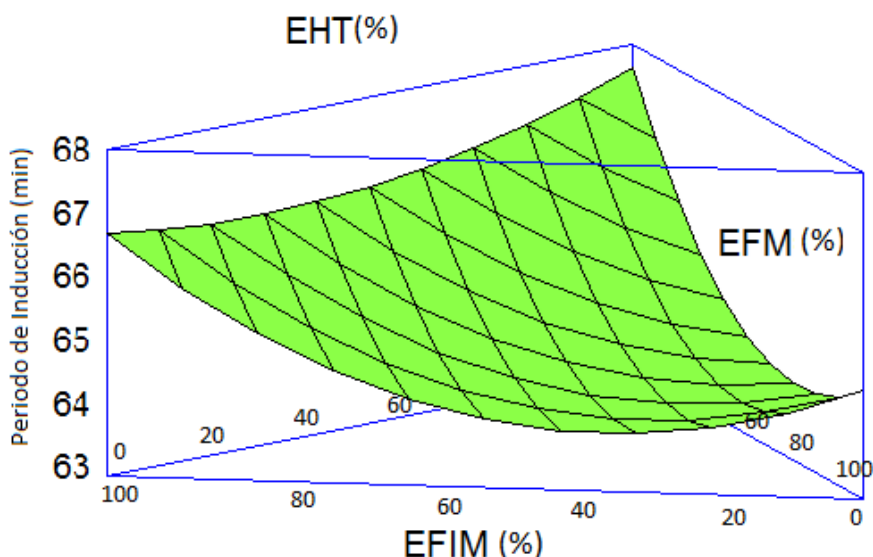


Figura 16: Superficie de respuesta para el periodo de inducción del aceite de sacha inchi en presencia de mezclas de compuestos fenólicos.

4.4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE MEZCLAS ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE TARA, INCA MUÑA Y MASHUA CON PALMITATO DE ASCORBILO, ÁCIDO CÍTRICO Y α -TOCOFEROL

Los resultados obtenidos de la eficacia antioxidante de mezclas binarias sobre la estabilidad oxidativa del aceite de sacha inchi se muestran en el Cuadro 9. Los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla del extracto de tara hidrolizado por 180 min (EHT) con palmitato de ascorbilo (PA) en cantidades de 200 y 100 ppm, respectivamente, lo que permitió obtener un periodo de inducción de 87.8 min. Las mezclas conformadas por extracto de tara (200 ppm) con ácido cítrico (AC, a 100 ppm) o con α -tocoferol (α -T, a 100 ppm) dieron lugar a bajos periodos de inducción de 73.6 y 65.0 min, respectivamente; con grados de protección de 15.2 y 30.4%, respectivamente. Los mismos resultados fueron observados con los polifenoles de mashua (200 ppm); cuando se usaron en combinación con PA (100 ppm), AC (100 ppm) o α -T (100 ppm), con periodos de inducción de 76.2, 68.0 y 62.2 minutos, respectivamente y grados de protección 35, 20 y 10% respectivamente.

Mientras que con el extracto fenólico de inca muña (IM) a una concentración de 200 ppm combinados con 100 ppm de PA ó 100 ppm de AC ó 100 ppm de α -T, permitieron obtener un periodo de inducción de 83.6, 69.2 y 65.2 minutos y grados de protección de 48.1, 22.6 y 15.5%, respectivamente.

La mezcla 5 (EFMO) (Cuadro 8) compuesto de 66.67% de extracto hidrolizado de tara a 180 min + 33.33% de extractos fenólicos de inca muña, presentó los mejores resultados de periodo de inducción en el aceite de sachá inchi, se evaluó los efectos sinérgicos o antagónicos del mismo con los antioxidantes PA, AC y α -tocoferol. Los resultados indican que la mezcla EFMO a una concentración de 200 ppm combinados con 100 ppm de PA (EFMO-200 + PA100) permitieron obtener periodos de inducción de 85.2 minutos, mientras que en combinación con ácido cítrico a 100 ppm (EFMO-200 + AC100) dieron periodos de inducción de 72.4 minutos y en combinación con α -tocoferol a 100 ppm (EFMO-200 + α -T100) se obtuvo un periodo de inducción de 64.4 minutos.

Los factores de estabilización mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todas las mezclas evaluadas. Los mayores factores de estabilización alcanzados estuvieron dados para las mezclas: EHT-200 + PA-100 y EFIM-200 + PA-100 cuyos valores fueron de 1.6 y 1.5, respectivamente; así como para la mezcla EFMO-200 + PA-100 (1.5). El sinergismo calculado (interacción en la cual el efecto antioxidante de una o más sustancias es mayor que la suma de los efectos antioxidantes de cada elemento solo) para la mezcla EHT-200 + PA-100, EFIM-200 + PA-100 y EFIM-200 + PA-100 fue de 24.7, 12.5 y 13.7%, respectivamente.

Cuando los extractos hidrolizados de tara, extractos fenólicos de mashua e inca muña fueron combinados con α -Tocoferol, se observaron efectos antagónicos. Cuando se adicionó 100 ppm de α -tocoferol al aceite de sachá inchi se alcanzó un periodo de inducción de 56.6 minutos, no difiriendo significativamente del encontrado para el aceite de sachá inchi sin antioxidantes (control, 56.4 minutos).

Cuadro 9: Periodo de inducción, grado de protección y factor de estabilización del aceite de sachá inchi obtenidos en presencia de antioxidantes.

Antioxidante	Periodo de Inducción (min)	Grado de protección (%)	Factor de estabilización
Control (sin antioxidante)	56.46 ± 0.14 a	0.00 ± 0.00 a	1.00 ± 0.00 a
α-T-100	56.63 ± 0.06 a	0.30 ± 0.36 a	1.00 ± 0.00 a
AC-100	63.19 ± 0.33 c	11.93 ± 0.85 b	1.10 ± 0.00 b
PA-100	70.33 ± 0.56 g	24.56 ± 1.42 g	1.23 ± 0.06 e
EFIM-200	66.36 ± 0.62 e	17.50 ± 0.80 d	1.20 ± 0.06 de
EFIM-200 + α-T-100	65.21 ± 0.71 d	15.50 ± 1.54 c	1.17 ± 0.06 cd
EFIM-200 + AC-100	69.23 ± 0.43 h	22.60 ± 0.69 f	1.20 ± 0.00 de
EFIM-200 + PA-100	83.64 ± 0.55 i	48.17 ± 1.27 h	1.50 ± 0.00 g
EFM-200	64.73 ± 0.60 d	14.63 ± 0.75 c	1.13 ± 0.06 bc
EFM-200 + α-T-100	62.25 ± 0.53 b	10.27 ± 1.17 b	1.10 ± 0.00 b
EFM-200 + AC-100	68.06 ± 0.69 f	20.53 ± 1.15 e	1.20 ± 0.00 de
EFM-200 + PA-100	76.22 ± 0.43 j	35.00 ± 1.10 i	1.33 ± 0.06 f
EFMO-200	67.46 ± 0.63 f	19.47 ± 1.03 e	1.20 ± 0.00 de
EFMO-200 + α-T-100	64.45 ± 1.09 d	14.13 ± 2.16 c	1.13 ± 0.06 bc
EFMO-200 + AC-100	72.47 ± 0.41 k	28.33 ± 0.95 j	1.30 ± 0.00 f
EFMO-200 + PA-100	85.27 ± 0.09 l	51.00 ± 0.50 k	1.50 ± 0.00 g
EHT-200	66.23 ± 0.48 e	17.33 ± 1.12 d	1.20 ± 0.00 de
EHT-200 + α-T-100	65.07 ± 0.09 d	15.23 ± 0.45 c	1.17 ± 0.06 cd
EHT-200 + AC-100	73.67 ± 0.44 n	30.47 ± 0.45 l	1.30 ± 0.00 f
EHT-200 + PA-100	87.86 ± 0.35 m	55.61 ± 0.26 n	1.60 ± 0.00 h

EFIM: extracto fenólicos de inca muña; EFM: extracto fenólico de mashua; EHT: extracto hidrolizado de tara; EFMO: extracto fenólicos de la mezcla de tara e incamuña.

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

El α-tocoferol a 100 ppm en combinación con el extracto hidrolizado de tara, extractos fenólicos de mashua e inca muña y la mezcla EFMO-200 (todos ellos a 200 ppm) alcanzaron periodos de inducción de 65.0, 62.2, 65.2 y 64.4 minutos, respectivamente; siendo estos valores inferiores a los encontrados cuando se empleó sólo los extractos (a 200 ppm) en el aceite con valores de 66.2, 62.2, 65.2 y 64.4, respectivamente; esto indicaría que se produjeron efectos antagónicos cuando el α-tocoferol fue adicionado a los diferentes extractos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Knez y Bauman *et al.* (2000) quienes determinaron efectos antagónicos para mezclas de extractos de romero y α-tocoferol, mientras que las mezclas de extractos de romero con palmitato de ascorbilo presentaron altos valores de

sinergismo (56.0 %) y con la adición de ácido cítrico se alcanzó un menor efecto sinergista (2.61 %). Al respecto, se puede afirmar que el α -tocoferol reduce el efecto antioxidante de algunos extractos fenólicos como el romero, según lo reportado por Hopia *et al.* (1996) y Baniyas *et al.* (1992).

Finalmente, se observa que el mejor grado de protección del aceite de sachá inchi se dio por adición de mezclas binarias de antioxidantes, determinándose que la mezcla de extracto hidrolizado de tara (200 ppm) + PA (100 ppm) alcanzando un 55.61% más de protección respecto al control (sin antioxidante).

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

De la prueba anterior se observó que los mejores resultados fueron obtenidos con los taninos hidrolizados de la tara (EHT) y con la mezcla de los taninos hidrolizados más el palmitato de ascorbilo (PA), por esta razón se decidió evaluar la influencia de la concentración de los mismos, sobre la eficacia antioxidante en el aceite de sachá inchi, dichos resultados se presentan en el Cuadro 10.

Se observó que conforme se incrementó la concentración del extracto hidrolizado de tara, se obtuvo mayores tiempos de inducción, factores de estabilización y grados de protección sobre el aceite de sachá inchi; este efecto fue mayor al incorporar a los extractos hidrolizados de tara el palmitato de ascorbilo y el efecto fue más pronunciado aún cuando se incrementaron las concentraciones de palmitato de ascorbilo. El mayor tiempo de inducción alcanzado fue el correspondiente a la mezcla de 400 ppm de extracto hidrolizado de tara con 100 ppm de palmitato de ascorbilo (EHT-400 + PA-100) siendo este de 96.6 minutos, mientras que la mezcla de 400 ppm de extracto hidrolizado de tara con 25 ppm de palmitato de ascorbilo (EHT-400 + PA-25) alcanzó 78.1 minutos. Con la adición de 100 ppm de palmitato de ascorbilo, se observó un incremento en el periodo de inducción en un 18.53 minutos respecto al periodo de inducción obtenido para el extracto hidrolizado de tara a 400 ppm y un incremento en 40.17 minutos, respecto a la muestra control (aceite de sachá inchi sin

adición de antioxidante). Las concentraciones de PA empleados en los ensayos fueron inferiores a la dosis máxima permitido de 200 mg/Kg de aceite establecido por la FDA (Yi *et al.*, 2011).

Cuadro 10. Periodos de inducción, factor de estabilización y grado de protección determinados para el aceite de sachá inchi, en presencia de mezclas antioxidantes de extracto hidrolizado de tara y palmitato de ascorbilo.

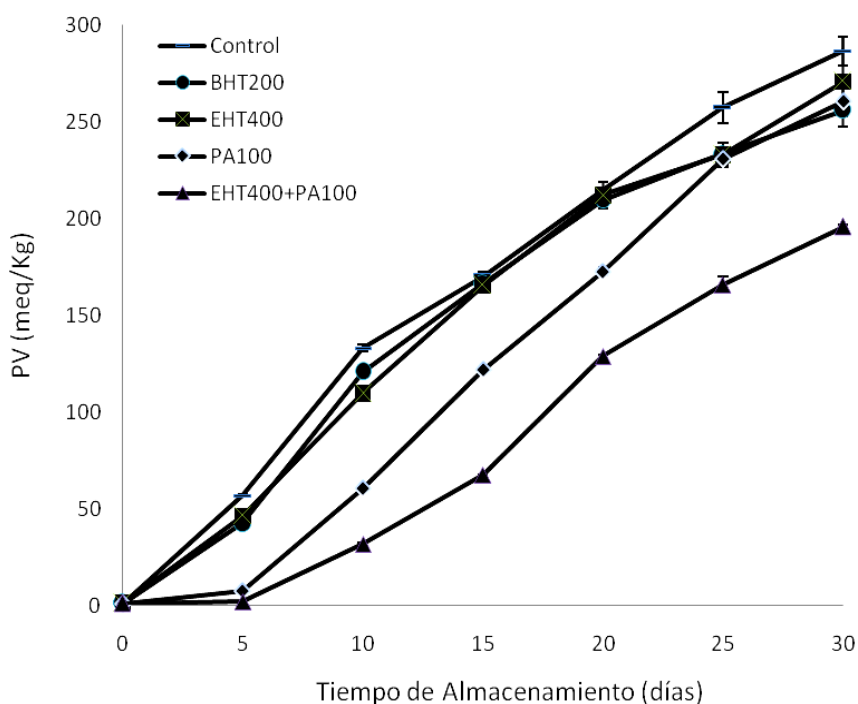
Antioxidante	Periodo de Inducción (min)	Factor de estabilización	Grado de protección (%)
Control	56.46 ± 0.14 a	1.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
EHT-200	66.23 ± 0.48 b	1.17 ± 0.01 b	17.30 ± 0.60 b
EHT-200+PA-25	70.85 ± 0.43 c	1.25 ± 0.01 c	25.48 ± 1.06 c
EHT-200+PA-50	73.96 ± 0.52 d	1.31 ± 0.01 d	30.99 ±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

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

4.5. PRUEBAS DE ALMACENAMIENTO ACELERADO

4.5.1. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

En la Figura 17 se muestra la representación grafica de los resultados obtenidos para el índice de peróxidos de las muestras de aceite de secha inchi.



BHT 200: BHT a 200 ppm, EHT400: extracto hidrolizado de tara a 400 ppm, PA 100: palmitato de ascobilo a 100 ppm, EHT400 + PA100: Extracto hidrolizado de tara a 400 ppm más palmitato de ascobilo a 100 ppm.

Figura 17. Evolución del índice de peróxido en el aceite de sachá inchi con diferentes antioxidantes durante el periodo de almacenamiento.

Se observa que las muestras control (sin antioxidantes) y con los antioxidante BHT a 200 ppm y extracto hidrolizado de tara a 400 ppm, exhiben un comportamiento similar, respecto al índice de peróxidos, donde ocurre un incremento lineal del valor peróxido durante los 30 días de almacenamiento, obteniéndose, para este periodo, valores de 286.7, 270.8 y 256.0 meq O₂/Kg, respectivamente.

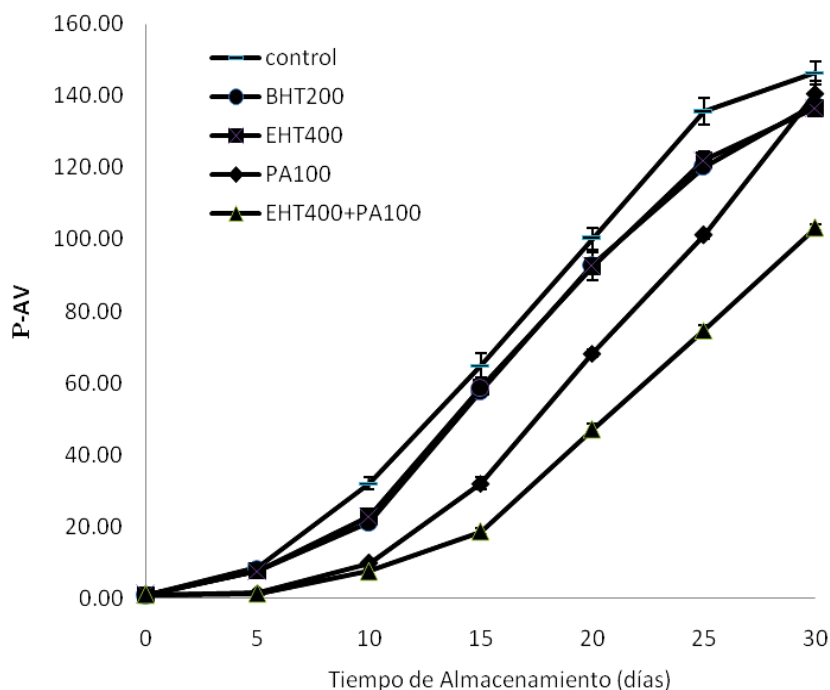
La mayor estabilidad del aceite de sachá inchi a la oxidación y formación de hidroperóxidos fue evidenciada para las muestras con adición de la mezcla compuesta por el extracto hidrolizado de tara (400 ppm) y el palmitato de ascorbilo (100 ppm), llegando a un valor de IP de 195.83 meq O₂/Kg a los 30 días de almacenamiento. Se observa que la adición de antioxidantes tiende a mejorar la estabilidad del aceite frente al proceso oxidativo, estando ello sujeto al tipo de antioxidante empleado, a la concentración del mismo y la sinergia encontrada entre mezclas de antioxidantes. Comparando los valores de índice de peróxidos alcanzados por la muestra control (sin antioxidante) al cabo de 20 días (214.7 meq O₂/Kg) con estudios realizados por Omar *et al.* (2010) empleando aceite de linaza, difieren ampliamente, habiendo reportado para la muestra control valores de 142.1 meq O₂/Kg, esta diferencia se debe principalmente a las condiciones de almacenamiento y la naturaleza del aceite de sachá inchi con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados, que son más susceptibles a la oxidación.

Las concentraciones de los antioxidantes añadidos en nuestro estudio fueron muy bajas comparados a los utilizados por Ixtaina *et al.* (2011) quienes utilizaron en aceite de chia (perfil de ácidos grasos cercano al aceite de sachá inchi) extracto de té verde a 500 y 2500 ppm, palmitato de ascorbilo a 2500 ppm, reportaron valores de índice de peróxidos de 14 y 16 meq O₂/Kg para las dosis de aplicación de 2,500 y 500 ppm de extracto de té verde, respectivamente y 2 meq O₂/Kg después de los 195 días de almacenaje a 20 °C en presencia de 2500 ppm de PA. La concentración de palmitato de ascorbilo utilizado por Ixtaina *et al.* (2011) supera los límites establecidos por el Codex Alimentarius, que establece 500 ppm.

4.5.2. VALOR *p*-ANISIDINA

En la Figura 18 se observa la evolución del valor *p*-anisidina en el aceite de sachá inchi en presencia de antioxidantes y muestra control (sin antioxidantes). La tendencia de los valores de *p*-anisidina fue similar a la encontrada para el IP, alcanzando un valor máximo de *p*-anisidina de 146.4 a los 30 días de almacenamiento para la muestra control (sin antioxidante). Se observa que la mayor inhibición en la formación de los productos secundarios de oxidación se logró con la mezcla de 400 ppm de extracto hidrolizado de tara más 100 ppm de palmitato de ascorbilo, llegando a

una inhibición del 85.2, 76.6, 71.3, 53.1, 44.3 y 29.4 % respecto a la muestra control para los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30, respectivamente. También se observa los resultados obtenidos para las muestras con BHT a 200 ppm y con extracto hidrolizado de tara a 400 ppm no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en sus comportamientos.



BHT 200: BHT a 200 ppm, EHT400: extracto hidrolizado de tara a 400 ppm, PA 100: palmitato de ascorbilo a 100 ppm, EHT400 + PA100: Extracto hidrolizado de tara a 400 ppm más palmitato de ascorbilo a 100 ppm.

Figura 18. Evolución del valor *p*-anisidina en el aceite de sachá inchi durante las pruebas de almacenamiento acelerado.

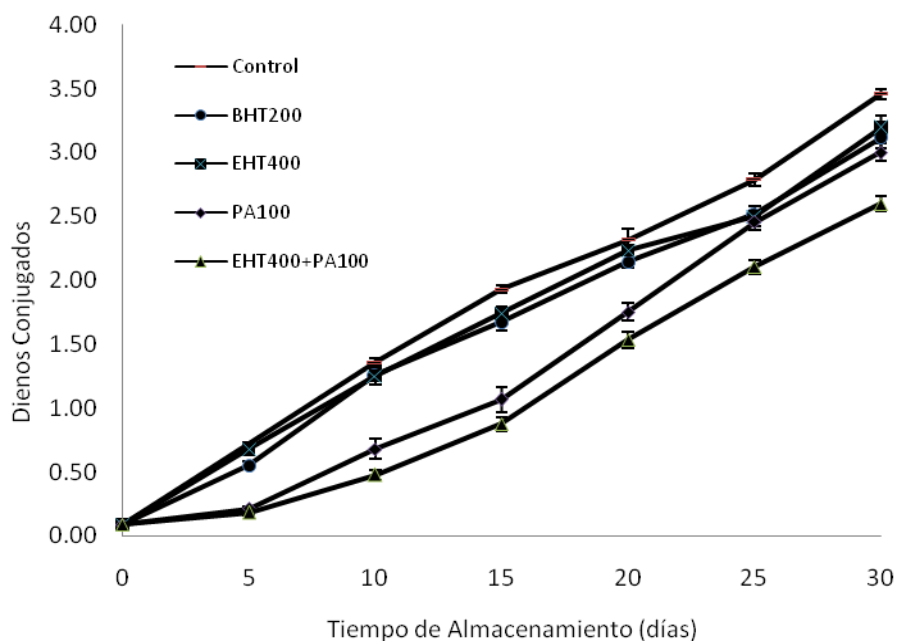
Comparando la eficacia de los antioxidantes evaluados en esta prueba a los 15 días de almacenamiento a 55 °C, se observa que la mezcla de antioxidantes: extracto hidrolizado de tara (400 ppm) mas palmitato de ascorbilo (100 ppm) inhiben en un 71.3 % la formación de compuestos de la oxidación secundaria, el palmitato de ascorbilo (100 ppm) inhibe en un 50.8 %, el BHT (200 ppm) y el extracto hidrolizado de tara (400 ppm) inhiben en un 10.9 y 9.4 %, respectivamente, todos estos valores fueron determinados considerando el valor *p*-anisidina obtenido para la muestra control (64.87) equivalente al 100%.

Para el aceite de sachá inchi con adición de antioxidantes (BHT, palmitato de ascorbilo y extracto hidrolizado de tara) se observa que el valor de *p*-anisidina se incrementa rápidamente a partir del décimo día; un resultado similar fue reportado por Knez y Bauman (2000) para el aceite de girasol en presencia de los antioxidantes: extracto de romero, ácido cítrico y palmitato de ascorbilo. Comparando la tendencia de incremento en el valor *p*-anisidina de las muestras control (sin adición de antioxidantes) tanto del aceite de sachá inchi y girasol, se observa que en el aceite de sachá inchi la velocidad de formación de compuestos secundarios de oxidación incrementa en mayor medida a partir del quinto día, mientras que en aceite de girasol comenzó a los 7-8 días de almacenamiento a 60 °C. Esta diferencia se debe básicamente a la composición en ácidos grasos poliinsaturados y posiblemente a la presencia de antioxidantes naturales en ambos aceites.

Nuestros resultados de valores *p*-anisidina de la muestra con la mezcla (EHT400 + PA100) al día 15, comparados con estudios realizados por Campos (2010) quien emplea el extracto hidrolizado de tara (200 ppm) por vía química por un tiempo de hidrólisis de 4 y 9 horas, determinando valores *p*-anisidina de 15.1 y 23.9, respectivamente, cuando emplearon aceite de soya almacenado a 60 °C. Esta diferencia se debe principalmente a la mayor concentración utilizada de extracto de tara en nuestro estudio en combinación de palmitato de ascorbilo y también a la composición y variabilidad en el perfil de ácidos grasos.

4.5.3. DIENOS CONJUGADOS

En la Figura 19 se presenta los resultados de dienos conjugados obtenidos en el aceite de sachá inchi, en presencia de diferentes antioxidantes. Altos contenidos de dienos conjugados fueron observados para la muestra control (sin antioxidantes) y en las muestras con BHT y EHT; mientras que en las muestras con PA y la mezcla EHT + PA los contenidos de dienos fueron menores. La formación de altos contenidos de dienos conjugados está relacionada con la presencia de alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Liu & White, 1992), mientras que los trienos conjugados pueden ser producidos por la deshidratación de dienos conjugados (Fishwick & Swoboda, 1977).



BHT 200: BHT a 200 ppm, EHT400: extracto hidrolizado de tara a 400 ppm, PA 100: palmitato de ascorbilo a 100 ppm, EHT400 + PA100: Extracto hidrolizado de tara a 400 ppm más palmitato de ascorbilo a 100 ppm.

Figura 19: Incremento en dienos conjugados en el aceite de sacha inchi

El valor de dienos conjugados alcanzados al cabo de 5 días en presencia de la mezcla antioxidante (ETH400+PA100) inhibe la formación de dienos conjugados en más del 64%, respecto al control. Comparando estos resultados con los reportados por Mohdaly *et al.* (2011) quienes determinaron una inhibición en la formación de dienos conjugados en 35 y 43%, respectivamente, respecto al control (sin antioxidante); se demuestra la efectividad de la mezcla desarrollada.

4.5.4. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Los resultados del análisis de perfil de ácidos grasos de los aceites almacenados por 10, 20 y 30 días, se muestran en el Cuadro 11. En el aceite de sacha inchi correspondiente al día cero, se determinó la presencia de los siguientes ácidos grasos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico en concentraciones de 3.8, 2.9, 7.9, 33.9 y 42.6 g/100 g de aceite, respectivamente, de los cuales el total de ácidos grasos poliinsaturados, la suma de los ácidos linoleico, y linolénico, correspondió a 76.6

g/100 g de aceite. Estos resultados son cercanos a los reportados por Fanali *et al.* (2011), con valores de 4, 3, 9 36 y 47 g/100 g de aceite. El perfil de ácidos grasos en aceite de sachá inchi es variable dependiendo del origen, estado de madurez, las condiciones de cultivo, factores medioambientales (Ng *et al.* 2013).

De acuerdo al análisis estadístico se encontró que no existen diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos, tanto en las muestras de aceite sin adición de antioxidantes (control) y con adición de los diferentes antioxidantes, lo que indicaría que durante las pruebas de almacenamiento acelerado el perfil de ácido graso no fue afectado por el proceso oxidativo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Maurer *et al.* (2012), quienes evaluaron el proceso de oxidación del aceite de sachá inchi bajo condiciones aceleradas a 65°C y determinaron que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados totales (80.9 g/100 g de aceite) no varió significativamente respecto al día cero (control).

4.5.5. CONTENIDO DE TOCOFEROLES

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

Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos (g/100 g de aceite) del aceite de sachá inchi con y sin antioxidante a diferentes tiempos de almacenamiento.

Aceite de sachá inchi	Días	Ácido palmítico C16:0	Ácido Esteárico C18:0	Ácido oleico (ω -9) C18:1	Ácido linoleico (ω -6) C18:2	Ácido Alfa-Linolénico (ω -3) C18:3	Total de ácidos grasos poliinsaturados
Sin antioxidante	0	3.84 ± 0.00c	2.94 ± 0.00a	7.97 ± 0.00b	33.99 ± 0.01a	42.67 ± 0.01a	75.66 ± 0.02a
	10	3.77 ± 0.01a	2.89 ± 0.00a	7.96 ± 0.01b	34.30 ± 0.00bc	42.70 ± 0.00a	77.12 ± 0.04a
	20	3.83 ± 0.01bc	2.93 ± 0.01a	8.15 ± 0.00b	34.45 ± 0.01cd	42.10 ± 0.00a	76.55 ± 0.00a
	30	3.81 ± 0.00b	2.93 ± 0.00a	7.41 ± 0.00a	33.90 ± 0.00a	42.44 ± 0.01a	76.49 ± 0.09a
Con antioxidante (EHT-400 + PA-100)	0	3.84 ± 0.00c	2.94 ± 0.01a	7.97 ± 0.00b	33.99 ± 0.01a	42.67 ± 0.01a	76.64 ± 0.06a
	10	3.83 ± 0.06bc	2.94 ± 0.06a	7.94 ± 0.07b	34.15 ± 0.23ab	41.21 ± 2.05a	75.36 ± 2.35a
	20	3.83 ± 0.01bc	2.92 ± 0.01a	8.00 ± 0.01b	34.18 ± 0.01ab	42.51 ± 0.01a	76.69 ± 0.01a
	30	3.82 ± 0.06bc	2.89 ± 0.31a	8.31 ± 0.04c	34.26 ± 0.12d	41.81 ± 0.33a	76.09 ± 0.21a

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

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

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

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

Cuadro 12. Variación en el contenido de tocoferoles en mg/100 g de aceite de sachá inchi durante las pruebas de almacenamiento acelerado.

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

Resultados promedio de tres repeticiones ± SD.

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

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

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

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

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

En la Figura 20 se presenta la cinética de degradación del (a) γ - y (b) δ -tocoferol, se observó que las muestras con la mezcla de antioxidantes (EHT-400 + PA-100) presentan una cinética de degradación lineal, mientras que en aquellas muestras sin antioxidante la degradación fue exponencial

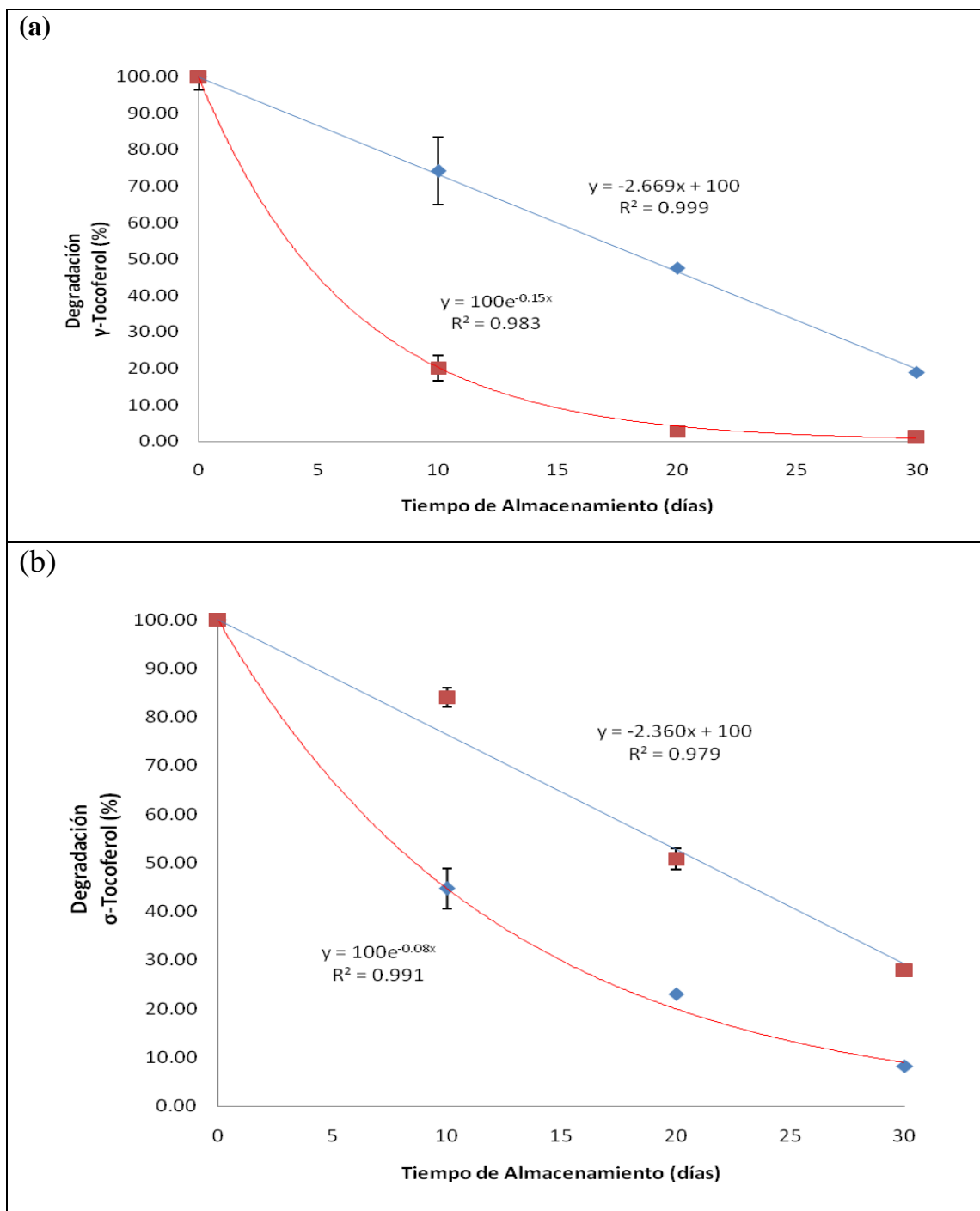


Figura 20. Cinética de degradación para el γ - y δ -tocoferol en el aceite de sachachi con y sin adición de antioxidantes.

4.5.6. CONTENIDO DE FITOESTEROLES

El contenido de fitosteroles en el aceite de sacha inchi en presencia y ausencia de antioxidantes se muestra en el Cuadro 13. De acuerdo a los resultados, el almacenamiento a 55 °C por 30 días no influye en el contenido fitosteroles del aceite de sacha inchi. Este aceite presenta fitosteroles como el campesterol, stigmasterol y β -sitosterol, variando su concentración de acuerdo al cultivar (Chirinos *et al.*, 2013). El β -sitosterol fue el fitosterol más importante que representa más del 60%, seguido del stigmasterol y finalmente el campesterol, lo que concuerda con los reportado por Chirinos *et al.* (2013) y Thanh *et al.* (2006).

Cuadro 13. Variación del contenido de fitosteroles en el aceite de sacha inchi sometidos a pruebas de almacenamiento acelerado.

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

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

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

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

V. CONCLUSIONES

- Las vainas de tara pueden ser hidrolizados a ácido gálico y galotaninos de bajo peso molecular mediante tratamiento térmico a 121.1 °C y 105 kPa, alcanzando en un tiempo de 180 minutos un grado de hidrólisis de 29.8% así como también un incremento en la capacidad antioxidante determinada *in vitro*, cuyos resultados ABTS+, FRAP y ORAC fueron 941, 940 y 703 $\mu\text{mol TE/ml}$.
- El empleo de galotaninos hidrolizados de tara (29.8% de hidrólisis) tiene efecto protector en el aceite de sacha inchi frente a la oxidación, incrementándose la estabilidad en un 20.0 %, respecto al control (aceite de sacha inchi sin antioxidante) cuando la evaluación se realizó mediante calorimetría de barrido diferencial a 120 °C.
- Combinaciones de los extractos hidrolizados de tara con fenólicos de mashua y fenólicos de inca muña no presentaron efectos antioxidantes sinérgicos, siendo las capacidades antioxidantes *in vitro* inferiores a la capacidad antioxidante del extracto hidrolizado de tara.
- El extracto hidrolizado de tara en combinación con palmitato de ascorbilo mostró un efecto antioxidante sinergista en la conservación del aceite de sacha inchi determinado mediante calorimetría de barrido diferencial a 120 °C.
- El estudio de la estabilidad del aceite de sacha inchi a 55 °C demostró que la mezcla del extracto hidrolizado de tara (400 ppm) con palmitato de ascorbilo (100 ppm) retarda la formación peróxidos así como la formación de productos secundarios de la oxidación

- El almacenaje del aceite de sachá inchi a 55 °C por 30 días, con o sin antioxidantes, no influye en el perfil de ácidos grasos de dicho aceite. Sin embargo pérdidas importantes en γ - y σ -tocoferol se observaron particularmente en el caso de las muestras almacenadas sin antioxidantes. Tampoco se observaron diferencias en el perfil y contenido de fitosteroles durante el almacenaje.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de fraccionamiento e identificación de los diferentes galotaninos obtenidos producto de la hidrólisis térmica a 121.1 °C por 180 minutos.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* y eficacia antioxidante mediante calorimetría de barrido diferencial de las diferentes fracciones obtenidas en aceite de sachá inchi.
- Evaluar la actividad antioxidante de extractos hidrolizados mediante tratamiento térmico en aceite de sachá inchi purificado (libre de tocoferoles) para verificar la efectividad antioxidante.
- Estudiar el efecto antioxidante de los extractos hidrolizados de tara por tratamiento térmico en diferentes aceites vegetales empleando pruebas de almacenamiento acelerado.
- Realizar estudios para evaluar el efecto sinérgico entre α -, β -, γ -, σ -tocoferol con extractos hidrolizados de tara y otras fuentes de compuestos fenólicos.
- Realizar una hidrólisis de extractos parcialmente purificados a temperaturas superiores a los 121.1°C para lograr una hidrólisis completa de galotaninos en ácido gálico.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. AGUILAR-GALVEZ, A., NORATTO, G., CHAMBI, F., DEBASTE, F., & CAMPOS, D. 2014. Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry*, 156(2013), 301–4.
2. AKOH C, DAVID B, MIN. 2008. Food Lipids. 3rd ed, ed. T.F. Grups. New York. 914.
3. AOAC (1995). Official methods of analysis Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists
4. ANDREASEN, M. F., LANDBO, A.-K., CHRISTENSEN, L. P., HANSEN, A., & MEYER, A. S. 2001. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4090–4096.
5. ANWAR, F., MANZOOR, M., & BAJWA, J. R. 2004. Antioxidant activity of solvent extracts of strawberry (*F. Ananassa*) using various antioxidant assays. *Pakistan Journal of Analytical Chemistry*, 5(2), 28–37.
6. AKIYAMA, H., FUJII, K., YAMASAKI, O., OONO, T., & IWATSUKI, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 487–491.

7. BANIAS, C., OREOPOULOU, V., & THOMOPOULOS, C. D. 1992. The Effect of Primary Antioxidants and Synergists on the Activity of Plant Extracts in Lard, *69*(6), 520–524.
8. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191–203.
9. BARCLAY, F. ANTUNES, Y. EGAWA, K.L. MCALLISTER, K. MUKAI, T. NISHI, M.R. VINGVIST. 1981. The efficiency of antioxidants delivered by liposomal transfer, *Biochim. Biophys. Acta* *1328*, 1–12.
10. BREWER, M. S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221–247.
11. CARTAYA, O., REYNALDO, I. 2001. Reseña bibliográfica, Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, *22*(2), 5-14.
12. CAMPOS, D., NORATTO, G., CHIRINOS, R., ARBIZU, C., ROCA, W., CISNEROS-ZEVALLOS, L. 2006. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosum*). *J. Sci. Food Agric.* *86*, 1481–1488.
13. CAMPOS GUTIERREZ, D. 2010. Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (*Caesalpinia spinosa*) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales. *Perúbiodiverso*. Lima, Perú

14. CHAMBI, F., CHIRINOS, R., PEDRESCHI, R., BETALLELUZ-PALLARDEL, I., DEBASTE, F., & CAMPOS, D. 2013. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products*, 47, 168–175.
15. CHIAVARO, E., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., BARNABA, C., VITTADINI, E., CERRETANI, L., & BENDINI, A. 2008. Differential scanning calorimetry: a potential tool for discrimination of olive oil commercial categories. *Analytica Chimica Acta*, 625(2), 215–26.
16. 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*, 106(3), 1285–1298.
17. CHIRINOS, R., HUAMÁN, M., BETALLELUZ-PALLARDEL, I., PEDRESCHI, R., & CAMPOS, D. 2011. Characterisation of phenolic compounds of Inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chemistry*, 128(3), 711–716. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.093
18. CHIRINOS, R., PEDRESCHI, R., ROGEZ, H., LARONDELLE, Y., & CAMPOS, D. 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152.
19. CHIRINOS, R., ZULOETA, G., PEDRESCHI, R., MIGNOLET, E., LARONDELLE, Y., & CAMPOS, D. 2013. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141(3), 1732–9.

20. CHOE, E., & MIN, D. B. 2006. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation, 5, 169–186.
21. DYER, J. M., STYMNE, S., GREEN, A. G., & CARLSSON, A. S. 2008. High-value oils from plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54(4), 640–55.
22. FANALI, C., DUGO, L., CACCIOLA, F., BECCARIA, M., GRASSO, S., DACHÀ, M., ... MONDELLO, L. 2011. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13043–9.
23. FOLLEGATTI-ROMERO, L. A., PIANTINO, C. R., GRIMALDI, R., & CABRAL, F. A. 2009. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 323–329.
24. FARHOOSH, R., GOLMOVAHHED, G.A., KHODAPARAST, M.H.H., 2007. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chem.* 100, 231–236.
25. FISHWICK, M. J., & SWOBODA, P. A. T. 1977. Measurement of oxidation of polyunsaturated fatty acids by spectrophotometric assay of conjugated derivatives. *Journal of Science Food and Agriculture*, 28, 387–391.
26. GARRO, J., RIEDL, B., CONNER, A., 1997. Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung* 51, 235–243.
27. GONZÁLEZ, M. J., TORRES, J. L., & MEDINA, I. 2010. Impact of thermal processing on the activity of gallotannins and condensed tannins from *Hamamelis virginiana* used as functional ingredients in seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4274–83.

28. GORDON, M. F. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 1–18). London: Elsevier Applied Science.
29. HAMED, S., & ABO-ELWAFI, G. 2012. Enhancement of oxidation stability of flax seed oil by blending with stable vegetable oils. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(10), 5039–5048.
30. HERTOEG, M. G. L., HOLMAN, P. C. H., & VENEMA, D. P. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591–1598.
31. HEO, H. J., KIM, Y. J., CHUNG, D., & KIM, D.-O. 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104(1), 87–92.
32. IXTAINA, V. Y., NOLASCO, S. M., & TOMÁS, M. C. 2011. Oxidative Stability of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil: Effect of Antioxidants and Storage Conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077–1090.
33. IUPAC. 1987. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives* (7th ed.). Palo Alto, CA: Blackwell Scientific Pub. Ltd.
34. JACOBSEN, C., HARTVIGSEN, K., THOMSEN, M. K., HANSEN, L. F., LUND, P., SKIBSTED, L. H., MEYER, A. S. 2001. Lipid Oxidation in Fish Oil Enriched Mayonnaise : Calcium Disodium Ethylenediaminetetraacetate , but Not Gallic Acid , Strongly Inhibited Oxidative Deterioration.

35. JEONG, S.M., KIM, S.Y., KIM, D.R., JO, S.C., NAM, K.C., AHN, D.U., ET AL., 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3389–3393.
36. KIM, T. J., SILVA, J. L., KIM, M. K., & JUNG, Y. S. 2010. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chemistry*, 118(3), 740–746.
37. KIM, T. J., SILVA, J. L., & JUNG, Y. S. 2011. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. *Food Chemistry*, 126(1), 116–120.
38. KNEZ, Ī., & BAUMAN, D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol , ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil, 71, 229–233.
39. KOSKI, A., PSOMIADOU, E., TSIMIDOU, M., HOPIA, A., KEFALAS, P., WÄHÄLÄ, K., & HEINONEN, M. 2002. Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *European Food Research and Technology*, 214(4), 294–298.
40. LAMPI, A., DIMBERG, L. H., & KAMAL-ELDIN, A. 1999. A study on the influence of fucosterol on thermal polymerisation of purified high oleic sunflower triacylglycerols, 579(July 1998), 573–579.
41. LERCKER, G., RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T., 2002. Cholesterol oxidation mechanism. In: Guardiola, F., Dutta, P.C., Codony, R., Savage, G.P. (Eds.), *Cholesterol and Phy- tosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence and Biological Effects*. AOCS Press, Champaign, IL, pp. 1–26

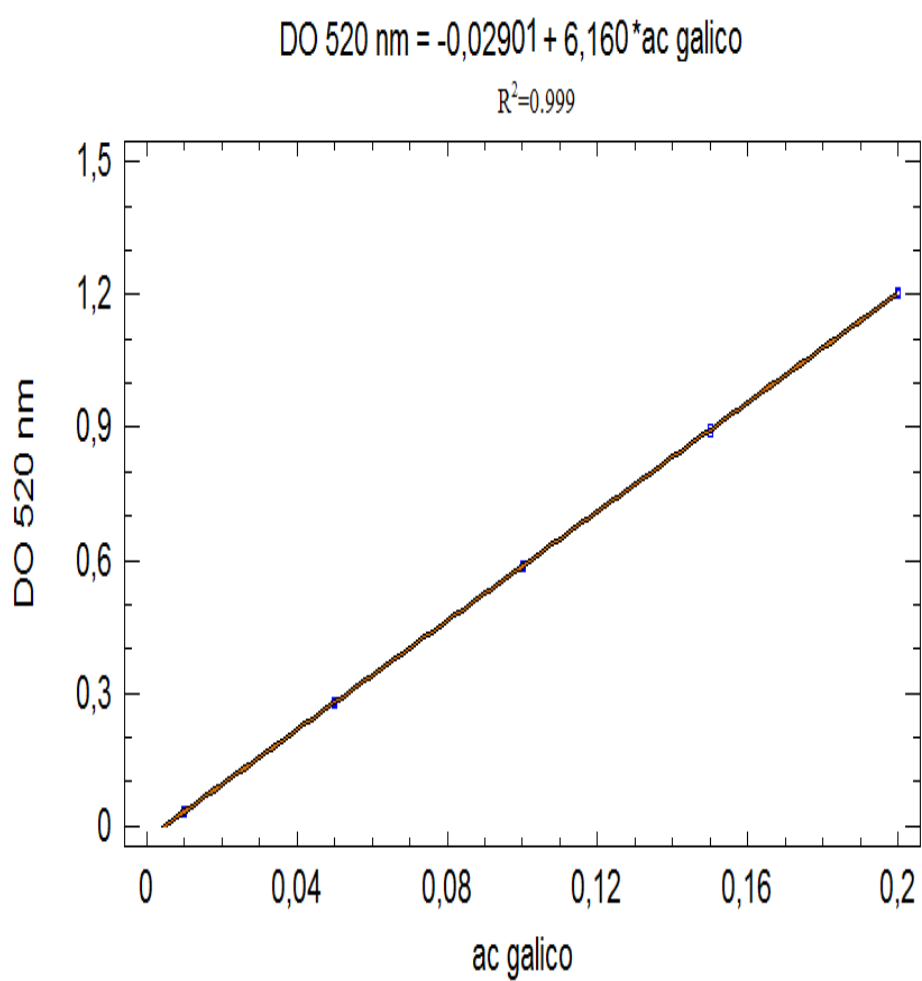
42. LAGUERRE, M., LECOMTE, J., & VILLENEUVE, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–82.
43. LEE, S., DECKER, E. A, FAUSTMAN, C., & MANCINI, R. A. 2005. The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70(4), 683–9.
44. LET, M. B., JACOBSEN, C., & MEYER, A. S. 2007. Ascorbyl palmitate, gamma-tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2369–75.
45. LIU, Q., XU, Y. K., ZHANG, P., NA, Z., TANG, T., & SHI, Y. X. 2014. Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L .) oil from Xishuangbanna (China), 65(March), 1–9.
46. MAURER, N. E., HATTA-SAKODA, B., PASCUAL-CHAGMAN, G., & RODRIGUEZ-SAONA, L. E. 2012. Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry*, 134(2), 1173–80.
47. MOHDALY, A. A. A., SMETANSKA, I., RAMADAN, M. F., SARHAN, M. A., & MAHMOUD, A. 2011. Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 952–959.
48. MUELLER-HARVEY, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 3–20.

49. NG, S.-K., JESSIE, L.-Y. L., TAN, C.-P., LONG, K., & NYAM, K.-L. 2013. Effect of Accelerated Storage on Microencapsulated Kenaf Seed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(7), 1023–1029.
50. OMAR, K. A., SHAN, L., WANG, Y. L., & WANG, X. 2010. Stabilizing flaxseed oil with individual antioxidants and their mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 1003–1011.
51. OSSIPOV, V., LOPONEN, J., OSSIPOVA, S., HAUKIOJA, E., PIHLAJA, K., 1997. Gallotannins of birch *Betula pubescens* leaves: HPLC separation and quantification. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 493–504.
52. OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, R., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619–4626.
53. PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), 4290–4302.
54. PODSEDEK, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.
55. PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. C. 1989. The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.
56. RUBILAR, M., MORALES, E., SÁEZ, R., ACEVEDO, F., PALMA, B., VILLARROEL, M., & SHENE, C. 2012. Polyphenolic fractions improve the oxidative stability of microencapsulated linseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(7), 760–771.

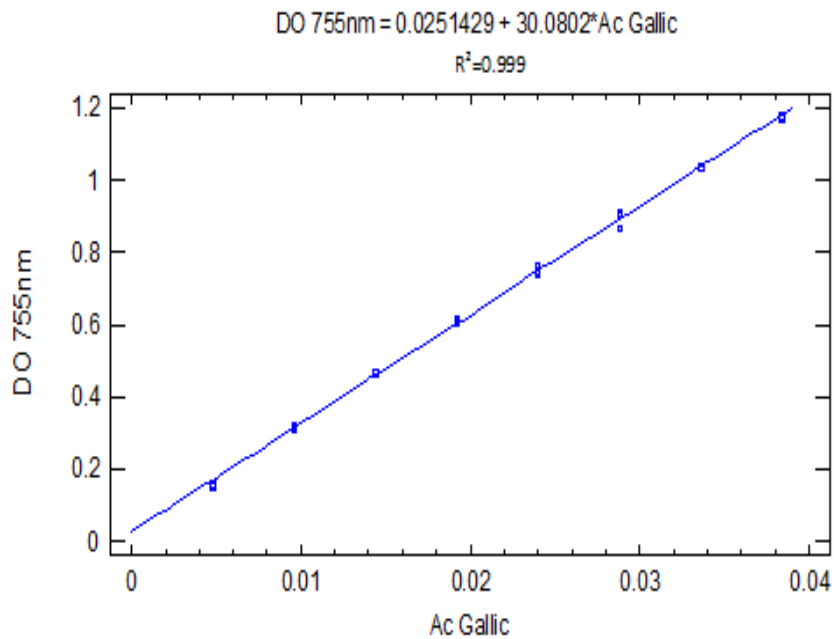
57. SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A., 1965. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
58. SULTANA, B., ANWAR, F., & PRZYBYLSKI, R. 2007. Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. *Food Chemistry*, 104(3), 997–1005.
59. THANH, T. T., VERGNES, M.-F., KALOUSTIAN, J., EL-MOSELHY, T. F., AMIOT-CARLIN, M.-J., & PORTUGAL, H. 2006. Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined by GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 220–225.
60. TIAN, F., LI, B., JI, B., YANG, J., ZHANG, G., CHEN, Y., & LUO, Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113(1), 173–179.
61. ZHANG, Y., YANG, L., ZU, Y., CHEN, X., WANG, F., & LIU, F. 2010. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662.

VIII. ANEXOS

1. Curva estándar para determinación de ácido gálico

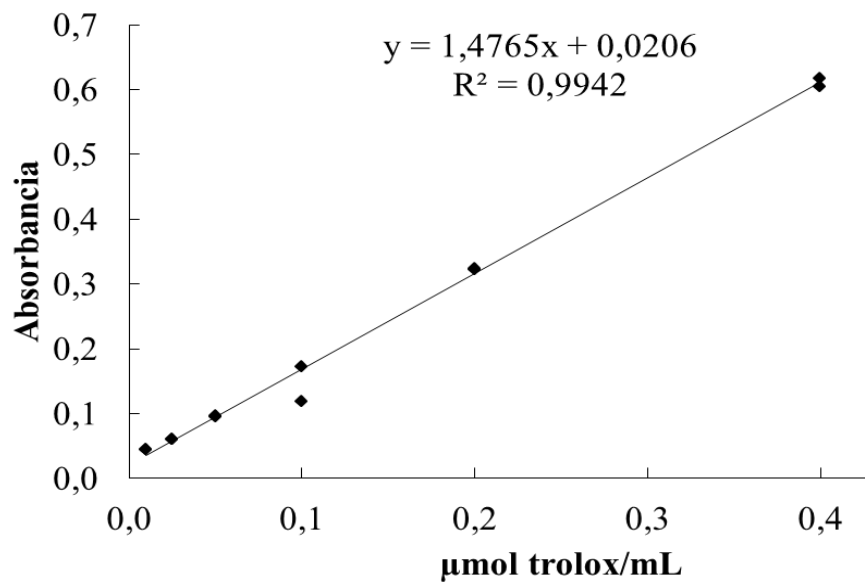


2. Curva estándar para la determinación de compuestos fenólicos

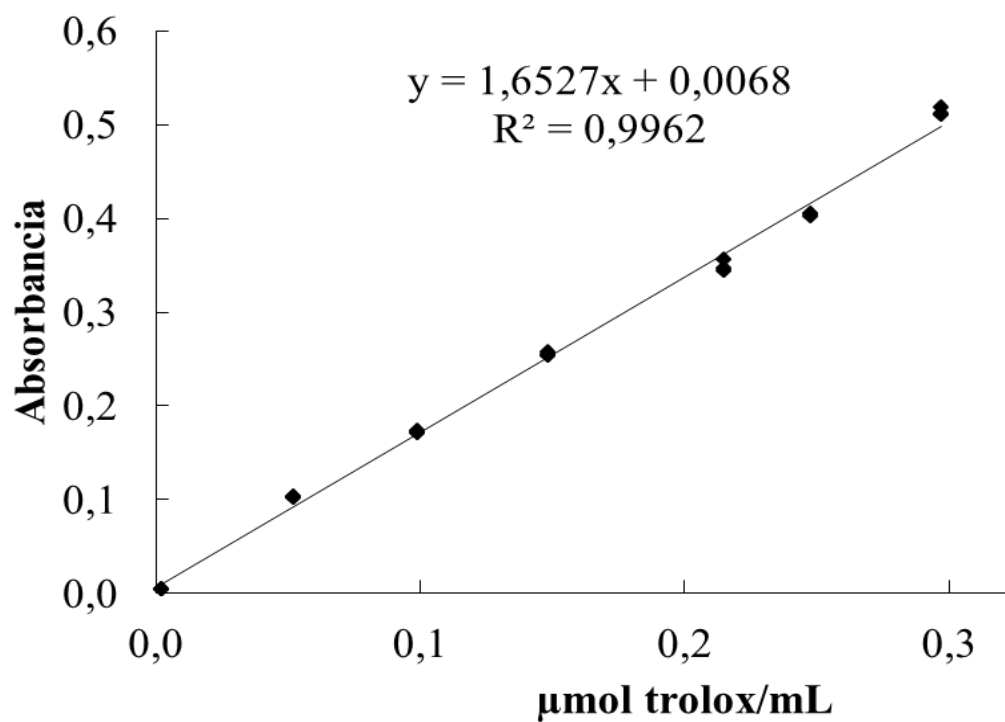


3. Curva estándar para la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*

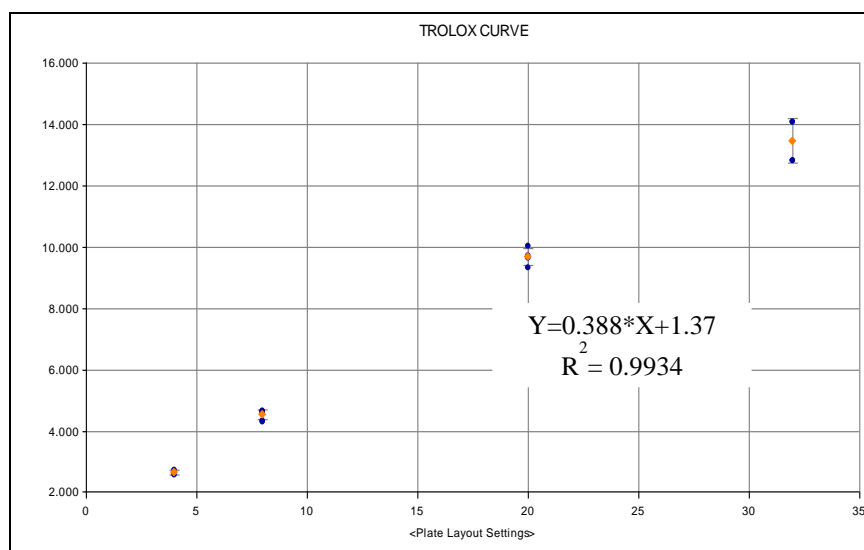
a) Método ABTS+



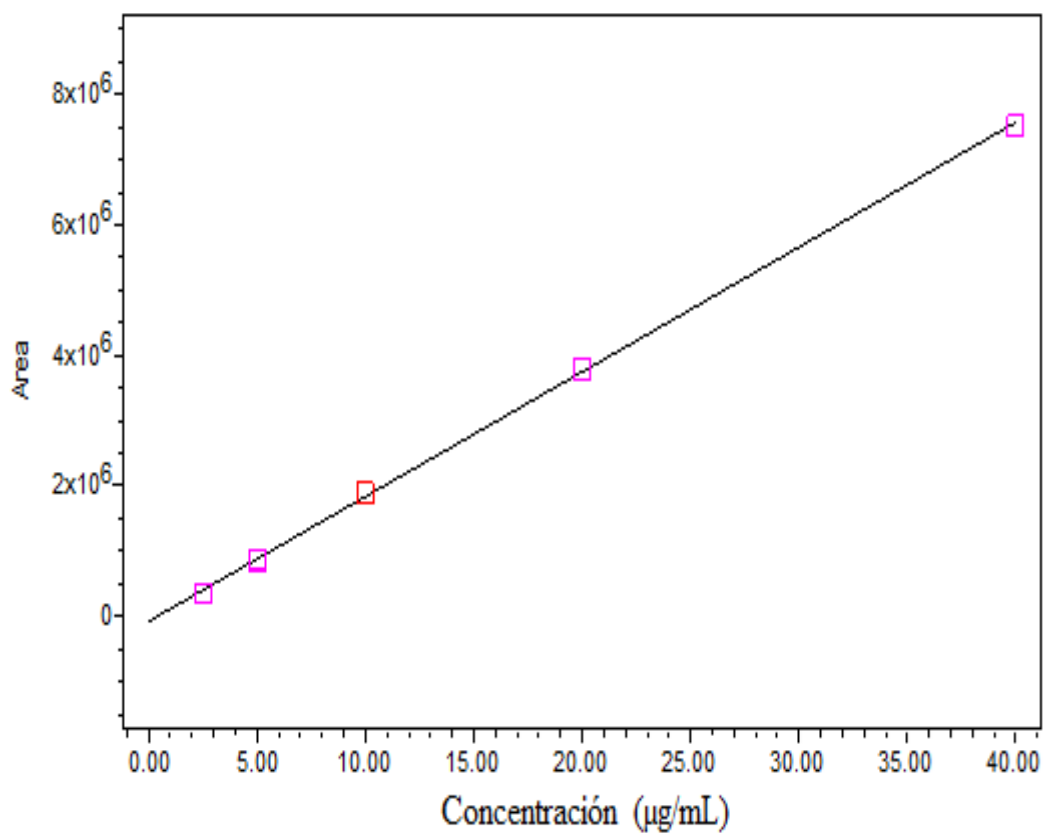
b) Método FRAP



c) Método ORAC



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



Ecuaciones empleadas:

Alfa-Tocoferol:

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

Beta-Tocoferol:

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

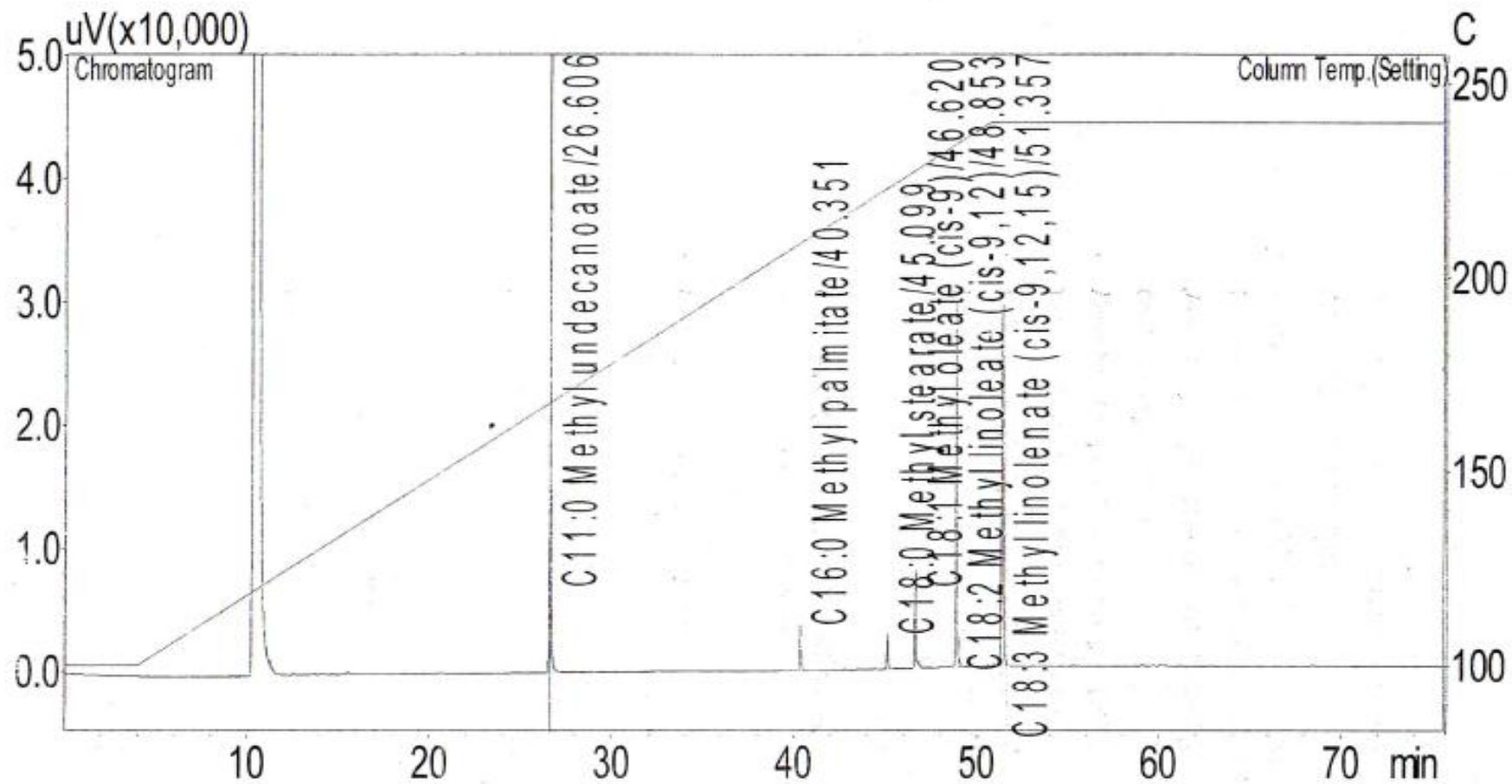
Gama-Tocoferol:

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

Delta-Tocoferol:

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

5. Cromatograma obtenidos para los estándares de ácidos grasos



6. Cromatograma correspondiente a los estándares de fitosteroles

