

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE MORINGA
(*Moringa oleífera*) CON PRENSA-EXPELLER Y DETERMINACIÓN
DE SU TIEMPO DE VIDA EN ANAQUEL”**

Presentada por:

JHOEL FERNÁNDEZ SOBRADOS

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima - Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE MORINGA (*Moringa oleífera*)
CON PRENSA-EXPELLER Y DETERMINACIÓN DE SU TIEMPO DE VIDA EN
ANAQUEL”**

Presentado por:

JHOEL FERNÁNDEZ SOBRADOS

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Mg. Sc. Walter Francisco Salas Valerio
PRESIDENTE

Dr. Luis Fernando Vargas Delgado
MIEMBRO

Dr. David Campos Gutiérrez
MIEMBRO

Mg. Sc. Gloria Jesús Pascual Chagman
ASESOR(A)

Mg. Sc. Gladys Tarazona de Rodríguez
CO-ASESOR(A)

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres, Rosa Sobrados y Metalio Fernández, por brindarme su apoyo incondicional y siempre estar para mí.

A mi hermana July, por alentarme a seguir adelante y nunca rendirme.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora, la Mg. Sc. Gloria Pascual por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto y por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

A mi co-asesora, la Mg. Sc. Gladys Tarazona por sus consejos y enseñanzas durante todo este tiempo.

Al profesor James Villar, por el asesoramiento de la parte estadística de esta investigación.

A mis amigos, por apoyarme y darme ánimos para lograr esta meta.

A Miguel Angel, por estar siempre disponible a ayudarme tanto en la parte experimental, redacción y sustentación y por el apoyo moral en los tiempos difíciles (xD).

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - INNÓVATE PERÚ (proyecto N° 226) del Concurso de Proyectos de Investigación básica y aplicada, por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	MORINGA	3
2.2	IMPORTANCIA DE LA MORINGA.....	4
2.3	ACEITE DE MORINGA	5
2.4	PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE	6
2.4.1	EXTRACCIÓN POR PENSADO	7
2.4.2	EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.....	7
2.5	APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES.....	8
2.5.1	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	9
2.6	PRINCIPALES ALTERACIONES QUE AFECTAN LAS GRASAS.....	10
2.6.1	LIPÓLISIS O ENRANCIAMIENTO HIDROLÍTICO	10
2.6.2	AUTOOXIDACIÓN O ENRANCIAMIENTO OXIDATIVO.....	11
2.7	MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LOS ACEITES	12
2.7.1	ÍNDICE DE PERÓXIDO	12
2.7.2	ÍNDICE DE P-ANISIDINA	13
2.7.3	ÍNDICE DE ACIDEZ.....	13
2.7.4	COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA (K232 Y K270)	14

2.8	PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS ACEITES VEGETALES	14
2.9	TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	16
2.9.1	ENSAYO DPPH.....	18
2.9.2	ENSAYO ABTS.....	19
2.9.3	MÉTODO ORAC.....	19
2.10	VIDA EN ANAQUEL DE ALIMENTOS	20
2.10.1	DETERIORO RELACIONADO CON LA TEMPERATURA	21
2.10.2	LA ECUACION DE ARRHENIUS	25
2.10.3	OTROS MODELOS.....	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	28
3.2	MATERIA PRIMA E INSUMOS	28
3.3	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	29
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	31
3.5	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	41
3.6	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA DEL ACEITE DE MORINGA	45
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE MORINGA.....	48
4.2	RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE MORINGA.....	49

4.3	CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE DE MORINGA.....	51
4.4	CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE MORINGA	55
4.5	CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE MORINGA.....	58
4.6	DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE MORINGA.....	65
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	83
V.	CONCLUSIONES	84
VI.	RECOMENDACIONES	86
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
VIII.	ANEXOS	102

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Características fisicoquímicas del aceite de <i>Moringa oleífera</i>	5
Cuadro 2: Contenido de ácidos grasos en la semilla de <i>Moringa oleífera</i>	6
Cuadro 3: Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT.....	18
Cuadro 4: Análisis proximal de las semillas de <i>Moringa oleífera</i> (% base seca).....	48
Cuadro 5: Rendimiento de la extracción del aceite de moringa con prensa-expeller.....	49
Cuadro 6: Características fisicoquímicas del aceite de moringa.....	52
Cuadro 7: Contenido de ácidos grasos del aceite de moringa.....	56
Cuadro 8: Resumen del contenido de ácidos grasos del aceite de moringa.....	57
Cuadro 9: Contenido de polifenoles totales del aceite de moringa.....	59
Cuadro 10: Contenido de tocoferoles del aceite de moringa.....	61
Cuadro 11: Capacidad antioxidante por el método de ABTS del aceite de moringa.....	63
Cuadro 12: Variación del índice de peróxido en el tiempo por temperatura de almacenamiento.....	67
Cuadro 13: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} en el tiempo por temperatura de almacenamiento.....	70
Cuadro 14: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} en el tiempo por temperatura de almacenamiento.....	71
Cuadro 15: Variación de la acidez libre en el tiempo por temperatura de almacenamiento.....	74
Cuadro 16: Constantes experimentales de la velocidad de reacción k en función de la temperatura.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto de la molienda y del tratamiento enzimático sobre la estructura de las semillas oleaginosas.	9
Figura 2: Estados de la oxidación lipídico.	14
Figura 3: Reacción del mecanismo por transferencia de un hidrógeno.....	17
Figura 4: Cambio de Calidad frente al tiempo mostrado por una reacción de Orden Cero. 23	
Figura 5: Cambio de Calidad frente al tiempo mostrado por una reacción de Primer Orden.	25
Figura 6: Flujo de operaciones para la obtención de aceite con previo tratamiento enzimático a partir de semillas de moringa.....	44
Figura 7: Variación del índice de peróxido en función al tiempo de almacenamiento	67
Figura 8: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} en función al tiempo de almacenamiento.	71
Figura 9: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} en función al tiempo de almacenamiento.	72
Figura 10: Variación del porcentaje de ácidos grasos libres en función al tiempo de almacenamiento.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	102
ANEXO 2: CURVA ESTÁNDAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE-ABTS	103
ANEXO 3: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA EL ÍNDICE DE PERÓXIDO	104
ANEXO 4: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL ÍNDICE DE PERÓXIDO	104
ANEXO 5: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{232}	105
ANEXO 6: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{232}	105
ANEXO 7: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270}	106
ANEXO 8: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270}	106
ANEXO 9: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA LA ACIDEZ LIBRE.....	107
ANEXO 10: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA LA ACIDEZ LIBRE.....	107
ANEXO 11: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE MORINGA	108
ANEXO 12: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE MORINGA EXTRAÍDO CON PREVIO TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	109
ANEXO 13: CROMATOGRAMA DEL CONTENIDO DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE MORINGA	110
ANEXO 14: CROMATOGRAMA DEL CONTENIDO DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE MORINGA EXTRAÍDO CON PREVIO TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	111
ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL RENDIMIENTO CON PRENSA-EXPPELLER	112
ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LA ACIDEZ LIBRE.....	112

ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	112
ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL ÍNDICE DE PERÓXIDO	113
ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL ÍNDICE DE P-ANISIDINA	113
ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{232}	113
ANEXO 21: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270}	114
ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS	114
ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES	117
ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL CONTENIDO DE TOCOFEROLES.....	117
ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE-ABTS	118
ANEXO 26: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ÍNDICE DE PERÓXIDO	119
ANEXO 27: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{232}	120
ANEXO 28: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270}	121
ANEXO 29: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE PROMEDIOS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA ACIDEZ LIBRE	122

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la eficacia del uso de una enzima (hemicelulasa al 2%, materia prima:agua de 3:1 y tiempo de hidrólisis de 24 horas) para incrementar el rendimiento de la extracción del aceite de moringa con prensa-expeller y los cambios en las características fisicoquímicas y antioxidantes del aceite, además de estimar la vida útil del aceite de moringa sin tratamiento enzimático por métodos acelerados. Para la estimación de vida útil, muestras de aceite crudo de moringa fueron almacenadas a temperaturas de 40, 50 y 60 °C y se realizó la medición del índice de peróxido, grado de acidez y coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} y k_{270} . Se registró la evolución de los cuatro parámetros de calidad cada cinco días durante 40 días y se tomó como referencia las características del aceite de oliva virgen mencionadas por el Codex Alimentarius. Se obtuvo un mayor rendimiento en la extracción del aceite de moringa realizada con previo tratamiento enzimático y se encontró diferencias significativas en el índice de peróxido y grado de acidez. Se determinó que el ácido oleico se encuentra en mayor proporción en el aceite de moringa (72%) y α -tocoferol el isómero mayoritario. Además, se determinó que el aceite de moringa extraído con previo tratamiento enzimático presentó un mayor contenido de polifenoles totales con respecto al aceite de moringa control; sin embargo, no se encontró diferencias significativas en la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS. Se estimó que el tiempo de vida del aceite de moringa a la temperatura de 20 °C fue de 280 días para el índice de peróxido, 214 días para el coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} , 204 días para el coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} y 222 días para el grado de acidez.

Palabras clave: *Moringa oleífera*, oxidación lipídica, ácidos grasos, polifenoles, tocoferoles, vida útil.

ABSTRACT

In the present study, the efficiency of the use of an enzyme (2% hemicellulase, raw material: water of 3: 1 and hydrolysis time of 24 hours) was evaluated to increase the yield of the moringa oil extraction with press expeller and the changes in the physicochemical and antioxidant characteristics of the oil, besides estimating the shelf life of the moringa oil without enzymatic treatment by accelerated methods. For the estimation of shelf life, samples of raw moringa oil were stored at temperatures of 40, 50 and 60 °C and the evaluation was made based on the peroxide index, degree of acidity and coefficient of extinction k₂₃₂ and k₂₇₀. The evolution of the four quality parameters was recorded every five days for a total time of 40 days and the characteristics of the virgin olive oil mentioned by the Codex Alimentarius were taken as reference. It was obtained a greater yield in the extraction of the moringa oil with previous enzymatic treatment and was found significant differences in the peroxide index and degree of acidity. It was determined that oleic acid was found to be higher in moringa oil (72%) and α -tocopherol being the greater isomer. In addition, it was determined that the moringa oil extracted with previous enzymatic treatment had a higher content of total polyphenols compared to the control moringa oil; however, no significant differences were found in the antioxidant capacity determined by The ABTS assay. The shelf life of the moringa oil was estimated to be 280 days for the peroxide index, 214 days for the extinction coefficient k₂₃₂, 204 days for the extinction coefficient k₂₇₀ and 222 days for the degree of acidity.

Keywords: *Moringa oleifera*, lipid oxidation, fatty acids, polyphenols, tocopherols, shelf life.

I. INTRODUCCIÓN

En el año 2010, el Ministerio de Agricultura (MINAG) y el Programa Sembrando, llevaron a cabo en Ica el lanzamiento de una campaña de cultivo de moringa, planta con enorme potencial nutritivo originaria de la India y África, conocida como el “El árbol de la Vida”, que entre todas sus propiedades puede ser usada para combatir la desnutrición infantil.

La planta moringa es un producto alimenticio importante constituido con propiedades de alto valor nutritivo. Las diferentes partes de esta planta: raíz, corteza, goma, hoja, fruto (vainas), flores, semilla y aceite de la semilla han sido usado para tratar a diferentes enfermedades en las prácticas de la medicina nativa del sur de Asia (Latif y Anwar, 2008). Esta planta es utilizada en el tratamiento de inflamaciones, enfermedades infectocontagiosas, gastrointestinal, hematológico, cardiovascular y hepatorenal, siendo correlacionada estas propiedades con la posesión de actividad antioxidante (Sánchez *et al.*, 2015).

Los principales aportes de la moringa en términos de macro y micronutrientes, se encuentran en las hojas, que al igual que las vainas frescas y los frutos presentan un valor considerable de vitamina A en forma de β -carotenos, minerales (hierro, potasio y calcio) y vitamina C. Además, las hojas secas y molidas contienen hasta un 30 por ciento de proteínas en base seca, razón por la que se conoce que las hojas presentan mayores fuentes de nutrientes que las vainas. Las semillas pueden contener hasta un 30-42 por ciento de aceite, y además presenta entre 35-40 por ciento de proteínas (Alfaro; citado por Guevara *et al.*, 2012).

Uno de los principales productos obtenidos a partir de las semillas de moringa es el aceite, el cual es rico en ácido oleico y en tocoferoles (Anwar *et al.*; citado por Martín *et al.*, 2013). Excepto por su menor contenido de ácido linoleico, dicho aceite presenta composición química y propiedades físicas que lo asemejan al de oliva. El aceite de moringa también puede ser empleado en la mejora de la estabilidad oxidativa de otros aceites (Martín *et al.*, 2013).

Por otro lado, estudios han demostrado que el empleo de enzimas como pretratamiento previo a la extracción ha surgido como un medio eficaz para mejorar el rendimiento de aceite en técnicas de extracción por prensado (Rosenthal *et al.*; citado por Latif, 2009). Tomando en cuenta que el aceite de moringa aporta muchos beneficios para la salud por su alto nivel de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico) y antioxidantes naturales, es que se busca determinar la influencia del tratamiento enzimático en el rendimiento y en las características que presenta este aceite.

Debido a las múltiples propiedades que presenta el aceite de moringa y la necesidad de fomentar su consumo, uno de los requisitos para su comercialización es determinar el tiempo de vida de este aceite. Según Hernández y Sastre (1999), los productos industrializados necesitan claramente declarar su vida en anaquel, es decir, el tiempo en el cual sus características se mantienen en niveles aceptables; esto debido a demandas de los consumidores y asuntos legales. Es por ello la necesidad de conocer el tiempo de vida del aceite de moringa.

El objetivo de esta investigación consistió en evaluar el efecto de un tratamiento enzimático sobre el rendimiento, características fisicoquímicas, contenido de compuestos bioactivos (polifenoles y tocoferoles) y capacidad antioxidante del aceite de *Moringa oleífera*. Además, se buscó estimar el tiempo de vida en anaquel del aceite de moringa sin tratamiento enzimático mediante el método de pruebas aceleradas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 MORINGA

Moringa es un género de plantas con numerosas especies distribuidas por Zonas Áridas y Semiáridas de Asia, África y Madagascar. La especie más conocida es *Moringa oleífera* y su principal utilidad es de complemento alimenticio. (Magaña, 2012).

Moringa oleífera, árbol perteneciente a la familia Moringaceae, es nativo de las estribaciones meridionales del Himalaya y en la actualidad se cultiva prácticamente en todas las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo. Puede crecer en condiciones de escasez de agua, pero su cultivo intensivo, con irrigación y fertilización, aumenta los rendimientos de biomasa hasta superar las 100 toneladas por hectárea (Makkar y Becker; citado por Martín *et al.*, 2013).

Según Balbir (2005), el árbol de moringa se encuentra ubicado taxonómicamente de la siguiente forma:

División : *Magnoliophyta*
Clase : *Magnoliopsida*
Subclase : *Dilleniidae*
Orden : *Capparidales*
Familia : *Moringaceae*
Género : *Moringácea*
Especie : *Moringa oleífera*

La *Moringa oleífera* es un árbol de crecimiento muy rápido, en el primer año se puede desarrollar varios metros, hasta tres o incluso cinco en condiciones ideales de cultivo. No alcanza gran altura, hasta unos 10-12 metros. La copa es poco densa, de forma abierta, como

una sombrilla (tipo acacia), el tronco puede ser único o múltiple. El sistema radicular es muy poderoso. Las flores son de color crema y aparecen principalmente en las épocas de sequía, cuando el árbol suele perder las hojas. El fruto es una vaina, parecida a una legumbre, pero de sección triangular, de unos 30-45 cm de longitud. Las semillas son negruzcas, redondeadas y con un tejido a modo de alas (Fuglie, citado por Magaña, 2012).

2.2 IMPORTANCIA DE LA MORINGA

La Moringa ofrece una amplia variedad de productos alimenticios, ya que todas las partes de la planta son comestibles: las vainas verdes (parecidas a las legumbres), las hojas, las flores, las semillas, y las raíces son muy nutritivas y se pueden usar para el consumo humano por su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales (Berger *et al.*; citado por Magaña, 2012).

Las hojas tienen cualidades nutritivas sobresalientes, que están entre las mejores de todos los vegetales perennes. El contenido de proteína es del 27 por ciento; además tienen cantidades significativas de calcio, hierro y fósforo, así como vitamina A y C. Este valor nutricional es particularmente importante en áreas donde la seguridad alimentaria se puede ver amenazada por períodos de sequía, pues las hojas de moringa pueden cosecharse durante las épocas secas, cuando no hay otros vegetales frescos disponibles (Martín *et al.*, 2013).

Las semillas se utilizan en la alimentación, la medicina, el tratamiento de aguas y como fertilizantes (Foidl *et al.*; citado por Martín *et al.*, 2013). La semilla contiene un 40 por ciento de aceite, que es de alta calidad, poco viscoso y dulce, con un 73 por ciento de ácido oleico, similar al aceite de oliva.

El aceite se usa en la industria de perfumería y la de cosméticos como lubricante, en la alimentación humana y en la producción de biodiesel. Las cascarillas de las semillas sirven de materia prima para la producción de carbón activado y de intercambiadores aniónicos. La planta también se emplea como cerca viva o cortina rompevientos, mientras que la biomasa lignocelulósica del tronco y de las ramas puede ser utilizada como material de construcción y para producir pulpa celulósica y etanol (Fahey; citado por Martín *et al.*, 2013).

Las diferentes partes de *Moringa oleifera* contienen más de 40 compuestos con actividad antioxidante. Entre los compuestos con este potencial, ya sea por actividad de captación de radicales libres o por capacidad de formación de quelatos de iones metálicos identificados en las semillas de moringa, se encuentran compuestos fenólicos como el kaempferol y los ácidos gálico y elágico (Singh *et al.*; citado por Martín *et al.*, 2013).

2.3 ACEITE DE MORINGA

Las semillas de moringa contienen entre 19 y 47 por ciento de aceite. El aceite de moringa es rico en ácido oleico y en tocoferoles (Anwar *et al.*, citado por Martín *et al.*, 2013). Excepto por su menor contenido de ácido linoleico, dicho aceite presenta composición química y propiedades físicas que lo asemejan al de oliva (Martín *et al.*, 2013). En el Cuadro 1 se muestran algunas características del aceite crudo de las semillas de Moringa.

Cuadro 1: Características fisicoquímicas del aceite de *Moringa oleifera*

CONSTITUYENTE	CONTENIDO
Índice de yodo (g de I/100 g de aceite)	68.63±1.00
Índice de refracción (40 °C)	1.4571±0.01
Densidad (g/cm ³) 24 °C	0.9032±0.03
Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	181.4±2.60
Materia insaponificable (%)	0.74±0.08
Acidez (% ácido oleico)	0.81±0.05

FUENTE: Anwar y Rashid (2007)

También puede ser empleado en el mejoramiento de la estabilidad oxidativa de otros aceites. Durante la conservación, cocción y fritura de los aceites vegetales tradicionales ocurre el deterioro de sus cualidades nutritivas debido a reacciones colaterales de degradación del ácido linoleico (Warner y Knowlton, citado por Martín *et al.*, 2013). El ácido oleico, el cual es más resistente a la oxidación que el linoleico, está contenido en grandes cantidades en el aceite de *M. oleifera* por eso, la adición de este a otros aceites permite obtener mezclas con

propiedades mejoradas para el uso culinario sin que se afecten las propiedades nutricionales (Martín *et al.*, 2013).

De acuerdo con Ortiz *et al.* (2012), el aceite de Ben es más estable que el aceite de canola, el aceite de soja y el aceite de utilizado en la fritura. La mezcla de aceite de Ben con aceite de girasol y aceite de soja mejora la estabilidad oxidativa de la mezcla.

Si se compara el aceite de moringa con otros aceites vegetales, su contenido en aceite es similar a la semilla de girasol (22-37.5%) y mayor al de la soja (18-22.63%) (Rashid *et al.*; citado por Arias, 2014).

Tras el proceso de prensado de las semillas para la extracción del aceite, se obtiene una torta que puede tener varias aplicaciones: fertilizante para el suelo por su alto contenido en nitrógeno, alimento para animales por su alto contenido en proteína bruta (casi el 60%), o para el tratamiento de la turbidez del agua en los países en vías de desarrollo gracias al polielectrolito catiónico presente en la torta (Pérez *et al.*; citado por Arias, 2014).

En el Cuadro 2 se presenta el contenido de ácidos grasos en la semilla de *Moringa oleífera*.

Cuadro 2: Contenido de ácidos grasos en la semilla de *Moringa oleífera*

ÁCIDO GRASO	CONTENIDO (%)
Ácido oleico	68.9
Ácido linoléico	3.8
Ácido mirística	1.5
Ácido palmítico	3.6
Ácido esteárico	10.8
Ácido behénico	6.3
Ácido lignocérico	0.13

FUENTE: Alfaro, citado por Martín *et al.* (2013)

2.4 PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

El proceso de extracción de aceite a partir de semillas, depende del tipo y estructura de las mismas. Cuando presentan alto contenido de aceite (>20% base seca) el proceso a utilizar es la aplicación de fuerza mecánica por prensado con el fin de romper las paredes celulares del material vegetal, obteniéndose el aceite crudo y la torta de prensado, la cual retiene aceite residual. Con semillas que poseen bajo contenido graso (<20% base seca) se emplea extracción con disolventes orgánicos como el hexano, presentando ventajas de ser operaciones simples con bajos costos de operación; sin embargo, los productos son relativamente de bajo valor y necesitan ser refinados (Grasso, 2013).

Históricamente, los tres procesos más comunes para recuperar el aceite a partir de semillas oleaginosas son el prensado hidráulico, el prensado expeller y la extracción con solventes (Grasso, 2013).

2.4.1 EXTRACCIÓN POR PRENSADO

Se aplica a frutos y semillas oleaginosas, complementando generalmente el prensado con la extracción por solventes. Previamente, las semillas deben pasar por las etapas de preparación de limpieza y descascarillado, una vez que las semillas han sido molidas de tal forma de desgarrar las células para dejar en libertad el aceite contenido en ellas, se las somete al prensado (Contreras, 2011).

El material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas tipo batch o en forma continua, dentro de éstos se tienen los equipos: Tornillo sin fin de alta o de baja presión, extractor *expeller*, extractor centrífugo, extractor *decanter* y rodillos de prensa (Sánchez, 2006). Los rendimientos de la extracción dependerán de la cantidad de presión aplicada, del tiempo que se deje drenar el aceite, la temperatura y la viscosidad (Avellaneda, 2010).

2.4.2 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

La extracción por solvente, principalmente hexano, es uno de los métodos más tradicionales para la obtención de aceites de semillas oleaginosas. El principio de extracción por solvente es simple y se basa en el hecho de que un componente (soluto) se distribuye entre dos fases

según la relación de equilibrio determinada por la naturaleza del componente y las dos fases (Lilian, 2010).

En el sistema de extracción por disolventes, se puede partir de las semillas oleaginosas o de la torta proteínica obtenida por el sistema de extracción mecánica, ya que aún contiene un cierto porcentaje de aceite que se puede reducir al mínimo. Si partimos directamente de las semillas, estas deben ser limpiadas, descascarilladas y trituradas en unos rodillos, pasando entonces a un acondicionador para homogeneizar, luego pasa a un molino, con lo que se divide finamente, permitiendo así una mejor extracción del aceite en el extractor, donde un disolvente de las materias grasas arrastra a estas, siendo separadas en el evaporador a la vez que se recupera el disolvente y vuelve al extractor (Navas, 2010).

2.5 APLICACIÓN DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES

La extracción de aceites vegetales provenientes de semillas oleaginosas se ha caracterizado principalmente por incluir procesos térmicos y mecánicos que facilitan la extracción del aceite mediante la degradación de las paredes celulares de las semillas; sin embargo, los procesos de extracción de aceite pueden verse favorecidos por la hidrólisis parcial de las paredes de las células del cotiledón haciendo permeable su estructura y facilitando la extracción del aceite mediante el uso de las enzimas hidrolíticas apropiadas como celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Durán, 2010).

El rol de la mayoría de las enzimas hidrolíticas como las celulasas, hemicelulasas y pectinasas en estos procesos es romper la estructura de las membranas celulares del cotiledón. La Figura 1 muestra el efecto del tratamiento enzimático sobre semillas previamente molidas. Puede verse a partir de la Figura 1 que la acción enzimática hace a la estructura más permeable; la extensión de este efecto depende del tamaño de partícula. Las enzimas proteolíticas principalmente hidrolizan las proteínas de las membranas celulares así como también las del citoplasma (Rosenthal y Col; citado por Grasso, 2013).

Considerando la especificidad de las carbohidratasas, una elección razonable de enzimas para una semilla o un fruto dado sólo puede hacerse luego de comprender el arreglo complejo de los polisacáridos en las paredes celulares. Las paredes celulares primarias de la mayoría

de las plantas superiores poseen una estructura común que consiste en fibras de celulosa enlazadas a cadenas de hemicelulosa (Grasso, 2013).

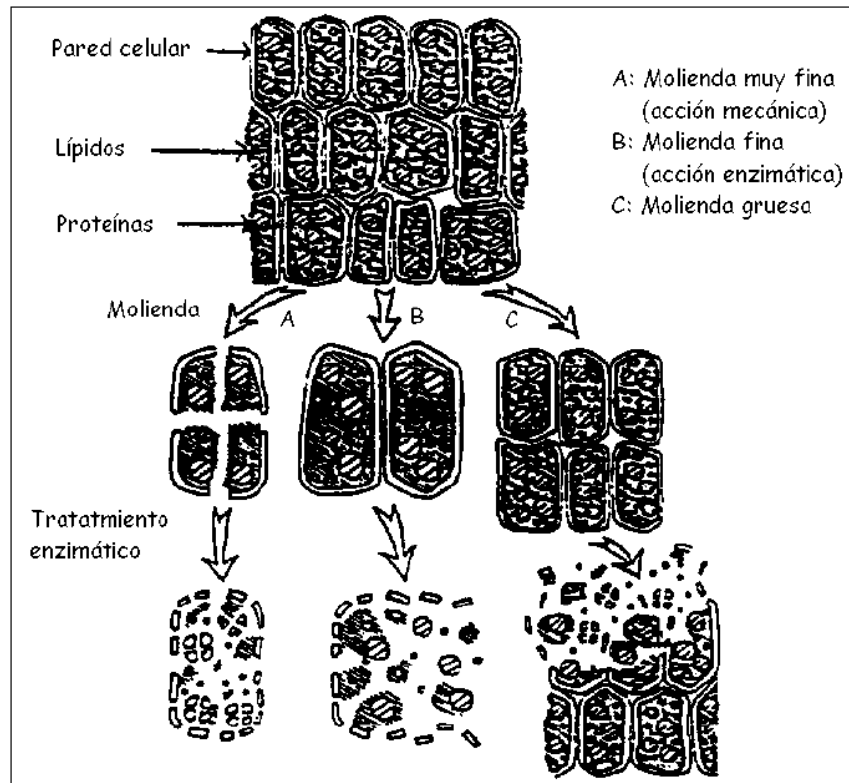


Figura 1: Efecto de la molienda y del tratamiento enzimático sobre la estructura de las semillas oleaginosas.

FUENTE: Grasso (2013).

2.5.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática de una enzima se ve afectada por factores ambientales generales, como la temperatura y el pH. También puede verse afectada por productos químicos que influyen específicamente en la enzima (Campbell y Reece, 2007).

a. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Cada enzima opera mejor en algunas condiciones que en otras, porque estas condiciones óptimas favorecen la estructura más activa para la molécula de enzima. Hasta cierto punto, la velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura, en parte porque los sustratos colisionan con los sitios activos con mayor frecuencia cuando las

moléculas se mueven con rapidez. Sin embargo, por encima de cierta temperatura, la velocidad de la reacción enzimática cae abruptamente. La agitación térmica de la molécula de enzima rompe los puentes de hidrogeno, los enlaces iónicos y otras interacciones débiles que estabilizan la estructura activa, la molécula proteica finalmente se desnaturaliza. Cada enzima tiene una temperatura óptima a la cual la velocidad de reacción es máxima (Campbell y Reece, 2007).

b. EFECTO DEL PH

La mayoría de las enzimas posee un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH, la actividad disminuye. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento acido-base de la enzima y del sustrato, así como de otros muchos factores que son por lo general difíciles de analizar cuantitativamente (Koolman y Rohm, 2004).

2.6 PRINCIPALES ALTERACIONES QUE AFECTAN LAS GRASAS

La estabilidad oxidativa es un indicador importante en el desempeño y la vida de anaquel de la grasa. Depende de la composición de la muestra y de las condiciones a las que está sujeta (Smith *et al.*, 2006). La exposición al aire libre, a altas temperaturas, a la luz, a trazas de metales (hierro y cobre) y a la humedad refuerzan la oxidación. Igualmente, la composición de la grasa: contenido de ácidos grasos insaturados, número y posición de los dobles enlaces, tipo de isomería (*cis*- y *trans*-) y el contenido de antioxidantes influyen en el proceso de oxidación (Osborn y Akoh, 2003).

El deterioro de los lípidos se relaciona en general con el término “rancidez” dándose principalmente dos reacciones: lipólisis o rancidez hidrolítica y autooxidación o rancidez oxidativa (Badui, 1996).

2.6.1 LIPÓLISIS O ENRANCIAMIENTO HIDROLÍTICO

Este tipo de enranciamiento ocurre generalmente, en presencia de calor y humedad catalizado por enzimas lipolíticas llamadas lipasas. La hidrólisis de los triglicéridos deja en libertad glicerol, ácidos grasos libres, monoacilglicéridos y diacilglicéridos. Las lipasas

actúan en las interfaces agua/aceite o grasa y por tanto, su accionar hace que se eleve la acidez libre de los mismos (Kairuz, 2002).

En el caso de algunos aceites vegetales, los ácidos grasos liberados por las lipasas son de más de 14 átomos de carbono, poco volátiles y por tanto no se perciben por el olfato; su presencia sólo se puede advertir mediante la determinación del índice de acidez y de otras características (Baduí, 1996). Sin embargo, los tratamientos térmicos que se aplican a los aceites y grasas comerciales durante el procesamiento destruyen las lipasas, por lo cual este tipo de rancidez se presenta más frecuentemente cuando se utilizan productos que no han sido procesados a temperaturas suficientemente altas para destruir estas enzimas (Kairuz, 2002).

A diferencia de otras reacciones enzimáticas, la lipólisis se puede efectuar en condiciones de actividad acuosa muy baja, debido a que, sí los triglicéridos se encuentran en estado líquido, tienen una gran movilidad y pueden favorecer el contacto con la lipasa y provocar la reacción (Kairuz, 2002).

2.6.2 AUTOOXIDACIÓN O ENRANCIAMIENTO OXIDATIVO

Este tipo de enranciamiento se debe a la oxidación atmosférica de la grasa, razón por la cual es conocido también como autooxidación, por ser un mecanismo que genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran la reacción (Baduí, 1996).

La acción del oxígeno atmosférico, sobre las cadenas alifáticas poliinsaturadas de los ácidos grasos, da lugar al sabor y olor típicos, fuertes y desagradables de las grasas oxidadas. Sin embargo, existen enzimas como las lipoxigenasas y ciclooxigenasas o las hidroperóxidasas, enol isomerasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, entre otras, que son responsables de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, siendo la lipoxigenasa la enzima clave de todo el proceso (Zamora *et al.*, 1991).

La autooxidación es la causante de la mayor parte de los problemas de deterioro de los productos grasos y generalmente envuelve un mecanismo en cadena de radical libre. Este El mecanismo comprende tres fases (Daniels *et al.*, 2006):

- Iniciación o de formación de radicales libres (hidroperóxidos).
- Propagación o de reacción de los radicales libres entre sí
- Terminación o de constitución de productos no radicales (alcoholes, compuestos carbonílicos).

2.7 METODOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LOS ACEITES

La industria de alimentos ha usado una serie de métodos para analizar diversos intermedios o productos de la oxidación; estos varían desde las evaluaciones sensoriales sencillas, que son poco precisas y muy subjetivas, hasta algunos análisis químicos y físicos que requieren de instrumentos complejos, más reproducibles y sensibles que cuantifican objetivamente la intensidad de la oxidación (Castillo, 2007).

A continuación se hará una breve descripción de cada uno de los métodos más utilizados por la industria de alimentos, los cuales miden la estabilidad oxidativa de las grasas y los aceites.

2.7.1 ÍNDICE DE PERÓXIDO

Es el método clásico para medir la oxidación de grasas y aceite, con él se mide la concentración de los intermedios inestables, formados en la primera fase del proceso de oxidación que posteriormente se descomponen para dar los compuestos secundarios de oxidación (Castillo, 2007). El Índice de Peróxidos se expresa como los miliequivalentes de peróxidos presentes en 1 kg de aceite o grasa, y brinda información sobre el grado de oxidación de un aceite (Zumbado, 2002).

Al principio de la oxidación de las grasas es posible que, en su mayoría, el producto de la reacción no sea más que hidroperóxido. Al aumentar la cantidad de peróxidos y aparecer el olor y el sabor característicos de la rancidez, se demuestra la presencia de otros productos resultantes de la descomposición de los hidroperóxidos (Zumbado, 2002).

2.7.2 ÍNDICE DE P-ANISIDINA (AV)

Es una estimación de los productos secundarios de oxidación (Guillén y Nerea, 2002). Se define, por convención, como 100 veces la absorbancia medida a 350 nm en una celda de un cm de espesor, de una solución que contiene 1 g de aceite en 100 mL de una mezcla de solvente y reactivo. La prueba del índice de p-anisidina es particularmente útil para aceites con bajos índices de peróxidos.

El principio de éste método radica en la reacción de condensación entre los dienales conjugados o 2-alquenes de la muestra y el reactivo de p-anisidina (p metoxianilina) en solución de iso-octano seguido por determinación espectrofotométrica a 350 nm (Miller, 2001). La intensidad del color de los productos amarillentos formados depende no solo de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes sino también de su estructura: un doble enlace en la cadena carbona, conjugado con el doble enlace del carbonilo, aumenta la absorbancia molar (Grompone, 1991).

2.7.3 ÍNDICE DE ACIDEZ

En general el índice de acidez es una medida de la cantidad de cadenas de ácido graso que han sido hidrolizadas desde la estructura básica del glicerol, representa el número de KOH necesarios para saponificar los ácidos grasos libres de una grasa y se expresa generalmente como porcentaje de ácidos grasos calculados en términos del ácido oleico (Badui, 1996).

La medida de los ácidos grasos libres permite evaluar el estado general de enranciamiento de un alimento ya que usualmente el enranciamiento hidrolítico acompaña el enranciamiento oxidativo (Kairuz, 2002). Los índices descritos anteriormente, pueden estar relacionados con los tres estados de oxidación como se muestra en la Figura 2.

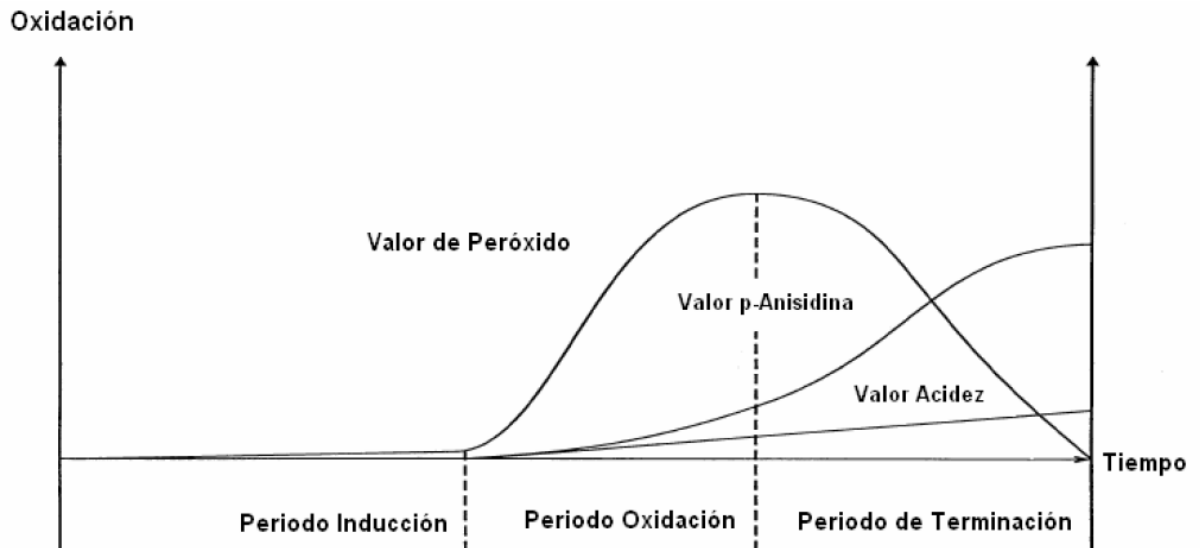


Figura 2: Estados de la oxidación lipídico.

FUENTE: Grompone (2005).

2.7.4 COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA (K₂₃₂ Y K₂₇₀)

Durante la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados se forman hidroperóxidos que en su estructura contienen dobles enlaces conjugados los cuales absorben radiación en torno a una longitud de onda de 232 nm. Estos compuestos evolucionan con el tiempo dando lugar a otros como las diacetonas o, en el caso de los hidroperóxidos de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, a sistemas con tres dobles enlaces conjugados. Estos productos secundarios, procedentes de la degradación de los hidroperóxidos, tienen la característica de absorber radiación UV entorno a los 270 nm (Navas, 2010). Por tanto, La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce trienos y dienos conjugados que están acompañados por un incremento en la absorción ultravioleta a 232 y 270 nm, respectivamente (Miller, 2001).

2.8 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS ACEITES VEGETALES

La actividad antioxidante de los tocoferoles, polifenoles y otros compuestos de los aceites vegetales, presenta un creciente interés desde que fueron relacionados con su carácter protector frente a enfermedades degenerativas crónicas como enfermedades coronarias, complicaciones cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y estrés oxidativo (Varela; citado

por Navas, 2010); además de su contribución a la reducción de la peroxidación lipídica (Wagner *et al.*; citado por Navas, 2010) y actividad antihipertensiva (Perona *et al.*; citado por Navas, 2010).

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, por lo que son muy inestables y reaccionan rápidamente con otras moléculas. Los radicales libres se pueden formar por la acción del ozono, los pesticidas, las reacciones fotoquímicas, las radiaciones ionizantes o el estrés (Tur, 2004). Los antioxidantes son moléculas capaces de bloquear el inicio de la cadena de reacciones de oxidación causadas por los radicales libres inhibiendo su capacidad oxidante (Young y Woodside, 2001).

Los polifenoles presentes en los aceites vírgenes, específicamente los contenidos en el aceite de oliva son los co-responsables de la reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares, asociado a la composición y efecto antioxidante del perfil lipídico, lo que constituye una fuente de protección contra el daño oxidativo (Varela, 2009).

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación *in vitro*. (Decker, citado por González, 2010). Además la capacidad antioxidante de tales compuestos polares en sistemas lipídicos, se debe a que se localizan en la interfase lípido-aire, permitiendo una mejor protección contra el oxígeno molecular del aire que los antioxidantes lipofílicos, que permanecen en solución en fases oleosas y que, por lo tanto, actúan mejor en sistemas aceite en agua (O/W) (Boskou; citado por Escobar, 2010).

La vitamina E está formada por un grupo de 8 vitámeros. Su estructura consta de dos partes primarias: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Estos 8 vitámeros se dividen en dos grupos fundamentales: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral; los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con tres dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11. Dentro de cada grupo, los vitámeros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como α , β , γ y δ (Nuñez, 2007).

La actividad antioxidante de los tocoferoles aumenta en la serie $\alpha \rightarrow \delta$, lo contrario ocurre con la actividad vitamínica y con la velocidad de reacción con radicales peróxido. La actividad del γ -tocoferol comparada con el α -tocoferol es más alta y se debe a la mayor estabilidad del primero y a la aparición de productos distintos, durante la reacción de antioxidación (Belitz y Grosch; citado por Concha y Vivanco, 2006).

Los tocoferoles y tocotrienoles, actúan coordinados con otras moléculas y enzimas para la defensa de las células (especialmente glóbulos rojos, células musculares y células nerviosas) frente a los efectos nocivos producidos por los radicales libres, considerados hoy día importantes antioxidantes con potenciales beneficiosos a la salud (Sayago *et al.*, 2007).

2.9 TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la actividad antioxidante de los alimentos es importante para predecir el potencial antioxidante *in vitro* de los mismos antes de ser ingeridos; así mismo, nos permite determinar la protección frente a la oxidación y el deterioro del alimento que disminuye su calidad y valor nutricional (Samaniego, 2006).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Dichos radicales reaccionarían con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de esta se inhibiría la generación de los primeros. Así, lo que se determina realmente es el efecto antioxidante ya que la actividad antioxidante no se puede medir de forma directa. Lo ideal sería medir la actividad antioxidante de cada componente de la muestra por separado, sin embargo, y sobre todo en el caso de muestras naturales, es muy difícil determinar el número y concentración de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra (Samaniego, 2006).

En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es bueno trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados. Las características “ideales” que debe reunir un método de determinación de capacidad antioxidante son: sencillez, mecanismo químico definido y punto final fijo, reproducibilidad,

adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas y elevado rendimiento de análisis (Prior *et al.*, 2005).

Se han descritos dos mecanismos por medio de los cuales los antioxidantes pueden desactivar a los radicales libres (Prior *et al.*, 2005):

a. MECANISMO POR TRANSFERENCIA DE UN HIDRÓGENO (HAT)

La presencia de un radical libre altamente reactivo induce la ruptura homolítica de un enlace en la molécula del antioxidante. Por lo general esta fractura se produce en una unión oxígeno – hidrógeno, como resultado ocurre la transferencia de un H hacia el radical y la formación de un nuevo radical libre menos reactivo. Este mecanismo se ve en presencia de moléculas aromáticas y de otras moléculas que posean un elevado grado de conjugación, ya que los dobles enlaces alternos permiten la deslocalización del electrón no compartido y, como resultado el radical formado es más estable.

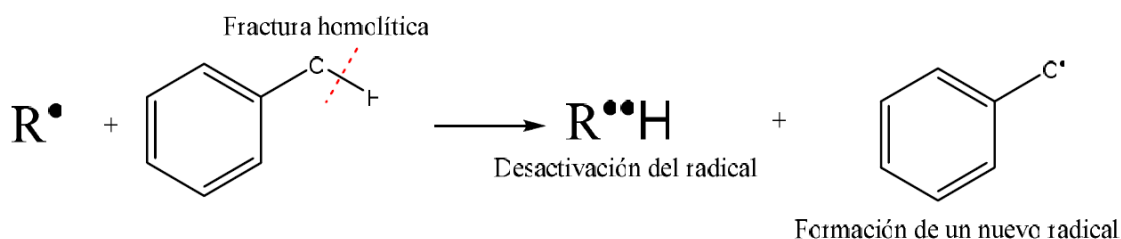


Figura 3: Reacción del mecanismo por transferencia de un hidrógeno.

FUENTE: Navas (2010).

b. MECANISMO POR TRANSFERENCIA SIMPLE DE UN ELECTRÓN (ET)

En este caso, el antioxidante cede un electrón al radical libre, por lo que el potencial de ionización de la molécula es muy importante para establecer la factibilidad de que el proceso ocurra. Como resultado se neutraliza al radical y se forma una especie altamente inestable (AOH^+) que cede un protón a la molécula de agua para producir un radical libre, que se estabilizará por los efectos inductivos o resonantes asociados a su estructura molecular. La medición de la capacidad antioxidante se basa por lo tanto, en el poder reductor que exhiba el compuesto.

Cuadro 3: Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT

ENSAYO	CATEGORIA
Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP) N,N- dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP) Inhibición de la oxidación del ácido linoleico Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL)	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

FUENTE: Tovar (2013)

2.9.1 ENSAYO DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILO)

Consiste en determinar la capacidad de captura del radical libre DPPH por parte de los compuestos antioxidantes. Este radical presenta un pico máximo de absorción a 515 nm y tras la adición del antioxidante se produce una disminución de absorbancia proporcional a la concentración y actividad de dicho antioxidante (Brand-williams *et al.*, 1995). En la reacción, la coloración del DPPH cambia de púrpura a amarillo debido a la absorción de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante.

El radical libre es estable y está disponible comercialmente, lo que reduce el tiempo de análisis y evita su generación por distintas vías, como ocurre con el método ABTS, que podrían conllevar una variabilidad en los resultados obtenidos (Samaniego, 2006).

2.9.2 ENSAYO ABTS (ACIDO 2,2'-AZINO-BIS-3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFONICO)

El radical $ABTS^+$ se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. El grado de decoloración permite conocer el porcentaje de inhibición del catión radical $ABTS^+$ en función de la concentración y el tiempo, y es calculado con respecto a la concentración del Trolox, utilizado como estándar bajo las mismas condiciones (Samaniego, 2006).

Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación *in vivo*, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68 V), pudiendo reaccionar con el radical, muchos compuestos fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados que pueden interferir en los resultados finales, lo cual, es un inconveniente. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso (Samaniego, 2006).

2.9.3 MÉTODO ORAC (OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY)

Este método permite medir la inhibición del antioxidante causada por el radical piróxilo que induce oxidaciones; por lo tanto, a medida que la molécula fluorescente (fluoresceína) es atacada y dañada por los radicales, se va perdiendo su fluorescencia. La función de los antioxidantes es la de proteger las moléculas que tienen tendencia a oxidarse, y cuanto más capacidad antioxidante tiene un compuesto o alimento mayor es la capacidad de mantener la emisión de luz por parte de la molécula fluorescente. El grado de protección frente a la oxidación se cuantifica con un medidor de fluorescencia y se reporta en términos de "equivalentes de Trolox" (TE) (Huang *et al.*, 2005).

En el análisis se utiliza la proteína β -ficoeritrina fluorescente como un sustrato oxidable y AAPH (2 azobis (2 amidino-propano) dihidrocloruro) como generador de radicales peróxilo o radicales hidroxilo. En la cuantificación de la respuesta se utiliza la técnica de medición del área bajo la curva de descenso de la actividad antioxidante (AUC). Por lo tanto, en la

medición se combina tanto el porcentaje de inhibición como el periodo de inhibición a lo largo del tiempo producido por los antioxidantes en estudio. Esta evaluación se puede adaptar para medir la capacidad antioxidante de materiales tanto lipofílicos como hidrofílicos (Zuleta *et al.*, 2009).

2.10 VIDA EN ANAQUEL DE ALIMENTOS

Para Hernández y Sastre (1999), la vida útil es el periodo entre la elaboración y la compra al detalle de un producto alimenticio, durante el cual dicho producto mantiene una calidad satisfactoria. Otra definición del mismo autor sería el tiempo durante el almacenamiento en el que el producto mantiene su aptitud para el uso.

Los principales mecanismos de degradación de los alimentos que disminuyen la vida en anaquel de los mismo son los siguientes: (a) cambios físicos, los cuales son acusados por la manipulación, almacenamiento y transporte de los alimentos; (b) cambios químicos, los cambios ocurren en los componentes internos de los alimentos tanto por las sustancias aplicadas al momento de su procesamiento como del medio externo al que está sometido el alimento. Dentro de los cambios químicos que más problemas presentan son la presencia de actividad enzimática y rancidez de los lípidos por presencia de oxígeno y (c) cambios microbiológicos; los microorganismos tienen la habilidad de multiplicarse a tasas de crecimiento muy altas. Los alimentos tienen los nutrientes necesarios para su crecimiento (Singh, 2000).

Para predecir la vida útil de un producto es necesario en primer lugar identificar y/o seleccionar la variable cuyo cambio es el que primero identifica el consumidor meta como una baja en la calidad del producto (Brody; citado por Enriquez y Vilcapoma, 2012), por ejemplo, en algunos casos esta variable puede ser la rancidez, cambios en el color, sabor o textura, pérdida de vitamina C o inclusive la aparición de poblaciones inaceptables de microorganismos.

Posteriormente se analiza la cinética de la reacción asociada a la variable seleccionada, que depende en gran medida de las condiciones ambientales. Es importante recalcar que la vida útil no es función del tiempo en sí, sino de las condiciones de almacenamiento del producto

y los límites de calidad establecidos tanto por el consumidor como por las normas que rigen propiamente los alimentos. (Labuza; citado por Enriquez y Vilcapoma, 2012).

La vida útil se determina al someter a estrés el producto, siempre y cuando las condiciones de almacenamiento sean controladas. Se pueden realizar las predicciones de vida útil mediante utilización de modelos matemáticos (útil para evaluación de crecimiento y muerte microbiana), pruebas en tiempo real (para alimentos frescos de corta vida útil) y pruebas aceleradas (para alimentos con mucha estabilidad) en donde el deterioro es acelerado y posteriormente estos valores son utilizados para realizar predicciones bajo condiciones menos severas. (Charm, 2007).

2.10.1 DETERIORO RELACIONADO CON LA TEMPERATURA

Los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutritivo del alimento, y además, producen compuestos volátiles que imparten olor y sabor desagradable, esto generalmente se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química o enzimática (rancidez hidrolítica), y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación (rancidez oxidativa) (Ziller y Campbell; citado por Douglas, 2007).

Generalmente el estudio de la estabilidad de un aceite comestible, o resistencia al deterioro debido a cualquiera de los tipos de rancidez, se realiza en función de variables o índices que permitan determinar si ha ocurrido reacciones con los grupos funcionales de las grasas o aceites que pudieran provocar degradación de los mismos o de sus componentes. Entre ellos destacan el índice de acidez y el índice de peróxido (Ramos y Tarazona; citado por Douglas, 2007). Luego, se evalúa la velocidad o rapidez de dichas reacciones de deterioro, expresados como cambios de concentración por unidad de tiempo.

Uno de los factores que afectan la rapidez de deterioro de las grasas y aceites es la temperatura, observándose que un incremento de la misma aumenta la velocidad de estas reacciones de deterioro (Ziller y Campbell; citado por Douglas, 2007). Teóricamente la constante de velocidad de reacción puede obedecer a la ecuación de Arrhenius, la cual expresa matemáticamente su dependencia con la temperatura absoluta.

a. VELOCIDAD DE REACCIÓN

Los alimentos pueden considerarse en general como sistemas discontinuos. La velocidad de reacción, es decir, la velocidad de aparición o desaparición de alguna sustancia, necesita ser adaptada a cada sistema. Además de tratarse de medios de densidad prácticamente constante, puede admitirse que la velocidad de reacción representa, en estos casos, el cambio de concentración de un reactivo en función del tiempo. La velocidad de reacción proporcionaría, por tanto, una medida de la reactividad y estabilidad del sistema (Johnson *et al.*, 1995).

Según Taoukis *et al.* (2000), mediante un estudio cuidadoso de los componentes y procesos de los alimentos, puede establecerse que las reacciones analizadas tienen un impacto importante en la velocidad de deterioro. Basado en este análisis y sin subestimar la complejidad fundamental de los sistemas alimenticios, el cambio en el alimento puede representarse por la pérdida de uno o más índices de calidad (por ejemplo un nutriente de un sabor característico) o por la formación de un producto desagradable (por ejemplo un sabor desagradable o decoloración). Generalmente, los factores de calidad son parámetros químicos, físicos, microbiológicos o sensoriales cuantificables, seleccionados para describir representativamente el deterioro de la calidad de un sistema particular de alimentos.

La velocidad de reacción es función principalmente de la composición y de la temperatura. La influencia de ésta se representa a través de la constante cinética o velocidad específica. Con muy pocas excepciones, la velocidad de las reacciones aumenta, a menudo de forma aguda, con la temperatura. La relación entre la constante de velocidad y la temperatura se describe mediante la ecuación de Arrhenius (Escardino y Berna, 2003).

b. REACCIÓN DE ORDEN CERO ($n=0$)

Para reacciones de orden cero ($n=0$), el porcentaje de pérdida de vida en anaquel en el tiempo es constante a una temperatura constante (Labuza y Riboh, 1982).

Se parte de la siguiente expresión (Labuza y Riboh, 1982):

$$-\frac{dA}{d\theta} = KA^n \dots \dots \dots (1)$$

El valor n es reemplazado por 0 en la ecuación 2. Integrando la ecuación tenemos:

$$A = A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (2)$$

Donde:

A_0 = Valor inicial de la característica de calidad.

A = Valor de la característica de calidad en el tiempo θ .

K = Constante de velocidad de orden cero (unidades de tiempo elegidas -1).

θ_s = Vida en anaquel en días, meses, años.

La Figura 4 muestra el ploteo del cambio de calidad versus el tiempo de almacenamiento para una reacción de Orden Cero.

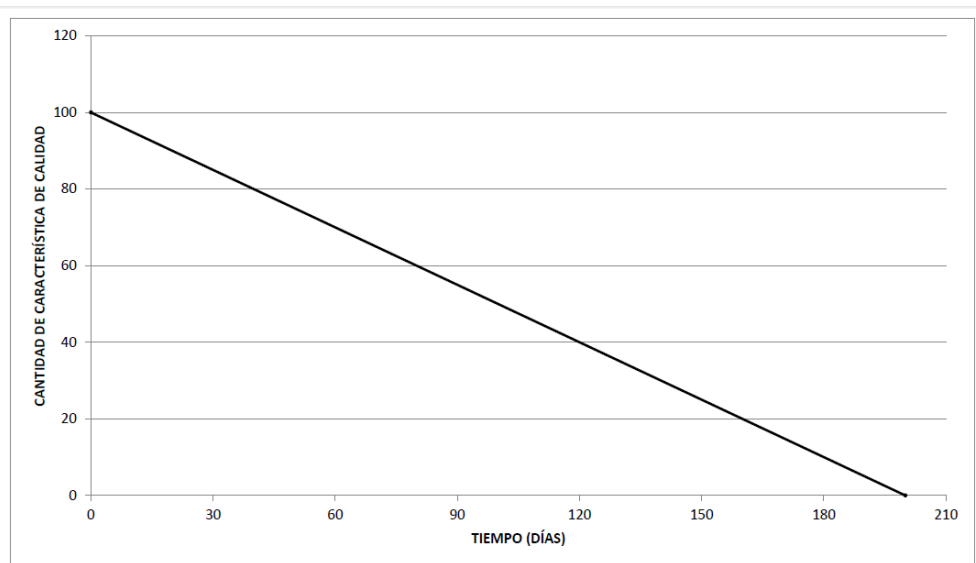


Figura 4: Cambio de Calidad frente al tiempo en una reacción de cero.

FUENTE: Fennema (2000).

Un orden de reacción cero (n=0) es aplicable para las siguientes formas de deterioro (Labuza y Riboh, 1982):

- Degradación enzimática en frutas frescas y vegetales, algunos alimentos congelados y algunas pastas refrigeradas.
- Pardeamiento no enzimática en cereales secos y productos lácteos deshidratados.
- Oxidación lipídica (desarrollo de rancidez en alimentos congelados y deshidratados).

c. REACCIÓN DE PRIMER ORDEN (n=1)

La vida en anaquel en muchos casos no sigue una velocidad constante de degradación. En efecto, el valor de n puede variar para muchas reacciones desde cero hasta cualquier valor fraccional o sobre dos. Muchos alimentos que no se deterioran por orden cero siguen un modelo donde n=1, que resulta en un decrecimiento exponencial en la velocidad de pérdida como calidad decreciente. Esto no significa que la vida en anaquel de alimentos que siguen este diseño es más larga que la de aquellos con una velocidad constante; desde que el valor de la constante de velocidad K es diferente (Labuza y Riboh, 1982).

En este caso, si se reemplaza n=1 en la ecuación 1 se obtiene:

$$-\frac{dA}{d\theta} = KA^n \dots \dots \dots (1)$$

Integrando la ecuación tenemos:

$$\ln A = \ln A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (3)$$

Donde:

A_0 = Valor inicial de la característica de calidad.

A = Valor de la característica de calidad en el tiempo θ .

k = Constante de velocidad de orden uno (unidades de tiempo elegidas -1).

θ_s = Vida en anaquel en días, meses, años.

La Figura 5 muestra el ploteo del cambio de calidad versus el tiempo de almacenamiento para una reacción de primer orden.

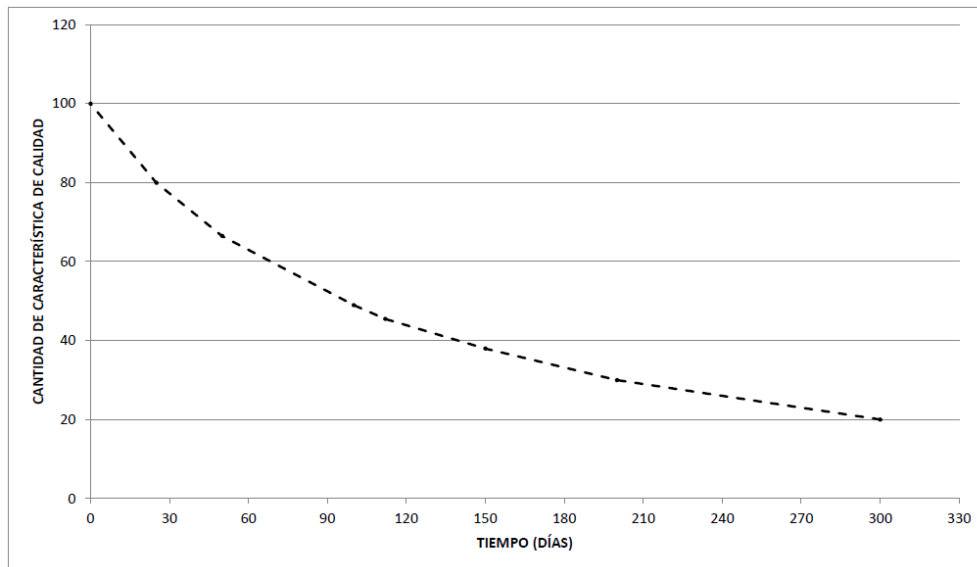


Figura 5: Cambio de Calidad frente al tiempo mostrado por una reacción de Primer Orden.

FUENTE: Fennema (2000).

Los tipos de deterioro que siguen una reacción de primer orden ($n=1$) son (Labuza y Riboh, 1982):

- Rancidez en aceites o vegetales secos.
- Crecimiento microbiano (carnes y ensaladas).
- Producción microbiana de sabores indeseables y limo (carnes y pescado).
- Pérdida de vitaminas (alimentos envasados y deshidratados).
- Pérdida de calidad proteica (alimentos deshidratados).

2.10.2 LA ECUACION DE ARRHENIUS

Uno de los modelos más utilizados en la determinación de la vida de anaquel de un producto es el Modelo de Arrhenius. La relación de Arrhenius, desarrollada teóricamente para reacciones químicas moleculares reversibles, ha sido experimentalmente aplicada a un número de reacciones químicas complejas y fenómenos físicos (Chica y Osorio, 2003).

Las reacciones de pérdida de calidad de los alimentos han mostrado que siguen un comportamiento de Arrhenius con la temperatura, dado por la siguiente ecuación:

$$K = K_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \dots \dots \dots (4)$$

Donde:

K es la constante de velocidad de la reacción,

Ko es la constante de la ecuación de Arrhenius

Ea la energía de activación que se necesita para vencer la degradación de productos.

T = Temperatura Absoluta (K)

R= 1.987 cal/mol, constante universal de los gases

Aplicándole logaritmo neperiano a la Ec. 4 quedaría que:

$$\ln K = -\frac{E_a}{RT} + \ln K_0 \dots \dots \dots (5)$$

Luego, la Ec.5 puede tomar la forma lineal, donde al graficar Ln K contra 1/T daría una línea recta cuya pendiente sería igual a $-E_a/R$. Esta ecuación (Ec. 5) permite predecir, bajo ciertas limitaciones, el comportamiento de la constante de velocidad de una reacción para una temperatura estudiada y cualquier otra temperatura diferente a la del ensayo. Una de las variantes de esta dependencia es el valor de Q_{10} , el cual se define como el número de veces que varía la velocidad de una reacción con un cambio de 10 °C en la temperatura. Si la velocidad de reacción se duplica con el cambio de 10 °C con la temperatura, $Q_{10}= 2$ (Toledo; citado por Douglas, 2007).

Una pendiente excesiva significa que la reacción es más dependiente de la temperatura, es decir, a mayor incremento de la temperatura, la reacción aumenta a una velocidad mayor (Labuza y Riboh, 1982).

Fennema (2000) señala que cuando se aplica la técnica de regresión, se reutiliza el análisis estadístico para determinar el 95 por ciento de los límites de confianza de los parámetros de Arrhenius. Si solo se dispone de tres valores K, el rango de confianza normalmente es grande. Para obtener límites de confianza estrechos y significativos en E_a y K_0 , se necesitan velocidades a más temperaturas. Se han propuesto que cinco o seis temperaturas experimentales dan el cociente óptimo práctico de exactitud, frente a la cantidad de trabajo

experimental. Mientras más temperaturas sean usadas, mayor será la significancia estadística de los datos. Al limitarse a tres temperaturas experimentales debido al coste y/o dificultad de disponer de incubadoras a seis temperaturas constantes, pueden utilizarse diversos métodos estadísticos para aumentar la exactitud, uno de los cuales es considerar cada par de datos (punto) como una estimación independiente de K.

2.10.3 OTROS MODELOS

Saguy y Karel (1980) mencionan que han sido sugeridas ocasionalmente otras funciones distintas al modelo de Arrhenius para la correlación de la información de estabilidad de alimentos, considerando los siguientes modelos de dependencia de la temperatura.

Modelo lineal: $k = a + bT \dots \dots \dots (6)$

Modelo exponencial: $k = aT^b \dots \dots \dots (7)$

Modelo hiperbólico: $k = \frac{a}{b-T} \dots \dots \dots (8)$

Donde:

K: Pendiente que relaciona A (Valor de característica en el tiempo θ).

a: Constantes.

T: Temperatura absoluta (K).

Debido a que existen virtualmente ilimitadas opciones de modelos matemáticos para ajustar las ecuaciones a los datos experimentales, las consideraciones en las elecciones de un modelo seguirían a estas guías principales (Hill y Grieger, 1980):

- Simplicidad del modelo, menos coeficientes son compatibles con un error razonable.
- La más baja desviación posible entre el modelo predicho y los datos experimentales, medidos por el cuadrado medio del error.
- Sin discontinuidad en el rango de variables

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las siguientes instalaciones de la Universidad Nacional Agraria La Molina:

- Laboratorio de Análisis Fisicoquímico de la Facultad de Industrias Alimentarias.
- Laboratorio de Investigación e Instrumentación de la Facultad de Industrias Alimentarias.
- Planta Piloto de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias.
- Laboratorio de Fisicoquímico de la Universidad de Lima.

3.2 MATERIA PRIMA E INSUMOS

3.2.1 MATERIA PRIMA

Se utilizaron semillas de *Moringa oleífera*, las cuales fueron provistas por la empresa Fundo Escondido SAC, ubicada en el departamento de Ica.

3.2.2 ENZIMAS

Hemicelulasa (Sigma Aldrich) purificada a partir de *Aspergillus niger*, cuya actividad β -galactasa puede ser determinada empleando goma de algarrobo como sustrato. Las condiciones óptimas de actividad de la enzima son 37-40 °C y un pH de 4.9-5.1.

3.3 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1 MATERIALES

- Balones esmerilados de 250 mL
- Balones Kjeldahl para digestión de proteínas
- Beakers de 50, 250 y 500 mL
- Bureta de 25 mL
- Campana desecadora
- Cápsulas de porcelana
- Embudo Buchner
- Erlenmeyers de 250 mL
- Papel filtro rápido y Whatman # 42
- Pipetas de 5 y 10 mL
- Placas Petri
- Probetas de 10, 50 y 100 mL
- Termómetro
- Tamices
- Frascos ámbar

3.3.2 EQUIPOS

- Balanza analítica. Marca OHAUS. Mod. E12140[®]
- Balanza digital de precisión. Marca OHAUS. Mod. TA 3001[®]
- Molino de discos
- Prensa-*expeller* KOMET[®]
- Espectrofotómetro
- Cromatógrafo de gases equipado con FID (Detector de Ionización de Flama). Marca Perkin Elmer Autosystem XL[®]
- Cromatógrafo HPLC *Agilent* de la serie 1100 acoplado a un detector de fluorescencia *Thermo Finnigan* modelo FL3000[®]
- Estufa de convección forzada. Marca BINDER. Mod. FED 53[®]
- Estufa al vacío. Marca LABOR MUSZERIPARI[®]

- Equipo de filtración al vacío.
- Equipo *Soxhlet* de Laboratorio.
- Mufla. Marca SXHIMAGEN[®]
- Balanza de humedad
- Baño María. Marca MEMMERT. Mod. WNB 14[®]
- Centrífuga
- Colorímetro
- Potenciómetro. Marca HANNA INSTRUMENTS. Mod. HI 2211[®]
- Espectrofotómetro.
- Refractómetro ABBE. Marca AUS JENA[®]
- Termómetro digital tipo punzón. Marca HANNA INSTRUMENTS. Mod. HI 145000[®]
- Computadora con *software* estadístico Statgraphics Centurion[®]
- Refrigeradora

3.3.3 REACTIVOS

- Ácido acético glacial. Marca MERCK[®]
- Ácido clorhídrico concentrado. Marca MERCK[®]
- Ácido sulfúrico concentrado. Marca FERMONT[®]
- Ácido bórico. Marca MERCK[®]
- Alcohol etílico 95%. Marca MERCK[®]
- Hexano para análisis. Marca MERCK[®]
- Metanol. Marca MERCK[®]
- Almidón en polvo. Marca MERCK[®]
- Cloroformo. Marca MERCK[®]
- Fenolftaleína. Marca MERCK[®]
- P-anisidina. Marca RUICHEM[®]
- Catalizador para proteínas. Marca MERCK[®]
- Carbonato de sodio. Marca MERCK[®]
- Hidróxido de sodio. Marca SIGMA-ALDRICH[®]
- Isooctano para análisis. Marca MERCK[®]
- Reactivo de Wijs. Marca MERCK[®]

- Tetracloruro de carbono. Marca HI MEDIA®
- Tiosulfato de sodio. Marca MERCK®
- Yoduro de potasio. Marca SIGMA-ALDRICH®
- Reactivo de Folin. Marca MERCK®
- Ácido gálico. Marca MERCK®
- Persulfato de potasio. Marca MERCK®
- Cromóforo ABTS. Marca MERCK®
- Trolox. Marca MERCK®

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

a. HUMEDAD

Se fundamenta en la pérdida de agua hasta peso constante y se realizó según el método de la A.O.A.C (1995), para lo cual se coloca en una estufa tal como se describe a continuación:

- Se pesó 5 ± 0.2 g de la muestra dentro de un plato de aluminio para humedad de capacidad de 5 cm de diámetro y 2 cm de profundidad (previamente tarado) cogiéndolo firmemente con las pinzas.
- Se secó la muestra en una estufa a 105 °C hasta peso constante.
- Se enfrió la muestra en un desecador por 30 min y se pesó la muestra.
- Se reportó el porcentaje de pérdida de peso como humedad.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

b. GRASA TOTAL (EXTRACTO ETÉREO)

Se realizó según el método de la AOAC (1995), la grasa es extraída de la muestra seca con la ayuda de solventes orgánicos, para lo cual se utiliza el equipo de extracción *Soxhlet* tal como se indica a continuación:

- Se pesó 5 g de las muestras de semillas completamente seca y se colocaron en los cartuchos de extracción. Previamente se pesó el balón de destilación del evaporador rotatorio.
- Este cartucho se colocó en el equipo Soxhlet y se vertieron 120 mL de éter de petróleo. Se activó el equipo y se mantuvo la extracción durante 2 horas de arrastre por solvente.
- El extracto se recogió en el balón de destilación y se procedió a evaporar hasta eliminar todo el éter de petróleo. El balón se colocó en una estufa durante 1.5 horas para eliminar residuos de éter. Luego se enfrió en un desecador.
- Su peso se cuantificó en una balanza analítica. Los diferentes pesos registrados se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$\text{Extracto etéreo (\%)} = \frac{C - (B - A)}{C} \times 100$$

Donde:

A: Peso del balón de destilación limpio y seco (g).

B: Peso del balón de destilación (g).

C: Peso de la muestra seca (g).

c. **PROTEÍNAS**

Se realizó según el método de la A.O.A.C (1995), para lo cual se siguieron los pasos que se describen a continuación:

- La muestra es digerida con ácido sulfúrico empleando sulfato de cobre pentahidratado como catalizador y sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición, para liberar el nitrógeno a partir de la proteína y retener el nitrógeno como sal de amonio. Se agrega hidróxido de sodio al cincuenta por ciento para liberar el amoniaco, el cual es destilado y recogido en una solución de ácido bórico para luego ser titulado. Para transformarlo en porcentaje de proteína bruta (peso/peso), se multiplica el porcentaje de nitrógeno obtenido por 6.25. El proceso seguido es el siguiente:
- Se pesó 1 g de muestra de semillas completamente seca y se colocó en un tubo de digestión.

- Se agregó el catalizador (5 g de sulfato de potasio y 0.5 g de sulfato de cobre), 5 mL de agua destilada y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocaron cinco perlas de ebullición.
- El equipo fue calentado hasta 230 °C, donde se conecta el tubo de digestión con el sistema de neutralización en el que los gases formados son neutralizados con una solución de NaOH al 10 por ciento.
- Una vez evidenciada la formación de un color verde esmeralda en el fondo de los tubos, se deja digerir por 30 minutos.
- Apenas terminó la digestión, se retiraron los tubos y se enfriaron sin desconectar del sistema de neutralización.
- Luego los tubos se colocaron en un destilador que generó amoníaco, el cual es recogido en una solución de ácido bórico al 3 por ciento.
- Finalmente se titula con HCl 0.1 N y se empleó la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de proteínas:

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{(\text{Gasto}_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}} \times 0.014)}{\text{Peso de la muestra}} \times 6.25$$

d. CENIZAS

Es la cantidad de materia incombustible que sobra luego de someterla a calcinación en una mufla. Se realizó según el método de la AOAC (1995), este procedimiento se menciona a continuación:

- Se tomaron unos 30 g de muestra de semillas y se dejaron en una estufa a 105 °C hasta peso constante. Esta muestra se dejó enfriar durante media hora en un desecador.
- Se pesaron 5 g de semillas en una balanza analítica y colocaron en un crisol previamente tarado.
- El crisol y la muestra se colocaron en una mufla a 550 °C durante 4 horas.
- Luego de la incineración, el crisol es enfriado durante una hora en un desecador y luego pesado en una balanza analítica.

Los pesos obtenidos se reemplazan en la siguiente ecuación:

$$Ceniza (\%) = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Donde:

A: Peso de crisol a peso constante con la muestra seca (g).

B: Peso del crisol con cenizas (g).

C: Peso de la muestra seca (g).

e. **FIBRA CRUDA**

Se realizó según el método de la A.O.A.C (1995), para lo cual se siguieron los pasos que se describen a continuación:

Se lavó el residuo con agua hirviendo, con la solución de HCl y nuevamente con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con éter de petróleo. Se colocó el crisol en el horno a 105 °C por 12 horas y se enfrió en desecador.

Se pesaron rápidamente los crisoles con el residuo y colocaron en una mufla a 550 °C por 3 horas, se dejó enfriar en un desecador y pesados nuevamente. El cálculo de la fibra cruda es:

$$Fibra\ cruda (\%) = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Donde:

A: Peso del crisol con el residuo seco (g).

B: Peso del crisol con la ceniza (g).

C: Peso de la muestra (g).

3.4.2 ANÁLISIS DEL ACEITE CRUDO

El aceite crudo obtenido fue sometido a los siguientes análisis fisicoquímicos:

a. ÍNDICE DE PERÓXIDO

Se siguió el método recomendado por la A.O.A.C 965.33 (1995). Se pesaron 5 ± 0.05 g de aceite en un matraz. Se adicionaron 30 ml de una solución de ácido acético/cloroformo (3:2 v/v) y 500 μ l de yoduro de potasio saturado. Se agitó manualmente durante un minuto. Luego se añadieron 30 ml de agua destilada y un mililitro de almidón al 1 por ciento. Finalmente se procedió a titular con tiosulfato de sodio 0.01 N, hasta la desaparición del color azul. También se preparó un blanco, el cual contenía agua destilada en lugar de aceite, y se realizó el mismo procedimiento.

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

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

Donde:

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

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

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

b. GRADO DE ACIDEZ

Se determinó según el método de la A.O.A.C. 910.28 (1995) para aceites crudos. Se pesó 5 g de aceite en un matraz de 250 ml y se agregó 50 ml de etanol neutralizado. Después de añadió 0.5 ml de fenolftaleína al 0.1 por ciento y se procedió a titular con solución estándar de KOH 0.1 N agitando continuamente hasta la aparición de un color rosado tenue que persista por un tiempo mayor o igual a un minuto.

El grado de acidez o acidez libre del aceite del aceite se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Ácidos grasos libres (\% como ácido oleico)} = \frac{V \times N \times 282}{10 \times P}$$

Donde

V: volumen de disolución de KOH gastado en la valoración (ml),

N: normalidad exacta de la disolución de KOH

P: peso de la muestra de aceite (g).

c. ÍNDICE DE *P*-ANISIDINA

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

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

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

Donde:

As: Absorbancia de la muestra luego de la reacción

Ab: Absorbancia de la muestra antes de la reacción

d. COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA (K₂₃₂ Y K₂₇₀)

Se siguió el método recomendado por la AOCS Ch 5-91 (2008). El procedimiento analítico consiste en pesar con una precisión de 0.0001g 0.1 g de muestra de aceite en un matraz aforado de 10 mL, se enrasa el matraz con isooctano de calidad espectrofotométrica y se agita bien para homogeneizar el contenido y posterior a ello se mide la extinción a 232 nm y 270 nm. Los valores de extinción (E_λ) a 270 nm deben estar comprendidos en el intervalo que va desde 0.1 a 0.8 en el caso contrario es necesario repetir la medida utilizando soluciones más concentradas o más diluidas, según el caso. El coeficiente de absorbancia en el ultravioleta a una longitud de onda λ se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$K_\lambda = \frac{E_\lambda}{C \times e}$$

Donde

E_λ : Extinción medida en el espectrofotómetro a dicha longitud de onda,

C: Concentración de la disolución de aceite (g/100 ml)

e: Paso óptico de la cubeta (1 cm).

e. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Mide el cambio de dirección que experimenta un haz de luz al pasar a través del material a evaluar. Se determinó según el método de la AOAC (1995) realizándose la medición con un refractómetro de ABBE siguiendo los siguientes pasos:

- Se colocan gotas de aceite limpio (centrifugado) a 20 °C sobre la plataforma para muestras.
- Posteriormente se regula la intensidad de luz con el espejo.
- Se toma la medida visualizada a través del ocular del equipo.

f. CONTENIDO DE COMPUESTO FENÓLICOS

Esta determinación, que se ha realizado siguiendo el método colorimétrico propuesto por Vásquez *et al.* (1973) y Gutfinger (1981), consiste en la extracción de los compuestos fenólicos de la muestra con una mezcla de metanol-agua, posterior reacción de una alícuota del extracto con el reactivo de Folin-Ciocalteu y medida espectrofotométricamente de la absorbancia de los complejos azulados formados. La concentración de los polifenoles en el aceite (mg kg^{-1}) se calcula por interpolación a partir de una recta de calibrado previamente preparada en la mismas condiciones utilizando ácido gálico como patrón.

El procedimiento analítico consiste en pesar con precisión 10 g de la muestra de aceite a analizar y disolverlos en 20 mL de hexano. Esta disolución se pasa a un embudo de decantación y se realizan tres extracciones consecutivas, con alícuotas de 10 mL de metanol-agua 60:40 (v/v), agitando vigorosamente durante 2 minutos. El embudo se deja en reposo hasta que las fases se separan, y los tres extractos metanólicos se recogen en un mismo matraz aforado de 50 mL que se enrasa con agua destilada, obteniendo así el extracto fenólico.

Para la determinación de los polifenoles totales, se toman 2.50 mL de extracto fenólico y se llevan a un matraz aforado de 25 mL en el que también se añaden 9 mL de agua destilada y 1.25 mL de extracto de reactivo de Folin- Ciocalteu. El matraz se tapa y agita, dejándolo finalmente en reposo por 3 minutos. Se añaden 3.75 mL de carbonato sódico al 20 por ciento (p/v) y se enrasa el matraz con agua destilada. Transcurridas dos horas en la oscuridad, se centrifuga a 1500 RPM durante 10 minutos y se mide la absorbancia del sobrenadante en una cubeta de 1 cm de paso óptico a 725 nm, frente a un blanco que se prepara que se prepara de la misma forma pero añadiendo, en lugar del extracto fenólico, 1.50 mL de metanol-agua 60:40 (v/v) y 1 mL de agua.

La concentración de compuestos fenólicos en el extracto, Cef; expresada en mg/L, se determina interpolando en una recta de calibrado obtenida en las mismas condiciones a partir de disoluciones de ácido gálico patrón de concentraciones comprendidas entre 10 y 120 mg/L. El contenido en polifenoles totales de la muestra de aceite, Cpt, se expresa en mg/kg de ácido gálico.

g. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Se realizó según el método LABS-ITP-FQ-002-98, Rev.4, 2003; validado por el laboratorio Físicoquímico LABS-ITP (Instituto Tecnológico Pesquero del Perú). Los triglicéridos y fosfolípidos fueron saponificados y metilados y posteriormente se procedió a la cuantificación de los ácidos grasos por cromatografía gaseosa, las mismas que se describen a continuación.

En un tubo de ensayo se pesaron 50 mg de aceite, después de agregó 3.0 mL de éter de petróleo y se agitó en un vórtex hasta que se disolvió. Luego se adicionó 0.25 mL de hidróxido de sodio 2N en metanol. El tubo de ensayo se agitó vigorosamente en un vórtex por 10 segundos y se sumergió en baño maría a aproximadamente 50 °C durante 30 segundos. Posteriormente se agregó 0.35 mL de ácido clorhídrico 2N en metanol. Se agitó y se centrifugó a 3000 RPM por 7 minutos. Se separó la fase del éter de petróleo que contiene los ácidos grasos metilados y se introdujo en un vial de vidrio.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos formados en la etapa previa fueron separados por inyección de 3 µl de la solución dentro del cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer Autosystem XL acoplado al detector de ionización de llama (FID). La columna usada fue una columna capilar Supelcowax-10 de sílica fundida marca Supelco de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película. La temperatura del horno para la corrida se programó como sigue: inicialmente a 90 °C (por 2 minutos), se incrementó la temperatura hasta 240 °C a 3 °C/min y un periodo isotérmico de 25 minutos a 240 °C. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron en 250 y 260 °C, respectivamente. Se utilizó hidrógeno de alta pureza como gas portador.

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos metilados se realizó mediante comparación de sus tiempos de retención con los estándares conocidos previamente inyectados. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto al total de ácidos grasos presentes en el aceite.

h. CONTENIDO DE TOCOFEROLES

El contenido de tocoferoles, expresados en ppm, presentes en el aceite extraído de las semillas de moringa se determinó por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), según el método de la AOCS, Ce 8-89 (2008).

El equipo empleado para la separación y cuantificación de los tocoferoles fue un cromatógrafo HPLC *Agilent* de la serie 1100 acoplado a un detector de fluorescencia *Thermo Finnigan* modelo FL3000 con longitud de onda de excitación de 290 nm y longitud de onda de emisión de 330 nm. La columna utilizada (250 x 4,6 mm) es de relleno Lichrosorb Si-60, tamaño de partícula de 5 μm (*Sugerlabor Madrid*). La fase móvil que se emplea en la separación es una mezcla de n-hexano-isopropanol 98,5:1,5 (v/v) con un flujo de 1 mL/ min, y un volumen de inyección de 20 mL.

El procedimiento consiste en pesar 200 mg de aceite en un matraz aforado de 10 mL y disolverlos en hexano para HPLC. Posteriormente 20 μl de las muestras fueron inyectadas directamente al HPLC. La cuantificación se realiza por interpolación del área del pico del tocoferol en una recta de calibrado obtenida en las mismas condiciones experimentales, a partir de disoluciones patrón de α , β , γ y δ tocoferol en hexano, preparadas inmediatamente antes de su uso, de concentraciones que cubren el rango entre 1 y 8 mg L^{-1} .

i. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA POR EL MÉTODO ABTS

En primer lugar se procedió a obtener los extractos hidrofílicos y lipofílicos a partir del aceite de moringa, para ellos se procedió a realizar extracciones sucesivas las que se describen a continuación. Se pesó 2 g de aceite y se disolvió en 1 mL de n-hexano. Luego se añadió 2 mL de metanol-agua 80:20 (v/v), agitándose vigorosamente durante 2 minutos y se procedió a centrifugar a 4000 RPM durante 5 minutos. Posterior a ello se separó la parte lipídica (lipofílica) de la metanólica (hidrofílica). Se realizaron dos extracciones adicionales con metanol-agua a la parte lipídica y se almacenaron los dos extractos en oscuridad (Marfil, 2008).

Para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica se siguió el método descrito por Prior *et al.*, citado por Marfil (2008). Se toman 2 mL de la disolución diluida de ABTS⁺ y se mezclan con 100 μ L de la muestra (extracto hidrofílico o lipofílico) de aceite de moringa a ensayar. Posteriormente, la mezcla se agitó durante 30 segundos y se dejó reaccionar por un tiempo determinado hasta cuando la medida de la absorbancia fuera constante (30 minutos). Al finalizar este tiempo, se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm tanto de las muestras (extracto lipofílico e hidrofílico) como la del blanco. Todas las medidas se han realizado por triplicado. La capacidad antioxidante total se obtendrá por suma de la capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica.

Para el caso de la curva de calibración, se prepara una disolución madre de Trolox y a partir de esta disolución, se preparan distintos puntos que integrarán la recta de calibrado, con concentraciones comprendidas entre 0.08 y 0.8 μ mol Trolox/mL (fracción lipofílica) y entre 0.06 y 0.6 μ mol Trolox/mL (fracción hidrofílica). Cada punto de la recta se prepara igual que las muestras, es decir, poniendo 100 μ L de cada dilución y 2 mL de la disolución ABTS⁺, se agita durante 30 segundos. Posteriormente, se deja en oscuridad a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a los 30 minutos exactos, obteniendo así el valor de absorbancia final.

Los resultados obtenidos se expresan en forma de un índice, el valor TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). Dicho valor se define como los moles de Trolox que tienen la misma capacidad antioxidante que 1 kg de la muestra a ensayar.

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este trabajo se buscó comparar los rendimientos entre la extracción con prensa-*expeller* del aceite asistida y no asistida por enzima. Además, se buscó evaluar si este tratamiento enzimático previo a la extracción del aceite genera variaciones en las propiedades fisicoquímica y antioxidantes del aceite de moringa.

Para la extracción del aceite de moringa se siguió la siguiente metodología:

Pesado

Se pesó las semillas con el fin de conocer el rendimiento del aceite en función de la materia prima inicial.

Limpieza y selección

Con este proceso se logró obtener semillas libres de materiales extraños como tallos, piedras, hojas, semillas secas, etc.

Triturado grosero

Se realizó luego un triturado grosero en un molino de rodillos para lograr romper la cáscara de las semillas.

Descascarillado

Esta separación se llevó a cabo en un ciclón, que por diferencias de pesos, se obtuvo por un lado semillas y por otro, cáscaras.

Molienda y tamizado

La molienda se realizó en un molino de discos para reducir el tamaño de las semillas para posibilitar una mejor extracción en la prensa-*expeller* KOMET.

El tamizado se realizó con mallas número 10 y 20, equivalentes a una apertura de 2 y 0.85 mm de diámetro. La elección de las mallas se logró luego de pruebas preliminares. El tamizado uniformizará el tamaño de las semillas, en las cuales las semillas molidas gruesas (mayor a 2 mm) se volverán a moler y tamizar con el fin de aprovechar toda la materia prima.

Tratamiento enzimático

Se realizó una hidrólisis enzimática para aumentar el rendimiento de la extracción del aceite. Según Guerrero *et al.* (2015), los parámetros para obtener un mayor rendimiento deben ser:

concentración de enzima (hemicelulasa) de 2 por ciento con respecto al peso de la muestra de semilla de moringa, relación materia prima y agua será de 3:1 y el tiempo de hidrólisis enzimática de 24 horas. La temperatura y pH óptimos de la enzima hemicelulasa indicada en la ficha técnica son 37-40 °C y 4.9-5.1, respectivamente.

La mezcla de materia prima y agua destilada fueron colocados en *beakers* y expuestos a un baño maría a una temperatura de 40 °C, la cual es la temperatura óptima de actividad de la enzima.

Inactivación enzimática

Para inactivar las enzimas luego de la hidrólisis, la mezcla de materia prima, agua y enzimas fueron expuestos a una temperatura de 80 °C por un tiempo de 5 minutos en una estufa.

Secado

Posteriormente, se acondicionó esta mezcla para su extracción. Fue necesario un secado a una temperatura de 60 °C para llegar a una humedad de 6 por ciento. Este secado se realizó en una estufa.

Extracción

Se utilizó 100 gramos de semillas, las cuales pasaron por la prensa-*expeller* KOMET para lograr la extracción del aceite y la obtención de la torta. Las condiciones operacionales de la prensa-*expeller* se determinaron en las pruebas preliminares.

Centrifugación

El proceso de centrifugación logró separar el aceite crudo de impurezas provenientes de la torta. Se utilizarán 5000 rpm y un tiempo de 30 minutos, ya que según Navas (2010), con estas condiciones, se obtiene un máximo rendimiento, un aceite totalmente transparente y libre de impurezas.

Se pesará el aceite centrifugado para obtener el rendimiento de la extracción.

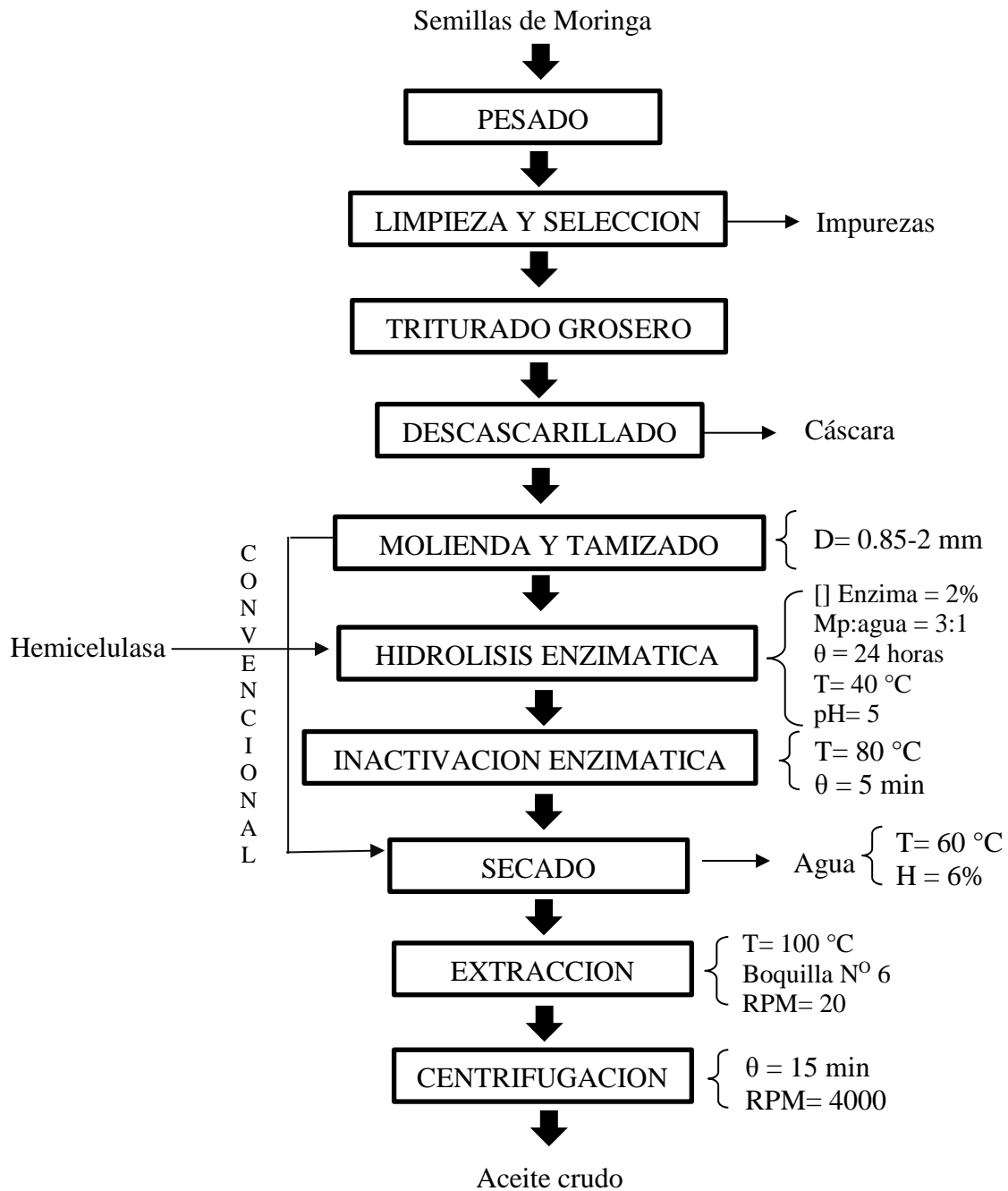


Figura 6: Flujo de operaciones para la obtención de aceite con previo tratamiento enzimático a partir de semillas de moringa.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ESTIMACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA DEL ACEITE DE MORINGA

3.6.1 ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

Para determinar la estabilidad del aceite crudo de moringa sin tratamiento enzimático se acondicionó las muestras de 35 ml de aceite en envases de vidrio de color ámbar, tapadas con un tapón plástico a presión y cerrado con una tapa rosca, ocupando en promedio el 90 por ciento del volumen del envase, para luego ser almacenadas a las temperaturas de evaluación.

El aceite fue almacenado a las temperaturas de 40, 50 y 60 °C y evaluadas durante un periodo de 40 días a intervalos de cada 5 días. Estas temperaturas están apoyadas en base a trabajos de investigación ya realizados por Torres (2000), Torres (2003) y Ángeles (2002) y en pruebas preliminares realizadas a diversas temperaturas. La evaluaciones que se realizaron fueron el índice de peróxido, coeficiente de absorbancia en el ultravioleta (k_{232} y k_{270}) e índice de acidez. Todos estos análisis se realizaron por triplicado.

Una vez obtenidos los datos se determinó el orden de la reacción (n) de deterioro de las muestras de aceite según el método planteado por Labuza (1982), se obtuvo la constante de velocidad de reacción (k) y se definió el modelo matemático más apropiado que relacione la temperatura con la velocidad de reacción para la determinación de vida en anaquel y luego de ello se procedió a determinar la vida en anaquel del aceite crudo de moringa a temperatura ambiente.

3.6.2 DETERMINACION DEL ORDEN DE REACCIÓN (n)

Se empleó el método de integración planteado por Labuza y Riboh (1982) para determinar el orden de reacción de deterioro del aceite de moringa, según los descriptores críticos elegidos. Éste método consiste en elegir un orden de reacción igual a cero (n=0) cuya ecuación integrada es:

$$A = A_0 - K\theta_S \dots \dots \dots (2)$$

En donde se reemplazaron los valores experimentales de A (descriptor crítico) y θ (tiempo de almacenamiento) para luego mediante una regresión lineal poder obtener el valor de la constante K, que es igual a la pendiente de la gráfica obtenida de dicha regresión.

Posteriormente se eligió el orden de reacción $n = 1$, cuya ecuación integrada y linealizada es la siguiente:

$$\ln A = \ln A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (3)$$

Se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior, para luego poder escoger el modelo que mejor se ajuste a lo planteado, en base al coeficiente de determinación (R^2) obtenido del análisis de regresión lineal aplicado.

3.6.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN (K)

Una vez determinado el orden de reacción para cada grupo de valores mediante la regresión lineal obtenida, se determinó el valor de la constante de la reacción (K) que es igual a la pendiente de dicha regresión. Se obtuvieron los parámetros de velocidad de reacción para cada factor de calidad y a las temperaturas de 40, 50 y 60 °C.

3.6.4 DETERMINACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO APROPIADO QUE RELACIONA LA TEMPERATURA CON LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

Para la determinación del mejor modelo que relaciona la influencia de la temperatura con la velocidad de reacción se utilizaron los modelos linealizados de Arrhenius y los propuestos por Saguy y Karel (1980), los cuales se presentan a continuación:

Modelo Arrhenius: $\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \dots \dots \dots (5)$

Modelo lineal: $k = a + bT \dots \dots \dots (6)$

Modelo exponencial: $\text{Log} k = \text{Log} a + b \text{Log} T \dots \dots \dots (9)$

Modelo hiperbólico: $\frac{1}{k} = \frac{a}{b} + \frac{1}{a}T \dots \dots \dots (10)$

Para definir el modelo matemático que se utilizó en la determinación de la vida en anaquel se realizó lo recomendado por Saguy y Karel (1980): escoger aquel modelo que presenta la más baja desviación posible entre el modelo predicho y los datos experimentales, medidos por el coeficiente de determinación.

3.6.5 ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL

Una vez elegido el modelo matemático que describe mejor la influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de reacción, se determinó el valor de la constante (k) considerando una temperatura ambiental de 20 °C, reemplazando en la ecuación del modelo matemático elegido el valor de la temperatura de almacenamiento ambiental (Fennema, 2000).

Posteriormente el valor obtenido de k, fue reemplazado en la ecuación de pérdida de calidad ya determinada anteriormente, según el orden de reacción que más se ajustó a los valores del descriptor crítico; y conocidos los valores experimentales iniciales del descriptor crítico evaluado (A_0) y el límite de calidad del mismo, es decir, el valor límite (A), se obtuvo el tiempo de vida en anaquel a temperatura ambiente (20 °C).

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de t de *Student* para dos muestras independientes en donde se trabajó con un nivel de significancia o error estadístico del 5 por ciento (0,05), lo que permitió determinar si los datos arrojados en la investigación presentan diferencias significativas en cuanto al rendimiento de la extracción y los factores de calidad del aceite crudo de moringa. Los datos obtenidos de la evaluación de la vida útil del aceite crudo de moringa se analizaron estadísticamente aplicando el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), teniendo como bloques al número de días de almacenamiento y los tratamientos a las diferentes temperaturas de almacenamiento, para el factor de calidad evaluado (índice de peróxido, índice de acidez y coeficiente de absorbancia en el ultravioleta (k_{232} y k_{270})). La ejecución del análisis estadístico se realizó con el apoyo del *software* Statgraphics Centurión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE MORINGA

En el Cuadro 4 se presentan los resultados del análisis proximal de las semillas de *Moringa oleífera*. Los resultados obtenidos muestran que las semillas de moringa contienen 7.8 por ciento de humedad, 30.3 por ciento de grasa cruda, 29 por ciento de proteína cruda, 36.9 por ciento de carbohidratos (obtenidos por diferencia), 20.5 por ciento de fibra cruda y 3.8 por ciento de cenizas.

Cuadro 4: Análisis proximal de las semillas de *Moringa oleífera* (% base seca)

CARACTERÍSTICA	CONTENIDO (%)
Humedad (g/100 g semilla)	7.8 ± 0.20
Cenizas totales (g/100 g semilla)	3.8 ± 0.10
Grasa cruda (g/100 g semilla)	30.3 ± 0.15
Proteína cruda (g/100 g semilla)	29.0 ± 0.19
Fibra cruda (g/100 g semilla)	20.5 ± 0.07
Carbohidratos* (g/100 g semilla)	36.9 ± 0.17

*Carbohidratos obtenidos por diferencia

Anwar *et al.* (2003) reportaron mayores contenidos de grasa cruda (38-42%) en semillas de *Moringa oleífera* cultivadas en regiones templadas de Pakistan, mientras que Compaoré *et al.* (2010) obtuvieron un contenido de grasa de 43.56 por ciento. Por otro lado, Abdulkarim *et al.* (2005) obtuvieron un contenido de grasa de 30.8% en semillas de *Moringa oleífera* provenientes de Malasia. Todos estos valores reportados en cuanto al contenido de grasa en las semillas de *Moringa oleífera* son mayores al obtenido en este estudio (30.3%), sin embargo, las variaciones en el contenido de grasa pueden ser debido a las diferencias del clima de cultivo, lugar de origen y tiempo de cosecha de las semillas.

El alto porcentaje de grasa cruda hace a esta semilla una fuente potencial para la industria del aceite. Además, se obtuvo un alto contenido de proteínas en las semillas de *Moringa oleífera* (29%). Compaoré *et al.* (2010) obtuvieron un 35.37 por ciento de proteína cruda, mientras que Abdulkarim *et al.* (2005) obtuvieron un contenido de proteína de 38.3%. Folkard *et al.* (1993) mencionan que el alto contenido en proteínas de las semillas de moringa puede ser usado como una buena fuente de coagulantes activos y desinfectantes debido a sus moléculas de proteína positivamente cargadas y propiedades antimicrobianas (Folkard *et al.*, 1993).

4.2 RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE MORINGA

En el Cuadro 5 se presenta los resultados del rendimiento obtenido en la extracción del aceite de moringa con prensa-*expeller*. Entre las características presentadas por el aceite de *Moringa oleífera* se resalta que es un aceite de color amarillo dorado claro, líquido a temperatura ambiente con sabor agradable.

El porcentaje de aceite de moringa extraído con el método enzimático (28.43%) resulto ser más elevado que el aceite control (24.70%), obteniéndose una diferencia significativa entre ambas extracciones. El incremento en el rendimiento del aceite puede ser atribuido a la actividad de la enzima (hemicelulasa). Badr *et al.* (1992) mencionan que los aceites vegetales dentro de las células de las plantas están conectadas con almidón, celulosa, hemicelulosa, proteínas y pectinas y que las celulasas y hemicelulasas ayudan a romper los vínculos entre las moléculas de aceite incrementando el rendimiento.

Cuadro 5: Rendimiento de la extracción del aceite de moringa con prensa-*expeller* obtenido sin y con tratamiento enzimático

	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO
Rendimiento (%)	24.70 ± 0.20 ^a	28.43 ± 0.29 ^b

*El análisis se realizó por triplicado

**Letras diferentes significa que hay diferencia significativa

Grasso (2013) menciona que la combinación del tratamiento mecánico y el enzimático permite la eficaz demolición de las paredes celulares y conlleva a una mayor extractibilidad del aceite. En este estudio se usó ambos mecanismos para aumentar el rendimiento de la extracción del aceite de moringa.

Grasso (2013) indica que la pared primaria de las semillas es una matriz de pectinas, hemicelulosa y proteína con microfibrillas de celulosa, mientras que en la pared secundaria prevalecen la celulosa y hemicelulosa, que constituyen más del 50 por ciento del total de polisacáridos en la mayoría de semillas. Sobre la base de esta composición, las actividades celulolíticas y hemicelulolíticas serán las más adecuadas para degradar la pared celular y aumentar la extractibilidad del aceite. En esta investigación se buscó evaluar el efecto de la hemicelulasa en la mejora de la extractibilidad del aceite de moringa. Sin embargo, Latif y Anwar (2008) menciona que los complejos enzimáticos son más efectivas para la degradación de las paredes celulares de semillas, debido a su acción sinérgica haciendo más disponible el aceite para la extracción.

Latif y Anwar (2008) realizaron la extracción del aceite de semillas de *Moringa concanensis* utilizando enzimas comerciales y obteniendo rendimientos que oscilan entre 23.54 a 27.46 por ciento. Estos valores de rendimiento son ligeramente inferiores a los encontrados en esta investigación (28.43%) al realizar la extracción del aceite de las semillas de *Moringa oleífera* con el uso de enzimas. Estas variaciones pueden deberse a la variedad de semilla usada, al lugar de procedencia de la semilla y al método de extracción del aceite, debido a que en la investigación realizada por Latif y Anwar (2008) se usó una extracción acuosa, mientras que en este estudio la extracción se llevó a cabo usando la prensa-*expeller*.

Tsankis *et al.* (1999) realizaron la extracción del aceite de las semillas de *Moringa oleífera* variedad Mbololo de Kenya con prensado en frío y obtuvieron un rendimiento de 25.8 por ciento, mientras que Lalas *et al.* (2001) trabajaron con semillas de *Moringa oleífera* variedad Periyakulam de India, obteniendo 25.1 por ciento de rendimiento con prensado en frío. En comparación con este estudio, estos valores son semejantes al obtenido en el aceite de moringa control 24.70 por ciento, posiblemente a que se trabajó con la misma variedad de semilla y método de extracción.

Los valores de rendimiento obtenidos con prensa *expeller* en esta investigación (24.7 y 28.43%) son menores a los obtenidos en la extracción realizada con solvente. Tsankis *et al.* (1999) realizaron la extracción del aceite de las semillas de *Moringa oleífera* con n-hexano y una mezcla de cloroformo-metanol y obtuvieron rendimientos de 35.7 y 31.2 por ciento, respectivamente, esto debido a la capacidad del disolvente para superar las fuerzas que unen a los lípidos dentro de la matriz de la muestra (Lalas *et al.*, 2001).

Folkard *et al.* (1993) menciona que el contenido de aceite en las semillas de moringa es comparable con el de algunas semillas comunes como cártamo, girasol, mostaza, sésamo, lino y cacahuete. Además, Pritchard (1991) menciona que el contenido de aceite presente en las semillas de moringa oleífera es bastante mayor que algunos cultivos comunes de semillas oleaginosas tales como algodón (15.0-24.0%) y soya (17.0-21.0%) y comparable con las semillas de cártamo (25.0-40.0%) y mostaza (24.0-40.0%).

4.3 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE DE MORINGA

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de los diferentes parámetros de calidad evaluados en el aceite de moringa (grado de acidez, índice de peróxidos, índice de refracción, índice de p-anisidina, coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} y k_{232}). Estos parámetros proporcionan información acerca del estado de degradación del aceite por causas «naturales», como consecuencia por ejemplo del empleo de una materia prima defectuosa o de un incorrecto proceso de elaboración y/o conservación. Como elemento de comparación se usarán los límites legales establecidos para el aceite de oliva virgen (Codex Alimentarius, 2015) debido a que el aceite de moringa presenta similar composición de ácidos grasos.

Cuadro 6: Características fisicoquímicas del aceite de moringa obtenido sin y con tratamiento enzimático

PARÁMETROS DE CALIDAD	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	ACEITE DE OLIVA VIRGEN*
Índice de refracción (20 °C)	1.4678 ± 0.0001 ^a	1.4677 ± 0.0001 ^a	1.4677-1.4705
Índice de peróxido (mEqO ₂ /kg)	0.86 ± 0.05 ^a	1.26 ± 0.05 ^b	≤20
Grado de acidez (%m/m ácido oleico)	1.23 ± 0.04 ^a	1.51 ± 0.04 ^b	≤2
Índice de p-anisidina	0.31 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.02 ^a	-
K ₂₃₂	1.25 ± 0.01 ^a	1.26 ± 0.01 ^a	≤2.6
K ₂₇₀	0.11 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	≤0.2

*Según la norma del Codex Alimentarius (2015)

**Los análisis se realizaron por triplicado

***Letras diferentes significa que hay diferencia significativa

a. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción encontrado para el aceite de moringa control resultó de 1.4678, mientras que el aceite con un previo tratamiento enzimático tuvo un índice de 1.4677, no encontrándose diferencias significativas entre ambas muestras. Latif *et al.* (2011) encontraron valores de 1.4562-1.4574, mientras que Lalas *et al.* (2001) obtuvieron índices de refracción entre 1.459-1.460 y además menciona que no encontró variaciones en este índice al realizar la extracción del aceite de moringa por tres métodos. Los valores hallados en este estudio son superiores a los reportados en ambas investigaciones.

b. ÍNDICE DE PERÓXIDO

Con respecto al índice de peróxido, se obtuvo 0.86 mEq O₂/kg en el aceite de moringa control, mientras que para el aceite obtenido con previo tratamiento enzimático resultó de 1.26 mEq O₂/kg, encontrándose diferencias significativas entre ambas muestras. Este posible incremento en este índice puede ser debido al tratamiento enzimático. Además, Grompone

(1991) menciona que la utilización del índice de peróxido se limita a las etapas iniciales de la reacción debido a que los hidroperóxidos sufren reacciones posteriores de descomposición, pudiéndose obtener un índice de peróxido bajo porque la materia prima es de buena calidad o porque los hidroperóxidos se han reducido por algún proceso, enmascarando su deterioro verdadero. En este caso, el bajo índice de peróxido obtenido en el aceite de moringa se debe a que es un aceite estable debido a los tocoferoles presentes y a su composición de ácidos grasos en donde predomina el ácido oleico.

Ruttarattanamongkol *et al.* (2014) realizaron la extracción del aceite de moringa con prensa-*expeller* y obtuvo un índice de peróxido de 1.05 mEq O₂/kg, mientras que Sánchez *et al.* (2015) obtuvieron un valor de 1.0 mEq O₂/kg en el aceite crudo de moringa. En comparación a los resultados obtenidos, se obtuvo valores ligeramente inferiores (0.86 mEq O₂/kg) a los reportados por estos autores, pudiendo deberse estas variaciones a la procedencia de la semilla de moringa.

Nzikou *et al.* (2009) y Anwar y Rashid (2007) reportaron valores de peróxido de 1.67 y 1.27 mEq O₂/kg de aceite, respectivamente; estos valores son más altos que los obtenidos en el presente estudio. Shahidi *et al.* (2005) indican que el aumento de este valor podría ser causado por las bajas temperaturas durante la última fase de maduración en las semillas o por el uso de altas temperaturas en el proceso de extracción del aceite.

c. GRADO DE ACIDEZ

Se obtuvo una diferencia significativa en el grado de acidez entre el aceite de moringa control (1.23% expresado como ácido oleico) y el aceite de moringa con un previo tratamiento enzimático (1.51%). Shahidi (2005) menciona que la aplicación de enzimas requiere de un aumento de humedad del medio y de la temperatura dejando al aceite más expuesto a la humedad, lo que causa la hidrólisis de los triglicéridos aumentando la acidez del aceite. Además, esta degradación de la pared celular por el uso de enzimas se correlaciona también con un mayor rendimiento.

Tsaknis *et al.* (1999) obtuvieron un grado de acidez de 1.01 por ciento (expresado como ácido oleico) al realizar la extracción del aceite de moringa por prensado en frío, mientras que Lalas *et al.* (2001) encontraron un valor de 1.94 por ciento. Ruttarattanamongkol *et al.*

(2014) realizaron la extracción con prensa-expeller del aceite de moringa encontrando un valor de 1.13 por ciento. Los valores obtenidos en esta investigación (1.23 y 1.51%) son semejantes a los reportados por estos autores, quienes también realizaron la extracción por prensado.

d. ÍNDICE DE P-ANISIDINA

El índice de p-anisidina encontrado para el aceite de moringa control resultó de 0.31, mientras que el aceite de moringa con un previo tratamiento enzimático tuvo un índice de 0.33, no encontrándose diferencias significativas entre ambas muestras. Sánchez *et al.* (2015) mencionan que la p-anisidina reacciona con los productos secundarios de la oxidación, como aldehídos y cetonas, y eso sirve como un test estándar para la rápida caracterización de aceites. Los bajos valores de índice de p-anisidina obtenidos en el aceite de moringa se debe que no presentaba productos secundarios de la oxidación, ya que el aceite se encontraba en buen estado. Además, Grompone (1991) indica que los productos secundarios de la reacción de oxidación de las grasas y aceites son los responsables de proporcionar los malos olores y sabores en los aceites. El aceite de moringa obtenido no presentaba sabor ni olores rancios.

Sánchez *et al.* (2015) obtuvieron un índice de p-anisidina de 0.36 en el aceite crudo de moringa al realizar la extracción por solvente, valores semejantes fueron obtenidos en esta investigación (0.31 y 0.33), aunque el método de extracción usado (prensa-*expeller*) fuera diferente. Manzoor *et al.* (2007) obtuvieron un valor de 1.84 para *Moringa oleífera*, mientras Latif y Anwar (2008) reportaron un valor de 1.82 para *Moringa concanensis*. Los diferentes valores pueden ser debido a la influencia de varios agentes o catalizadores de oxidación como aire y luz (UV), al estado y procedencia de las semillas de moringa.

e. COEFICIENTES DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA

Por otro lado, los coeficientes de extinción molar en el ultravioleta son índices fisicoquímicos que se utilizan para detectar la presencia de compuestos oxidados como hidroperóxidos (k_{232}) o de productos secundarios de oxidación (k_{270}), como pueden ser los dienos conjugados, aldehídos, cetonas, etc., que alteran la calidad de los aceite. Los coeficientes de extinción k_{232} y k_{270} encontrados para el aceite de moringa control fueron de

1.25 y 0.11, respectivamente; mientras que para el aceite de moringa con un previo tratamiento enzimático se obtuvo un k_{232} de 1.27 y un k_{270} de 0.12. Los valores de absorción de radiación en el ultravioleta a 232 y 270 nm reflejaron bajas concentraciones, lo que evidencia el buen estado del aceite de moringa obtenido.

Shahidi *et al.* (2005) mencionan que la extinción específica a 232 nm mide el grado de la oxidación primaria, y que el efecto de esta oxidación es un reordenamiento de la estructura del doble enlace, promovida por la luz, calor, enzimas o metales. El valor de k_{232} en el aceite de moringa de este estudio resultaron 1.25 (control) y 1.27 (aceite con tratamiento enzimático), estos valores son menores a los reportados por Tsaknis *et al.* (1999) para *Moringa peregrina* (1.67) y Anwar *et al.* (2006) para *Moringa oleífera* (1.92), pero similar a los de Anwar y Rashid (2007) para el aceite de las semillas de *Moringa oleífera* (1.38).

Tsaknis *et al.* (1999) obtuvieron un coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} de 0.195 al realizar la extracción del aceite de moringa por prensado en frío, mientras que Anwar *et al.* (2003) reportan un valor de 0.31 al realizar la extracción del aceite de moringa por solvente. Los valores hallados en este estudio son menores a los reportados por estos autores, estos bajos valores de k_{270} del aceite de moringa muestra que solo se han producido cantidades menores de compuestos secundarios de la oxidación.

El aceite de moringa cumple con la normativa del aceite de oliva virgen ya que todos los parámetros de calidad se encuentran dentro del rango establecida por el Codex Alimentarius (2015).

4.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE MORINGA

Los resultados experimentales obtenidos en nuestro estudio se muestran en el Cuadro 7, donde se indica el porcentaje de cada ácido graso. Destacar que, el ácido graso mayoritario en el aceite de moringa es el ácido oleico, representando aproximadamente 72 por ciento. En otros aceites de semillas, por ejemplo girasol, oscila entre 15-85 por ciento, soja entre 20-35 por ciento y colza entre 50-65 por ciento (López y López, 2005). Tuberoso *et al.* (2007), comparan distintos aceites vegetales comestibles y concluyen que el aceite de cacahuete, colza y oliva están caracterizados por una alta cantidad de ácido oleico (58.3, 60.7 y 67.2%, respectivamente). En el aceite de oliva el ácido oleico puede representar un 79 por

ciento del total de ácidos grasos, pudiendo esa cantidad variar ampliamente, encontrando aceites con un porcentaje de ácido oleico, del orden del 57 por ciento y en otros puede incluso alcanzar el 82 por ciento (López y López, 2005).

Los datos encontrados con respecto al contenido de ácido oleico en el aceite de moringa son similares a los reportados por Abdulkarim *et al.* (2005), Tsaknis *et al.* (1999) y Lalas *et al.* (2001) quienes obtuvieron los siguientes valores de 70, 75.39 y 71 por ciento, respectivamente. El elevado porcentaje de ácido oleico en el aceite de moringa lo hace deseable en términos de nutrición y alta estabilidad de cocción y fritura (Siguel y Lerman, citado por Abdulkarim *et al.*, 2005).

Cuadro 7: Contenido de ácidos grasos del aceite de semillas de *Moringa oleífera* obtenido sin y con tratamiento enzimático

ÁCIDO GRASO	CONTENIDO (%)	
	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO
C 16:0 (palmítico)	5.91 ± 0.14 ^a	5.93 ± 0.06 ^a
C 16:1 (palmitoleico)	0.97 ± 0.03 ^a	0.99 ± 0.01 ^a
C 18: 0 (Estearico)	3.95 ± 0.01 ^a	3.96 ± 0.02 ^a
C 18: 1 w-9 (Oleico)	72.07 ± 0.03 ^a	71.97 ± 0.30 ^a
C 18: 1 w-7 (Vaccénico)	4.80 ± 0.01 ^a	4.79 ± 0.01 ^a
C 18: 2 w-6 (Linoleico)	0.61 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.01 ^a
C 18: 3 w-3 (α -linolénico)	0.20 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^a
C 20:0 (Araquídico)	2.54 ± 0.04 ^a	2.53 ± 0.04 ^a
C 20:1 w-9 (Eicosanoico)	1.83 ± 0.02 ^a	1.82 ± 0.01 ^a
C 22:0 (Behénico)	6.03 ± 0.11 ^a	6.04 ± 0.21 ^a
C 24:0 (Lignocérico)	1.13 ± 0.02 ^a	1.16 ± 0.09 ^a

*El análisis se realizó por duplicado

**Letras diferentes significa que hay diferencia significativa

Aceites vegetales con alto contenido de ácido oleico como el aceite de girasol, maíz y canola han sido encontrados que tiene suficiente estabilidad oxidativa para ser utilizada en aplicaciones exigentes como la fritura (Warner y Knowlton; citado por Abdulkarim *et al.*, 2005). Además, los ácidos grasos monoinsaturados, especialmente ácido oleico comparado con ácidos grasos poliinsaturados, son generalmente más estable contra la rancidez oxidativa, tanto a temperatura ambiente de almacenamiento como de fritura (Anwar y Rashid, 2007); por lo tanto el aceite de moringa presenta una gran estabilidad frente a la oxidación.

Además, aparecen otra serie de ácidos grasos en inferiores proporciones, encabezados por el ácido behénico (6.04%), palmítico (5.92%), vaccénico (4.8%) y esteárico (3.96%), con pequeñas cantidades de ácido palmitoleico, linoleico, linolénico y eicosanoico. No hubo diferencias significativas en las cantidades de los principales ácidos grasos en las dos muestras de aceite de moringa.

El aceite de moringa extraído con y sin previo tratamiento enzimático contienen una cantidad substancial de ácido behénico (6.04%). El aceite de moringa puede, por lo tanto, ser usado como una fuente natural de ácido behénico, que ha sido usado como un agente estructurante y solidificante en margarinas y en alimentos que contiene grasas semisólidas y sólidas, eliminando la necesidad de hidrogenar el aceite (FDA, 2001).

Cuadro 8: Resumen del contenido de ácidos grasos del aceite de moringa obtenido sin y con tratamiento enzimático

RESUMEN DE ÁCIDOS GRASOS	CONTENIDO (%)	
	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO
Saturados	19.48 ± 0.03 ^a	19.51 ± 0.30 ^a
Monoinsaturados	79.67 ± 0.04 ^a	79.57 ± 0.30 ^a
poliinsaturados	0.87 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.01 ^a

Además, en el Cuadro 8 se puede apreciar que el aceite de moringa se caracteriza por presentar principalmente ácidos grasos monoinsaturados (79.6%). Esto concuerda con Anwar y Rashid (2007) quienes mencionan que generalmente más del 75 por ciento de la composición del aceite de moringa son ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), especialmente ácido oleico (>73%).

4.5 CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE MORINGA

a. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Los compuestos fenólicos contienen propiedades antioxidantes que protegen a los aceites de la autooxidación. La acción antioxidante consiste en retrasar o inhibir la oxidación de lípidos u otras moléculas mediante la inhibición de la iniciación o propagación de estas reacciones. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, las cuales juegan un rol importante en la adsorción y neutralización de radicales libres (Zheng y Shioy; citado por Escobar, 2010).

Además la capacidad antioxidante de tales compuestos polares en sistemas lipídicos, se debe a que se localizan en la interfase lípido-aire, permitiendo una mejor protección contra el oxígeno molecular del aire que los antioxidantes lipofílicos, que permanecen en solución en fases oleosas y que, por lo tanto, actúan mejor en sistemas aceite en agua (O/W) (Fogliano *et al.*; citado por Escobar, 2010).

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de polifenoles totales de las muestras de aceite de moringa analizadas. Se encontró diferencias significativas en la concentración de polifenoles totales entre el aceite de moringa control (53.4 mg/kg expresado en ácido gálico) y el aceite de moringa extraído con previo tratamiento enzimático (65.7 mg/kg expresado en ácido gálico). Los valores en esta investigación son superiores a los reportados por Ogbunugafor *et al.* (2011) quienes obtuvieron un valor de 40.17 mg/kg de polifenoles totales presentes en el aceite de moringa, con la diferencia que el método de extracción fue por solvente.

Cuadro 9: Contenido de polifenoles totales del aceite de moringa obtenido sin y con tratamiento enzimático

	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO
Polifenoles totales (mg ácido gálico/kg)	53.4 ± 2.26 ^a	65.7 ± 2.79 ^b

*El análisis se realizó por triplicado

**Letras diferentes significa que hay diferencia significativa

Los métodos tradicionales para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos, como el de Folin-Ciocalteu, se basan en técnicas espectrofotométricas, sin embargo, la gran variedad de compuestos fenólicos que existen hace que el grado de selectividad de estas técnicas no sea del todo adecuado pues es difícil encontrar una longitud de onda que vaya bien para todos los fenoles. Además, estas técnicas son muy sensibles a interferencias lo que puede llevar a una sobreestimación de los resultados (Antolovich *et al.*, 2000).

Al comparar los resultados del contenido de compuestos fenólicos totales del aceite de moringa obtenidos con y sin tratamiento enzimático (65.7 y 53.4 mg ácido gálico/kg, respectivamente), se observa un mayor valor en el primero. Meyer *et al.* (1998) mencionan que las enzimas hidrolíticas actúan sobre las paredes celulares de las semillas pudiendo provocar una mejora en la extracción de compuestos con actividad antioxidante en el aceite, es por ello que probablemente el contenido de polifenoles aumentó tras la aplicación de dicho tratamiento. Por otro lado, Capannesi *et al.* (2000) mencionan que durante la hidrólisis enzimática ocurre reacciones de degradación, así que esto pudo haber ocasionado el fraccionamiento de las moléculas de fenoles más grandes con la formación de componentes más pequeñas que pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, generando por consiguiente un mayor valor de polifenoles totales en el aceite extraído con previo tratamiento enzimático.

Valavanidis *et al.* (2004) determinaron el contenido en polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en distintos aceites vegetales comestibles, encontrando valores de 170-210

mg/kg en aceite de oliva virgen extra, 60-80 mg/kg en aceite de soja, 3-4 mg/kg en aceite de girasol y menos de 1 mg/kg en aceite de maíz (datos expresados en ácido gálico).

Se ha observado que los valores obtenidos en aceite de oliva virgen son bastante dispares, así pueden variar desde 50 a 800 mg/kg, expresados como ácido cafeico (Ramírez y Quiles, 2005); mientras que Pellegrini *et al.* (2001) encontró valores comprendidos entre 73-265 mg/kg en aceites de oliva virgen extra, entre 14-24 mg/kg en aceites de oliva y de 4 mg/kg en aceite de oliva refinado (datos expresados en ácido gálico). Al comparar el contenido de polifenoles del aceite de moringa con los valores reportados por cada tipo de aceite de oliva, se concluye que el aceite de moringa presenta un contenido de polifenoles totales semejante al aceite de oliva virgen.

El correspondiente análisis por HPLC muestra que los compuestos fenólicos más importantes como antioxidantes (tirosoles, hidroxitirosoles, oleuropeína) están prácticamente ausentes en aceites de girasol y maíz, y en cantidades traza en aceite de soja. En el caso del aceite de moringa, no se encontraron investigaciones donde se realice la identificación de los compuestos fenólicos presentes en este aceite; sin embargo, Govardhan *et al.* (2013), identificaron al ácido gálico, ácido cafeico, catequina, epicatequina y al ácido p-cumárico en la semilla de moringa, así que posiblemente estos compuestos fenólicos pueden encontrarse en el aceite de moringa.

b. CONTENIDO DE TOCOFEROLES

Los tocoferoles actúan como antioxidantes atrapando los hidroperóxidos y deteniendo la reacción en cadena del proceso de autooxidación en grasas y aceites. En concreto, el γ -tocoferol muestra una fuerte actividad antioxidante protegiendo otros compuestos del aceite, como los ácidos grasos y el α -tocoferol actúa sobre aspectos de la nutrición humana y la salud (Tuberoso *et al.*, 2007). En este estudio se determinó que en el aceite de moringa el isómero mayoritario es el α -tocoferol, además de presentar una cantidad elevada de γ -tocoferol. Los resultados del contenido de tocoferoles se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10: Contenido de tocoferoles del aceite de moringa (mg/kg de aceite) obtenido sin y con tratamiento enzimático

TOCOFEROL	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO
α -Tocoferol	274,65 \pm 0.18 ^a	252,98 \pm 0.17 ^b
β -Tocoferol	19.26 \pm 0.17 ^a	19.02 \pm 0.30 ^a
γ -Tocoferol	42.87 \pm 1.42 ^a	48.71 \pm 1.44 ^a
δ -Tocoferol	8.07 \pm 0.30 ^a	8.34 \pm 0.37 ^a
Tocoferoles totales	344.85 \pm 1.47 ^a	329.05 \pm 2.30 ^b

*El análisis se realizó por duplicado

**Letras diferentes significa que hay diferencia significativa

Los niveles de tocoferoles totales en el aceite de moringa fue de 344.85 mg/kg y de 329.05 mg/kg para el aceite de moringa extraído con previo tratamiento enzimático, encontrándose diferencias significativas solo en el contenido de α -tocoferoles. Estos datos resultan superiores a los niveles de tocoferoles totales reportados por Latif y Anwar (2008) quienes obtuvieron 120.39 mg/kg, sin embargo, en ese estudio se extrajo el aceite por solvente y la variedad de moringa usada fue *Moringa concanensis*, no *Moringa oleífera*. Además, Ruttarattanamongkol *et al.* (2014) obtuvieron una concentración de 198.5 mg/kg de tocoferoles totales, en donde solo identificaron el α -tocoferol (137.8 mg/kg) y γ -tocoferol (60.7 mg/kg); siendo los valores obtenidos en esta investigación superiores a los reportados por estos autores.

En este estudio, el isómero mayoritario es α -tocoferol, representando un 80 por ciento, comparado con el γ -tocoferol (12%), el β -tocoferol (6%) y el δ -tocoferol (2%). Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Latif y Anwar (2008) el α -tocoferol es la forma predominante pero con una menor proporción (66%); el segundo tocoferol que se encuentra en mayor proporción es el δ -tocoferol con 25 por ciento y el γ -tocoferol se encuentran como componente minoritario (9%), mientras que el β -tocoferol no fue identificado. Estas diferencias en las proporciones de los diferentes isómeros se deben principalmente al método de extracción empleado y a la variedad de semilla de moringa usada.

Fennema (2000) indica que el aceite vegetal comestible con mayor proporción en α -tocoferol es el de girasol (564 mg/kg); los aceites donde predomina el γ -tocoferol son el de soja y de maíz (604 y 566 mg/kg, respectivamente); otros aceites presentan similar proporción de ambos isómeros: el aceite de cacahuete, 141 mg/kg de α -tocoferol y 131 mg/kg de γ -tocoferol; el aceite de algodón, 403 y 383 mg/kg de α y γ -tocoferol, respectivamente.

En aceites de oliva vírgenes españoles, se han cuantificado niveles de 86.6 mg/kg (Gimeno *et al.*, 2000), 121 mg/kg (Ruiz *et al.*, 1995), 55-324 mg/kg (Salvador *et al.*, 2003). Pellegrini *et al.* (2001) en un estudio realizado en aceites italianos, aportan valores comprendidos entre 251-369 mg/kg de α -tocoferol en aceite de oliva virgen extra, entre 146-194 mg/kg en aceite de oliva y de 138 mg/kg en aceite de oliva refinado. El contenido de tocoferoles totales recomendado por la Consejo Oleícola Internacional (COI) para aceites de oliva vírgenes de calidad oscila entre 100 y 250 mg/kg, y en este caso el aceite de moringa supera este rango, por lo que se puede afirmar que los valores obtenidos de tocoferoles totales y concretamente, de γ tocoferol en los aceite de moringa analizados (42.87 y 48.71 mg/kg), van a ejercer una influencia muy positiva sobre la estabilidad comercial y resistencia a tratamientos térmicos de este aceite.

Espín *et al.* (2000) y Valavanidis *et al.* (2004) recuerdan que los tocoferoles presentan diferente estabilidad a elevadas temperaturas, que disminuye en el orden $\alpha < \beta < \gamma \approx \delta$. Gutiérrez y Fernández (2002) señalan que el α -tocoferol es uno de los antioxidantes naturales que se destruye más fácilmente durante el proceso oxidativo. Esta puede ser una de las causas en la diferencia de α -tocoferol determinado entre el aceite de moringa control (274.65 mg/kg) y el aceite extraído con tratamiento enzimático previo (252.98 mg/kg), ya que en este último se utiliza altas temperaturas (80 °C) para la inactivación enzimática y podría haber causado la destrucción del α -tocoferol.

Ryan *et al.* (1998) mencionan que las cantidades más bajas de tocoferoles totales aparecen en muestras que presentan por lo general una acidez y un índice de peróxidos elevados. En nuestro caso, el aceite de moringa extraído con un tratamiento enzimático previo presentó valores de acidez e índice de peróxido más elevados que el aceite de moringa control, mostrando esta correlación ya que el aceite de moringa extraído con un tratamiento enzimático previo presentó un contenido menor de tocoferoles.

c. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En el Cuadro 11 se muestra los resultados de la capacidad antioxidante hidrofílica, lipofílica y total del aceite de moringa extraído con y sin tratamiento enzimático. No hubo diferencias significativas entre la capacidad antioxidante lipofílica, hidrofílica y total de las 2 muestras de aceite.

Cuadro 11: Capacidad antioxidante por el método de ABTS del aceite de moringa (mmol Trolox/kg aceite) obtenido sin y con tratamiento enzimático

	SIN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO
Capacidad antioxidante hidrofílica	0.58 ± 0.01 ^a	0.61 ± 0.01 ^a
Capacidad antioxidante lipofílica	1.12 ± 0.10 ^a	1.15 ± 0.11 ^a
Capacidad antioxidante total	1.70 ± 0.11 ^a	1.76 ± 0.12 ^a

*El análisis se realizó por triplicado

**Letras diferentes significa que hay diferencia significativa

En el método ABTS, se recomienda según algunos autores, realizar las medidas a los 30 minutos (Pellegrini *et al.*, citado por Samaniego, 2006) o a los 15 minutos (Cano *et al.*, citado por Samaniego, 2006) para que dé tiempo a reaccionar a todos los compuestos. En este estudio el tiempo de reacción elegido fue cuando la lectura de la absorbancia de las muestras permanecía constante, siendo este tiempo igual a 30 minutos.

Según Pérez y Saura (2006), los compuestos antioxidantes de los alimentos se extraen con disolventes de diferentes polaridades de acuerdo con el carácter hidrofílico o lipofílico de los compuestos que se desean evaluar. El disolvente más comúnmente utilizado en la obtención de extractos lipofílicos es el hexano. También se han utilizado el eter dietílico y cloruro de metileno entre otros. Para la extracción de compuestos con carácter hidrofílico se han utilizado metanol, etanol, mezclas de etanol/agua, acetona/agua y metanol/agua. Recientemente se ha observado que el tipo de disolvente y la polaridad puede afectar a la transferencia del electrón singlete y a la del átomo de hidrogeno, los cuales son esenciales en la medida de la capacidad antioxidante. Para esta investigación se usó hexano para la obtención del extracto lipofílico y una mezcla de metanol agua para el extracto hidrofílico.

Con respecto a la capacidad antioxidante hidrofílica, el aceite de moringa control presentó un valor de 0.58 mmol Trolox/kg de aceite, mientras que para el aceite de moringa asistido con un previo tratamiento enzimático resultó de 0.61 mmol Trolox/kg de aceite. Gorinstein *et al.*, citado por Marfil (2008) aportan valores TEAC en aceites de oliva virgen que oscilan entre 0.78-2.64 mmol Trolox/kg. Espín *et al.* (2000) resaltan que en la fracción hidrofílica o polar de los aceites vegetales se extraen principalmente los compuestos fenólicos. Brenes *et al.* (1999), Valavanidis *et al.* (2004) y Franconi *et al.* (2006) citado por Marfil (2008) puntualizan que esta fracción contiene la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen, lignanos y oleuropeína, entre otros compuestos.

En este estudio se observa una correlación entre el contenido polifenólico total del aceite con la capacidad antioxidante, observándose que el aceite de moringa asistido con un previo tratamiento enzimático presentó un mayor contenido fenólico y a la vez una mayor capacidad antioxidante que el aceite control. Marfil (2008) encuentra esta misma correlación entre el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante en el aceite de argán, mientras que otros autores como Velioglu *et al.* (1998), también comprueban esta correlación en distintos productos como verduras, hortalizas, frutas y semillas.

La capacidad antioxidante lipofílica del aceite de moringa control fue de 1.12 mmol Trolox/kg de aceite, mientras que para el aceite de moringa asistido con un previo tratamiento enzimático resultó de 1.15 mmol Trolox/kg de aceite. Se obtuvo una mayor capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica en el aceite con un tratamiento enzimático previo, estos mismos resultados son obtenidos por Wiesman (2009) quien reporta un aumento considerable de compuestos antioxidantes en el aceite de oliva cuya extracción fue previamente asistida por enzimas, esto debido a que las enzimas hidrolíticas actúan sobre las paredes celulares de las semillas pudiendo provocar una mejora en la extracción de compuestos con actividad antioxidante en el aceite.

Con respecto a la capacidad antioxidante lipofílica realizado con el método ABTS, Pellegrini *et al.* (2001) en un estudio llevado a cabo en Italia, obtienen valores TEAC comprendidos entre 1.53-2.69 mmol Trolox/kg en aceite de oliva virgen extra y entre 0.72-1.06 mmol Trolox/kg en aceite de oliva. Los valores encontrados en este estudio para el aceite de moringa (1.12 y 1.15 mmol Trolox/kg de aceite) se asemejan a la capacidad antioxidante reportada para el aceite de oliva.

Tuberoso *et al.* (2007) realizaron la determinación de capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica en diferentes aceites vegetales y encontró que la razón entre la capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica (LF/HF) muestra que la parte lipofílica predomina sobre la parte hidrofílica encontrándose valores de LF/HF entre 1.83 (aceite de oliva) y 7.38 (aceite de girasol). Esto significa que la contribución de la parte lipofílica es muy fuerte y que está conectada con el contenido de tocoferoles. La razón de capacidad antioxidante LF/HF para el aceite de moringa (1.90) es muy similar al reportado para el aceite de oliva, por lo que se puede indicar que hay un predominio de compuestos antioxidantes lipofílicos como los tocoferoles.

Pellegrini *et al.* (2001) reporta valores de capacidad antioxidante total por el método ABTS entre 1.53 a 2.69 mmol Trolox/kg de aceite para aceites de oliva extra virgen y de 0.72 a 1.06 mmol Trolox/kg de aceite para aceites de oliva, indicando que la diferencia se debe a diferentes procesos de manufactura. Además, menciona que la capacidad antioxidante total del aceite de oliva se debe a su contenido de polifenoles y tocoferoles.

En un estudio realizado por Pellegrini *et al.* (2003) utilizando el método ABTS se reportan valores de capacidad antioxidante total de 1.79 mmol Trolox/kg en aceite de oliva virgen extra, de 0.63 mmol Trolox/kg en aceite de oliva, de 1.29 mmol Trolox/kg en aceite de maíz, de 2.20 mmol Trolox/kg en aceite de soja, de 1.17 mmol Trolox/kg en aceite de girasol y de 0.61 mmol Trolox/kg en aceite de cacahuete. Los valores de capacidad antioxidante total del aceite de moringa (1.70 y 1.76 mmol Trolox/kg aceite) son similares al de aceite de oliva extra virgen

4.6 DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE MORINGA

Se realizó la determinación de tiempo de vida en anaquel del aceite de moringa extraído sin tratamiento enzimático debido que a pesar de que se obtuvo un menor rendimiento en comparación al aceite extraído con el uso de enzimas, esta diferencia no fue tan elevada que justifique el uso de la enzima; además, se encontró un mayor índice de peróxido y grado de acidez en el aceite de moringa extraído con el uso de enzimas ocasionando un mayor deterioro del aceite, mientras que el aceite control presentó índices de deterioro más bajos.

4.6.1 DETERMINACIÓN DEL ORDEN DE REACCIÓN

Para determinar el orden de reacción de deterioro del aceite de moringa se empleó el método de integración planteado por Labuza y Riboh (1982), según la ecuación 1. Los valores experimentales del índice de peróxido, grado de acidez, coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} y k_{270} y el tiempo, fueron reemplazados en el método de integración planteado por Labuza y Riboh (1982) según la ecuación 2 y 3.

Los resultados del estudio demuestran que se da una oxidación progresiva del aceite de moringa durante el almacenamiento, lo que se traduce en un incremento del índice de peróxidos, grado de acidez y coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} y k_{270} .

Cabe resaltar que la tendencia de la curva del tratamiento 60 °C muestra una pendiente más pronunciada en comparación a los tratamientos de 50 y 40 °C, repitiéndose este comportamiento en los cuatro factores de calidad evaluados. Esto puede deberse a que la temperatura ejerce una gran influencia en la constante de velocidad de reacción, por lo que a una mayor temperatura se acelerarán las reacciones de deterioro.

Debido a que no existen límites establecidos por organismos internacionales y nacionales para el aceite de moringa se tomaron como referencia los límites para el aceite de oliva virgen pues presentan similar perfil de ácidos grasos; esto mismo es mencionado por Martín *et al.* (2013) y Tsankis *et al.* (1999).

Los datos experimentales de las determinaciones del índice de peróxido con respecto al tiempo se presentan en el Cuadro 12 y Figura 7.

Cuadro 12: Variación del índice de peróxido en el tiempo por temperatura de almacenamiento

TIEMPO (DÍAS)	ÍNDICE DE PERÓXIDO (meq O ₂ /kg)		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	1.17	1.17	1.17
5	1.36	1.72	1.93
10	1.58	2.09	1.76
15	1.82	2.55	3.09
20	2.09	2.92	3.94
25	2.42	3.62	4.71
30	2.55	4.01	5.54
35	2.77	4.15	8.08
40	3.03	5.69	11.33

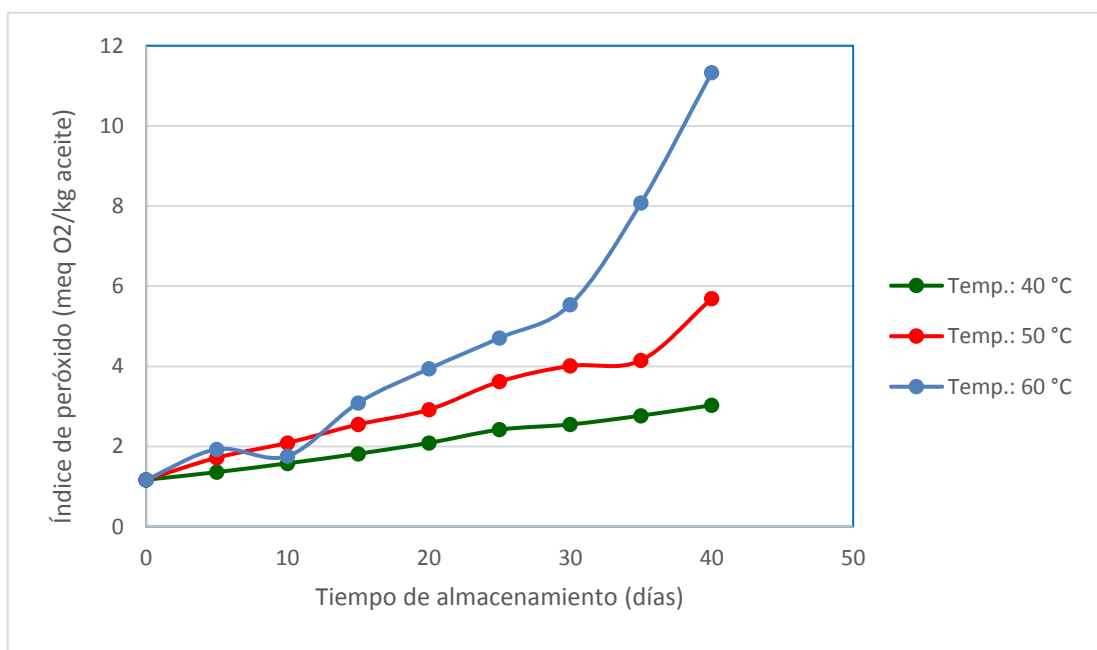


Figura 7: Variación del índice de peróxido en función al tiempo de almacenamiento.

Los valores reportados en el Cuadro 12 a los tratamientos con las temperaturas analizadas, 40, 50 y 60 °C no llegaron a alcanzar el valor máximo permitido por el Codex Alimentarius (2015) (≤ 20 meq O₂/kg. aceite), siendo el valor más alto reportado de 11.33 (meq O₂/kg. aceite) a la temperatura de 60 °C, esto se puede deber a la gran estabilidad que presenta el aceite de moringa y a la presencia de compuestos antioxidantes que contiene.

Los peróxidos se consideran como los primeros productos de la oxidación de los aceites y su formación sigue, al menos durante las primeras etapas, una marcha paralela a la cantidad de oxígeno absorbido (Marfil, 2008).

Por su parte, Bailey (2001) afirma que durante las primeras fases de la oxidación los peróxidos formados parecen ser relativamente estables, de tal forma que su concentración aumenta paralelamente a la absorción de oxígeno por la grasa. En las últimas fases, sin embargo, comienzan a descomponerse y forman compuestos causantes de la rancidez con modificación del olor y del sabor. Ángeles (2002) agrega que los olores y sabores a rancios que se han producido en el aceite se deben a la descomposición de los hidroperóxidos y la formación de productos secundarios como aldehídos, cetonas y ácidos de bajo peso molecular. Al realizar las evaluaciones del índice de peróxido en los últimos días de almacenamiento se evidencia un olor a rancio, principalmente el aceite de moringa almacenada a 60 °C, evidenciándose la oxidación del aceite.

Los peróxidos son radicales inestables formados a partir de los triglicéridos; un índice de peróxido elevado es un indicador de que el producto tiene un gran potencial de rancidez y que puede fallar cuando se encuentre en el anaquel (Navas, 2010). El índice de peróxido inicial del aceite de moringa resultó de 1.17 meq O₂/kg aceite, este bajo valor del índice podría significar que este aceite no tiene un gran potencial a enranciarse.

Debido a la formación de los radicales libres los cuales se pueden apreciar por el aumento de acidez, estos radicales son rápidamente susceptibles al ataque del oxígeno atmosférico, resultando en la formación de peróxidos e hidroperóxidos (Marfil, 2008).

Choe y Min (2006) señalan que la velocidad de formación de radicales peróxidos e hidroperóxidos depende solamente de la disponibilidad de oxígeno y la temperatura. A la temperatura de 40 y 50 °C hubo un incremento en el contenido de peróxidos, mientras que

a la temperatura de 60 °C se obtuvo un mayor incremento de este índice. Esto puede deberse a que la formación de productos de la autooxidación en el periodo de inducción es lenta a bajas temperaturas. (Choe y Min, 2006)

Las reacciones de autooxidación habitualmente presentan un periodo de inducción, durante el cual se producen cambios muy pequeños en los lípidos. Tras el periodo de inducción, el deterioro oxidativo de los lípidos se produce mucho más rápidamente; los sabores inadecuados son más notables al final del proceso de inducción (Pokorny *et al.*, citado por Landeo, 2009). Esta tendencia puede observarse en la Figura 7, en la que se muestra que durante los primeros días de almacenamiento hay un ligero incremento del índice de peróxido, sin embargo, conforme aumenta el tiempo de almacenamiento se presenta un cambio exponencial en el índice de peróxidos del aceite de moringa.

Existen una serie de factores que influyen sobre la velocidad de oxidación; unos retardándola, como son ciertas sustancias denominadas “antioxidantes”, y otras acelerándola. Dentro de estos últimos, los principales son: luz, calor (elevada temperatura o cambios bruscos de temperatura), trazas metálicas, catalizadores orgánicos, humedad, restos de materia orgánica, etc. (Marfil, 2008). En este estudio se usó elevadas temperaturas para acelerar la oxidación del aceite de moringa.

La autooxidación o rancidez oxidativa es la principal causa de la pérdida de calidad en los aceites crudo y refinados durante su almacenamiento. La estabilidad oxidativa y deterioro de los aceites dependen de su composición inicial, concentración de compuestos menores como los antioxidantes, grado de procesamiento y las condiciones de su almacenamiento (Taylor, 2005). En concordancia con esto, el contenido de polifenoles y tocoferoles y el contenido de ácidos grasos que presente el aceite de moringa serán esenciales para minimizar el deterioro del aceite.

Gutiérrez y Fernández (2002) y Romani *et al.* (2007) inciden en las condiciones de almacenamiento y conservación del aceite, como punto crítico para preservar su contenido tanto en polifenoles como en tocoferoles, con gran influencia de la temperatura y exposición a la luz. Es bien conocido, que el contenido en polifenoles y tocoferoles resulta un parámetro importante en la vida media de los aceites, a fin de preservar su composición química y

características organolépticas. Ambos aspectos presentan gran relevancia en el aceite de moringa, ya que son de gran interés por su valor nutricional.

Espín *et al.* (2000) y Valavanidis *et al.* (2004) recuerdan que los tocoferoles presentan diferente estabilidad a elevadas temperaturas, que disminuye en el orden $\alpha < \beta < \gamma \approx \delta$. Gutiérrez y Fernández (2002) señalan que el α -tocoferol es uno de los antioxidantes naturales que se destruye más fácilmente durante el proceso oxidativo. En este sentido, se concluye que los valores obtenidos de tocoferoles totales y concretamente, de γ -tocoferol en los aceites de moringa analizados, van a ejercer una influencia positiva sobre la estabilidad comercial y resistencia a tratamientos térmicos de este aceite.

Los datos experimentales de las determinaciones del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} con respecto al tiempo se presentan en el Cuadro 13 y Figura 8.

Cuadro 13: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} en el tiempo por temperatura de almacenamiento

TIEMPO (DÍAS)	COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA		
	K_{232}		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	1.27	1.27	1.27
5	1.49	1.60	1.71
10	1.55	1.66	1.84
15	1.66	1.82	2.02
20	1.70	1.88	2.18
25	1.74	1.92	2.34
30	1.83	1.99	2.49
35	1.91	2.20	2.58
40	1.92	2.36	2.63

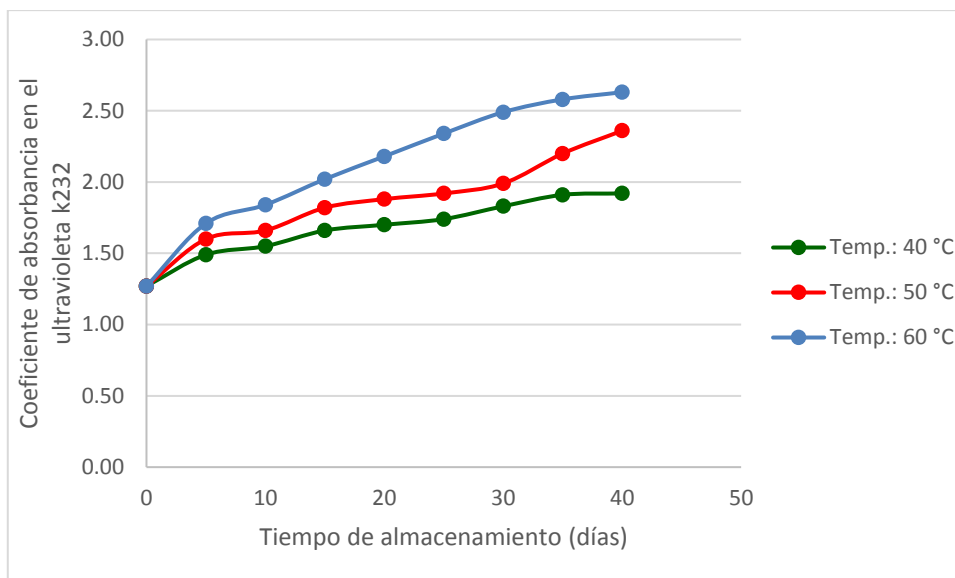


Figura 8: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₃₂ en función al tiempo de almacenamiento.

Los datos experimentales de las determinaciones del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₇₀ con respecto al tiempo se presentan en el Cuadro 14 y Figura 9.

Cuadro 14: Variación del coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₇₀ en el tiempo por temperatura de almacenamiento

TIEMPO (DÍAS)	COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K ₂₇₀		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.114	0.114	0.114
5	0.130	0.138	0.147
10	0.138	0.147	0.152
15	0.146	0.155	0.161
20	0.150	0.160	0.168
25	0.153	0.165	0.177
30	0.157	0.170	0.186
35	0.163	0.178	0.197
40	0.169	0.189	0.207

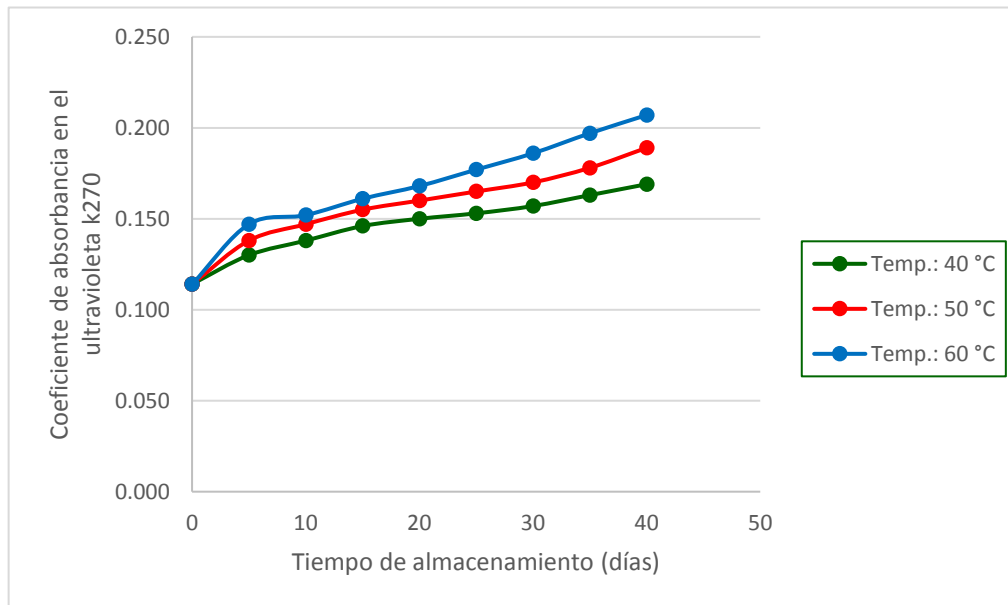


Figura 9: Variación del coeficiente de absorción en el ultravioleta k270 en función al tiempo de almacenamiento.

Luego de 40 días de almacenado el aceite de moringa a 40, 50 y 60 °C, se observa que los valores reportados en los Cuadros 13 y 14 para el coeficiente de absorción en el ultravioleta a 232 y 270 nm, respectivamente, se encuentran en los límites de los valores reportados por el Codex Alimentarius (2015) para el aceite de oliva virgen (2.6 y 0.2 para los coeficientes de extinción a 232 y 270 nm, respectivamente).

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos (Marfil, 2008).

El estudio de la zona de absorción ultravioleta que va desde 220-300 nm es indispensable para conocer no sólo el estado de oxidación de un aceite, sino también modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos o bien, una posible adulteración (Marfil, 2008).

Los ácidos grasos insaturados son sensibles a las oxidaciones autocatalíticas, induciendo la extensión de este proceso a otros ácidos grasos. En primer lugar aparecen hidroperóxidos,

poco estables, que absorben cerca de una longitud de onda de 232 nm. A continuación, son las dicetonas y las cetonas insaturadas las que absorben cerca de los 270 nm. También pueden formarse hidroxilos y carbonilos, que incrementan la absorbancia de la radiación ultravioleta entre 260 y 280 nm, con un máximo alrededor de 270 nm. El coeficiente de absorbancia en el ultravioleta específica aumenta conforme la alteración oxidativa es mayor, hasta fases muy avanzadas (Marfil, 2008). Estos índices son usados en este estudio de vida útil del aceite de moringa para complementar la información obtenida mediante el índice de peróxido.

La temperatura de almacenamiento jugo un papel importante en la velocidad de oxidación. La formación de dienos conjugados, medidos a una absorbancia de 232 nm, producto de la oxidación primaria del aceite fue más rápida a la temperatura de 60 °C. Paralelamente, la velocidad de formación de compuestos secundarios de la oxidación siguió esta misma tendencia, siendo mayor a la temperatura de 60 °C que a las temperaturas de 50 y 40 °C.

En la Figura 8 y 9 se puede apreciar que la velocidad de reacción para las tres temperaturas de trabajo a una absorbancia de 232 nm se da mucho más rápido que a una absorbancia de 270 nm, esto se debe a que hay una mayor formación de hidroperóxidos que productos secundarios (aldehídos, cetonas y alcoholes) en todo el proceso de oxidación.

Durante la fase inicial y de propagación de la oxidación, la formación de dienos conjugados medidos a una absorbancia de 232 nm muestran un comportamiento similar con el índice de peróxido para las tres temperaturas de trabajo; además, en estas temperaturas parte de los hidroperóxidos se descomponen en productos secundarios, produciendo aldehídos durante el proceso de inducción, siendo el de mayor porcentaje los productos primarios (Pokorny *et al.*; citado por Landeo, 2009).

Los datos experimentales de las determinaciones del porcentaje de ácidos grasos con respecto al tiempo se presentan en el Cuadro 15 y Figura 10.

Cuadro 15: Variación de la acidez libre en el tiempo por temperatura de almacenamiento

TIEMPO (DÍAS)	ACIDOS GRASOS LIBRES (% ÁCIDO OLEICO)		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	1.30	1.30	1.30
5	1.33	1.34	1.34
10	1.43	1.41	1.47
15	1.46	1.50	1.48
20	1.53	1.54	1.57
25	1.45	1.60	1.72
30	1.48	1.61	1.76
35	1.57	1.62	1.77
40	1.63	1.84	2.12

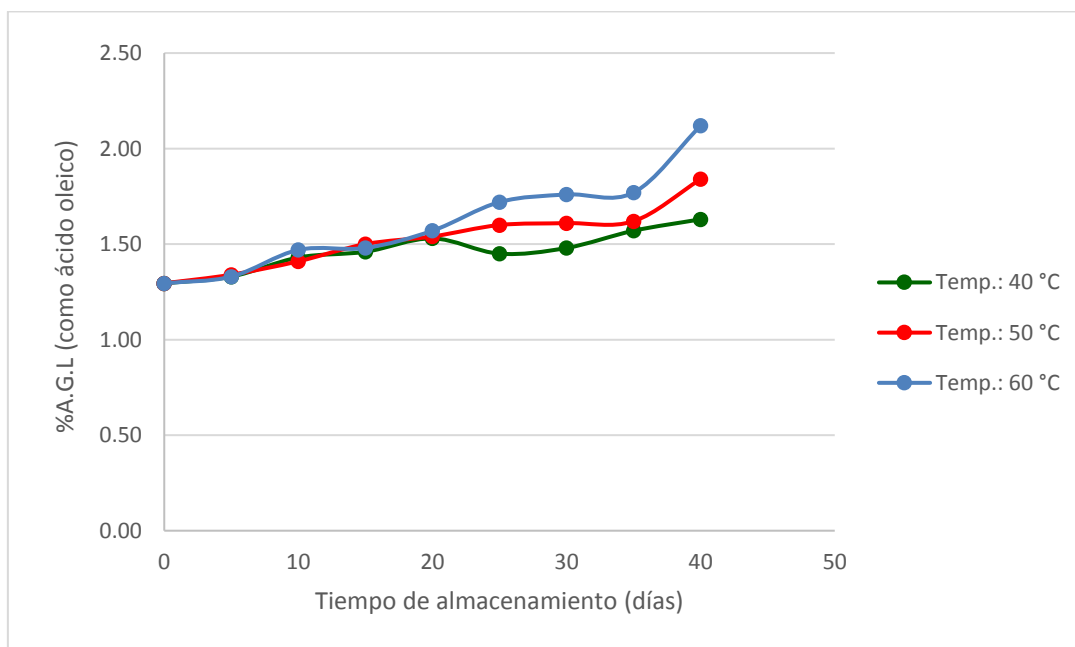


Figura 10: Variación del porcentaje de ácidos grasos libres en función al tiempo de almacenamiento.

Se analizó el incremento del porcentaje de ácidos grasos libres en función de la temperatura en un tiempo determinado para los cuales se emplearon como variables tres temperaturas de almacenamiento (40, 50 y 60 °C), como se puede observar en el Cuadro 15 y Figura 10. En términos generales la calidad del aceite disminuye al aumentar la temperatura con el transcurso del tiempo.

El tiempo de evaluación del aceite de moringa fue de 40 días en el cual los valores experimentales al final del tiempo de estudio para la temperatura de 60 °C superaron los límites establecidos por el Codex Alimentarius (2015), ($\leq 2.0\%$ expresado como ácido oleico), mientras que para las temperaturas de 40 y 50 °C no se llegó a superar este límite.

Según los resultados mostrados en el Cuadro 16, observamos que existe una relación directa entre el incremento de las constantes de velocidad de reacción al aumentar la temperatura de almacenamiento. El factor en estudio (% de ácidos grasos libres) de las muestras almacenadas se incrementa más rápidamente a temperatura de 60 °C que a temperaturas de 50 y 40 °C y luego de 40 días observamos el porcentaje de ácidos grasos llegó a 2.12, 1.84 y 1.63, respectivamente. Esto mismo es señalado por Choe y Lee (2006) quienes mencionan que la autooxidación se desarrolla lentamente a bajas temperaturas y que la velocidad se incrementa cuando la temperatura se incrementa.

Gracian, citado por Landeo (2009) menciona que la acidez por su sola presencia no tiene efecto despreciativo sobre la grasa, son las laceraciones que van asociadas a la acidificación las responsables directamente de la disminución en la calidad del producto. Es por ello que la acidez por sí sola no basta para definir la calidad de un aceite; por lo tanto, es necesario buscar otros criterios complementarios que ayuden a la calificación de los aceites (coeficiente de absorbancia en el ultravioleta, índice de peróxidos, etc.).

Las oxidaciones se realizan en los ácidos grasos no saturados que, cuando están libres, se oxidan por lo general más rápidamente que cuando son parte de moléculas de triglicéridos o fosfolípidos. Pero es sobre todo el grado de insaturación el que influye en la velocidad de oxidación. Los ácidos grasos saturados sólo se oxidan a temperaturas superiores a 60 °C, mientras que los poliinsaturados se oxidan incluso durante el almacenamiento de los alimentos en estado congelado (Martínez, 2010). En el caso del aceite de moringa, debido

a que este aceite está formado principalmente por ácidos grasos saturados y monoinsaturados es menos propenso a la oxidación.

Se ha encontrado que los aceites vegetales con alto contenido en ácido oleico tienen suficiente estabilidad oxidativa para ser utilizados en aplicaciones exigentes tales como la fritura (Corbett; citado por Abdulkarim *et al.*, 2005). Los estudios llevados a cabo sobre el efecto de la fritura de alimentos sobre las propiedades del aceite de *M. oleífera* han demostrado que este aceite es estable a la oxidación. Tsaknis *et al.* (1999) y Lalas *et al.* (2001) informaron que el aceite prensado en frío tenía una mejor estabilidad a la fritura en comparación con el aceite extraído con hexano y que el aceite de oliva virgen tenía la mayor resistencia a la degradación térmica.

Cabe destacar que un elevado contenido de ácido oleico (en torno al 80%) y relativamente bajo en ácido linoleico se traduce en un elevado coeficiente de insaturación lo que proporciona gran estabilidad oxidativa a los aceites (Ángeles *et al.*, 2005). El ácido oleico en el aceite de moringa representa el 72 por ciento y el ácido linoleico 0.6 por ciento lo cual se traduciría en una gran estabilidad en este aceite.

El aceite de moringa contiene aproximadamente 13-18 por ciento de ácidos grasos saturados y 82-87 por ciento de ácidos grasos insaturados, por lo que puede soportar rancidez oxidativa (Anwar y Rashid, 2007) y puede tener una vida útil de cinco años debido a su excepcional estabilidad oxidativa (Ramachandran *et al.*, 1980). El aceite extraído de las semillas de *Moringa oleífera* se compone de un 82 por ciento de ácidos grasos insaturados, 70 por ciento de los cuales son ácido oleico. Este aceite contiene el mismo perfil de ácidos grasos que el aceite de oliva, excepto por el ácido linoleico (Tsaknis *et al.*, 1999). Sin embargo, actualmente las semillas de *Moringa oleífera* no son utilizadas ampliamente para la extracción, el procesamiento y la comercialización de aceite.

Se determinó que el índice de peróxido y la acidez libre se ajusta mejor a un orden de reacción igual a uno ($n=1$), al presentar mayores valores del coeficiente de determinación (r^2), comparados con los de orden cero (Anexo 3 y 9); mientras que los coeficientes de extinción k_{232} y k_{270} se ajustan mejor a un orden de reacción igual a cero ($n=0$), al presentar mayores valores del coeficiente de determinación (r^2), comparados con los de primer orden (Anexo 5 y 7).

4.6.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN

Los resultados de análisis de regresión lineal al que fueron sometidos los datos experimentales para la variación del índice de peróxido, coeficientes de extinción k_{232} y k_{270} y acidez libre se muestran en el Cuadro 16; a partir de este cuadro podemos afirmar que existe una relación directa entre el incremento de las constantes de velocidad de reacción conforme se incrementa la temperatura de almacenamiento.

Cuadro 16: Constantes experimentales de la velocidad de reacción (k) en función de la temperatura

CONSTANTES DE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN (K)	TEMPERATURA (°C)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Índice de peróxido (meq O ₂ /días/kg. aceite)	0.0240	0.0354	0.0536
Coefficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} (nm/días)	0.0150	0.0232	0.0324
Coefficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} (nm/días)	0.0012	0.0016	0.0020
Acidez libre (% A.G.L./días)	0.0049	0.0077	0.0111

En el Cuadro 16 se muestra que a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento se obtiene mayores valores de constantes de velocidad de reacción (k), esto significa que conforme se incrementa la temperatura de almacenamiento, el aceite se degrada más rápido. Este comportamiento es similar al presentado por Torres (2000), quién sometió aceite de oliva virgen a elevadas temperatura para determinar su tiempo de vida en anaquel, concluyendo que existe una relación directa entre el valor k y la temperatura de almacenamiento.

4.6.3 DETERMINACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

Los resultados del análisis de regresión lineal que se aplicó a los modelos matemáticos linealizados (ecuaciones 5, 6, 9 y 10) se muestran en los Anexos 4, 6, 8 y 10.

A partir del análisis de regresión se seleccionó el Modelo Exponencial para el incremento del índice de peróxido, el Modelo Lineal para el incremento de los coeficientes de extinción k_{232} y k_{270} y el Modelo de Arrhenius para el incremento del porcentaje de ácidos grasos libres por tener los coeficientes de determinación (r^2) más cercano a la unidad.

4.6.4 DETERMINACIÓN DE LA VIDA ÚTIL

a. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN FUNCIÓN AL ÍNDICE DE PERÓXIDO

Para determinar la vida en anaquel se obtiene por extrapolación del modelo matemático elegido (modelo exponencial) la constante de velocidad de reacción k a 20 °C:

$$K_{20} = 0.01013 \text{ días}^{-1}$$

Finalmente para obtener el tiempo de vida en anaquel (θ_s) a temperatura ambiente promedio (20 °C) se utilizó la ecuación 3, la cual al reemplazar los valores resultó:

$$\ln A = \ln A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (3)$$

Donde:

A: Índice de peróxido al final de la vida en anaquel para el aceite de moringa tomando como referencia al aceite de oliva virgen, siendo este valor igual a 20 meq O₂/kg de aceite (Codex Alimentarius, 2015).

A₀: Índice de peróxido inicial del aceite de moringa, siendo este igual a 1.17 meq O₂/kg de aceite

θ_s : Tiempo de vida en anaquel (días) a temperatura de 20 °C.

K₂₀: Constante de velocidad de reacción a 20 °C.

Reemplazando en la ecuación 3:

$$\ln 20 = \ln 1.17 - 0.01013 \times \theta_s$$

$$\theta_s = 280 \text{ días} = 9.34 \text{ meses}$$

El tiempo de vida en anaquel del aceite de moringa en función al índice de peróxido para una temperatura de almacenamiento de 20 °C fue de 280 días (9.34 meses).

b. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN FUNCIÓN AL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K232

Para determinar el tiempo de vida en anaquel obtenemos por extrapolación del modelo matemático elegido (modelo lineal) la constante de velocidad de reacción k a 20 °C:

$$K_{20} = 0.0062 \text{ días}^{-1}$$

Finalmente para obtener el tiempo de vida en anaquel (θ_s) a temperatura ambiente promedio (20 °C) se utilizó la ecuación 2, la cual al reemplazar los valores resultó:

$$A = A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (2)$$

Donde:

A: Coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} al final de la vida en anaquel para el aceite de moringa tomando como referencia al aceite de oliva virgen, siendo este valor igual a 2.6 (Codex Alimentarius, 2015).

A_0 : Coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} inicial del aceite de moringa, siendo este igual a 1.27.

θ_s : Tiempo de vida en anaquel (días) a temperatura de 20 °C.

K_{20} : Constante de velocidad de reacción a 20 °C.

Reemplazando en la ecuación 2:

$$2.6 = 1.27 - 0.0062 \times \theta_s$$

$$\theta_s = 214 \text{ días} = 7.15 \text{ meses}$$

El tiempo de vida en anaquel del aceite de moringa en función al coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} para una temperatura de almacenamiento de 20 °C fue de 214 días (7.15 meses).

c. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN FUNCIÓN AL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270}

Para determinar el tiempo de vida en anaquel obtenemos por extrapolación del modelo matemático elegido (modelo lineal) la constante de velocidad de reacción k a 20 °C la cual resultó:

$$K_{20} = 0.00042 \text{ días}^{-1}$$

Finalmente para obtener el tiempo de vida en anaquel (θ_s) a temperatura ambiente promedio (20 °C) se utilizó la ecuación 2, la cual al reemplazar los valores resultó:

$$A = A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (2)$$

Donde:

A: Coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} al final de la vida en anaquel para el aceite de moringa tomando como referencia al aceite de oliva virgen, siendo este valor igual a 0.2 (Codex Alimentarius, 2015).

A_0 : Coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} inicial del aceite de moringa, siendo este igual a 0.114.

θ_s : Tiempo de vida en anaquel (días) a temperatura de 20 °C.

K_{20} : Constante de velocidad de reacción a 20 °C.

Reemplazando en la ecuación 3:

$$0.2 = 0.114 - 0.00042 \times \theta_s$$
$$\theta_s = 204 \text{ días} = 6.82 \text{ meses}$$

El tiempo de vida en anaquel del aceite de moringa en función al coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{270} para una temperatura de almacenamiento de 20 °C fue de 204 días (6.82 meses).

d. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN FUNCIÓN A LA ACIDEZ LIBRE

Para determinar el tiempo de vida en anaquel obtenemos por extrapolación del modelo matemático elegido (modelo de Arrhenius) la constante de velocidad de reacción k a 20 °C la cual resultó:

$$K_{20} = 0.001953 \text{ días}^{-1}$$

Finalmente para obtener el tiempo de vida en anaquel (θ_s) a temperatura ambiente promedio (20 °C) se utilizó la ecuación 3, la cual al reemplazar los valores resultó:

$$\ln A = \ln A_0 - K\theta_s \dots \dots \dots (3)$$

Donde:

A: Acidez libre al final de la vida en anaquel para el aceite de moringa tomando como referencia al aceite de oliva virgen, siendo este valor igual a 2 por ciento (expresado como ácido oleico) (Codex Alimentarius, 2015).

A_0 : Acidez libre inicial del aceite de moringa, siendo este igual a 1.3 por ciento (como ácido oleico).

θ_s : Tiempo de vida en anaquel (días) a temperatura de 20 °C.

K_{20} : Constante de velocidad de reacción a 20 °C.

Reemplazando en la ecuación 3:

$$\begin{aligned} \ln 2 &= \ln 1.30 - 0.001953 \times \theta_s \\ \theta_s &= 222 \text{ días} = 7.42 \text{ meses} \end{aligned}$$

El tiempo de vida en anaquel del aceite de moringa en función al porcentaje de ácidos grasos libres para una temperatura de almacenamiento de 20 °C fue de 222 días (7.42 meses).

Se obtuvo 4 tiempos de vida del aceite de moringa, siendo estos: 280, 222, 214 y 204 días en función del índice de peróxido, grados de acidez, coeficiente de absorbancia en el

ultravioleta k_{232} y k_{270} , respectivamente, eligiéndose como vida útil final del aceite de moringa 204 días por ser la de menor valor de los cuatro factores evaluados y así poder asegurar la calidad del aceite consumido.

Para estimar la vida útil potencial con pruebas aceleradas, Barrionuevo (2015) recomienda el k_{232} y k_{270} como los mejores índices para evaluar la evolución de la oxidación debido a (1) son buenos indicadores de productos de oxidación primaria y secundaria, (2) presentan una gran linealidad en su evolución haciendo posible calcular fácilmente el grado de oxidación y a partir de éste, el tiempo de vida útil, (3) se ha observado en estudios previos realizados por otros autores que el k_{232} se correlacionan significativamente con la pérdida de ácidos grasos insaturado y finalmente (4) son parámetros de fácil determinación. En este estudio se tomó como vida útil final del aceite de moringa el tiempo estimado en función del k a 232 mn (204 días).

Según los datos de vida útil obtenidos en el aceite de moringa, se puede observar que éste es diferente según el criterio de calidad que empleemos para su determinación. Barrionuevo (2015) realizó la determinación de la vida útil del aceite de oliva virgen extra de diferentes variedades por métodos acelerados, encontrado tiempos muy diferentes según el criterio de calidad usado. Por ejemplo, para la variedad Picual obtuvo 20 meses en función de la acidez libre, 2 meses en función del índice de peróxido y 19 y 37 días en función de los coeficientes de extinción k_{232} y k_{270} , respectivamente, tomando como temperatura ambiente 25 °C.

Por otro lado Torres (2000) determinó el tiempo de vida en anaquel del aceite de oliva virgen en función al índice de peróxido y acidez libre por métodos acelerados, obteniendo 12.5 y 13.2 meses, respectivamente, para una temperatura de almacenamiento de 20 °C. Comparando los valores de vida útil del aceite de moringa en función al índice de peróxido y acidez libre (9.34 y 7.42 meses) con los del aceite de oliva virgen reportados por Torres (2000), se puede observar que se obtuvo tiempos de vida útil menores, sin embargo, las diferencias se puede deber a las condiciones del experimento, orden de reacción elegido, modelo matemático empleado y que se ha tomado como referencia los límites establecidos por el Codex Alimentarius (2015) para el aceite de oliva virgen debido a que aún no hay una reglamentación establecida para el aceite de moringa.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Según el Anexo 26, 27, 28 y 29 se puede afirmar que a un nivel de significancia del 5 por ciento existen diferencias significativas entre las tres temperaturas de trabajo (40, 50 y 60 °C) al evaluar los cuatro factores de calidad medidos (% ácidos grasos libres, índice de peróxido, k232 y k270 en un tiempo determinado), debido a que el valor de P (0.000) es menor al nivel de significación 0.005 y en forma simultánea mediante la prueba de t-Student se pudo determinar que existen diferencias significativas entre los promedio de las tres temperaturas de trabajo correspondientes para cada factor de calidad evaluado

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una diferencia significativa en el rendimiento al usar un tratamiento enzimático previo en la extracción del aceite de moringa con prensa-*expeller* (28.43%) comparado con el tratamiento control (24.7%), comprobándose que el uso de enzimas mejora el rendimiento de la extracción.
- En la caracterización del aceite de moringa, no se encontró diferencias significativas con respecto al índice de refracción, índice de p-anisidina, coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} y k_{270} al comparar el aceite extraído con previo tratamiento enzimático y el aceite control; sin embargo, se obtuvo menores índices de peróxido y acidez en la muestra control, evidenciándose un deterioro del aceite extraído con el uso de enzimas.
- Se determinó mediante el perfil de ácidos grasos que en el aceite de moringa predomina el ácido oleico (72%) seguido por ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (6%), behénico (6%), esteárico (4%) y araquídico (2.5%).
- Se obtuvo un mayor contenido de polifenoles totales en el aceite de moringa extraído con previo tratamiento enzimático (65.7 mg ácido gálico/kg) comparado con el aceite control (53.4 mg ácido gálico/kg). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas en la capacidad antioxidante lipofílica e hidrofílica del aceite de moringa determinada por el método ABTS.
- Se obtuvo elevadas concentraciones de tocoferoles en el aceite de moringa (275 y 253 mg/kg), encontrándose un mayor contenido de α -tocoferol y tocoferoles totales en el aceite de moringa extraído con el uso de enzimas. Además, se determinó que el α -

tocoferol es el isómero mayoritario (aproximadamente un 80% del total) en el aceite de moringa.

- Se determinó el tiempo de vida del aceite de moringa a 20 °C por métodos acelerados en función del índice de peróxido (280 días), grados de acidez (222 días), coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k_{232} (214 días) y k_{270} (204 días), siendo 204 días la vida útil estimada del aceite de moringa por ser la de menor valor de los cuatro factores evaluados.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de moringa para determinar su influencia y relación con la capacidad antioxidante.
- Realizar la determinación de la capacidad antioxidante por métodos con diferentes mecanismos de reacción como ORAC o TRAP.
- Realizar futuros estudios sobre el contenido de tocotrienoles presentes en el aceite de moringa debido a que son compuestos antioxidantes que también pueden encontrarse presente en este aceite.
- Realizar el estudio de vida útil del aceite de moringa con cuatro o cinco temperaturas de almacenamiento para tener una mayor confiabilidad al momento de realizar el análisis de regresión y poder obtener tiempos de vida útil aún más exactos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aardt, M; Duncan, S; Long, T; Keefe, S; Marcy, J; Susan, S. 2004. Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: thermogravimetric analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:587-591.
- Abdulkarim, S; Long, K; Lai, O; Muhammad, S; Ghazali, H. 2005. Some physico chemical properties of *Moringa oleífera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. Malaysia, University Putra.
- Alam, N; Bristi, N; Rafiquzzaman, M. 2012. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21:143-152.
- Ali, R. 2001. Physicochemical properties of oil extracted from moringa (*Moringa oleífera*) Seeds. Sudán, University of Khartoum.
- Ángeles, J. 2002. Determinación del aceite crudo y semirrefinado de la semilla de sacha inchi (*Plukenetia lobubilis*) sometido a temperaturas variables de almacenamiento. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Ángeles, M; Palancar, M; Vergara, G. 2005. El aceite de oliva virgen de Madrid: calidad, caracterización y valor nutritivo. Laboratorio alimentario del IMIDRA. España.
- Antolovich, M; Prenzler, P; Robards, K; Ryan, D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125(5):989-1009.
- Anwar, F; Bhangar, M. 2003. Analytical characterization of *Moringa oleífera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6558-6563.

- Anwar, F; Nahid, Z; Rashid, U. 2006. Characterization of *Moringa oleifera* seed oil from drought and irrigated regions on Punjab, Pakistan. *Grasas y Aceites* 57(2):160-168.
- Anwar, F; Rashid, U. 2007. Physico-chemical characteristics of *Moringa oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. *Pakistan Journal Botany* 39(5):1443-1453.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official methods of analysis. 15 ed. Washington DC, United States.
- AOCS (American Oil Chemists Society). 2008. Official methods and recommended practices. 6 ed. Champaign D.C, United States.
- Arias, C. 2014. Estudio de las posibles zonas de introducción de la *Moringa oleifera* en la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias. Tesis Ing. España, Universidad Politécnica de Madrid.
- Avellaneda, F. 2010. Producción y caracterización de biodiesel de palma y de aceite reciclado mediante un proceso batch y un proceso continuo con un reactor helicoidal. Tesis Ing. España, Universidad Rovira Virgili.
- Badr, F; Sitothy, M. 1992. Optimizing conditions for enzymatic extraction of sunflower oil. *Zagazig University* 43(5).
- Baduí, S. 1996. Química de los alimentos. México, Longman de México. 648 p.
- Bailey, A. 1984. Aceites y grasas industriales. España, Reverté. 746 p.
- Bailey, A. 2001. Aceites y grasas industriales. España, Reverté. 746 p.
- Balbir, M. 2005. Trees for life: moringa book. Misuri, Unites States. 52 p.

- Barrionuevo, M. 2015. Cinética de oxidación del aceite de oliva virgen extra de diferentes variedades mediante pruebas aceleradas de vida útil. Tesis Mg. Sc. Córdoba, España, Universidad de Córdoba.
- Bermúdez, A. 2003. Lípidos diseñados para consume humano y estabilidad. *Lípidos y salud* 4(2):1-4.
- Blanco, N; López, N. 2006. Vida útil del aceite de girasol alto oleico y del aceite de girasol convencional durante el proceso continuo de fritura de maní. Tesis Lic. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.
- Brand-Williams, W; Cuvelier, M; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Wiss Technol* 28:25-30.
- Bruchmann, E. 1980. *Bioquímica Técnica*. España, Acribia. 230 p.
- Campbell, N; Reece, J. 2007. *Biología*. 7 ed. España, Médica Panamericana S.A. 1392 p.
- Capannesi, C; Palchetti, I; Mascini, M; Parenti, A. 2000. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry* 71:553-562.
- Castillo, J. 2007. Evaluación de la estabilidad oxidativa de grasas interesterificadas enzimáticamente. Tesis Ing. Colombia, Universidad Industrial de Santander.
- Charm, S. 2007. Food engineering applied to accommodate food regulations, quality and testing. *Alimentos Ciencia e Ingeniería* 16(1):5-8.
- Cheftel, J; Cheftel, H. 1980. *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos*. Zaragoza, España, Acribia.
- Chica, B; Osorio, S. 2003. Determinación de la vida de anaquel del chocolate de mesa sin azúcar en una película de polipropileno biorientado. Tesis Ing. Colombia, Universidad Nacional de Colombia.

- Choe, E; Min, D. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Food Science and Food Safety* 5:169-186.
- Choe, E; Lee, J. 2006. Temperature dependence of the autoxidation and antioxidants of soybean, sunflower, and olive oil. *European Food Research and Technology* 226:239-246.
- Codex Alimentarius. 2015. Norma del Codex para los aceites de olive virgen y refinado de orujo de aceituna. Codex Stand 33-1981 (Rev. 1-1989).
- Collazos, C; Alvistur, E; Vásquez, J; Quiroz, A; Herrera, N; Robles, M; Arias, M; Viñas, E; Urquieta, R; Días, C; Roca, A; Faching, A; Hernandez, E. 1996. Tablas peruanas de composición de alimentos. 7 ed. Lima, Perú, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de la Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. 87 p.
- Compaoré, W; Nikièma, P; Bassolé, H; Savadogo, A; Mouecoucou, J. 2011. Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleífera* and pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in burkina faso (en línea). *Journal of Biological Sciences* 3(1): 64-72. Consultado 03 oct. 2016. Disponible en <http://maxwellsci.com/print/crjbs/v3-64-72.pdf>.
- Concha, G; Vivanco, J. 2006. Evolución de la rancidez oxidativa y la frescura del músculo de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) alimentado con dietas adicionadas de antioxidantes naturales y conservado al estado congelado (-18 °C). Tesis Ing. Chile, Universidad de Chile.
- Contreras, S. 2011. Producción de biodiesel a partir de especies oleaginosas. *In* Seminario de Materiales y Tecnologías en Ingeniería. Chile, Universidad Católica del Maule.
- Daniels, R; Kim, H; David, M. 2006. Hydrogenation and interesterification effects on the oxidative stability and melting point of soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6011-6015.

- Dobarganes, M; Ríos, J; Pérez, M. 1995. Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante la termoxidación. *Grasas y aceites* 37(29):61-67.
- Douglas, B; Salazar, M; Gladys, M; Herolys, M. 2007. Cinética de deterioro del aceite de la semilla de la palma coroba (*Attalea maripa*). *Universidad de Oriente* 19(2):172-182.
- Durán, J. 2010. Aplicación de enzimas en el proceso de extracción del aceite residual de la torta de palmiste. Tesis Ing. Colombia, Universidad Industrial de Santander.
- Elmadfa, I; Wagner, K. 1997. Vitamin E and stability of vegetable oils. *Fett/Lipid* 99:234-238.
- Enriquez, R; Vilcapoma, D. 2012. Evaluación de vida útil en anaquel de tres variedades de maíz (*Zea mays*) nativo tostado y envasado en tres tipos de envases. Tesis Ing. Huancayo, Perú, Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Escardino, A; Berna, A. 2003. Introducción a la ingeniería de las reacciones químicas. Valencia, España, Universitat de Valencia. 417 p.
- Escobar, P. 2010. Validación y desarrollo de una metodología analítica para la determinación de polifenoles totales en aceites de oliva mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tesis Ing. Chile, Universidad de Chile.
- Espín, J; Soler-Rivas, C; Wichers, H. 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:648-56.
- FDA (Food and Drug Administration). 2001. Agency response letter. GRAS notice N° 000069, Washington DC, United States.
- Fenemma, O. 2000. Química de los alimentos. 2 ed. Zaragoza, España, Acribia. 1280 p.

- Folkard, J; TraviS, V; Sutherland, J; Holmes, R. 1993. Innovative water and waste water treatment for developing countries. *Journal Indian Water Resources Soc.* 5:29-32.
- Gimeno, E; Calero, E; Castellote, A; Lamuela-Raventós, R; De la Torre, M; López-Sabater, M. 2000. Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Chrom. A.* 881:255-259.
- González, F. 2010. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. Tesis Mg. Sc. México, Instituto Politécnico Nacional.
- Govardhan, S; Pradeep, S; Radhaa, C. 2013. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleífera* seed flour. *Journal of Functional Food* 5(4):1883-1891.
- Grasso, V. 2013. Diseño del proceso: pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna. Tesis Ph. D. Argentina, Universidad Nacional de La Plata.
- Grompone, M. 1991. El índice de *p*-anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. *Grasas y aceites* 42(1):8-13.
- Grompone, M. 2005. Oxidación de los lípidos: teorías y aplicaciones. *In XI Congreso latinoamericano de Grasas y Aceites.*
- Guerrero, K; Pascual, G; Silva, M; Guevara, A; Salvá, B; Encina, C. 2015. Efecto del tratamiento enzimático (hemicelulasa) en la extracción de aceite de semilla de moringa (*Moringa oleífera*) por prensado en frío. *Scientia Agropecuaria.*
- Guevara, J; Rovira, M. 2012. Caracterización de tres extractos de *Moringa oleífera* y evaluación de sus condiciones de infusión en sus características fisicoquímicas. Tesis Ing. Honduras, Universidad Zamorano.

- Guillén, M; Nerea, C. 2002. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry* 77:503-510.
- Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58:966.
- Gutiérrez, F; Fernández, J. 2002. Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of extra quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:571-577.
- Hernández, M; Sastre, A. 1999. *Tratado de nutrición*. España, Días de Santos. 1496 p.
- Hidalgo, F; Zamora, R; Alaíz, M. 1999. Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. Química radicalaria de los ácidos grasos poliinsaturados. *Grasas y aceites* 42(5):379-386.
- Hill, G; Grieger, R. 1980. Kinetic data: Generation, interpretation, and use. *Food Technology* 34(2):56-66.
- Huang, D; Ou, B; Prior, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.
- Huerta, R. 1993. Determinación de la vida útil de un chocolate mezclado con kiwicha (*Amarantus candatus*) expandida, mediante métodos acelerados de deterioro. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 1987. *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. 7 ed. Oxford, England.
- Johnson, J; Braddock, R; Chen, C. 1995. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *Journal Food Science* 60(3):502-505.

- Kairuz, L. 2002. Introducción al estudio de la composición de los alimentos. Colombia, Guadalupe. 162 p.
- Koolman, J; Rohm, K. 2004. Bioquímica. Texto y atlas. 3 ed. Madrid, España, Médica Panamericana. 488 p.
- Labuza, T. 1982. Shelf-life: dating of foods. Minnesota, United States, Food and nutrition Press. 500 p.
- Labuza, T; Riboh, D. 1982. Theory and applications of Arrhenius kinetics to prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology* 36(10):66-74.
- Lalas, S; Tsaknis, J. 2001. Characterization of *Moringa oleífera* seed oil variety "Periyakulam 1". *Journal of Food Composition and Analysis* 15:65-77.
- Landeo, P. 2009. Determinación del tiempo de vida en anaquel mediante pruebas aceleradas del aceite semirrefinado de unguirahui y a condiciones ambientales (18 °C). Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Latif, S. 2009. Analytical investigations to compare the enzyme-assisted extraction of vegetable oils with conventional methods. Tesis Ph. D. Pakistán, University of Agriculture Faisalabad.
- Latif, S; Anwar, F. 2008. Quality assessment of *Moringa concanensis* seed oil extracted through solvent and aqueous-enzymatic techniques. *Grasas y aceites*, 59(1):69-75.
- Latif, S; Anwar, F; Ijaz, A. 2011. Aqueous enzymatic process for oil and protein extraction from *Moringa oleífera* seed. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8):1012-1018.
- Lilian, M. 2010. Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia*): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa. Tesis Ph. D. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.

- Liñán, F. 2010. *Moringa oleífera*: el árbol de la nutrición. Ciencia y Salud virtual 2(1):130-138.
- López, M; López, H. 2005. Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid, España, Médica Panamericana. 812 p.
- Magaña, W. 2012. Aprovechamiento post-cosecha de la moringa (*Moringa oleífera*). Revista Iberoamericana de Tecnología 13(2):171-174.
- Magariños, C; Bauza, M. 2003. Determinación del color de aceites de oliva vírgenes. Revista FCA 35(2):71-76.
- Manzoor, M; Anwar, F; Iqbal, T. 2007. Physico-chemical characterization of *Moringa concanensis* seeds and seed oil. Journal American Oil Chemists' Society 84:413-419.
- Marfil, R. 2008. Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de argán (*Argania spinosa*). Tesis Ph. D. Granada, España, Universidad de Granada.
- Marín, R. 2007. Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Tesis Ing. Santiago, Chile, Universidad de Chile.
- Martín, C, Martín, G, García, A, Fernández, T, Hernández, E; Puls, J. 2013. Potential applications of *Moringa oleífera*. Pastos y Forrajes 36(2):137-149.
- Martínez, M. 2010, Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia*): Influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa. Tesis Ph. D. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.
- Meyer, A; Jepsen, S; Sorensen, N. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46:2439-2446.
- Miller, D. 2001. Química de los alimentos, manual de laboratorio. España, Limusa. 173 p.

- Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social. Desnutrición crónica infantil, metas al 2016. Consultado 10 de oct. 2015. Disponible en <http://www.midis.gob.pe/>.
- Navas, P. 2010. Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceite vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. Tesis Ph. D. Castilla-La Mancha, España, Universidad de Castilla-La Mancha.
- Naz, S; Sheikh, H; Siddiqi, R; Syed, S. 2005. Deterioration of live, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Research International* 38:127-134.
- Niki, E; Yoshida, Y; Saito, Y; Noriki, N. 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338:668-676.
- Nzikou, J; Matos, L; Moussounga, J; Ndangui, C; Kimbonguila, A; Silou, T. 2009. Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety Congo-Brazaville. *Journal of Food Technology* 7(3):59-65.
- Núñez, R. 2007. Evaluación del contenido de tocoferoles y tocotrienoles en aceite de nuez de selecciones clonales de *Gevuina avellana* Mol. Tesis Ph. D. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile.
- Ogbunugafor, H; Eneh, F; Ozumba, A; Igwo-Ezikpe, M; Okpuzor, J; Igwilo, I; Adenekan, S; Onyekwelu, O. 2011. Physico-chemical and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed oil. *Pakistan Journal of Nutrition* 10(5):409-414.
- Ortiz, J; Navarrete, A; Sacramento-Rivero, J; Rubio-Atoche, C; Acereto, P; Rocha-Uribe, J. 2012. Extraction and characterization of oil from *Moringa oleifera* using supercritical CO₂ and traditional solvents. *Journal of Analytical Chemistry* 3:946-949.
- Osborn, H; Casimir, A. 2003. Effects of α -tocopherol, β -carotene, and soy isoflavones on lipid oxidation of structured lipid-base emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(23):6856-6859.

- Parrota, J. 1993. *Moringa oleifera* Lam. Reseda, horseradish tree. SO-ITF-SM-61. Los Angeles, United States, Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.
- Pellegrini, N; Visioli, F; Buratti, S; Brighenti, F. 2001. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2532-8.
- Pellegrini, N; Serafin, M; Colombi, B; Del Rio, D; Salvatore, S; Bianchi, M; Brighenti, F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition* 33(9):2812-9.
- Pérez, J; Saura, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research internacional* 39:791-800.
- Primo, E. 1998. *Química de los alimentos*. España, Síntesis. 461 p.
- Prior, R; Wu, X; Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290-4302.
- Pritchard, J. 1991. Analysis and properties of oilseeds. *Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods* 127:80-98.
- Ramachandran, C; Peter, K; Gopalakrishnan, P. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Econ. Bot.* 34:276-283.
- Ramírez, M; Quiles, J. 2005. Vitamina C, vitamina E y otros antioxidantes. *Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Madrid, España, Acción Médica.
- Rodríguez, S. 2010. Pruebas de vida útil y diseño de etiqueta para néctares de curuba (*Passiflora tripartita* var. *Mollissima*) y gulupa (*Passiflora edulis* var. *edulis*). Tesis Ing. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia.

- Romani, A; Lapucci, C; Cantini, C; Ieri, F; Mulinacci, N; Francesco, V. 2007. Evolution of minor polar compounds and antioxidant capacity during storage of bottled extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4):1315-1320.
- Ruiz, M; Artacho, R; Fernández, M; López, H; López, M. 1995. Stability of α -tocopherol in virgin olive oil during microwave heating. *Food Science and Technology* 28:644-646.
- Ruttarattanamongkol, K; Siebenhandl-Ehn, S; Schreiner, M; Petrasch, A. 2014. Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction, physico-chemical properties and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil in comparison with conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* 58:68-77.
- Ryan, D; Robards, K; Lavee, S. 1998. Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae* 75:31-6.
- Saguy, I; Karel, M. 1980. Modeling of quality deterioration during food processing and storage. *Food Technology* 34(2):78-80.
- Salvador, M; Aranda, F; Gómez-Alonso, S; Fregapane, G. 2003. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry* 80:359-66.
- Samaniego, C. 2006. Estudio y evaluación de la capacidad antioxidante de aceites de oliva virgen extra. Tesis Ph. D. Granada, España, Universidad de Granada.
- Samaniego, C; Troncoso, A; García-Parrilla, M; Quesada, J; López, H; López, M. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta* 593:103-7.
- Sánchez, D; López, J; Núñez, J; Servín, G; López, J; Paseiro, P. 2015. Effect of the refining process on *Moringa oleifera* seed oil quality. *Food Chemistry* 187:53-57.

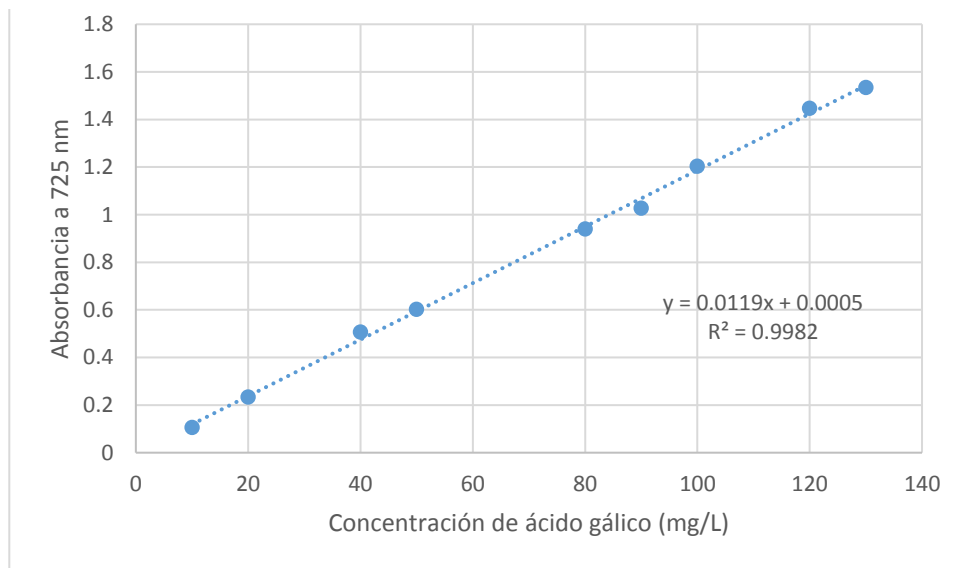
- Sánchez, J. 2006. Extracción de aceites esenciales: experiencia colombiana, *In* II congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Colombia, Universidad Nacional de Colombia.
- Sayago, A; Marín, M; Aparicio, R; Morales, M. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Revista aceites y grasas* 58:74-86.
- Shahidi, F; Zhong, Y. 2005. Lipid oxidation: measurement methods. *Edible oil and fat products: Chemistry, properties, and health effects* 1:357-385.
- Sineiro, J; Domínguez, H; Nuñez, M. 1998. Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales. *Revista grasas y aceites* 49(2):191-202.
- Singh, R. 2000. *Scientific principles of shelf-life evaluation*. 2 ed. United States (Chapter 1). 321 p.
- Smith, S; King, R; David, M. 2006. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food chemistry* 102(4):1208-1213.
- Taoukis, S; Labuza, P; Saguy, S. 2000. Kinetics of food deterioration and shelf life prediction. *Handbook of Food Engineering* 1:361-404.
- Taylor, D. 2005. *Bailey's industrial oil and fat products*. Hoboken 1:285-339.
- Torres, J. 2003. Determinación de la estabilidad del aceite de girasol coloreado con achiote mediante pruebas aceleradas. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Torres, S. 2000. Determinación del tiempo de vida en anaquel de aceite de oliva virgen mediante pruebas aceleradas. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.
- Tovar, J. 2013. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis Ing. Pereira, Colombia, Universidad Tecnológica de Pereira.

- Tsaknis, J; Lalas, S; Gergis, V; Dourtoglou, V; Spiliotis, V. 1999. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4495-4499.
- Tuberoso, C; Kowalczyk, A; Sarritzu, E; Cabras, P. 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oil seeds for food use. *Food Chemistry* 103(4):1494-1501.
- Tur, J. 2004. Los antioxidantes en la dieta mediterránea. *Revista Especializada de Nutrición Comunitaria* 10(4):1987-2007.
- UDEA (Universidad de Antioquia). 2010. Grasas y aceites comestibles (en línea). Consultado 24 abr. 2016. Disponible en <http://docencia.udea.edu.co/qf/grasas/refraccion.html>.
- Valavanidis, A; Nisiotou, C; Papageorgiou, Y; Kremli, I; Satravelas, N; Zinieris, N; Zygalaiki, H. 2004. Comparison of the radical scavenging potencial of polar and lipidic fractions for olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2358-2365.
- Varela, G. 2009. Antioxidantes de las frutas en la dieta. España, Madrid. 12 p.
- Vázquez, A; Janer, C; Janer, M. 1973. Determinación de los polifenoles del aceite de oliva *Grasas y aceites* 24:350-357.
- Velioglu, Y; Mazza, L; Gao, L; Oomah, B. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4113-4117.
- Vergara, R. 2000. Determinación del tiempo de vida en anaquel del aceite virgen de la semilla de ajonjolí (*Sesemum indicum* L.) a temperatura ambiente y mediante pruebas aceleradas. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM.

- Wiesman, Z. 2009. Desert olive oil cultivation: advanced bio technologies. Estados Unidos, Hard Bound. 416 p.
- Young, I; Woodside, J. 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol* 54:176- 186.
- Zamora, R; Hidalgo, F; Alaíz, M. 1991. Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. Metabolismo de los hidroperóxidos lipídicos. *Grasas y aceites* 42(3):230-238.
- Ziller, S; Campbell, E. 1996. *Grasas y aceites alimentarios*. Zaragoza, España, Acribia,
- Zuleta, A; Esteve, M; Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114:310-316.
- Zumbado, J. 2002. *Análisis químico de los alimentos-Métodos clásicos*. Cuba, Universidad de la Habana. 435 p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

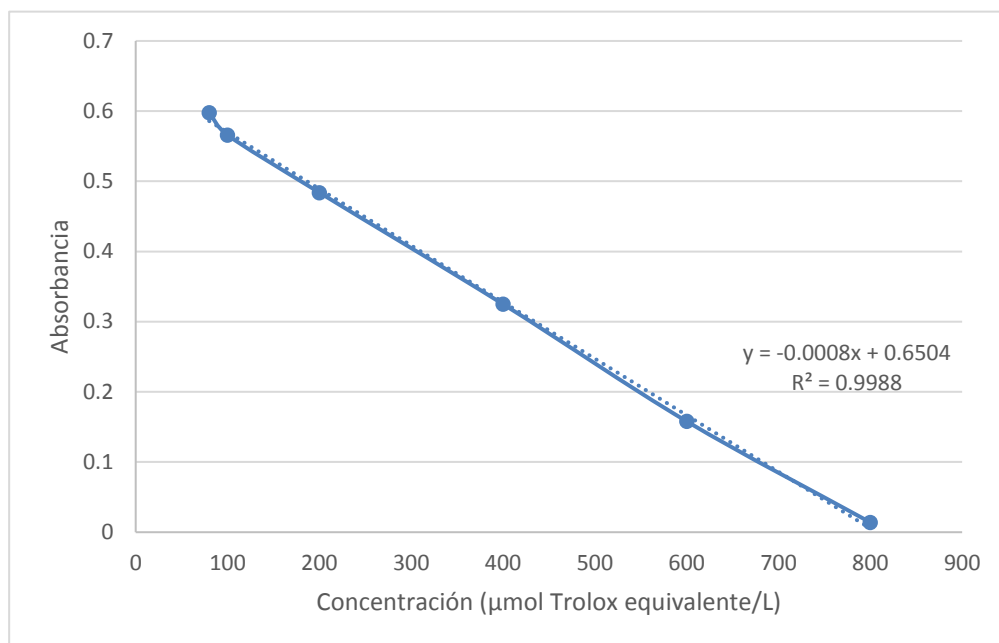


Donde:

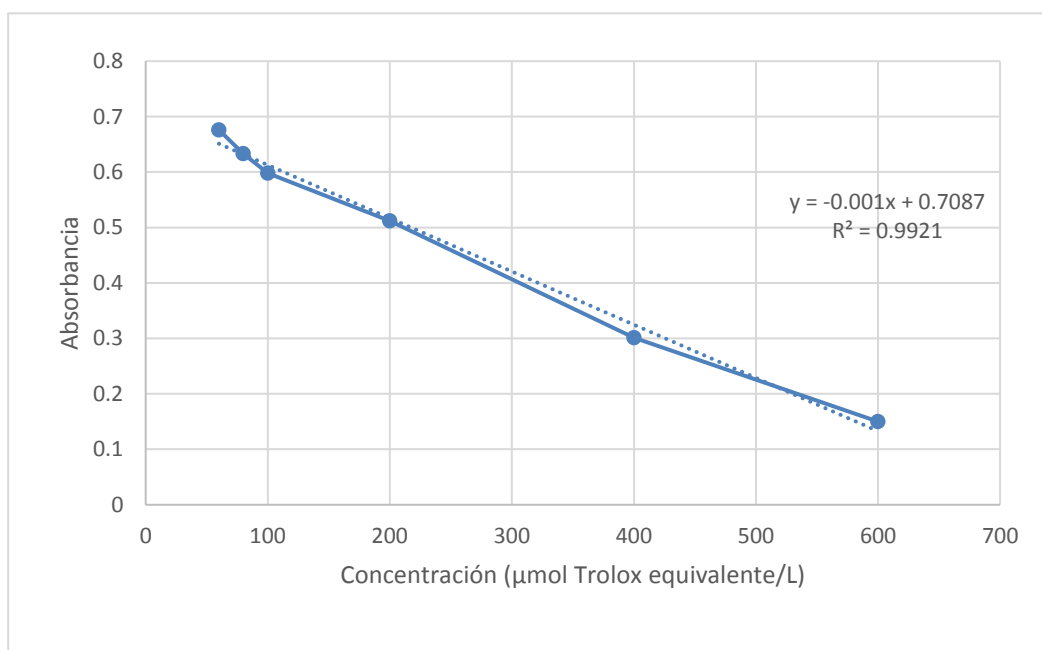
x = Concentración de ácido gálico (mg/L)

y = Absorbancia leída a 725 nm

ANEXO 2: CURVA ESTÁNDAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA



CURVA ESTANDAR DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA



ANEXO 3: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA EL ÍNDICE DE PERÓXIDO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Orden de reacción (n)	R ²		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.9958	0.9617	0.8831
1	0.9808	0.9658	0.9762

ANEXO 4: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS QUE RELACIONAN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN CON LA TEMPERATURA PARA EL ÍNDICE DE PERÓXIDO

MODELO	PARÁMETRO	VALORES
Arrhenius	Ln k ₀	9.6315
	E _a /R	-4184.6
	r ²	0.9987
Lineal	A	-0.4404
	B	0.0015
	r ²	0.9827
Exponencial	Log a	-33.987
	B	12.969
	r ²	0.9992
Hiperbólico	A	401.13
	B	-1.1505
	r ²	0.9909

ANEXO 5: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{232} A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Orden de reacción (n)	R^2		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.9427	0.9469	0.9516
1	0.9108	0.9177	0.8955

ANEXO 6: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS QUE RELACIONAN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN CON LA TEMPERATURA PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{232}

MODELO	PARÁMETRO	VALORES
Arrhenius	$\ln k_0$	8.6487
	E_a/R	-4017.6
	r^2	0.9966
Lineal	A	-0.2575
	B	0.0009
	r^2	0.9989
Exponencial	$\log a$	-32.864
	B	12.441
	r^2	0.9955
Hiperbólico	A	625.09
	B	-1.7901
	r^2	0.9677

ANEXO 7: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270} A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Orden de reacción (n)	R^2		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.9473	0.9433	0.9525
1	0.9184	0.9048	0.9088

ANEXO 8: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS QUE RELACIONAN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN CON LA TEMPERATURA PARA EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K_{270}

MODELO	PARÁMETRO	VALORES
Arrhenius	$\ln k_0$	1.76
	E_a/R	-2664.8
	r^2	0.997
Lineal	A	-0.0113
	B	0.00004
	r^2	1
Exponencial	$\log a$	-23.51
	B	8.2519
	r^2	0.9959
Hiperbólico	A	6036.1
	B	-16.667
	r^2	0.9796

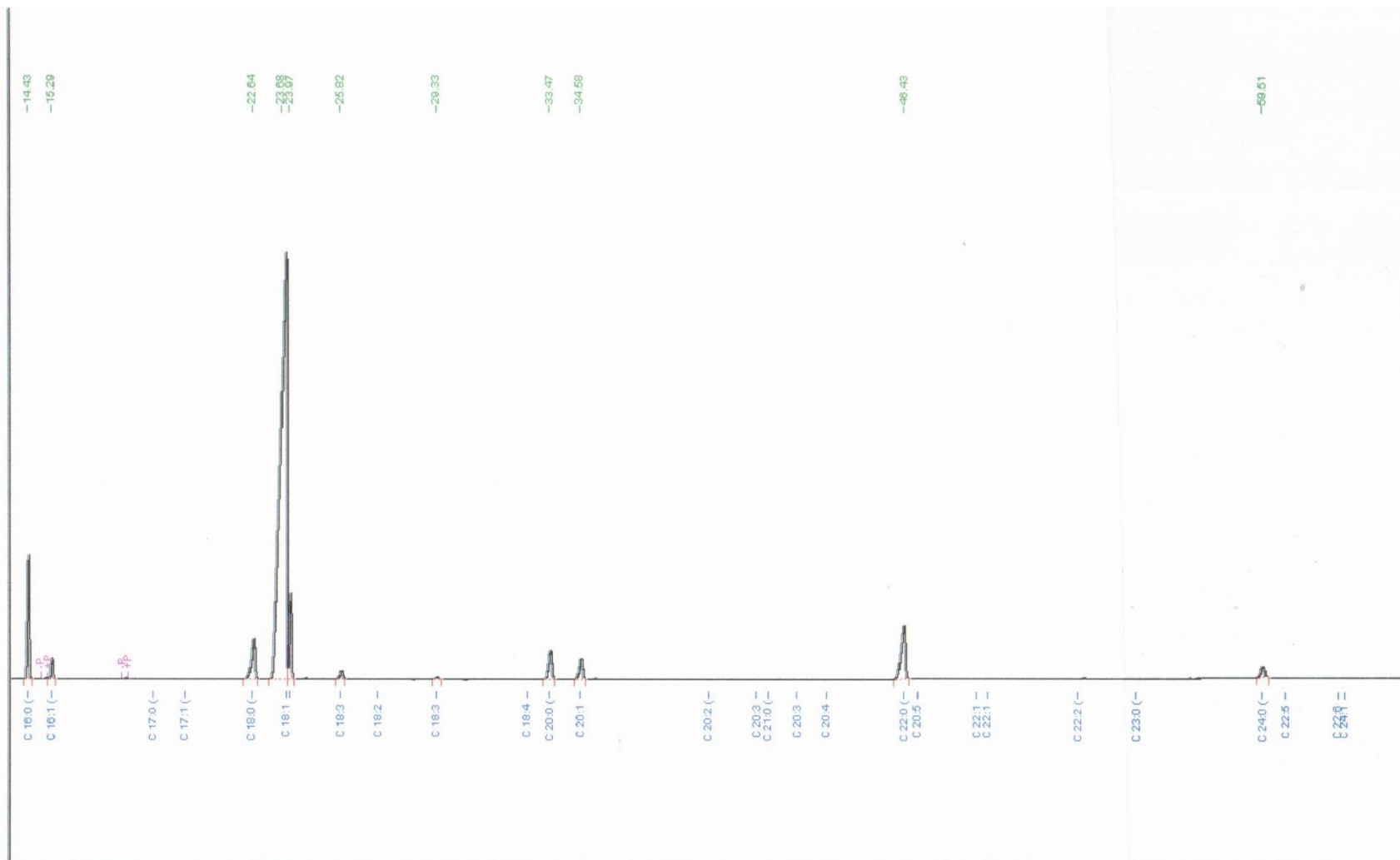
ANEXO 9: CORRELACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL PARA DIFERENTES ÓRDENES DE REACCIÓN PARA LA ACIDEZ LIBRE A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Orden de reacción (n)	R ²		
	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.8440	0.9314	0.9215
1	0.8421	0.9429	0.9487

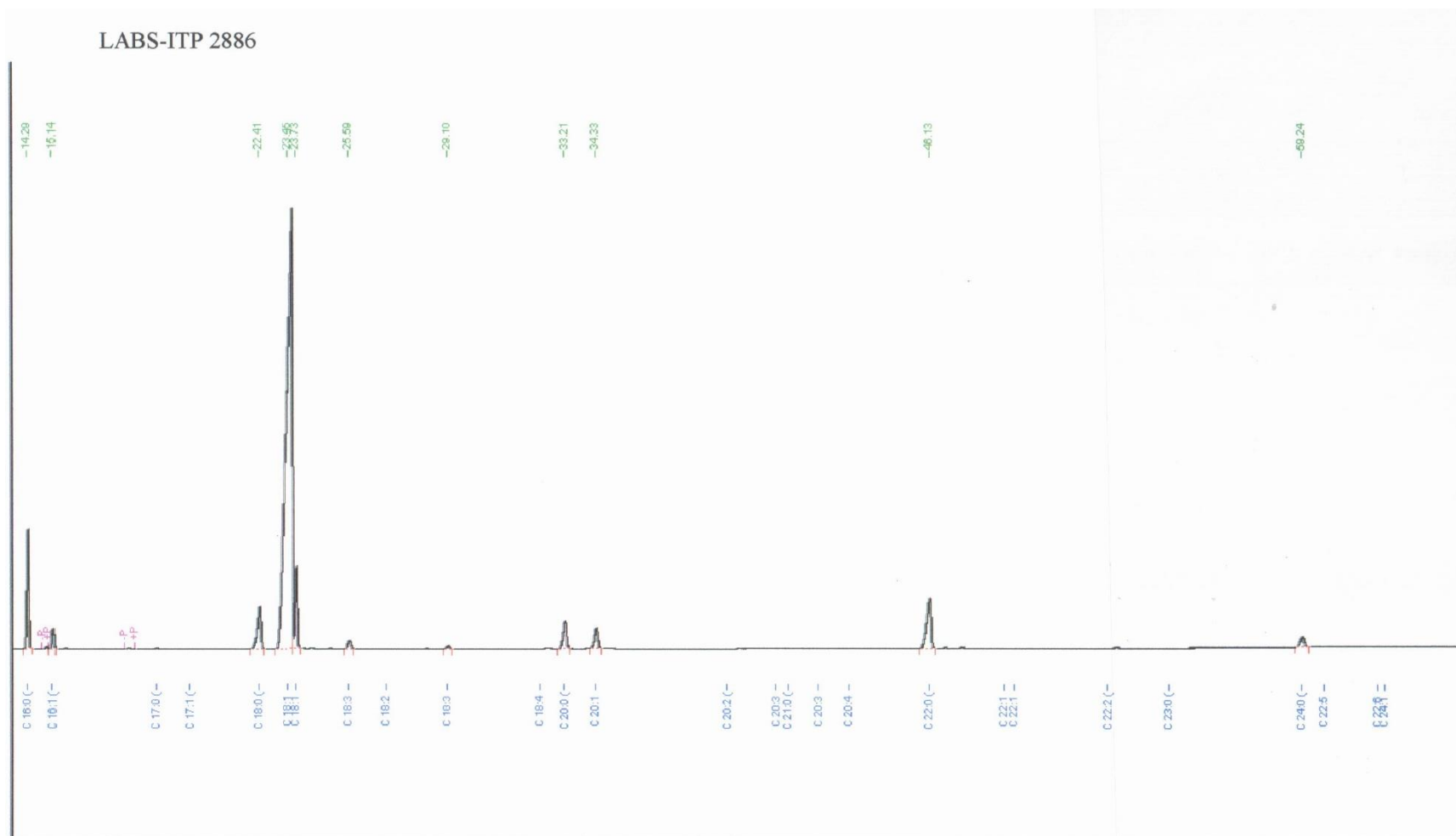
ANEXO 10: ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS QUE RELACIONAN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN CON LA TEMPERATURA PARA LA ACIDEZ LIBRE

MODELO	PARÁMETRO	VALORES
Arrhenius	Ln k ₀	8.3167
	E _a /R	-4264.7
	r ²	0.9982
Lineal	A	-0.0922
	B	0.0003
	r ²	0.9969
Exponencial	Log a	-35.266
	B	13.028
	r ²	0.9973
Hiperbólico	A	1982.3
	B	-5.6996
	r ²	0.9705

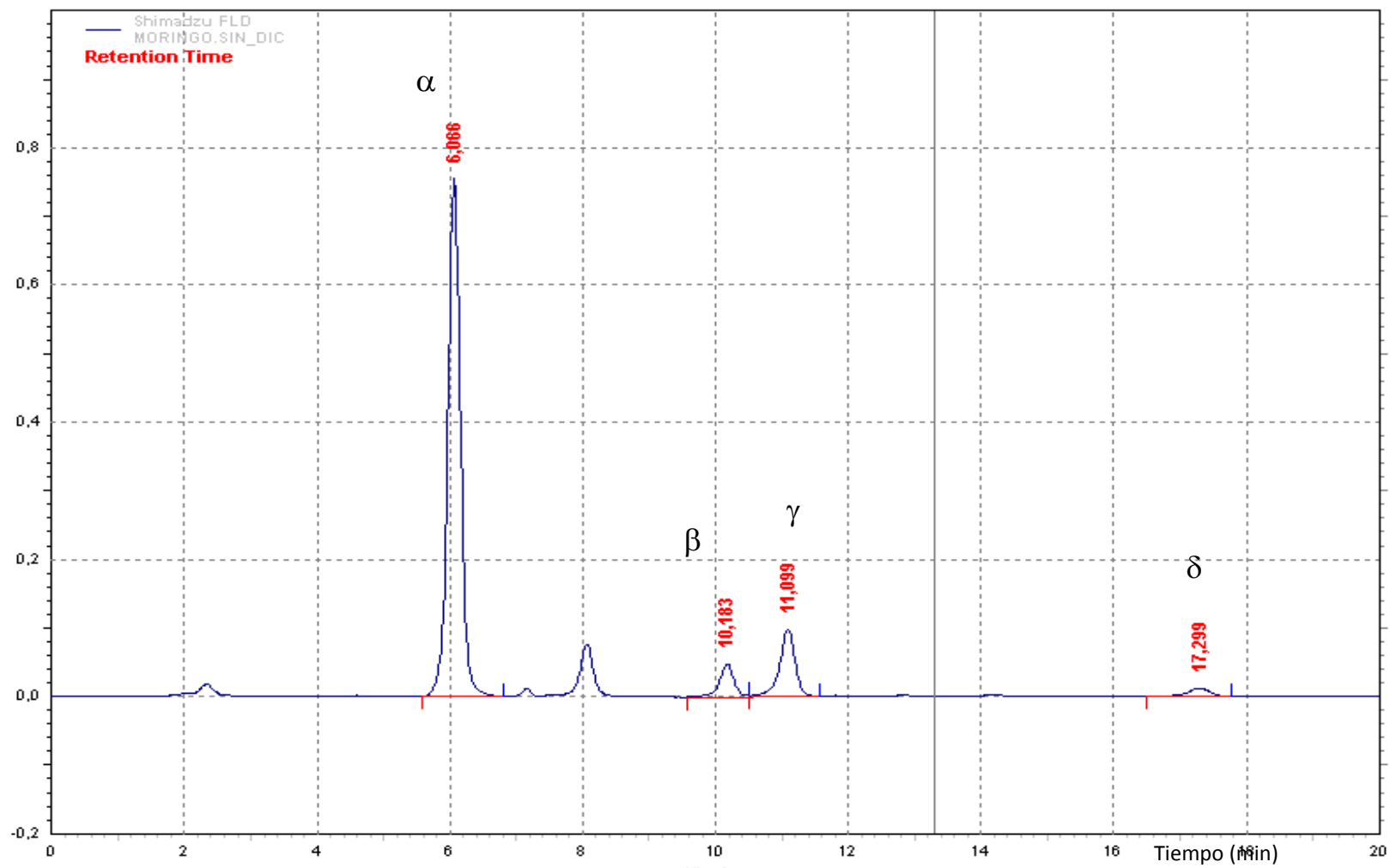
ANEXO 11: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE MORINGA



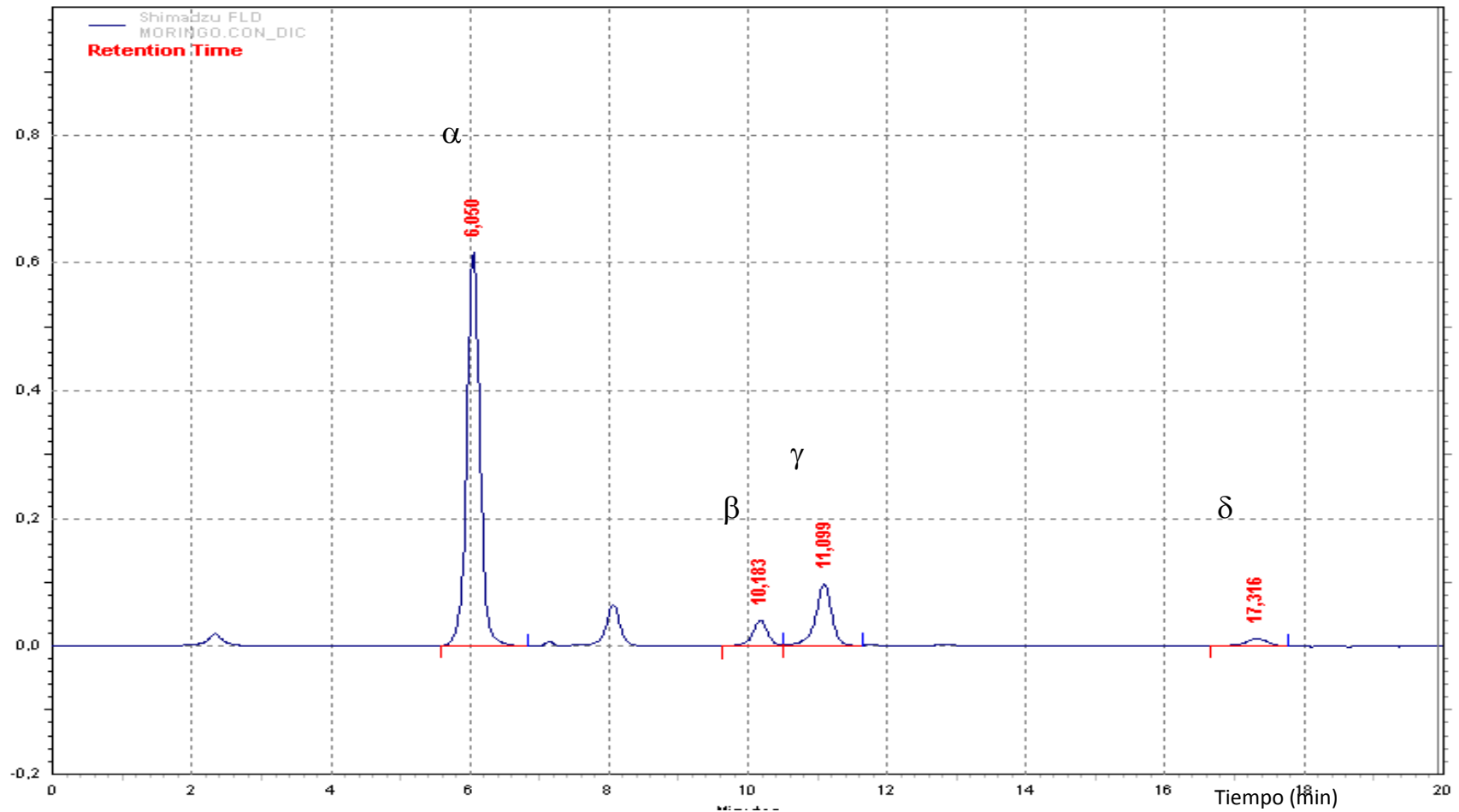
ANEXO 12: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE MORINGA EXTRAIDO CON PREVIO TRATAMIENTO ENZIMÁTICO



ANEXO 13: CROMATOGRAMA DEL CONTENIDO DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE MORINGA



ANEXO 14: CROMATOGRAMA DEL CONTENIDO DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE MORINGA EXTRAIDO CON PREVIO TRATAMIENTO ENZIMATICO



ANEXO 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL RENDIMIENTO CON PRENSA-EXPELLER EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Rendimiento

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	24.7	X
Con tratamiento enzimático	3	28.4333	X

ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LA ACIDEZ LIBRE EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para la Acidez Libre

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	1.23	X
Con tratamiento enzimático	3	1.51	X

ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL ÍNDICE DE REFRACCIÓN EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Índice de Refracción

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	1.4678	X
Con tratamiento enzimático	3	1.4677	X

ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL ÍNDICE DE PERÓXIDO EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Índice de Peróxido

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	0.86	X
Con tratamiento enzimático	3	1.26	X

ANEXO 19: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL ÍNDICE DE P-ANISIDINA EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Índice de p-Anisidina

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	0.31	X
Con tratamiento enzimático	3	0.33	X

ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K232 EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₃₂

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	1.25	X
Con tratamiento enzimático	3	1.26	X

ANEXO 21: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL COEFICIENTE DE ABSORBANCIA EN EL ULTRAVIOLETA K270 EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₇₀

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	0.11	X
Con tratamiento enzimático	3	0.12	X

ANEXO 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido palmítico (C 16:0)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	5.91	X
Con tratamiento enzimático	2	5.92	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido palmitoleico (C 16:1)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	0.97	X
Con tratamiento enzimático	2	0.99	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido esteárico (C 18:0)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	3.95	X
Con tratamiento enzimático	2	3.96	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido oleico (C 18:1 w-9)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	72.07	X
Con tratamiento enzimático	2	71.97	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido vaccénico (C 18:1 w-7)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	4.80	X
Con tratamiento enzimático	2	4.79	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido linoleico (C 18:2 w-6)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	0.61	X
Con tratamiento enzimático	2	0.63	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido α -linolénico (18:3 w-2)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	0.20	X
Con tratamiento enzimático	2	0.21	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido araquídico (C 20:0)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	2.54	X
Con tratamiento enzimático	2	2.53	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido eicosanoico (20:1 w-9)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	1.83	X
Con tratamiento enzimático	2	1.82	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido behénico (C 22:0)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	6.03	X
Con tratamiento enzimático	2	6.04	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el ácido lignocérico (C 24:0)

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	1.13	X
Con tratamiento enzimático	2	1.16	X

Pruebas de Múltiple Rangos para ácidos grasos saturados

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	19.54	X
Con tratamiento enzimático	2	19.60	X

Pruebas de Múltiple Rangos para ácidos grasos monoinsaturados

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	79.67	X
Con tratamiento enzimático	2	79.57	X

Pruebas de Múltiple Rangos para acidos grasos poliinsaturados

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	0.81	X
Con tratamiento enzimático	2	0.83	X

ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Contenido de Polifenoles Totales

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	53.4	X
Con tratamiento enzimático	3	65.7	X

ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR EL CONTENIDO DE TOCOFEROLES EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para el Contenido de α -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	274.64	X
Con tratamiento enzimático	2	252.98	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el Contenido de β -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	19.26	X
Con tratamiento enzimático	2	19.02	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el Contenido de γ -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	42.87	X
Con tratamiento enzimático	2	48.71	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el Contenido de δ -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	8.08	X
Con tratamiento enzimático	2	8.34	X

Pruebas de Múltiple Rangos para el Contenido Total de Tocoferoles

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	2	344.85	X
Con tratamiento enzimático	2	329.05	X

ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS EN EL ACEITE DE MORINGA

Pruebas de Múltiple Rangos para la Capacidad Antioxidante Lipofílica por el Método ABTS

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	1.12	X
Con tratamiento enzimático	3	1.15	X

Pruebas de Múltiple Rangos para la Capacidad Antioxidante Hidrofílica por el Método ABTS

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

<i>Extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sin tratamiento enzimático	3	0.61	X
Con tratamiento enzimático	3	0.58	X

ANEXO 26: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ÍNDICE DE PERÓXIDO

Cuadro ANVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura (TRATAMIENTO)	87.7177	2	43.8588	32.03	0.0000
B: Tiempo (BLOQUE)	225.86	8	28.2326	20.62	0.0000
RESIDUOS	95.8637	70	1.36948		
TOTAL (CORREGIDO)	409.442	80			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el índice de peróxidos con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas simultánea t- Student

H_p: Los promedios entre las temperaturas de 40, 50 y 60 °C son iguales.

H_a: Los promedios son diferentes.

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
40	27	2.08593	0.225214	X
50	27	3.10185	0.225214	X
60	27	4.61852	0.225214	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
40 - 50	*	-1.01593
40 - 60	*	-2.53259
50 - 60	*	-1.51667

* indica una diferencia significativa.

Conclusión:

Existen evidencias estadísticas con un nivel del 95% de confianza para afirmar que hay diferencias significativas entre los promedios de las temperaturas de 40 °C y 50 °C, 40 °C y 60 °C, 50 °C y 60 °C al evaluar como factor de calidad al índice de peróxido.

ANEXO 27: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN K232

Cuadro ANVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura (TRATAMIENTO)	2.66108	2	1.33054	116.97	0.0000
B: Tiempo (BLOQUE)	7.78155	8	0.972694	85.51	0.0000
RESIDUOS	0.796272	70	0.0113753		
TOTAL (CORREGIDO)	11.2389	80			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el coeficiente de absorción en el ultravioleta k₂₃₂ con un 95.0% de nivel de confianza.

Prueba simultánea t-Student

H_p: Los promedios entre las temperaturas de 40, 50 y 60 °C son iguales.

H_a: Los promedios son diferentes.

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
40	27	1.67407	0.0205258	X
50	27	1.85741	0.0205258	X
60	27	2.11593	0.0205258	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
40 - 50	*	-0.183333
40 - 60	*	-0.441852
50 - 60	*	-0.258519

* indica una diferencia significativa.

Conclusión:

Existen evidencias estadísticas con un nivel del 95% de confianza para afirmar que hay diferencias significativas entre los promedios de las temperaturas de 40 °C y 50 °C, 40 °C y 60 °C, 50 °C y 60 °C al evaluar como factor de calidad al coeficiente de absorción en el ultravioleta k₂₃₂.

ANEXO 28: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL COEFICIENTE DE EXTINCION K270

Cuadro ANVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura (TRATAMIENTO)	0.00587008	2	0.00293504	109.10	0.0000
B: Tiempo (BLOQUE)	0.0368059	8	0.00460074	171.01	0.0000
RESIDUOS	0.00188324	70	0.0000269034		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0445592	80			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₇₀ con un 95.0% de nivel de confianza.

Prueba simultánea t-Student

H_p: Los promedios entre las temperaturas de 40, 50 y 60 °C son iguales.

H_a: Los promedios son diferentes.

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
40	27	0.146704	0.00099821	X
50	27	0.157256	0.00099821	X
60	27	0.167556	0.00099821	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
40 - 50	*	-0.0105519
40 - 60	*	-0.0208519
50 - 60	*	-0.0103

* indica una diferencia significativa.

Conclusión:

Existen evidencias estadísticas con un nivel del 95% de confianza para afirmar que hay diferencias significativas entre los promedios de las temperaturas de 40 °C y 50 °C, 40 °C y 60 °C, 50 °C y 60 °C al evaluar como factor de calidad al coeficiente de absorbancia en el ultravioleta k₂₇₀.

ANEXO 29: ANÁLISIS DE VARIANZA Y DE COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA ACIDEZ LIBRE

Cuadro ANVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura (TRATAMIENTO)	0.429186	2	0.214593	6.41	0.0028
B: Tiempo (BLOQUE)	2.01275	8	0.251593	7.52	0.0000
RESIDUOS	2.34345	70	0.0334778		
TOTAL (CORREGIDO)	4.78538	80			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la acidez libre con un 95.0% de nivel de confianza.

Prueba simultánea t-Student

Hp: Los promedios entre las temperaturas de 40, 50 y 60 °C son iguales.

Ha: Los promedios son diferentes.

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
40	27	1.44852	0.0352125	×
50	27	1.47907	0.0352125	×
60	27	1.61593	0.0352125	×

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
40 - 50		-0.0305556
40 - 60	*	-0.167407
50 - 60	*	-0.136852

* indica una diferencia significativa.

Conclusión:

Existen evidencias estadísticas con un nivel del 95% de confianza para afirmar que no hay diferencias significativas entre los promedios de las temperaturas de 40 °C y 50 °C, mientras que para los promedios de las temperaturas de 40 °C y 60 °C, 50 °C y 60 °C sí hay diferencias significativas al evaluar como factor de calidad a la acidez libre.