

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LICOPENO DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum*) SOBRE LA VIDA ÚTIL DEL
ACEITE DE LINAZA (*Linum usitatissimum* L.)”**

Presentado por:

MIGUEL ANGEL VARAS CONDORI

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Lima - Perú

2019

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente tesis (Art. 24.
Reglamento de Propiedad Intelectual de la UNALM)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LICOPENO DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum*) SOBRE LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE LINAZA (*Linum
usitatissimum* L.)”**

Presentado por:

MIGUEL ANGEL VARAS CONDORI

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Dr. Américo Guevara Pérez

PRESIDENTE

Ph. D. Luis Fernando Vargas Delgado

MIEMBRO

Mg. Sc. Diana María Nolazco Cama

MIEMBRO

Mg. Sc. Gloria Jesús Pascual Chagman

ASESORA

Lima - Perú

2019

DEDICATORIA

A mis padres, Justa y Angel, y a mi hermana, Maria Esperanza, por su amor incondicional, apoyo, comprensión y paciencia. Gracias por brindarme todo lo necesario para mi formación profesional y así poder llegar a la culminación de esta primera etapa.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora, la Mg. Sc. Gloria Pascual, por haberme dado la oportunidad de formar parte del proyecto licopeno y depositar su confianza en mí.

Al Mg. Sc. Alberto Salas y a la Dra. Maritza Barriga por permitirme desarrollar la presente tesis en las instalaciones del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), y brindarme su apoyo hasta la culminación de la investigación. Asimismo, agradezco a todos los investigadores, analistas y personal del ITP que contribuyeron con mi formación profesional, especialmente al Químico Gary Álvarez por su incondicional apoyo y guía desde el primer día de trabajo con él.

A todos mis amigos de la universidad que estuvieron presentes en cada una de las etapas de la presente investigación, con los cuales sufrimos y aprendimos mucho, especialmente a Jhoel, Katty y Rocio que siempre estuvieron atentos y dispuestos en brindarme su apoyo, y a Pedro por su apoyo en los laboratorios de la facultad.

A las Ing. Gloria y Anna, mis compañeras de tesis en ITP, quienes me acompañaron y apoyaron en diferentes momentos de la parte experimental.

Al Dr. León Villegas por el apoyo en el desarrollo del método para cuantificar el licopeno, su gran paciencia y asesoría, la cual me permitió seguir adelante y culminar la tesis.

A la Dra. Alyssa Hidalgo por el apoyo en el análisis de tocoferoles y su gran y valiosa ayuda en la publicación del artículo científico de la presente investigación.

A mis jurados el Ph. D. Luis Fernando Vargas, la Mg. Sc. Diana Nolasco y al Dr. Américo Guevara por sus observaciones, las cuales ayudaron a enriquecer la presente tesis.

A todos aquellos que de alguna forma brindaron su apoyo para que la presente investigación y proyecto lleguen a culminación.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt), por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación a través del CONV. DE SUBV. N° 126-2015-FONDECYT, titulado: "Extracción del licopeno de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y su aplicación como antioxidante del aceite de linaza (*Linum usitatissimum*)".

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	LINAZA	4
2.1.1.	CARACTERÍSTICAS Y TAXONOMÍA	4
2.1.2.	AGRONOMÍA	5
2.1.3.	COMPOSICIÓN DE LA LINAZA	6
2.1.4.	IMPORTANCIA Y USOS DE LA LINAZA.....	7
2.1.5.	COMPONENTES ANTINUTRICIONALES	8
2.2.	ACEITE DE LINAZA.....	9
2.2.1.	EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LINAZA.....	9
2.2.2.	CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN	10
2.2.3.	IMPORTANCIA Y USOS DEL ACEITE DE LINAZA	13
2.3.	OXIDACIÓN LIPÍDICA	14
2.3.1.	AUTOOXIDACIÓN	15
2.3.2.	PRODUCTOS DE OXIDACIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA	17
2.3.3.	DESARROLLO DE LA RANCIDEZ DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	21
2.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS EN ACEITES	22

2.4.1. MÉTODOS PARA MEDIR LA OXIDACIÓN	22
2.4.2. MÉTODOS PARA MEDIR LA ESTABILIDAD OXIDATIVA	26
2.4.3. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN ACEITES	27
2.5. RANCIMAT	31
2.5.1. FUNDAMENTO	32
2.5.2. USO DEL RANCIMAT EN LA PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL	33
2.5.3. CUESTIONAMIENTO DE SU USO	33
2.6. ANTIOXIDANTES	34
2.6.1. MECANISMO DE ACCIÓN	35
2.6.2. ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	38
2.6.3. ANTIOXIDANTES NATURALES	40
2.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	42
2.7.1. MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA MEDIR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	43
2.7.2. LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS <i>IN VITRO</i>	47
2.7.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AL TROLOX (TEAC)	47
2.8. TOMATE	52
2.8.1. TAXONOMÍA Y BOTÁNICA	52
2.8.2. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN	52
2.8.3. COMPOSICIÓN Y VALOR NUTRICIONAL	54
2.9. LICOPENO	55

2.9.1. FUENTES DE LICOPENO	56
2.9.2. QUÍMICA DEL LICOPENO	57
2.9.3. LICOPENO COMO ANTIOXIDANTE	58
2.9.4. EXTRACCIÓN DE LICOPENO	60
2.9.5. CUANTIFICACIÓN DE LICOPENO POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)	62
2.10. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	63
2.10.1. REGIÓN SUPERCRÍTICA Y FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	64
2.10.2. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	66
2.10.3. PROCEDIMIENTO GENERAL DE EXTRACCIÓN.....	67
2.10.4. APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	68
2.10.5. FACTORES QUE AFECTAN LA SFE DE CAROTENOIDES	69
2.11. VIDA ÚTIL EN ALIMENTOS.....	71
2.11.1. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL.....	72
2.11.2. PRUEBAS ACELERADAS EN EL ESTUDIO DE VIDA ÚTIL	75
III. MATERIALES Y MÉTODOS	80
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	80
3.2. MATERIA PRIMA	80
3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	80
3.3.1. MATERIALES.....	80
3.3.2. REACTIVOS.....	82

3.3.3. EQUIPOS	83
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS	85
3.4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	85
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	98
3.5.1. FLUJO DE OPERACIONES	98
3.5.2. ESQUEMA EXPERIMENTAL	101
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	108
4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICO PROXIMAL DE LA LINAZA Y TOMATE SECO... ..	108
4.1.1. LINAZA	108
4.1.2. TOMATE SECO	110
4.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LINAZA.....	111
4.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL LICOPENO DE TOMATE.....	113
4.4. ESTABILIDAD OXIDATIVA CON RANCIMAT	116
4.5. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES.....	120
4.5.1. HUMEDAD.....	120
4.5.2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN	121
4.5.3. COLOR.....	121
4.5.4. ACIDOS GRASOS LIBRES.....	122
4.5.5. ÍNDICE DE PERÓXIDOS	123

4.5.6. ÍNDICE DE P-ANISIDINA	124
4.5.7. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k_{232}).....	125
4.5.8. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k_{268}).....	125
4.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	126
4.7. EVALUACIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES EN LOS ACEITES	129
4.8. EVALUACIÓN DE TOCOFEROLES DE LOS ACEITES	131
4.9. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	134
4.10. PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL POR RANCIMAT	139
4.11. PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL POR PRUEBAS ACELERADAS	142
4.11.1. PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL SEGÚN CADA ANÁLISIS REALIZADO EN LOS ACEITES.....	142
4.11.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LOS ANÁLISIS DE VIDA ÚTIL	162
4.11.3. EFECTO DEL LICOPENO EN EL ACEITE DE LINAZA.....	166
4.11.4. PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL FINAL	168
V. CONCLUSIONES	170
VI. RECOMENDACIONES	171
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
VIII. ANEXOS	194

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características fisicoquímicas y composición de aceites de linaza	12
Cuadro 2: Distribución de los hidroperóxidos formados en la autooxidación	19
Cuadro 3: Productos de descomposición de hidroperóxidos de ácidos grasos	20
Cuadro 4: Ensayos de capacidad antioxidante según su mecanismo de acción	46
Cuadro 5: Composición de nutrientes del tomate.....	55
Cuadro 6: Contenido de licopeno en diferentes fuentes	56
Cuadro 7: Condiciones críticas de algunos fluidos supercríticos de uso común.....	65
Cuadro 8: Métodos para medir la oxidación de lípidos en estudios de vida útil.....	73
Cuadro 9: Criterios para definir los límites de aceptabilidad en alimentos que experimentan reacciones oxidativas.....	74
Cuadro 10: Ecuaciones de cinética de reacción.....	77
Cuadro 11: Composición químico proximal de la linaza y tomate seco	108
Cuadro 12: Índice de estabilidad oxidativa (OSI) a 110 °C de los aceites.....	116
Cuadro 13: Caracterización de los aceites de linaza y linaza con licopeno	120
Cuadro 14: Capacidad antioxidante por el método ABTS del aceite de linaza, linaza con licopeno y del extracto de licopeno	126
Cuadro 15: Polifenoles totales en los aceites de linaza y linaza con licopeno	129
Cuadro 16: Contenido de tocoferoles en los aceites de linaza y linaza con licopeno	131
Cuadro 17: Perfil de ácidos grasos de los aceites de linaza y linaza con licopeno	134
Cuadro 18: Tipos de ácidos grasos de los aceites de linaza y linaza con licopeno	137

Cuadro 19: Valores de OSI (h) para la predicción de vida útil	139
Cuadro 20: Vida útil extrapolada a 25 °C por Rancimat	141
Cuadro 21: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de ácidos grasos libres	145
Cuadro 22: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de ácidos grasos libres	145
Cuadro 23: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de ácidos grasos libres	145
Cuadro 24: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de índice de peróxidos	149
Cuadro 25: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de índice de peróxidos	149
Cuadro 26: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de índice de peróxidos	149
Cuadro 27: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de índice de p-Anisidina.....	153
Cuadro 28: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de índice de p-Anisidina	153
Cuadro 29: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de índice de p-Anisidina	153
Cuadro 30: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de k_{232}	157
Cuadro 31: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de k_{232}	157

Cuadro 32: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de k_{232}	157
Cuadro 33: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de k_{268}	161
Cuadro 34: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de k_{268}	161
Cuadro 35: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de k_{268}	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diversidad genética de las semillas de lino.	5
Figura 2: Composición de ácidos grasos del aceite de linaza y otros aceites vegetales.....	11
Figura 3: Formación de 8-, 9-, 10- y 11-hidroperóxidos a partir del oleato.....	18
Figura 4: Formación de 9-, 13-hidroperóxidos a partir del linoleato.	19
Figura 5: Reacciones de descomposición de hidroperóxidos.....	19
Figura 6: Desarrollo de la rancidez durante el almacenamiento.	21
Figura 7: Reacción de aldehídos con el reactivo p-Anisidina.	25
Figura 8: Formación de trienos conjugados.	26
Figura 9: Curva típica obtenida por Rancimat.....	32
Figura 10: Gráfica para la extrapolación de la vida útil por Rancimat.....	33
Figura 11: Interacción de los antioxidantes en las etapas de la autooxidación.	38
Figura 12: Estructura química de los antioxidantes sintéticos.	39
Figura 13: Estructura química de los tocoferoles.	41
Figura 14: Estructura química del ácido ascórbico.	42
Figura 15: Estructura química de los carotenoides.....	42
Figura 16: Reacción de decoloración del ABTS ^{•+} en TEAC I.	49
Figura 17: Oxidación del ABTS con K ₂ S ₂ O ₈ para formar el radical ABTS ^{•+}	50
Figura 18: Dependencia de la capacidad antioxidante con el tiempo de reacción.	51
Figura 19: Cinéticas de reacción que muestran los antioxidantes con el ABTS ^{•+}	51

Figura 20: Cambios durante la maduración del tomate.....	53
Figura 21: Estructura química del licopeno.....	57
Figura 22: Formas isoméricas del licopeno.....	58
Figura 23: Comparación de la separación de los estándares de carotenoides en columna monomérica C18, polimérica C18 y columna de carotenoides C30.	63
Figura 24: Diagrama Presión-Temperatura del CO ₂	64
Figura 25: Diagrama Presión-Volumen del CO ₂	65
Figura 26: Esquema de un extractor de FSC.....	68
Figura 27: Etapas de la vida de un producto alimenticio.	71
Figura 28: Variación de la calidad de los alimentos durante el almacenamiento.....	72
Figura 29: Pasos fundamentales en las estrategias de evaluación de la vida útil.	73
Figura 30: Vida útil dentro de la vida segura de los alimentos.	75
Figura 31: Gráfica del modelo de Arrhenius para predecir la vida útil.....	78
Figura 32: Posibles desviaciones en la gráfica de Arrhenius.	79
Figura 33: Flujo de operaciones para la obtención de aceite de linaza prensado en frío. ...	99
Figura 34: Flujo de operaciones para la obtención del extracto de licopeno de tomate....	101
Figura 35: Esquema experimental de la investigación.....	106
Figura 36: Variación de ácidos grasos libres en el almacenamiento a 40 °C.....	142
Figura 37: Variación de ácidos grasos libres en el almacenamiento a 50 °C.....	143
Figura 38: Variación de ácidos grasos libres en el almacenamiento a 60 °C.....	143

Figura 39: Variación de ácidos grasos libres en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.....	144
Figura 40: Variación de ácidos grasos libres en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.	144
Figura 41: Variación del índice de peróxidos en el almacenamiento a 40 °C.....	146
Figura 42: Variación del índice de peróxidos en el almacenamiento a 50 °C.....	147
Figura 43: Variación del índice de peróxidos en el almacenamiento a 60 °C.....	147
Figura 44: Variación del índice de peróxidos en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.....	148
Figura 45: Variación del índice de peróxidos en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.	148
Figura 46: Variación del índice de p-Anisidina en el almacenamiento a 40 °C.....	150
Figura 47: Variación del índice de p-Anisidina en el almacenamiento de a °C.....	151
Figura 48: Variación del índice de p-Anisidina en el almacenamiento a 60 °C.....	151
Figura 49: Variación del índice de p-Anisidina en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.....	152
Figura 50: Variación del índice de p-Anisidina en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.	152
Figura 51: Variación del valor de k_{232} en el almacenamiento a 40 °C.	154
Figura 52: Variación del valor de k_{232} en el almacenamiento a 50 °C.	155
Figura 53: Variación del valor de k_{232} en el almacenamiento a 60 °C.	155
Figura 54: Variación del valor de k_{232} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.....	156

Figura 55: Variación del valor de k_{232} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.	156
Figura 56: Variación del valor k_{268} en el almacenamiento a 40 °C.....	158
Figura 57: Variación del valor k_{268} en el almacenamiento a 50 °C.....	159
Figura 58: Variación del valor k_{268} en el almacenamiento a 60 °C.....	159
Figura 59: Variación del valor de k_{268} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.....	160
Figura 60: Variación del valor de k_{268} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.	160

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE LICOPENO.....	194
ANEXO 2: CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DE LICOPENO DE TOMATE....	194
ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR OSI A 110 °C	195
ANEXO 4: CROMATOGRAMA DEL ACEITE DE LINAZA CON 80 PPM DE LICOPENO	195
ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA HUMEDAD	196
ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN	196
ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PARÁMETRO L* DE COLOR	197
ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PARÁMETRO a* DE COLOR.....	197
ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PARÁMETRO b* DE COLOR.....	198
ANEXO 10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES.....	198
ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÍNDICE DE PERÓXIDO	199
ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR P-ANISIDINA	199
ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR k_{232}	200
ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR k_{268}	200
ANEXO 15: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS	201
ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA.....	201
ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA	202

ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	202
ANEXO 19: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LOS POLIFENOLES TOTALES ...	203
ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS POLIFENOLES TOTALES	203
ANEXO 21: CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE LINAZA	204
ANEXO 22: CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE LINAZA CON 80 PPM DE LICOPENO	204
ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL α -TOCOFEROL	205
ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL γ -TOCOFEROL.....	205
ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL δ -TOCOFEROL.....	206
ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL β -TOCOFEROL	206
ANEXO 27: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LINAZA	207
ANEXO 28: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LINAZA CON 80 PPM DE LICOPENO	207
ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO α -LINOLÉNICO	208
ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO LINOLEICO	208
ANEXO 31: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO PALMÍTICO	209
ANEXO 32: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO ESTEÁRICO.....	209
ANEXO 33: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO OLEICO	210
ANEXO 34: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO VACCÉNICO	210

ANEXO 35: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO ARAQUÍDICO	211
ANEXO 36: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS	211
ANEXO 37: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS.....	212
ANEXO 38: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS SATURADOS	212
ANEXO 39: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS VALORES DE OSI A 90 °C.....	213
ANEXO 40: ANÁLISIS ESTADÍSTICO LOS VALORES DE OSI A 100 °C	213
ANEXO 41: ANÁLISIS ESTADÍSTICO LOS VALORES DE OSI A 110 °C.....	213
ANEXO 42: GRÁFICA PARA EXTRAPOLAR LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE LINAZA POR RANCIMAT	214
ANEXO 43: GRÁFICA PARA EXTRAPOLAR LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO POR RANCIMAT	214
ANEXO 44: VARIACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO	215
ANEXO 45: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A 40 °C	216
ANEXO 46: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A 50 °C	216
ANEXO 47: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A 60 °C	217
ANEXO 48: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL ACEITE DE LINAZA	217

ANEXO 49: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO	218
ANEXO 50: VARIACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO	219
ANEXO 51: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS A 40 °C.....	220
ANEXO 52: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS A 50 °C.....	220
ANEXO 53: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS A 60 °C.....	221
ANEXO 54: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS DEL ACEITE DE LINAZA	221
ANEXO 55: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO	222
ANEXO 56: VARIACIÓN DEL ÍNDICE DE P-ANISIDINA EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO	223
ANEXO 57: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA A 40 °C	224
ANEXO 58: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA A 50 °C	224
ANEXO 59: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA A 60 °C	225
ANEXO 60: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA DEL ACEITE DE LINAZA	225
ANEXO 61: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO	226

ANEXO 62: VARIACIÓN DEL VALOR k_{232} EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.....	227
ANEXO 63: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{232} A 40 °C	228
ANEXO 64: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{232} A 50 °C	228
ANEXO 65: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{232} A 60 °C	229
ANEXO 66: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{232} DEL ACEITE DE LINAZA	229
ANEXO 67: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{232} DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO.....	230
ANEXO 68: VARIACIÓN DEL VALOR k_{268} EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.....	231
ANEXO 69: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{268} A 40 °C	232
ANEXO 70: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{268} A 50 °C	232
ANEXO 71: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{268} A 60 °C	233
ANEXO 72: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{268} DEL ACEITE DE LINAZA	233
ANEXO 73: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE K_{268} DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO.....	234

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición del extracto de licopeno de tomate sobre la vida útil del aceite de linaza; asimismo, en sus características fisicoquímicas y propiedades antioxidantes. El aceite de linaza fue extraído por prensado en frío con prensa expeller obteniéndose un rendimiento de 33.38 ± 0.98 por ciento (p/p). El extracto de licopeno de tomate se extrajo con CO₂ supercrítico, y se cuantificó 219.95 ± 1.76 µg licopeno/g de tomate mediante HPLC. Se comparó el índice de estabilidad oxidativa (OSI) a 110 °C, medido por el equipo Rancimat, de tres concentraciones de licopeno (40, 80 y 120 ppm) en el aceite de linaza frente a un control negativo (aceite de linaza) y un control positivo (aceite de linaza con 200 ppm de BHT). La concentración de 80 ppm de licopeno en el aceite de linaza no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el control positivo según la prueba de Duncan, razón por la cual se utilizó esta concentración en las siguientes pruebas. Se caracterizó los aceites de linaza y linaza con licopeno (80 ppm) con los análisis de humedad, índice de refracción, color, ácidos grasos libres, índice de peróxidos, índice de p-Anisidina, k_{232} y k_{268} . Se determinó la capacidad antioxidante hidrofílica, lipofílica y total, polifenoles totales, tocoferoles y perfil de ácidos grasos en ambos aceites. Se predijo la vida útil de ambos aceites por extrapolación a 25 °C mediante el método Rancimat utilizando temperaturas de 90, 100 y 110°C, y por pruebas aceleradas en estufa a temperaturas de 40, 50 y 60 °C; teniendo como resultado un incremento del 31.08 y 32.48 por ciento en la vida útil del aceite de linaza por la adición de 80 ppm de licopeno según el método Rancimat y por pruebas aceleradas en estufa, respectivamente.

Palabras clave: licopeno, tomate, aceite de linaza, fluidos supercríticos, Rancimat, vida útil.

ABSTRACT

The aim of the research was to evaluate the effect of adding tomato lycopene extract on the shelf-life of flaxseed oil and on its physicochemical characteristics and antioxidant properties. Flaxseed oil was extracted by cold press with expeller obtaining a yield of 33.38 ± 0.98 percent (w/w). The lycopene extract of tomato was extracted with supercritical CO₂, and 219.95 ± 1.76 µg of lycopene/g of tomato was quantified by HPLC. The oxidative stability index (OSI) at 110 °C, measured by Rancimat equipment, of three lycopene concentrations (40, 80 and 120 ppm) in flaxseed oil was compared to a negative control (flaxseed oil) and a positive control (flaxseed oil with 200 ppm BHT). The concentration of 80 ppm of lycopene in flaxseed oil showed no significant difference ($p > 0.05$) with the positive control according to the Duncan test, therefore this concentration was used for the following tests. Flaxseed and flaxseed with lycopene (80 ppm) oils were characterized using the following analyses: moisture, refractive index, color, free fatty acids, peroxide value, p-Anisidine value, k_{232} and k_{268} . The hydrophilic, lipophilic and total antioxidant capacity, total polyphenols, tocopherols, fatty acid composition were determined in both oils. The shelf-life of both oils was predicted by extrapolation at 25 °C by the Rancimat method using temperatures of 90, 100 and 110 °C, and by accelerated tests in oven at temperatures of 40, 50 and 60 °C. The result was an increase of 31.08 and 32.48 percent in the shelf-life of flaxseed oil when adding 80 ppm of lycopene based on the Rancimat method and the accelerated tests in oven, respectively.

Keywords: lycopene, tomato, flaxseed oil, supercritical fluid, Rancimat, shelf-life.

I. INTRODUCCIÓN

La linaza es una semilla oleaginosa que está recuperando la gran popularidad de su uso tradicional como materia prima en la producción de aceite debido a beneficios para la salud reportados por el consumo de su aceite (Choo *et al.*, 2007a). Debido a su alto contenido de ácido α -linolénico, perteneciente a la familia ω -3, y por su baja relación ω -6/ ω -3, el aceite de linaza se ha vuelto atractivo para aplicaciones en alimentos funcionales y nutracéuticos (Tańska *et al.*, 2016). Raczyk *et al.* (2016) mencionan que se han reportado diferentes estudios que demuestran que el ácido α -linolénico puede proporcionar efectos benéficos contra la dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis, agregación plaquetaria, arritmias, y enfermedades coronarias.

A pesar de la importancia del aceite de linaza en la nutrición humana, Järvenpää, citado por Nykter y Kymäläinen (2006) menciona que solo un 30 por ciento de su producción a nivel mundial es destinada para fines alimentarios, mientras que el 70 por ciento restante es utilizado para otros fines industriales. Así por ejemplo, Tańska *et al.* (2016) mencionan su uso en la producción de pinturas, revestimiento de suelos (linóleo), agente antióxido, aditivo en plásticos de PVC y agente aglomerante para el carbón; esto debido a que el elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el α -Linolénico, lo vuelve un aceite muy inestable y fácil de oxidar (Omar *et al.*, 2010), lo que resulta en un deterioro significativo de sus propiedades organolépticas y valor nutritivo dentro de un corto período de almacenamiento (Shadyro *et al.*, 2017), por lo que es considerado como un aceite secante (Esmaeilifard *et al.*, 2017).

Una forma de conservar las propiedades de un aceite durante el tiempo de almacenamiento está directamente asociada con su estabilización por la adición de antioxidantes (Omar *et al.*, 2010). En la industria alimentaria los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y terc-butilhidroquinona (TBHQ) son ampliamente utilizados debido a que son efectivos y menos costosos que los antioxidantes de origen natural. Sin embargo, se ha cuestionado su seguridad debido a los posibles efectos negativos en la salud humana, lo que ha llevado a un incremento en el interés de nuevas investigaciones

dirigidas a la identificación de antioxidantes naturales (Shadyro *et al.*, 2017). Asimismo, Ghatak y Sen (2017) menciona que el BHT comparte las preocupaciones de seguridad con el BHA en lo que respecta al consumo humano, y aunque la FDA los reconoce como generalmente reconocidos como seguros (GRAS) en los Estados Unidos, el uso del BHA ha sido prohibido en Japón, Rumania, Suecia, Australia y muchos países europeos. Por lo que el gran desafío asociado con el uso de antioxidantes naturales es reemplazar a los antioxidantes sintéticos por agentes que proporcionen efectos iguales o mejores cuando son agregados a los aceites (Omar *et al.*, 2010).

El licopeno es un carotenoide ampliamente presente en los tomates y productos derivados de este, y es el principal componente responsable del color rojo típico de los tomates (Ciurlia *et al.*, 2009). Presenta una gama de propiedades biológicas únicas y distintas debido a su estructura acíclica, hidrofobicidad y gran variedad de enlaces dobles conjugados (Siwach *et al.*, 2016). Asimismo, ha ganado un amplio interés debido a que tiene una elevada actividad antioxidante y por presentar la mayor capacidad de desactivación del oxígeno singlete, siendo aproximadamente el doble que la del β -caroteno. Además, existe un número creciente de evidencias clínicas y estudios que apoyan el papel del licopeno en la protección contra diferentes tipos de cáncer (Choksi y Joshi, 2007).

El licopeno tiene una gran demanda por ser aceptado como un aditivo alimentario y antioxidante natural. Además, su actividad antioxidante se ha evaluado ampliamente en función de su capacidad para eliminar radicales libres en los sistemas, o para proteger los componentes celulares contra el daño oxidativo en modelos de cultivo celular o en modelos animales, por lo que existen suficientes pruebas para demostrar las propiedades antioxidantes del licopeno (Siwach *et al.*, 2016). Razón por la cual se han reportado estudios en los que la adición de licopeno en mantequilla, helado, mayonesa (Kaur *et al.*, 2011) y grasa anhidrada de leche (Siwach *et al.*, 2016) logra mejorar la vida útil de estos productos; y en el caso de aceites vegetales, se ha reportado que su adición logró mejorar la estabilidad oxidativa en aceite de soya (Stenson y Min, 2000, Li *et al.*, 2011) y aceite de oliva extra virgen (Montesano *et al.*, 2006).

La extracción tradicional de licopeno es realizada mediante extracción química debido a que es soluble en solventes orgánicos altamente tóxicos como tetrahidrofurano, benceno, cloroformo y cloruro de metileno (Ciurlia *et al.*, 2009). Asimismo, Cadoni *et al.* (2000) mencionan que estos métodos de extracción son difíciles, poco reproducibles y están sujetos

a errores debido a la pérdida durante la extracción. Además, el uso de estos solventes químicos altamente tóxicos contrasta con el creciente interés en el uso de procesos que sean respetuosos con el medio ambiente, por lo que se han propuesto técnicas innovadoras como lo es la extracción mediante fluidos supercríticos (Ciurlia *et al.*, 2009).

La tecnología de extracción aplicando fluidos supercríticos es una alternativa viable a los métodos convencionales para la extracción de muchos compuestos, entre los que se encuentran los aceites vegetales, que son fuente de una variedad de pigmentos, vitaminas, ácidos grasos esenciales y otros componentes de alto valor nutricional y funcional que se puede preservar de manera más efectiva (Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes, 2015). El dióxido de carbono (CO₂) en estado supercrítico es el fluido supercrítico más utilizado en este tipo de extracción, debido a las ventajas que presenta frente a otros fluidos supercríticos, entre las cuales destacan la baja temperatura crítica, no ser tóxico ni inflamable, y estar disponible a bajo costo y alta pureza; por lo que se vuelve en un solvente ideal para aplicaciones industriales que requieren una alta pureza de productos finales, tales como alimentos, colorantes, productos farmacéuticos y cosméticos (Ciurlia *et al.*, 2009).

La investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto antioxidante del extracto de licopeno extraído de tomate orgánico en base al aumento de la vida útil del aceite de linaza (*Linum unissitatum* L.); y como objetivos específicos: extraer aceite de linaza prensado en frío mediante prensa expeller; extraer y cuantificar el licopeno de tomate orgánico procedente del huerto de la UNALM utilizando CO₂ supercrítico; determinar mediante el equipo Rancimat la concentración adecuada de licopeno que se asemeje al índice de estabilidad oxidativa de 200 ppm de antioxidante BHT en el aceite de linaza; evaluar los cambios en las características fisicoquímicas, capacidad antioxidante, polifenoles totales, tocoferoles y perfil de ácidos grasos en los aceites de linaza y linaza con licopeno; y predecir la vida útil del aceite de linaza y linaza con licopeno mediante Rancimat y pruebas aceleradas en estufa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LINAZA

El lino (*Linum usitatissimum*) es una planta anual perteneciente al género *Linum* y a la familia *Linaceae* (Sultana, citado por Nykter y Kymäläinen, 2006). Existen variedades de lino destinadas para la obtención de fibra y otras donde se utilizan sus semillas (linaza) para la obtención de aceite (Cloutier, 2016), siendo sólo la *Linum usitatissimum* L. la que se cultiva para la producción comercial de aceite (Shim *et al.*, 2015).

En los últimos 50 años, la producción mundial de linaza fluctuó entre dos y cuatro millones de toneladas, pero en la última década se ha estabilizado en poco más de dos millones de toneladas (Cloutier, 2016), siendo Canadá (líder mundial), China, India, Estados Unidos y la Unión Europea los principales productores de linaza (Maheshwari y Kovalchuk, 2016).

El origen del lino se encuentra en el sur de Europa, el Cercano Oriente o Asia Central, y existe evidencia del uso de lino en las culturas neolíticas como fuente de fibra. La fibra de lino se identificó en sitios prehistóricos en Israel y Siria. El lino se cultivó en Egipto entre los años 4500 y 4000 a.C. y llegó a Suiza alrededor de 3000 a.C.; posteriormente fue encontrado en Inglaterra. Se cree que Lois Hebert, la primera granjera en Canadá, introdujo el lino en Canadá hace casi 400 años (Hall *et al.*, 2016).

2.1.1. CARACTERÍSTICAS Y TAXONOMÍA

Las semillas de lino (1.5 - 5.5 mm de diámetro) son planas y ovaladas con punta puntiaguda, aunque existe mucha variación en la forma de las semillas (Shim *et al.*, 2015). La capa de estas puede variar de un color marrón oscuro a amarillo o tener ambas (Figura 1), y por lo general son lisas y brillantes (Daun *et al.*, 2003). Todas las variedades de lino registradas en Canadá tienen una capa de semillas de color marrón oscuro, mientras que en otros países pueden encontrarse amarillas como la variedad Omega en los Estados Unidos (Przybylski, 2005). Mil semillas tienen un peso de 2.7 a 8.4 g, pero la mayoría de las variedades canadiense y estadounidense tienen un peso de mil semillas de 5 a 5.5 g (Cloutier, 2016).



Figura 1: Diversidad genética de las semillas de lino.

FUENTE: Adaptado de Cloutier 2016.

Las variedades de lino para fibra generalmente tienen tallos más largos (80 - 120 cm de alto), con menos ramas, menos cápsulas de semillas y semillas más pequeñas, mientras que las destinadas para la obtención de aceite tienen tallos más cortos y muy ramificados (60 - 80 cm de alto), mayor número de cápsulas de semillas y semillas más grandes (Przybylski, 2005).

El *Linum* es el género tipo para la familia del lino, Linaceae (DC) Dumort. La familia del lino está geográficamente extendida con unas 300 especies en todo el mundo, varias de las especies son arbustos y se encuentran en áreas tropicales, mientras que las especies perennes y anuales se encuentran en áreas templadas del mundo (Diederichsen y Richards, 2003).

La familia del lino está posicionada en el reino vegetal de la siguiente manera: División: Pteridophyta; Subdivisión: Angiospermae; Clase: Dicotyledoneae; Subclase: Rosidae; Orden: Geraniales. Dentro de esta, el género *Linum* pertenece a la tribu Linoideae H. Winkl, y en esta se encuentran otros cuatro géneros: *Reinwardtia* Dumort; *Tirpitzia* Hallier; *Hesperolinon* (A. Gray); y *Radiola* (Dillen.) Roth (Diederichsen y Richards, 2003).

2.1.2. AGRONOMÍA

El lino prospera mejor en regiones con un clima húmedo y moderadamente cálido, sin heladas tardías en primavera, y con suficiente humedad durante el período de crecimiento. El lino está bien adaptado al oeste de Canadá, donde las temperaturas oscilan entre 10 y 25 °C durante la temporada de crecimiento (Hall *et al.*, 2016). En climas templados, se cultiva como un cultivo anual de verano que madura en 90 a 150 días, incluyendo el período vegetativo, floración y maduración de las semillas. En algunas zonas se cultiva linaza de

invierno, las cuales no requieren la vernalización para florecer, y tienen la capacidad de soportar algunas temperaturas frías en las primeras etapas de desarrollo (Cloutier, 2016).

Idealmente, la linaza se siembra en suelo firme y húmedo de 1.5 a 3.0 cm de profundidad en hileras separadas de 15 a 20 cm a una densidad de siembra de 30 a 45 kg/ha. Se recomienda la siembra temprana para evitar algunas enfermedades, la sequía y el calor durante la floración y maduración de las semillas, lo que se traduce en un mayor rendimiento, contenido de aceite y calidad. En general, la utilización de las mejores prácticas de manejo agronómico, como la siembra temprana, la rotación de cultivos y el control de malezas y enfermedades, tiene un efecto importante en el rendimiento de la linaza (Cloutier, 2016).

2.1.3. COMPOSICIÓN DE LA LINAZA

Expresado en base seca, la linaza típica contiene de 41 a 43 por ciento de aceite, alrededor de 28 por ciento de fibra dietaria, 21 a 23 por ciento de proteína, 6 por ciento de carbohidratos y 4 por ciento de ceniza. Estos valores pueden variar entre los genotipos, particularmente en el contenido de aceite (Cloutier, 2016), así como las condiciones ambientales en el crecimiento, el procesamiento de las semillas y el método de análisis (Daun *et al.*, 2003).

La linaza contiene de 21 a 23 por ciento de proteínas en base seca, pero la torta obtenida después de la extracción de aceite puede tener un contenido del 31 a 33 por ciento (Cloutier, 2016). La composición de aminoácidos se considera generalmente buena, las proteínas de la linaza son relativamente altas en arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, mientras que la lisina, la metionina y la cistina son aminoácidos limitantes (Ganorkar y Jain, 2013).

La linaza tiene una relación de fibra soluble e insoluble que varía de 20:80 a 40:60, las cuales se encuentran en mayor proporción en la capa de la semilla. En un pequeño subconjunto de variedades, el contenido de mucílago (fibra soluble principal de la linaza) varía del 3 al 8 por ciento del peso de la semilla seca (Cloutier, 2016). Se ha reportado que las fibras dietarias de la linaza presentan una relación directa con la salud en particular en la regulación del peso corporal mediante la supresión del apetito y la disminución de la absorción de nutrientes (Kristensen *et al.*, citados por Bernacchia *et al.*, 2014).

La linaza presentan un bajo contenido de carbohidratos (azúcares y almidones), proporcionando solo 1 g por 100 g de linaza, razón por la cual contribuye poco al consumo total de carbohidratos, y es recomendado para personas con enfermedades específicas. Los

polisacáridos de la linaza se compone de dos fracciones principales: un arabinosilano neutro (75 por ciento) y un ramnogalacturonano (25 por ciento). El arabinosilano está compuesto principalmente por xilosa, arabinosa y galactosa, y el ramnogalacturonano está formado por los ácidos L-rammosa, D-galactosa, D-galacturónico y L-fucosa (Bernacchia *et al.*, 2014).

La linaza es una fuente de muchas vitaminas y minerales como calcio, magnesio y fósforo, lo cual es de gran importancia, ya que una porción de 30 g de la semilla constituye del 7 al 30 por ciento de la dieta recomendada para estos minerales. Las vitaminas más abundantes en la linaza son los tocoferoles (isómeros α , β y δ) y la niacina (Bernacchia *et al.*, 2014). Otros compuestos bioactivos son los compuestos fenólicos, incluidos lignanos, flavonoides y ácidos fenólicos. En particular, la linaza es la fuente dietaria más rica de precursores de lignanos, siendo el principal el secoisolariciresinol diglucósido (SDG), el cual tiene una serie de beneficios para la salud asociados con su consumo (Bernacchia *et al.*, 2014).

2.1.4. IMPORTANCIA Y USOS DE LA LINAZA

La principal importancia de la linaza se encuentra en el sector de la nutrición humana, ya que está emergiendo como un ingrediente alimentario funcional importante gracias a su contenido de compuestos activos que pueden proporcionar beneficios a la salud (Bernacchia *et al.*, 2014). El consumo diario de linaza ayuda a la prevención de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica debido a la presencia de ácido α -linolénico (ALA), lignanos, fitoestrógenos y fibra soluble, lo que lo hace adecuado como fuente de fármacos y terapéuticos (Maheshwari y Kovalchuk, 2016). Además, estos componentes son vinculados a varios atributos de salud en humanos y animales por lo que han contribuido a que la linaza sea bien vista en los mercados de alimentos y piensos (Cloutier, 2016).

Debido a su alto contenido en ALA, la linaza ha tenido mucha atención como ingrediente alimentario funcional (Goyal *et al.*, citados por Hall *et al.*, 2016). Se ha probado ampliamente que un alto nivel de ALA en la dieta puede reducir el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, y limitar la producción de ácidos araquidónicos y eicosanoides pro-inflamatorios (Zuk *et al.*, 2015), así como brindar efectos beneficiosos contra la dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis, la agregación plaquetaria y arritmias (Raczyk *et al.*, 2016). Se ha utilizado a menudo como suplemento alimenticio, donde el enriquecimiento con ácidos grasos ω -3 es necesario (Przybylski, 2005), y en la alimentación de aves de corral para producir huevos con alto contenido en ácidos grasos ω -3 (Kochhar, 2002).

La linaza contiene fibras solubles e insolubles. La fracción predominante de la fibra soluble es el mucílago, que se ha asociado con la disminución del colesterol en la sangre y la glucosa. Los lignanos son fitoestrógenos que también forman parte del componente de fibra dietaria. La semilla de lino es una de las mejores fuentes de estos compuestos difenólicos. El secoisolariciresinol diglucósido, el principal lignano de linaza, se ha asociado con la reducción de los riesgos de cánceres sensibles a las hormonas, como los cánceres de próstata, colon y mama. Los lignanos también tienen propiedades antioxidantes que conducen a su papel positivo en la reducción de la actividad de los radicales libres (Cloutier, 2016).

Debido a los beneficios que tiene en la salud se han desarrollado un número significativo de productos utilizando linaza (McVetty *et al.*, 2016). La linaza molida o entera se usan en muchos productos de panadería y confitería para aumentar el valor nutricional suministrando una buena fuente de ácidos grasos esenciales del tipo ω -3 (ácido α -linolénico) (Kochhar, 2002); han sido incorporadas en panes, muffins, cereales, crackers, barras energéticas, mezclas para hornear, snacks, sopas y waffles (Daun *et al.*, 2003).

En la extracción de aceite de linaza se tiene como subproducto una torta rica en proteínas que puede ser utilizada en la alimentación de ganados; mientras que el aceite extraído es utilizado como alimento humano, sobre todo como suplemento, pero su principal aplicación es como aceite industrial en tintas, pinturas y suelos de linóleo (Cloutier, 2016), debido a que se oxida y polimeriza fácilmente al exponerse al oxígeno (Hall *et al.*, 2016), siendo esta característica de oxidación rápida la que se requiere en estas industrias (Przybylski, 2005).

2.1.5. COMPONENTES ANTINUTRICIONALES

En la linaza se pueden encontrar inhibidores tripsina, myo-inositol fosfato, cadmio, glucósidos cianogénicos, fitoestrógenos con efectos adversos para la salud y compuestos tóxicos (Bernacchia *et al.*, 2014). Asimismo, se ha reportado la presencia de linatina y ácido fítico (Dunford, 2015), siendo la linatina un antagonista de la vitamina B₆ (Cloutier, 2016).

Los principales glucósidos cianogénicos reportados son la linamarina, linustatina, lotaustralina y neolinustatina (Dunford, 2015). Después de la ingestión, la hidrólisis puede conducir a la liberación de cianuro de hidrógeno que puede impedir el proceso esencial de la respiración celular. Sin embargo, la cantidad de glucósidos cianogénicos en la linaza es baja, y debido a que la dosis letal aguda de cianuro de hidrógeno en humanos es de 0.5 a 3.5

mg/kg de peso corporal, un adulto promedio tendría que consumir aproximadamente 1000 g de linaza en un día para ser una dosis mortal. La ingesta diaria recomendada de linaza de 30 a 40 g contiene muy por debajo de la dosis tóxica (Cloutier, 2016).

2.2. ACEITE DE LINAZA

Las variedades de linaza cultivadas en los últimos años contienen entre 40 a 50 por ciento de aceite, de los cuales el 55 a 57 por ciento es ALA (Cloutier, 2016), lo que le da un perfil de ácidos grasos único al aceite de linaza en comparación con las demás semillas oleaginosas (Fitzpatrick, 2011). El contenido de aceite y composición de ácidos grasos a menudo cambian debido a la adaptación del cultivo a las estaciones de crecimiento regionales, así como de los efectos ambientales (Cloutier *et al.*, citados por Zuk *et al.*, 2015).

2.2.1. EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LINAZA

Los principales métodos para la extracción comercial de aceite de linaza son la extracción con solventes y el prensado mecánico (Zheng *et al.*, 2003), o combinación de ambos, primero por un prensado y seguido por la extracción con solvente (Dunford, 2015). Sin embargo, por la naturaleza sensible del ALA, se requiere una extracción con condiciones suaves, por lo que el aceite comercial de linaza para uso alimentario se extrae por prensado en frío de las semillas enteras (Kolodziejczyk y Fedec, citados por Tostenson *et al.*, 2004), debido a que los ácidos grasos ω -3 son sensible al calor, oxígeno y luz (Choo *et al.*, 2007b). Dependiendo de las aplicaciones, el aceite de linaza se refina ligeramente y puede desodorizarse a baja temperatura para encapsularlo y mezclarlo con otros aceites (Kochhar, 2002).

El término prensado en frío no está bien definido, pero indica que la semilla fue prensada sin suplementar calor para proteger compuestos sensibles como el ALA. La definición legal es diferente o inexistente en algunos países, por ejemplo, para ser etiquetado como "prensado en frío" en el Reino Unido la temperatura del aceite al salir de la prensa de tornillo debe ser inferior a 50 °C (De Panfilis *et al.*, citados por Zheng *et al.*, 2003). El aceite de linaza prensado en frío es uno de los alimentos funcionales más reconocidos por los consumidores conscientes de la salud (Oomah, 2003), presenta sabor suave, color dorado, y puede almacenarse varios meses en botellas oscuras bajo refrigeración (Tostenson *et al.*, 2004); mientras que el obtenido por prensado caliente y solventes es de color marrón oscuro y se utiliza en industrias de barnices, pinturas, linóleo y jabón (van Doosselaere, 2013).

El aceite comestible de linaza debe almacenarse en condiciones frías, libres de oxígeno, luz, y protegerse mediante la adición de una formulación antioxidante adecuada que contenga quelantes metálicos y desactivadores de oxígeno singlete (Kochhar, 2002). Asimismo, Lukaszewicz *et al.*, citados por Herchi *et al.* (2012) mencionan que después de la extracción en frío, para evitar el rápido enranciamiento, el aceite de linaza a menudo se suplementa con vitamina E, se almacena en frascos de vidrio oscuro y no puede ser usado para freír. Sin embargo, rara vez es usado para freír o preparar alimentos en presencia de calor. En las principales regiones productoras de lino en China, como la provincia de Gansu, el aceite de linaza es usado como aceite de cocina (Pan, citado por Choo *et al.*, 2007b).

Para la extracción mecánica continua del aceite se utilizan expellers o prensas de tornillo (Oomah, 2003). La prensa de tornillo, aunque recupera menos aceite, es permitido por la industria de alimentos orgánicos, que sigue siendo responsable de gran parte de la industria del aceite de linaza. La extracción con solventes, aunque universalmente utilizada en grandes procesos comerciales de aceite vegetal, no está permitida por la industria de alimentos orgánicos y da como resultado aceite de linaza con sabor inaceptable (Tostenson *et al.*, 2004). Una forma de aumentar la extracción mecánica del aceite de linaza es por tratamiento con enzimas antes del prensado en frío (Anwar *et al.*, citados por Dunford, 2015).

La linaza contiene un pequeño porcentaje de un glucósido cianógeno llamado linamarina y una enzima llamada linsis. Entre 40 a 50 °C y en presencia de humedad, la enzima actúa sobre la linamarina para liberar ácido cianhídrico (HCN). Durante el prensado en frío, la linsis y la linamarina no se eliminan, y puede ser perjudicial alimentar a los animales con la torta obtenida después de la extracción de aceite. Sin embargo, el tratamiento térmico de la linaza antes y durante la extracción de aceite permite la eliminación de los compuestos tóxicos, dando así una torta que puede ser utilizada para la alimentación del ganado sin el problema de la torta obtenida por el prensado en frío. El prensado en caliente produce una torta con alrededor del 8 por ciento de aceite residual, y contiene de 30 a 40 por ciento de proteínas y se digieren fácilmente (van Doosselaere, 2013).

2.2.2. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN

La composición de ácidos grasos del aceite de linaza es única entre las semillas oleaginosas porque es particularmente alta en ALA, el ácido graso esencial de la familia de los ω -3. Las principales semillas oleaginosas del mundo contienen menor contenido de ALA que la

linaza, por ejemplo, los aceites de colza (canola) y de soya contienen 10 y 8 por ciento de ALA, respectivamente; mientras que los aceites de girasol, algodón, maíz y cacahuete solo contienen trazas. Las variedades convencionales de linaza contienen 57 por ciento de ALA, 16 por ciento de ácido linoleico, 18 por ciento de ácido oleico, 4 por ciento de ácido esteárico y 5 por ciento de ácido palmítico (Cloutier, 2016). En la Figura 2 se muestra la composición de ácidos grasos del aceite de linaza en comparación con otros aceites vegetales.

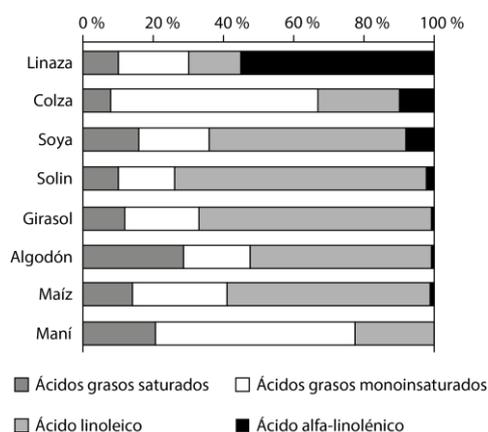


Figura 2: Composición de ácidos grasos del aceite de linaza y otros aceites vegetales.

FUENTE: Adaptado de Cloutier 2016.

Debido a la baja estabilidad oxidativa del aceite de linaza se han utilizado procedimientos de mejoramiento para solucionar este problema. Mediante un proyecto entre CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Australia) y United Grain Growers Ltd (Canadá), se desarrollaron semillas de lino denominadas “Linola” o “Solin”. El aceite obtenido de estas semillas es bajo en el contenido de ALA respecto al aceite de linaza tradicional, reduciendo su contenido desde un 50 a un 2 por ciento, lo que aumenta en gran medida la estabilidad oxidativa del aceite. El color de la semilla de linola es de un amarillo pálido, lo que permite que se distinga del color marrón de la linaza tradicional (Kochhar, 2002). Esta variedad fue desarrollada para satisfacer las necesidades del mercado de la industria de la margarina, sin embargo, el sector de la margarina desarrolló diferentes formulaciones usando principalmente aceites de soya y canola no hidrogenados y la demanda de aceite Linola no fue sostenida, por lo que este tipo de variedades de linaza ya no se comercializan. Se han desarrollado y comercializado variedades de linaza con un elevado contenido de ácido α -Linolénico entre 60 y 75 por ciento, principalmente para los sectores nutracéuticos y de alimentos funcionales (Cloutier, 2016). En el Cuadro 1 se muestra una comparación de las características fisicoquímicas del aceite de linaza y linola.

Cuadro 1: Características fisicoquímicas y composición de aceites de linaza

	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINOLA^a
Parámetro		
Densidad relativa (20 °C/agua a 4 °C)	0.93 - 0.94	0.92
Índice de refracción (n _D 20 °C)	1.48	1.47
Viscosidad (cP)	-	46.4
Índice de yodo	182 - 203	144
Materia insaponificable (%)	0.1 - 1.7	0.6
Índice de saponificación (mg KOH/g)	187 - 195	185
Ácidos grasos libres (% ácido oleico)	0.1 - 2.0	< 0.02
Triglicéridos (%)	94 - 98	96 - 98
Ácidos grasos	% p/p	
14:0	Trazas	Trazas
16:0	5.0 - 7.0	5.6 - 6.1
16:1	Trazas - 0.2	-
18:0	2.0 - 6.0	3.8 - 4.0
18:1 (cisΔ9)	17.9 - 19.0	15.5 - 15.9
18:2 (cisΔ9,12)	14.7 - 24.1	71.3 - 71.8
18:3 (cisΔ9,12,15)	47.4 - 58.7	2.0
20:0	Trazas - 0.4	-
Esteroles	% p/p	
Brasicasterol	1	1
Campesterol	27	23
Estigmasterol	8	4
B-sitosterol	50	54
Δ ⁵ -Avenasterol	10	18
Esteroles totales (g/kg)	2.3	2.2
Tocoferoles	ppm	
α-Tocoferol	20	15
γ -Tocoferol	200	200
δ-Tocoferol	7	5
Plastocromanol-8	120	110
Tocoferoles totales	347	330

^aRefinado, blanqueado y desodorizado

FUENTE: Adaptado de Hall *et al.* 2016.

El alto contenido de ALA influye en algunas propiedades fisicoquímicas del aceite de linaza, por ejemplo, el aceite de linaza con alto contenido de ALA tiene una gravedad específica más alta y puntos de fusión e inflamación más bajos que un aceite de linaza con bajo contenido de ALA. La materia insaponificable compone una fracción menor, pero contiene compuestos que juegan un papel importante en la prevención de la oxidación, lo que afecta el sabor y la calidad nutricional del aceite de linaza, entre los cuales se encuentran fitosteroles y antioxidantes (tocoferoles, tocotrienoles y plastocromanol-8) (Hall *et al.*, 2016).

El ALA puede acumularse a niveles tan altos como 64 por ciento dependiendo de las condiciones de cultivo y crecimiento, siendo los factores ambientales como el suelo y clima los que pueden influir en la composición de ácidos grasos del aceite de linaza. Los cultivos oleaginosos cultivados a temperaturas más bajas suelen acumular mayores niveles de ácidos grasos poliinsaturados que de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Hall *et al.*, 2016).

Los antioxidantes primarios en la linaza son los tococromanos, un grupo que consiste en cuatro tocoferoles y tocotrienoles (α -, β -, γ -, δ -) (Obranović *et al.*, 2015). El aceite de linaza contiene cantidades inferiores de tocoferoles en comparación de otros aceites vegetales, la mitad de la cantidad presente en los aceites de girasol y de canola, y un tercio de los presentes en el aceite de soya, lo que lo hace más susceptible a la oxidación (Przybylski, 2005). La cantidad de tocoferoles en los aceites de linaza difieren significativamente de 154 a 934 mg/kg de aceite (Obranović *et al.*, 2015), siendo el principal el γ -tocopherol (Choo *et al.*, 2007a). Otro antioxidante importante en el aceite de linaza es el plastocromanol-8, un potente antioxidante que podría desempeñar un rol importante en la estabilidad del aceite de linaza (Hall *et al.*, 2016). El plastocromanol-8 se considera como homólogo natural del γ -tocotrienol y el segundo tococromanol más representativo en la linaza con más del 25 por ciento de los tococromanos totales, cuya capacidad antioxidante es similar al γ -tocotrienol y 1.5 veces mayor que el α -tocopherol (Siger, citado por Obranović *et al.*, 2015). Del mismo modo, los esteroides o fitoesteroides están presentes en los aceites de linaza a un nivel más bajo que los de muchos aceites vegetales, encontrándose en un 2.3 mg/g en aceite de linaza en comparación con valores entre 4.1 a 6.9 mg/g en otros aceites vegetales (Przybylski, 2005).

2.2.3. IMPORTANCIA Y USOS DEL ACEITE DE LINAZA

El alto contenido de ALA es el que le brinda propiedades únicas y útiles al aceite de linaza para aplicaciones tanto alimentarias como no alimentarias (Hall *et al.*, 2016), pero contribuye a que el aceite se oxide muy rápido (Kochhar, 2002), debido a que el ácido graso ω -3 se oxida de 20 a 40 veces más rápido que el ácido oleico y de 2 a 4 veces más rápido que el ácido linoleico (Frankel, citado por Przybylski, 2005).

El ALA es un ácido graso esencial que desempeña un papel importante en el crecimiento y desarrollo, la reproducción, visión, mantenimiento de la piel sana, mantenimiento de la estructura celular, el metabolismo del colesterol y la regulación de genes; y al igual que el ácido graso ω -6 es requerido en la dieta ya que no puede ser sintetizado por el ser humano

(Fitzpatrick, 2011). Desde un punto de vista bioquímico, la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados modula la composición lipídica de la membrana, por lo que el consumo de aceite de linaza protege contra las consecuencias negativas de una dieta desequilibrada, y previene o retrasa la aparición de enfermedades crónicas al reducir la carga del estrés oxidativo y la generación de mediadores antiinflamatorios (Zuk *et al.*, 2015).

El elevado contenido de ALA vuelve al aceite de linaza un aceite secante excelente, por lo que se utiliza principalmente para fines no alimentarios como en la fabricación de pinturas, barnices, linóleos y tintas (Kochhar, 2002). Los aceites secantes, como el aceite de linaza, soya, tung, girasol, ricino, y como muchos aceites de pescado, son aceites altamente insaturados que se oligomerizan o polimerizan cuando se exponen al oxígeno, generalmente en presencia de un catalizador, dando como resultado un aumento en el peso molecular que incluye reticulación (Van De Mark y Sandefur, 2005), y la formación de un material sólido, pero elástico conocido como linoxina (van Doosselaere, 2013). Debido a estas reacciones de reticulación y polimerización, se forma una película suave y duradera después de su exposición al aire, una propiedad que es ventajosa para pinturas y barnices. El aceite de linaza vuelve a las pinturas más fluidas, transparentes, y brillantes. Además, se puede usar como un ingrediente en las formulaciones de tintas, en este caso se prepara un "stand oil" sometiendo el aceite a temperatura de 290 °C bajo exposición al aire hasta alcanzar una viscosidad aproximada de 200 P (Hall *et al.*, 2016). Asimismo, es utilizado como recubrimiento de aceite en la terminación de tallas de madera, como tintes y acabados de cubiertas de madera, recubrimientos de tejas de cedro, y en la formación de resinas alquídicas, el cual es usado en pinturas arquitectónicas (Van De Mark y Sandefur, 2005).

2.3. OXIDACIÓN LIPÍDICA

La oxidación se trata generalmente como la forma más frecuente de deterioro de los lípidos, lo que conduce al desarrollo de rancidez, sabores no deseados, polimerización y reacciones que reducen la vida útil y valor nutritivo del producto alimenticio (Yanishlieva-Maslarova, 2001). En alimentos se asocia con la reacción del oxígeno molecular que involucra dos tipos de mecanismos: autooxidación y oxidación fotosensibilizada (Wong, 2018). Los radicales libres y la fotooxidación en los carbonos alílicos son responsables del deterioro de los aceites y grasas insaturadas, lo que da como resultado sabores rancios y una calidad nutricional reducida, pero también se usan para polimerizar aceites secantes. Tanto la autooxidación como la fotooxidación producen hidroperóxidos alílicos (Scrimgeour, 2005).

La oxidación de los lípidos está influenciada por muchos factores como el medio, la concentración de oxígeno, temperatura, luz, grado de insaturación y los iones metálicos. En presencia de oxígeno, la oxidación no puede evitarse por completo ni puede revertirse, pero puede inhibirse, retrasando la acumulación de productos de oxidación (Scrimgeour, 2005).

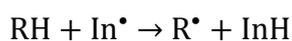
2.3.1. AUTOOXIDACIÓN

La autooxidación es un proceso inducido por radicales libres que tiene lugar entre el oxígeno molecular y los ácidos grasos insaturados. La autooxidación de ácidos grasos insaturados ocurre a través de un mecanismo de cadena de radicales libres que consiste en las etapas de iniciación, propagación y terminación (Shahidi *et al.*, 2017b).

Los lípidos normalmente están en un estado singlete no radical, y su reacción con el oxígeno atmosférico ($^3\text{O}_2$) es termodinámicamente desfavorable (Choe, 2017). El oxígeno en su estado fundamental triplete ($^3\text{O}_2$) es incapaz de reaccionar directamente con una especie en estado singlete tal como una molécula lipídica (RH) (Elias y Decker, 2017), debido a la dirección de spin opuesta de ambos (Shahidi y Wanasundara, 2005). Sin embargo, una vez que un lípido se convierte en una especie radical (R^\bullet), su reacción directa con el oxígeno puede proceder a velocidades rápidas (Elias y Decker, 2017). La velocidad de autooxidación generalmente aumenta con el aumento de la insaturación, por ejemplo, el linoleato reacciona aproximadamente 40 veces más rápido que el oleato, y para los polienos superiores, la velocidad se duplica por cada doble enlace adicional (Frankel, citado por Scrimgeour, 2005).

a. INICIACIÓN

La iniciación comienza con la abstracción de un átomo de hidrógeno adyacente a un doble enlace en una molécula o resto de ácido graso (RH) que puede ser catalizado por iniciadores (In^\bullet) como la luz, calor o iones metálicos para formar un radical libre, también llamado radical alquilo (R^\bullet) (Shahidi *et al.*, 2017b).

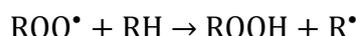
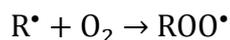


El radical libre como iniciador puede ser producido por la descomposición de hidroperóxidos ya presentes o por fotooxidación. La descomposición puede ser térmica, pero es más probable que sea promovida por trazas de iones metálicos de diferentes estados redox (Scrimgeour, 2005). Los metales de transición como el hierro y el cobre son capaces de

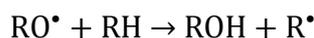
iniciar la autooxidación donando un electrón o abstrayendo un átomo de hidrógeno para generar radicales alquilo por reacción con ácidos grasos insaturados. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) también pueden iniciar la autooxidación (Shahidi *et al.*, 2017b).

b. PROPAGACIÓN

El radical alquilo resultante reacciona con el oxígeno atmosférico para formar un radical peroxilo inestable (ROO[•]), que a su vez puede abstraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido (ROOH), incluyendo hidroperóxidos conjugados y no conjugados, así como un nuevo radical alquilo (Shahidi *et al.*, 2017b) que reacciona rápidamente con el oxígeno para producir otro radical peroxilo (ROO[•]), dando como resultado un mecanismo oxidativo cíclico que se autopropaga (Elias y Decker, 2017). La reacción del radical alquilo con el oxígeno es más rápida que la reacción de transferencia de hidrógeno con los lípidos insaturados para formar hidroperóxidos (Frankel, 2005a).

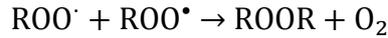


Los hidroperóxidos (ROOH) formados son relativamente inestables en las condiciones de los alimentos y pueden degradarse para producir radicales que aceleran aún más las reacciones de propagación. Esta degradación puede ocurrir por reacción con metales de transición reducidos (Mⁿ⁺) que son ubicuos en los alimentos o por radiación de alta energía, por ejemplo, luz ultravioleta. En estas reacciones se producen radicales alcoxilos (RO[•]) que reaccionan libremente con el sustrato lipídico nuevo (Elias y Decker, 2017).

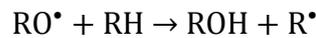


c. TERMINACIÓN

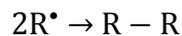
En las últimas etapas de la autooxidación, los radicales peroxilo se acumulan, y a niveles relativamente altos pueden interactúan entre sí (Frankel, 2005a) o con radicales alquilo para formar productos no radicales mediante reacciones de terminación (Shahidi *et al.*, 2017b).



Los radicales alcoxilo ($RO\cdot$) formados son inestables, lo que conduce a la descomposición de la molécula. Estas reacciones, comúnmente denominadas reacciones de escisión β , provocan la escisión de los enlaces C-C en la molécula de lípidos que da como resultado productos de bajo peso molecular (Elias y Decker, 2017). Además, los radicales alcoxilo pueden reaccionar con el lípido insaturado para formar alcoholes estables o experimentar fragmentación en aldehídos insaturados y otros productos inestables, produciendo nuevos radicales que pueden continuar la reacción en cadena (Frankel, 2005a).



Otras reacciones de terminación pueden producirse por condensación de radicales peroxilo, alcoxilo o alquilo. A bajas temperaturas, los radicales peroxilo pueden combinarse para producir dímeros con la formación de oxígeno, mientras que a bajas presiones de oxígeno y temperaturas elevadas, los radicales alcoxilo y alquilo pueden combinarse para producir dímeros que contienen éter y dímeros unidos por enlace C-C (Frankel, 2005a).



El término "terminación" es un concepto difuso en el sentido de que, desde el punto de vista práctico, las cadenas de oxidación de los lípidos probablemente nunca se detengan por completo, debido a que la descomposición y reordenamiento de los hidroperóxidos son las principales fuentes de propagación de los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo, por lo que la "terminación" se refiere a un radical individual, no a la reacción global (Schaich, 2005).

2.3.2. PRODUCTOS DE OXIDACIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA

Los hidroperóxidos son los productos de oxidación primarios, son relativamente estables a temperatura ambiente (Choe, 2017) y pueden formarse a partir del oleato, linoleato y linolenato. En el oleato, la abstracción de hidrógeno ocurre en el doble enlace cis C9-C10;

para la abstracción C9-H, el producto radical se estabiliza mediante el radical alílico deslocalizado entre C8-C9-C10; para la abstracción C10-H, la estructura del radical alquilo resultante se estabiliza mediante el radical alílico deslocalizado entre C9-C10-C11; formándose cuatro hidroperóxidos con mezclas de isómeros cis y trans: 8-OOH-cis- Δ 9,10; 11-OOH-cis- Δ 9,10; 9-OOH-trans- Δ 10,11 y 10-OOH-trans- Δ 8,9 (Figura 3) (Wong, 2018).

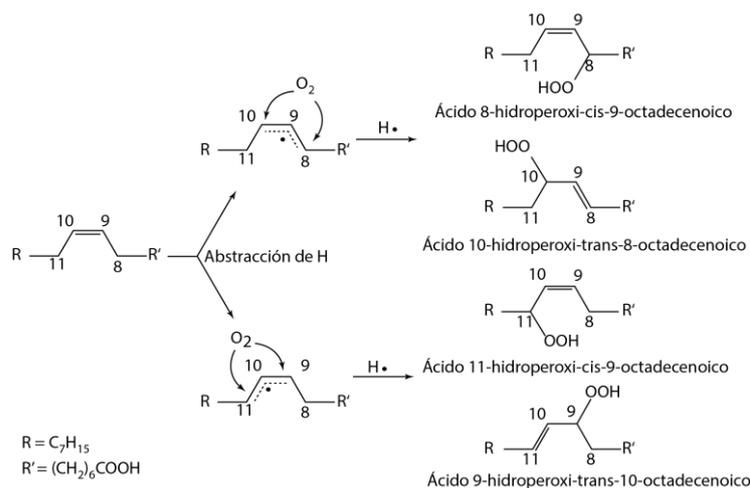


Figura 3: Formación de 8-, 9-, 10- y 11-hidroperóxidos a partir del oleato.

FUENTE: Adaptado de Wong 2018.

Para el linoleato, la abstracción de H ocurre en C11, debido a que el enlace C-H en la posición bis-alílica es el enlace más débil de la molécula. La estructura radical resultante se estabiliza mediante un pentadieno deslocalizado. La adición de oxígeno tiene lugar en C9 y C13, produciendo predominantemente los 9- y 13-hidroperóxidos en configuraciones trans y cis, ya que la estabilidad del sistema de dieno conjugado favorece el ataque de oxígeno en las posiciones finales (Figura 4). Del mismo modo, la autooxidación del linolenato da como resultado la formación de 9-, 12-, 13- y 16- hidroperóxidos (Wong, 2018). En el Cuadro 2 se muestra la distribución de los productos de oxidación del oleato, linoleato y linolenato.

En presencia de metales o altas temperaturas, los hidroperóxidos se descomponen fácilmente en radicales alcoxilos, los cuales son inestables y sufre una β -escisión homolítica en el enlace entre el carbono que tiene un radical de oxígeno y su carbono adyacente (Choe, 2017). Estas reacciones son responsables de la formación de muchos de los aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos de cadena corta (Figura 5), los cuales son responsables de los sabores oxidados (Wong, 2018). Los radicales resultantes pueden iniciar una autooxidación adicional y producir una serie de productos estables, muchos con propiedades indeseables tanto nutricionales como de sabor (Scrimgeour, 2005).

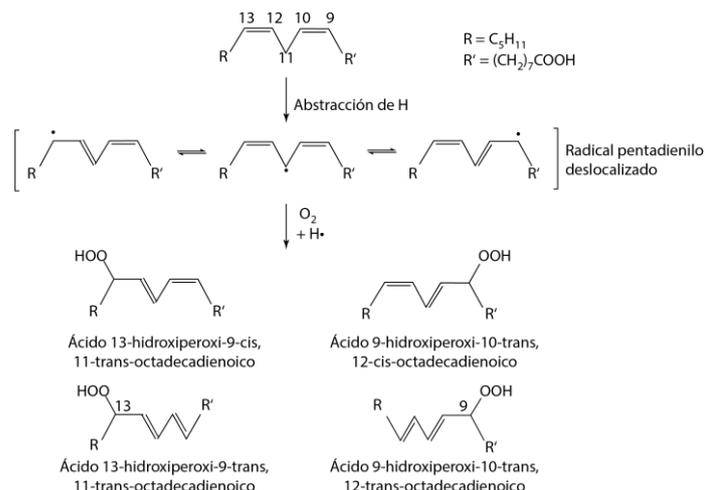


Figura 4: Formación de 9-, 13-hidroperóxidos a partir del linoleato.

FUENTE: Adaptado de Wong 2018.

Cuadro 2: Distribución de los hidroperóxidos formados en la autooxidación

	DISTRIBUCIÓN DE HIDROPERÓXIDOS (%)					
	8-OOH	9-OOH	10-OOH	12-OOH	13-OOH	16-OOH
Oleato	27	23	23	27		
Linoleato		50			50	
Linolenato		30		12	12	46

FUENTE: Adaptado de Frankel, citado por Wong 2018.

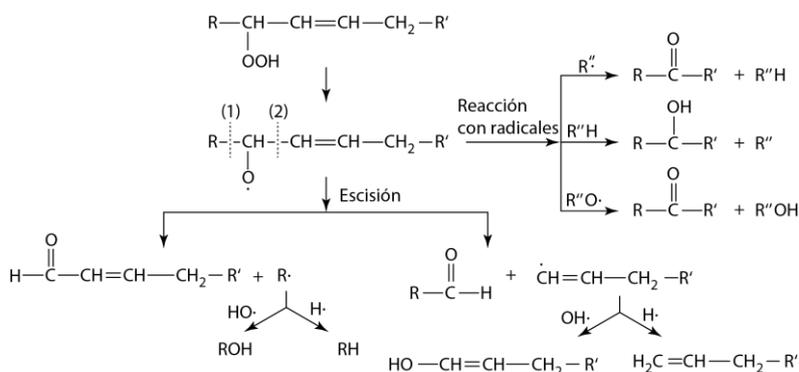


Figura 5: Reacciones de descomposición de hidroperóxidos.

FUENTE: Adaptado de Wong 2018.

Entre los compuestos volátiles formados como productos secundarios de oxidación se incluyen aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos, ésteres, lactonas y éteres, de los cuales los aldehídos son los que más afectan el olor y sabor del aceite. La mayoría de los aldehídos de cadena corta tienen un valor umbral muy bajo, por lo que solo necesitan estar presentes a niveles mínimos para ejercer su efecto olfativo (Gunstone, 2013). Los productos de descomposición del ácido oleico, linoleico y linolénico se mencionan en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Productos de descomposición de hidroperóxidos de ácidos grasos

ÁCIDO GRASO	COMPUESTOS CARBONILOS	HIDROCARBUROS
Ácido Oleico	1-Heptanol, octanal, heptanoato de metilo, nonanal, octanoato de metilo, 8-oxooctanoato de metilo, decanal, 2-decenal, 9-oxononanoato de metilo, 10-oxodecanoato de metilo, 10-oxodecanoato de metilo, 10-oxo-8-decenoato de metilo, 11-oxo-9-undecanoato de metilo.	Heptano, octano
Ácido Linoleico	Pentanal, 1-pentanol, hexanal, 2-octenal, 1-octeno-3-ol, heptanoato de metilo, 2-nonenal, octanoato de metilo, 8-oxooctanoato de metilo, 2,4-decadienal, 9-oxononanoato de metilo, 10-oxodecanoato de metilo.	Pentano
Ácido Linolénico	Propanal, butanal, 2-butenal, 2-pentenal, 2-hexenal, heptanoato de metilo, 3,6-nonadienal, octanoato de metilo, decatrienal, nonanoato de metilo, 9-oxononanoato de metilo, 10-oxodecanoato de metilo	Etano, pentano

FUENTE: Adaptado de Choe 2017.

Los 12- y 13-hidroperóxidos del linolenato son homófilos, lo que permite la ciclación de 1,3 para formar hidroperóxidos cíclicos. Del mismo modo, los 10- y 12-hidroperóxidos de linoleato producidos a partir de la fotooxidación son homófilos y pueden someterse a ciclación para formar peróxidos cíclicos. Sin embargo, los 10- y 15-hidroperóxidos de linolenato producidos a partir de la fotooxidación tiene un pentadieno vecino que puede ciclarse para formar diperóxidos. Además, en los hidroperóxidos del linolenato, la 1,4-ciclación después de la 1,3-ciclación inicial produce un peróxido bicíclico que se estabiliza mediante un radical alílico, la degradación térmica del peróxido bicíclico da la formación del malonaldehído (Wong, 2018).

Los aceites vegetales que contienen mezclas de oleato, linoleato y linolenato producen 14 isómeros posicionales de hidroperóxidos por autooxidación y oxidación fotosensibilizada. Se producen más productos secundarios, dímeros y oligómeros a partir de aceites que contienen linolenato que a partir de aceites que contienen linoleato. Los aceites de pescado que contienen ácidos grasos ω -3 producen productos de descomposición volátiles a temperaturas más bajas (por debajo de 40 °C) que los aceites vegetales que contienen linoleato y linolenato (por encima de 60 °C) (Frankel, 2005b).

2.3.3. DESARROLLO DE LA RANCIDEZ DURANTE EL ALMACENAMIENTO

La oxidación de los lípidos en los productos alimenticios se desarrolla lentamente en un inicio, y se acelera en etapas posteriores durante el almacenamiento. En este desarrollo de la oxidación se da un período de inducción, el cual se mide como el tiempo requerido para alcanza un punto final de oxidación que corresponde a un nivel de rancidez detectable. Asimismo, es tomado como el tiempo requerido para un cambio repentino en la velocidad de oxidación, al estimar la intersección entre las velocidades de oxidación iniciales y finales (Figura 6), o como el tiempo para alcanzar el final de su vida útil (Frankel, 2005b).

En la Figura 6 se muestra el desarrollo de la rancidez en un alimento durante su almacenamiento, las curvas de A y B muestran diferencia en la estabilidad oxidativa de diferentes muestras, lo cual puede deberse a los diferentes niveles iniciales de oxidación al comienzo del almacenamiento, así como también a su formulación, procesamiento y empaque (Frankel, 2005b). Es deseable extender el período de inducción, y por lo tanto la vida útil del producto, el mayor tiempo posible (Gunstone, 2013) lo cual se puede lograr mediante el uso de antioxidantes (Fan y Eskin, 2015).

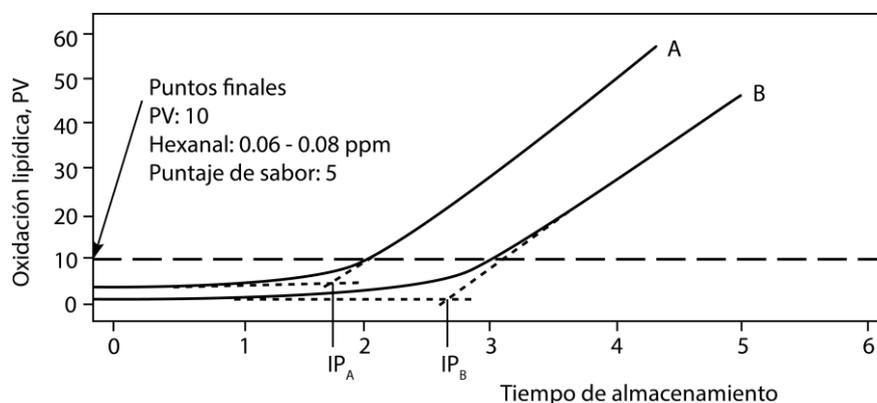


Figura 6: Desarrollo de la rancidez durante el almacenamiento.

FUENTE: Adaptado de Frankel 2005c.

2.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN ACEITES

Se pueden clasificar en métodos volumétrico (índice de peróxidos, ácidos grasos libres, índice de oxirano, índice de yodo); métodos espectroscópicos que incluyen la espectroscopia UV-Visible (k_{234} , k_{268} , índice de p-Anisidina, TBARS), espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia infrarroja (FT-IR), quimioluminiscencia, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, y resonancia paramagnética electrónica; métodos cromatográficos que incluyen cromatografía líquida de alta performance (HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño de alta performance (HPSEC), cromatografía de gases (CG), y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); y métodos sensoriales (Kamal Eldin, 2010). A continuación se describen los métodos utilizados en la presente investigación:

2.4.1. MÉTODOS PARA MEDIR LA OXIDACIÓN

Existen diversos métodos para medir la oxidación de lípidos en los alimentos. Los cambios en las propiedades químicas, físicas u organolépticas y sensoriales de las grasas y aceites durante la oxidación se pueden controlar para evaluar el grado de oxidación de los lípidos. Sin embargo, no existe un método uniforme y estándar para detectar todos los cambios oxidativos en todos los sistemas alimentarios (Shahidi *et al.*, 2017b).

Los productos de oxidación primaria como los hidroperóxidos, los productos de oxidación secundaria como aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y compuestos epoxi, y los radicales libres constituyen las bases para la medición del deterioro oxidativo de los lípidos de los alimentos (Shahidi y Zhong, 2005a).

Los métodos disponibles para monitorear la oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos se pueden dividir en los cambios oxidativos primarios como el cambio en la composición de ácidos grasos insaturados, el aumento de peso, formación de hidroperóxidos, índice de peróxidos, método de oxígeno activo e índice de estabilidad oxidativa, calorimetría de barrido diferencial y dienos conjugados; y cambios oxidativos secundarios como el valor del ácido 2,4 tiobarbiturico, oxirano, p-anisidina, TOTOX, octanoato, carbonilos, hidrocarburos y productos fluorescentes (Shahidi *et al.*, 2017b). Sin embargo, no existe un método uniforme y estándar para detectar todos los cambios oxidativos en todos los sistemas alimentarios, por lo que se recomienda el uso de dos o más métodos que evalúen los productos de oxidación primarios y secundarios (Shahidi y Zhong, 2005a).

a. ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Los ácidos grasos libres son los ácidos grasos separados de las moléculas de triglicéridos (Gupta, 2017a). Se forman después de la recolección de las semillas mediante hidrólisis enzimática o microbiana de aceites y grasas. Adicionalmente puede formarse por hidrólisis química durante el almacenamiento y transporte de los aceites crudos (Verhoeff y van Duijn, 2013). Un elevado contenido de humedad ayuda a que se desarrolle la hidrólisis y aumente el contenido de ácidos grasos libres, los cuales pueden contribuir a un objetable olor, sabor y otras características dependiendo de la composición del aceite (O'Brien, 2009). Los mecanismos de formación son los siguientes:



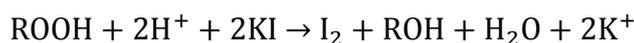
La cantidad de ácidos grasos libres se determina neutralizando los ácidos de una cantidad conocida de aceite con una solución alcalina (NaOH) de concentración conocida en un solvente orgánico. El cálculo se basa en el peso molecular promedio del aceite o grasa que se analiza (Verhoeff y van Duijn, 2013). Los resultados se expresan como porcentaje de ácido oleico, salvo en aceite de palma y derivados donde se expresa como porcentaje de ácido palmítico, y en aceite de coco como porcentaje de ácido láurico (Gupta, 2017a).

b. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Los peróxidos son los primeros productos de oxidación de los ácidos grasos (tanto libres como ácidos grasos esterificados), formados principalmente durante el almacenamiento, manipulación y transporte de aceites crudos, semiprocesados y refinados, y grasas en contacto con el aire. Los ácidos grasos se oxidan a los llamados hidroperóxidos, los cuales son insípidos en un inicio, pero sus productos de degradación como los aldehídos y las cetonas dan al aceite un sabor desagradable (Verhoeff y van Duijn, 2013). La velocidad de formación de hidroperóxidos en un inicio supera a la velocidad de sus productos de descomposición, pero esto se invierte en etapas posteriores (Shahidi y Zhong, 2005a).

El índice de peróxidos es una medida de la oxidación en su etapa inicial de los ácidos grasos insaturados en el aceite (O'Brien, 2009), mide todas las sustancias que oxidan al yoduro de potasio bajo condiciones del método y expresado como miliequivalentes de peróxido por

1000 g de aceite o grasa (Gupta, 2017a). Es el método clásico para la cuantificación de hidroperóxidos, el cual es determinado mediante un método yodométrico basado en la reducción del grupo hidroperóxido (ROOH) con ion yoduro (I⁻). La cantidad de yodo (I₂) liberada es proporcional a la concentración de peróxido presente. El I₂ liberado es titulado frente a una solución estandarizada de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) usando como indicador al almidón (Shahidi *et al.*, 2017b). Las reacciones químicas involucradas son las siguientes:



Los posibles inconvenientes de este método son la absorción de yodo en los sitios de insaturación de los ácidos grasos y la liberación de yodo del yoduro de potasio por el oxígeno presente en la solución a valorar, además, la medición de valores bajos puede traer dificultades en la determinación del punto final de la valoración. Los resultados pueden ser afectados por la estructura y la reactividad de los peróxidos, la temperatura y el tiempo de reacción. Este método es aplicable para todas las grasas y aceites, pero es altamente empírico y cualquier variación en el procedimiento puede afectar los resultados (Shahidi *et al.*, 2017b).

Durante la autooxidación, el índice de peróxido alcanza un máximo seguido de una disminución en etapas más avanzadas que varían de según el perfil de ácidos grasos y las condiciones de oxidación. El máximo valor se da en etapas más tempranas de la oxidación en los aceites más poliinsaturados, como los aceites de soya y colza que contienen linolenato, y los aceites de pescado que contienen ácidos grasos ω-3, porque sus hidroperóxidos se descomponen fácilmente. Los hidroperóxidos se descomponen rápidamente a temperaturas superiores a 100 °C, en presencia de metales, o cuando se exponen a la luz, y bajo estas condiciones aceleradas los resultados son engañosos y erróneamente bajos (Frankel, 2005c).

c. ÍNDICE DE P-ANISIDINA

El índice de p-anisidina se define como 100 veces la absorbancia, medida a 350 nm en una celda de 1 cm, de una solución que contiene 1 g de aceite en 100 mL de una mezcla de solvente y reactivo p-anisidina, según las condiciones del método. Este método mide algunos de los compuestos de oxidación secundarios de aceites y grasas generados a partir de la descomposición de los peróxidos (Gupta, 2017a), específicamente determina la cantidad de aldehídos, principalmente 2-alquenoales y 2,4-alcadienoales (Shahidi *et al.*, 2017b).

El método se basa en el hecho de que en presencia de ácido acético, la p-anisidina reacciona con los compuestos aldehídicos en un aceite produciendo productos de reacción amarillentos que absorben a 350 nm (Figura 7), la cual depende de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes y de sus estructuras. Se ha reportado que el doble enlace en la cadena de carbono conjugada con el doble enlace de carbonilo mejora la absorbancia a 350 nm por un factor de cuatro o cinco (Sessa y Rakis, citados por O'Brien, 2009). Asimismo, esta prueba es menos sensible a los aldehídos saturados en comparación con los aldehídos insaturados debido a que los productos formados a partir de aldehídos insaturados tienen una fuerte absorbancia a la longitud de onda del método (Yanishlieva-Maslarova, citado por Shahidi *et al.*, 2017b).

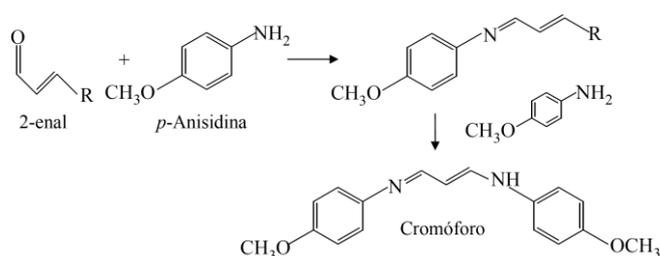


Figura 7: Reacción de aldehídos con el reactivo p-Anisidina.

FUENTE: Adaptado de Schaich 2016.

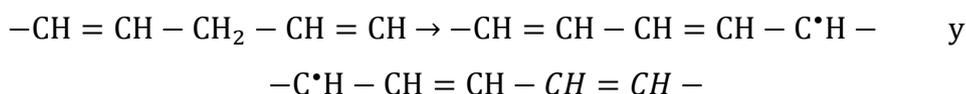
El reactivo p-anisidina es altamente tóxico y está en la lista de compuestos Inmediatamente peligroso para la vida y la salud (IDLH) del Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH). Además, causa daño a la sangre por ingestión oral, inhalación o contacto con la piel, y si se calienta fuertemente puede liberar vapores de óxido de nitrógeno muy tóxicos (Schaich, 2016).

d. COEFICIENTES DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados es acompañada de un aumento en la absorción ultravioleta del aceite. Los lípidos que contienen dienos o polienos muestran un cambio en la posición de doble enlace durante la oxidación debido a la isomerización y la formación de conjugados. Los dienos conjugados resultantes exhiben una absorción intensa a 234 nm, mientras que los trienos conjugados absorben a 268 nm (Shahidi *et al.*, 2017b).

El coeficiente de extinción a 232 nm (k_{232}) está relacionado a la oxidación primaria del aceite y es una indicación de la conjugación de los ácidos grasos poliinsaturados, mientras que a 270 nm (k_{270}) es una indicación de compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas) y está relacionado a productos secundarios de oxidación (Boskou, citado por Herchi *et al.*, 2012).

Muchos solventes y contaminantes absorben en el rango UV, por lo que en estos ensayos se utilizan solventes de alta pureza. Los lípidos no tienen cromóforos innatos para la detección óptica, sin embargo, la formación de radicales en los ácidos grasos poliinsaturados provoca un cambio en la posición del doble enlace, convirtiendo los ácidos grasos no conjugados a conjugados como se muestra en la siguiente reacción (Schaich, 2016):



Los dienos conjugados son el primer marcador químico de oxidación relativamente estable en ácidos grasos poliinsaturados, que debido a la resonancia absorben la luz UV en el rango de 231-235 nm. En general, la longitud de onda de absorción máxima para los dienos conjugados aumenta con la longitud de la cadena (Schaich, 2016).

Los trienos conjugados se forman en ácidos grasos poliinsaturados superiores durante etapas posteriores de oxidación por oxidación simultánea en ambos extremos (C9 y C16) del ácido linolénico y por reducción de hidroperóxidos a alcoholes seguidos de deshidratación (Figura 8). Se detectan a 268-275 nm, sin embargo, los carbonilos también absorben en este rango, por lo que la absorbancia no debe interpretarse como trienos conjugados sin una verificación secundaria de la estructura (Schaich, 2016).

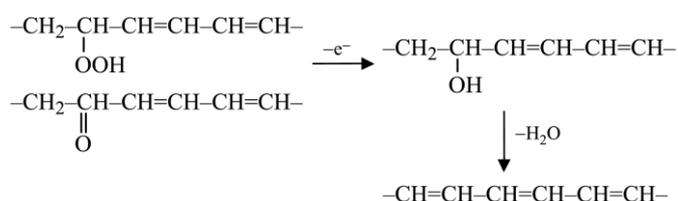


Figura 8: Formación de trienos conjugados.

FUENTE: Schaich (2016).

2.4.2. MÉTODOS PARA MEDIR LA ESTABILIDAD OXIDATIVA

La estabilidad se puede definir como la resistencia de un lípido a la oxidación y al deterioro resultante por la generación de sabores y olores causados por la rancidez y disminución de calidad en los alimentos (Frankel, 2005b). Generalmente se acepta como la vida del producto en almacenamiento hasta que sea evidente la rancidez. Los métodos que miden la estabilidad combinan las técnicas de medición de la oxidación con los efectos a largo plazo de factores que aceleren la oxidación (temperatura, luz, humedad, oxígeno, entre otros) (O'Brien, 2009).

Se han desarrollado varios métodos para evaluar la estabilidad a largo plazo de productos de grasas y aceites como el método de oxígeno activo, el índice de estabilidad oxidativa, el ensayo de Schaal y pruebas de sabor (O'Brien, 2009).

a. ÍNDICE DE ESTABILIDAD OXIDATIVA (OSI)

El índice de estabilidad oxidativa (OSI) se define como el punto de cambio máximo de la velocidad de oxidación, atribuido al aumento de la conductividad por la formación de ácidos orgánicos volátiles durante la oxidación de lípidos; para su medición se utilizan dos equipos disponibles en el mercado, Rancimat (Metrohm Ltd.) y Oxidative Stability Instrument (Omnion Inc.). La determinación del OSI requiere de un nivel de oxidación elevado (índice de peróxidos > 100) para obtener resultados confiables (Shahidi y Zhong, 2005a).

El método de oxígeno activo (AOM) fue el método más utilizado para evaluar la estabilidad oxidativa de grasas. Este método utilizaba temperatura elevada y aireación para acelerar la oxidación hasta que se alcanzaba por lo general un valor de 70 o 100 meq de peróxido/kg en aceites, sin embargo, la necesidad de obtener resultados de estabilidad oxidativa más rápidos impulsó el desarrollo y la introducción del Rancimat y OSI (Oxidative Stability Instrument), los cuales reemplazaron al AOM en 1996 volviéndose métodos oficiales (O'Brien, 2009). Sin embargo, estos miden el aumento en la conductividad del agua desionizada, el cual es el resultado de los productos de oxidación volátiles atrapados producidos cuando el aceite es calentado bajo una corriente de aire (O'Brien, 2009); siendo el ácido fórmico el principal producto de oxidación que ocasiona este aumento de conductividad (Shahidi *et al.*, 2017b).

El método OSI se ha utilizado como práctica industrial estándar para la evaluación de la estabilidad oxidativa de los aceites, así como la eficacia de la inhibición de la oxidación de lípidos en presencia de antioxidantes (Shahidi *et al.*, 2017b).

2.4.3. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN ACEITES

a. HUMEDAD

La humedad en aceites y grasas pueden ser causadas por restos de aceite residual en el aceite después del proceso de extracción o también pueden originarse en la cadena de suministro (Verhoeff y van Duijn, 2013). La presencia continua de humedad inducirá hidrólisis con un aumento de los ácidos grasos libres y sabores desagradables (O'Brien, 2009).

Entre los métodos para la determinación de humedad en aceites está el método de estufa de vacío, el cual proporciona resultados más precisos que la placa caliente y el de la estufa de aire, y es especialmente aplicable cuando la humedad está profundamente asentada. Una cantidad de muestra representativa es pesada y tarada en una placa seca para humedad, el vacío no debe superar los 100 mmHg a una temperatura de 20 a 25 °C por encima del punto de ebullición del agua a la presión de funcionamiento hasta que se obtenga un peso constante en períodos de una hora de secado (O'Brien, 2009).

b. ÍNDICE DE REFRACCIÓN (IR)

El índice de refracción (IR) de un aceite es definido como la relación entre la velocidad de la luz en el vacío (prácticamente en el aire) y la velocidad de la luz en el aceite a una temperatura específica; es una medida de la pureza de los aceites, por lo que se puede usar como un medio para identificarlos, y es medido con un refractómetro generalmente a 20 y 25 °C para aceites y 40 °C para grasas (Shahidi *et al.*, 2017a). Además, se relaciona con el peso molecular, ácidos grasos, longitud de la cadena, grado de insaturación y grado de conjugación, y es afectado por la temperatura, con una corrección de 0.000385 por cada grado (°C) (Perkins, citado por O'Brien, 2009). Con el aumento de temperatura el IR disminuye, pero aumenta con la longitud de las cadenas de carbono y el número de dobles enlaces de los ácidos grasos (O'Brien, 2009), aunque no de forma lineal (Gunstone, 2013).

c. COLOR

Los aceites vegetales crudos tienen un color que varía de rojo a verde/amarillo y marrón. Los principales contribuyentes a este color son los carotenoides (rojo) y la clorofila (verde). (Verhoeff y van Duijn, 2013). Algunos pueden tener pigmentación inesperadamente alta causada por daños en el campo, almacenamiento inadecuado o manejo defectuoso durante la trituración, extracción o procesamiento (O'Brien, 2009). Las mediciones de color se basan en la comparación con estándares de colores. Se usan varios estándares de color en la industria de aceites y grasas como el Lovibond en celdas de 1 y 5¼ pulgadas, Gardner, FAC y escala de yodo (Verhoeff y van Duijn, 2013).

d. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

El perfil o composición de ácidos grasos es determinado por cromatografía de gases (GC), antes de este, los métodos se limitaban a una combinación de índice de yodo, densidad

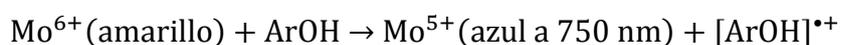
relativa, índice de refracción e índice de saponificación. La cromatografía gas-líquida proporciona un medio rápido y preciso para determinar la distribución de ácidos grasos de productos de grasas y aceites, lo cual es beneficioso para todos los aspectos de desarrollo de productos, control de procesos y comercialización porque las características físicas, químicas y nutricionales de las grasas y aceites están influenciadas por los tipos y proporciones de los ácidos grasos y su posición en el radical glicerol (O'Brien, 2009).

El perfil de ácidos grasos por GC implica la división de los componentes de la mezcla de lípidos en el estado de vapor entre una fase gaseosa móvil y una fase líquida estacionaria no volátil dispersa sobre un soporte inerte; generalmente requiere derivatización de los ácidos grasos para aumentar su volatilidad. Los ésteres metílicos de ácidos grasos pueden prepararse mediante técnicas de transesterificación, para luego separarse en columnas para GC y detectarse con un detector de ionización de llama (FID). La fase gaseosa generalmente es nitrógeno o helio para columnas empacadas y helio o hidrógeno para columnas capilares. El procedimiento en GC implica pasar el éster metílico, o triglicéridos transesterificados a través de una columna calentada por medio del gas portador. Los componentes de la mezcla se eluyen con el gas, se detectan y se miden en el extremo de salida de la columna mediante un medio adecuado. El tiempo de retención es el tiempo requerido para que un compuesto determinado pase a través de la columna, es indicado en el eje horizontal del cromatograma, es un índice cualitativo de la sustancia, y el área bajo la curva es en cada caso una medida cuantitativa del componente. La separación de los ácidos grasos se basa en la longitud de la cadena, el grado de saturación, así como la geometría y posición de los dobles enlaces. La secuencia de elución esperada para los ácidos grasos con la misma longitud de cadena es: saturada, monoinsaturada, disaturada, y así sucesivamente (O'Brien, 2009). La identificación de los picos cromatográficos se basa en la comparación de los tiempos de retención de un estándar con los de muestra (Shahidi *et al.*, 2017a).

e. POLIFENOLES TOTALES

Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes, protegen a los lípidos la oxidación, y tienen un efecto significativo sobre las características sensoriales y nutricionales del aceite (Symoniuk *et al.*, 2017). Son multifuncionales en el sentido de que pueden actuar como agentes reductores, donantes de átomos de hidrógeno y eliminadores de oxígeno singlete. Ciertos polifenoles son capaces de quelar iones de metales de transición que pueden inducir reacciones avanzadas de oxidación (reacción de Fenton) (Craft *et al.*, 2012).

Para evaluar el contenido fenólico total de un aceite, se aplica el método espectrofotométrico que utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu (Ricciutelli *et al.*, 2017), aunque cada vez es más criticado (Griffiths, 2016). Este método se desarrolló originalmente para el análisis de proteínas, aprovechando la reactividad de este reactivo hacia la proteína tirosina que tiene un grupo fenólico (Dasgupta y Klein, 2014), y se basa en la transferencia de electrones de compuestos fenólicos al reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) en medio alcalino proporcionado por el Na₂CO₃ (5 a 10 por ciento de en agua). Los fenólicos se oxidan en medio alcalino generando aniones fenolatos, los cuales al reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu (color amarillo) forman complejos de color azul que se desarrolla durante los 30 a 60 minutos y pueden detectarse a longitudes de onda de 750 a 765 nm (Craft *et al.*, 2012, Gülçin, 2012), y sigue la siguiente reacción:



El ácido gálico se usa a menudo como el compuesto estándar de referencia para este ensayo, por lo que los resultados son expresados como equivalente de ácido gálico (Dasgupta y Klein, 2014). El reactivo Folin-Ciocalteu no es específico para polifenoles debido a que puede reaccionar con muchas sustancias reductoras no fenólicas para formar cromógenos que pueden detectarse espectrofotométricamente, razón por la cual no es adecuado para la determinación del "contenido fenólico total", a menos que se consideren o eliminen especies que puedan interferir (Gülçin, 2012). De hecho, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) menciona que este método espectrofotométrico no es adecuado para evaluar el contenido de polifenoles en los alimentos (Ricciutelli *et al.*, 2017).

f. TOCOFEROLES

Los tocoferoles son componentes naturales en aceites vegetales, algunos son activos como antioxidantes, mientras que otros tienen actividad de vitamina E (Verhoeff y van Duijn, 2013). Los isómeros de tocoferoles (α -, β -, γ - y δ -) se separan con la ayuda de técnicas cromatográficas, estos incluyen cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta performance (HPLC), electrocromatografía capilar (CEC), nano-cromatografía líquida (Nano-LC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), cromatografía líquida capilar (CLC) y cromatografía en capa fina (TLC). Sin embargo, la estructura química y la polaridad similares del γ - y β -tocoferol, que difieren solo en la posición de los grupos metilo en la estructura del cromanol, dificultan la separación de estas formas (Saini y Keum, 2016).

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de fase normal (NP-) y de fase inversa (RP-) se usan comúnmente para la separación de tocoles en muestras de alimentos (Saini y Keum, 2016). NP-HPLC incorpora fases estacionarias polares y fases móviles no polares que dan como resultado una retención más prolongada de compuestos polares, son muy adecuadas para las separaciones de tococromanol debido a la solubilidad de las fracciones oleosas en los solventes y la capacidad de resolver todos los isómeros estructurales, incluidos los homólogos β y γ . RP-HPLC incorpora fases estacionarias no polares y fases móviles polares que dan como resultado una retención más prolongada de compuestos hidrófobos (Craft, 2016). Sin embargo, con desarrollos recientes en columnas de fase estacionaria, ahora es posible separar los tocoferoles β y γ usando RP-HPLC (Saini y Keum, 2016). Los detectores de fluorescencia son específicos para la detección y cuantificación de tocoferoles (Shahidi *et al.*, 2017a), y la composición de tocoferol se compara con una solución estándar que contiene concentraciones conocidas de tocoferoles (Verhoeff y van Duijn, 2013).

2.5. RANCIMAT

El método Rancimat es una prueba instrumental automatizada que mide el incremento de la conductividad del agua desionizada causado por los ácidos grasos de bajo peso molecular (principalmente ácido fórmico) producidos durante la autooxidación de lípidos a temperaturas elevadas (Frankel, 2005b). Permite la determinación del período de inducción (IP) o índice de estabilidad oxidativa (OSI) a diferentes temperaturas, el cual es el tiempo antes de que ocurra un rápido deterioro del aceite (Farhoosh *et al.*, 2008), y corresponde a la etapa final de la propagación en la oxidación (Symoniuk *et al.*, 2016a).

El Rancimat es considerado como el reemplazo del método de oxígeno activo, ganando una amplia aceptación por su facilidad de uso y reproducibilidad (Farhoosh, 2007a), además, es una medición continua que no requiere determinaciones analíticas periódicas y no utiliza solventes orgánicos (Farhoosh, 2007b). Asimismo, se ha demostrado que existe una correlación entre los datos de estabilidad obtenidos por Rancimat con los determinados por métodos sensoriales y/o analíticos (García-Moreno *et al.*, 2013). Se han reportado el uso de otros equipos que dan resultados similares al OSI medido por el Rancimat, entre estos equipos se encuentran la calorimetría de barrido diferencial (Farhoosh *et al.*, 2008, Raczyk *et al.*, 2016, Symoniuk *et al.*, 2017), oxitest (Tinello *et al.*, 2017), oxitester, rapidoxy, entre otros; siendo la calorimetría de barrido diferencial uno de los métodos reportados con alta correlación entre sus resultados y los del Rancimat (Arain *et al.*, 2009).

2.5.1. FUNDAMENTO

El método Rancimat se basa en los cambios de conductividad experimentados por el agua desionizada después de recolectar los ácidos orgánicos volátiles producidos por la oxidación acelerada del aceite (García-Moreno *et al.*, 2013), principalmente el ácido fórmico y acético (Shahidi y Zhong, 2005a). Una corriente de aire seco pasa a través de la muestra de aceite calentada, la cual a su vez, transporta los ácidos orgánicos volátiles a un recipiente con agua desionizada ocasionando el incremento de su conductividad (Farhoosh, 2007b).

El Rancimat determina automáticamente el tiempo transcurrido para alcanzar el cambio máximo de la velocidad de oxidación a la temperatura del ensayo causado por el incremento de la conductividad del agua desionizada. Este incremento es registrado automáticamente como se muestra en la Figura 9, en la que el punto en el tiempo donde comienza su inflexión es denominado Índice de estabilidad oxidativa (OSI), el cual se expresa en horas a la temperatura a la que se realizó su determinación (Dijkstra, 2016).

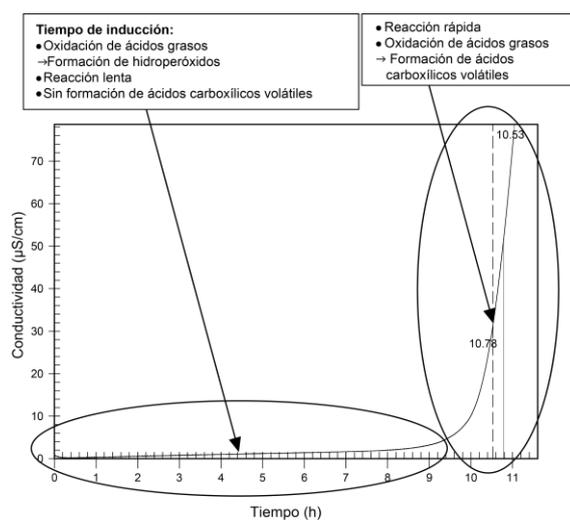


Figura 9: Curva típica obtenida por Rancimat.

FUENTE: Adaptado de Kivevele y Huan 2015.

El valor de OSI es una medida de la facilidad con la que la grasa se oxida a una temperatura determinada. En general, conforme aumenta el nivel de ácidos grasos insaturados totales (en particular ácidos grasos poliinsaturados), el potencial de la grasa para oxidarse y formar sabores rancios aumenta, ocasionando la disminución del valor de OSI a la temperatura en que fue medido (Hammond, 2003). Asimismo, el valor de OSI se ha correlacionado bien con la estabilidad en diferentes condiciones de oxidación de lípidos y con datos obtenidos independientemente de métodos sensoriales y/o analíticos (Farhoosh, 2007b).

2.5.2. USO DEL RANCIMAT EN LA PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL

El Rancimat también puede proporcionar información sobre el valor Q_{10} y la predicción de la vida útil en aceites (Farhoosh, 2007b). Debido a que la velocidad de oxidación está relacionada exponencialmente con la temperatura, la vida útil de un aceite disminuye logarítmicamente al aumentar la temperatura, por lo que puede predecirse por extrapolación en la gráfica que relaciona el log (OSI) con la temperatura (Figura 10) (Farhoosh, 2007a).

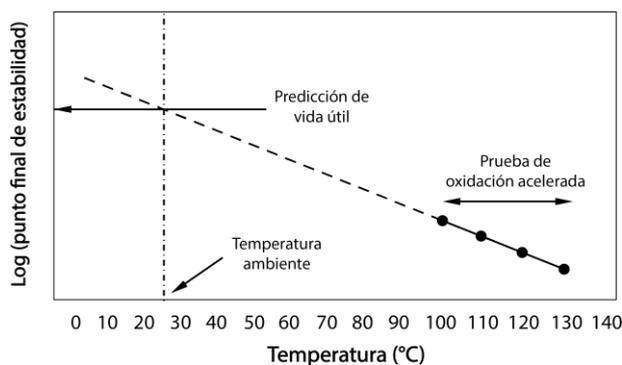


Figura 10: Gráfica para la extrapolación de la vida útil por Rancimat.

FUENTE: Adaptado de Farhoosh 2007a.

A partir de la gráfica mostrada en la Figura 10, también se puede calcular un factor de aceleración de la temperatura, conocido como Q_{10} , que se basa en el aumento de la velocidad de oxidación por un aumento de 10 °C de temperatura según la siguiente ecuación:

$$Q_{10} = \frac{S_T}{S_{T+10}}$$

Donde, S_T y S_{T+10} son las vidas útiles a las temperaturas T y $(T + 10)$, respectivamente (Farhoosh, 2007a). La regla general que dice que la oxidación se duplica con cada aumento de 10 °C en la temperatura se mantiene con los tiempos de Rancimat (Talbot, 2016). Además, se ha demostrado una fuerte relación lineal inversa entre el valor de OSI y la temperatura en los aceites vegetales y pescado, y que las reacciones de formación de productos medidos con conductividad siguen la cinética de Arrhenius en las condiciones del ensayo (Schaich, 2016).

2.5.3. CUESTIONAMIENTO DE SU USO

Las condiciones de trabajo del Rancimat difieren de las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, por lo que los resultados obtenidos bajo estas condiciones deben interpretarse con cuidado al ser utilizados para predecir la vida útil, ya que los mecanismos

de oxidación cambian con la temperatura y las muestras desarrollan niveles excesivos de enranciamiento que no son relevantes para las condiciones normales de almacenamiento, por lo que dependiendo del tipo de aceite estas predicciones pueden dar lugar a una sobreestimación o subestimación de la vida útil real (Farhoosh, 2007a). Además, se ha reportado que las curvas para los aceites prensados en frío no tienen un curso característico (Pawar *et al.*, citados por Symoniuk *et al.*, 2016b).

Frankel (2005b) menciona que el Rancimat no es confiable debido a que utiliza temperaturas muy elevadas en donde el mecanismo de oxidación de los lípidos cambia; la oxidación se vuelve más dependiente de la concentración de oxígeno, y la solubilidad del oxígeno disminuye. La dependencia del oxígeno aumenta con el grado de oxidación de los aceites, a medida que se reduce la presión de oxígeno la concentración de radicales peroxilo disminuye y los compuestos diméricos y poliméricos se producen por condensación de los radicales alquilo y alcoxilo. La oxidación lipídica se produce de forma errática al aumentar la actividad de los metales contaminantes y promover la actividad prooxidante de los tocoferoles en los aceites vegetales, además, las reacciones de polimerización y ciclación se vuelven importantes, y los ácidos volátiles medidos por Rancimat solo se producen en cantidades significativas a temperaturas elevadas y no son relevantes en las condiciones normales de almacenamiento. Sin embargo, a pesar de estas dificultades, el Rancimat es comúnmente usado para comparar la estabilidad relativa de muestras muy similares, pero los resultados de estas pruebas de estabilidad a altas temperaturas pueden ser engañosos en la evaluación de la efectividad de los antioxidantes, los cuales están influenciados por la temperatura, y frecuentemente se obtienen resultados ampliamente divergentes cuando se comparan los antioxidantes a temperaturas inferiores a 60 °C con temperaturas superiores a 60 °C.

2.6. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una molécula que ralentiza o previene la oxidación de otra molécula (Craft *et al.*, 2012), químicamente es un agente reductor, el cual puede recibir electrones y/o donar hidrógeno (Griffiths, 2016). En términos de alimentos, un antioxidante es cualquier sustancia que cuando se encuentra presente en bajas concentraciones comparada con la de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell and Gutteridge, citados por Gülçin, 2012), por lo que su objetivo principal como aditivo alimentario es mantener la calidad de dicho alimento y prolongar su vida útil en lugar de mejorar la calidad de los alimentos (Shahidi y Wanasundara, 2005).

En grasas y aceites, los antioxidantes retrasan el inicio de la oxidación o disminuyen las velocidades de reacciones oxidantes (Shahidi y Wanasundara, 2005), pueden inhibir diferentes etapas de la autooxidación o fotooxidación, y su rendimiento es dependiente de su concentración, sin embargo, también pueden actuar como prooxidantes bajo algunas condiciones (Schuler, citado por Scrimgeour, 2005). Los antioxidantes no detienen la oxidación, solo sirven para extender el período de inducción durante el cual la oxidación es muy lenta y no tiene grandes consecuencias, por lo que se deben agregar antioxidantes apropiados antes de que haya comenzado la oxidación. Ninguna cantidad de antioxidante puede regenerar una grasa que ya está oxidada (Gunstone, 2013).

El término "antioxidante" es en realidad un término general que incluye una gran cantidad de compuestos que son capaces de inhibir las oxidaciones de los lípidos por diversos mecanismos que abarcan la eliminación de los radicales libres, inactivación de los peróxidos y otras especies reactivas de oxígeno, la quelación o secuestro de catalizadores de metales de transición, y la desactivación de productos secundarios de oxidación de lípidos que están asociados con la rancidez oxidativa (Elias y Decker, 2017). No existe una sola manera de clasificar a los antioxidantes, se han descrito diferentes formas de clasificación según su fuente, función, mecanismos de acción y estructura química (Tsao, 2015).

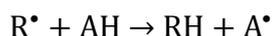
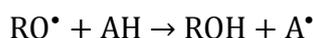
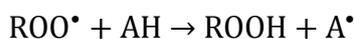
2.6.1. MECANISMO DE ACCIÓN

Por convención, los antioxidantes son ampliamente clasificados por su mecanismo de acción como antioxidantes primarios y secundarios. Sin embargo, algunos presentan más de un mecanismo y son denominados antioxidantes de función múltiple (Elias y Decker, 2017).

a. ANTIOXIDANTES PRIMARIOS

Los antioxidantes primarios, "tipo 1" o "rompedores de cadena" (Elias y Decker, 2017), inhiben o retardan la oxidación de lípidos al interferir con las etapas de propagación o iniciación mediante donación de átomos de hidrógeno a los radicales (Frankel, 2005d) para producir derivados lipídicos y radicales antioxidantes (A^*) que son relativamente estables y con menor capacidad de promover la autooxidación. La capacidad para donar un hidrógeno a un radical libre se puede predecir según su potencial de reducción de un electrón (E°), por lo que un compuesto con un E° inferior al de un radical libre es capaz de donar un hidrógeno, a menos que la reacción sea cinéticamente desfavorable (Elias y Decker, 2017).

Los antioxidantes primarios tienen mayores afinidades por los radicales peroxilo que los lípidos, por lo que los radicales libres peroxilo y alcoxilo formados durante la etapa de propagación y ramificación se neutralizan con antioxidantes primarios. Asimismo, pueden interactuar directamente con los radicales alquilo de lípidos (Elias y Decker, 2017).



El radical antioxidante producido presenta baja reactividad relativa con los lípidos debido a la estabilidad que logra mediante la deslocalización de su electrón desapareado, formando así híbridos de resonancia estables, lo que reduce la velocidad de propagación. Además, son capaces de participar en reacciones de terminación con los radicales peroxilo, alcoxilo y otros radicales antioxidantes (Elias y Decker, 2017).



Antes de llegar al punto en que los consumidores perciben la rancidez oxidativa se encuentra un período de inducción, el cual corresponde a la generación de radicales libres y consumo de los antioxidantes presentes y disponibles para la reacción. Los antioxidantes primarios son más efectivos si se agregan antes de este período y su adición a sistemas lipídicos que ya contienen cantidades considerables de peróxidos dará como resultado la pérdida rápida de su función antioxidante (Elias y Decker, 2017). El período de inducción finaliza cuando la capacidad antioxidante de los antioxidantes ha sido consumida, sin embargo, algunos compuestos pueden regenerar estos antioxidantes y prolongar su vida útil. Asimismo, algunos antioxidantes reaccionan dos veces con radicales peroxilo, y en algunas ocasiones los antioxidantes oxidados tienen capacidad antioxidante adicional (Gunstone, 2013).

Los antioxidantes primarios son principalmente fenoles, los cuales están presentes en una amplia gama de fuentes vegetales, como el romero, tomillo, salvia, mirto, té y avena (Gunstone, 2013). Otros antioxidantes primarios naturales son los carotenoides, flavonoides,

tocoferoles y tocotrienoles, mientras que el hidroxibutilanisol (BHA), hidroxitolueno (BHT), etoxiquina, galato de propilo (PG) y terc-butil hidroquinona (TBHQ) son antioxidantes primarios sintéticos (Shahidi y Wanasundara, 2005).

b. ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS

Los antioxidantes secundarios, "tipo 2" o "preventivos", reducen la velocidad de oxidación de lípidos por una serie de mecanismos, los cuales incluyen la quelación de metales de transición, regeneración de antioxidantes primarios, descomposición de hidroperóxidos a especies no radicales, desactivación de oxígeno singlete, absorción de radiación UV y/o eliminación de oxígeno. Algunos son conocidos como "sinergistas" debido a que promueven o aumentan la actividad de los antioxidantes primarios, por ejemplo el ácido cítrico, ascórbico, tartárico, el palmitato de ascorbilo y lecitina. Los antioxidantes secundarios tienen en común el no inhibir las reacciones de desactivación de radicales libres (Elias y Decker, 2017), por lo que no los convierten en moléculas estables (Shahidi y Wanasundara, 2005).

Los antioxidantes secundarios actúan inhibiendo el proceso de iniciación, principalmente a través de la quelación de los iones metálicos que promueven la iniciación, particularmente el cobre y hierro. Entre estos se encuentran el ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), ácido cítrico, ácido fosfórico, ciertos aminoácidos y algunos fosfolípidos. A menudo se agregan junto con antioxidantes primarios (Gunstone, 2013), y su eficacia depende del pH y también pueden mostrar actividad prooxidante (Scrimgeour, 2005).

Como el oxígeno es esencial para que se realice el proceso de autooxidación, la eliminación de especies moleculares de oxígeno es una forma de proporcionar actividad antioxidante, un ejemplo de estos es el ácido ascórbico que actúa como un agente reductor y eliminador de oxígeno (Shahidi y Wanasundara, 2005). El oxígeno singlete es el estado excitado del oxígeno, y su inactivación es una forma efectiva de prevenir el inicio de la oxidación de lípidos, ejemplo de esto son los carotenoides, como el β -caroteno, licopeno y luteína, que son capaces de inactivar sensibilizadores fotoactivados (Shahidi y Wanasundara, 2005).

Entre otros mecanismos se encuentran los desactivadores de la luz ultravioleta y los destructores de hidroperóxidos; los primeros absorben energía de la luz sin formación de radicales y desactivan fotoiniciadores de la oxidación de lípidos como hidroperóxidos y trazas de compuestos de carbonilo, y los segundos inhiben la oxidación por descomposición

inducida de hidroperóxidos formando alcoholes estables o productos inactivos mediante procesos no radicales como la reducción o donación de hidrógeno. El α -tocoferol, Trolox y otros compuestos fenólicos son débiles destructores de hidroperóxido (Frankel, 2005d).

La Figura 11 muestra la posible interacción de los antioxidantes primarios y secundarios en las diferentes etapas de la autooxidación de los lípidos en los alimentos.

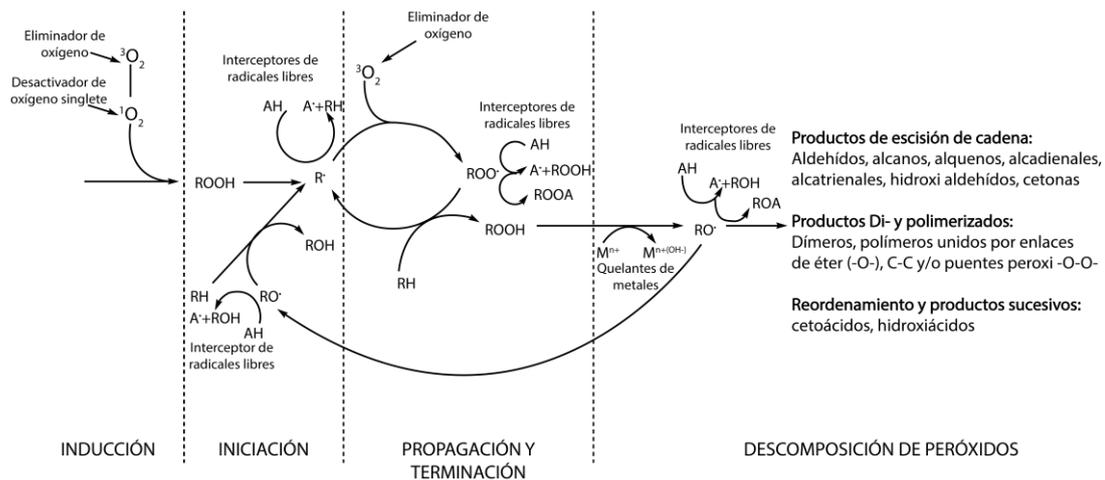


Figura 11: Interacción de los antioxidantes en las etapas de la autooxidación.

FUENTE: Adaptado de Shahidi y Wanasundara 2005.

En los sistemas de componentes múltiples, los antioxidantes pueden reforzarse mutuamente mediante efectos cooperativos conocidos como sinergismo. Muchas combinaciones de antioxidantes imparten más protección contra la oxidación de lípidos que la suma de sus actividades cuando se usan por separado. Combinaciones de un quelante metálico, como el ácido cítrico, y un antioxidante primario, como BHA, BHT, TBHQ o tocoferoles, son usados comúnmente, por lo que los aceites vegetales debido a sus concentraciones de α -, β - y γ -tocoferol son estabilizados de manera efectiva con adición de ácido cítrico (Frankel, 2005d).

2.6.2. ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Los antioxidantes sintéticos se sintetizan químicamente y se examinan toxicológicamente para su uso seguro en la dieta humana (Tsao, 2015), se usan para estabilizar grasas, aceites y alimentos que contienen lípidos, y son principalmente basados en fenoles (Shahidi y Wanasundara, 2005). Han sido probados para la seguridad y aprobación de su uso en alimentos a bajas concentraciones sobre la base de estudios de toxicidad complejos; los límites permisibles para su uso varían mucho de un país a otro y dependen del producto alimenticio. Se debe tener en cuenta la estabilidad térmica, la concentración efectiva y la

sinergia al momento de seleccionar un antioxidante para su uso en alimentos particulares, al igual la normativa vigente respecto a su uso, especialmente en los antioxidantes que se ha informado que muestran posibles efectos adversos para la salud (Shahidi y Zhong, 2005b).

Antioxidantes sintéticos como hidroxibutilanisol (BHA), hidroxitolueno (BHT), galato de propilo (PG) y terc-butil hidroquinona (TBHQ) (Figura 12) se han usado comúnmente en los Estados Unidos y en otros países para inhibir la oxidación de los lípidos y retrasar el desarrollo de la ranciedad en los alimentos (Frankel, 2005d). Sin embargo, su uso es cuestionado debido a que no todos son aceptados en todos los países (Gunstone, 2013).

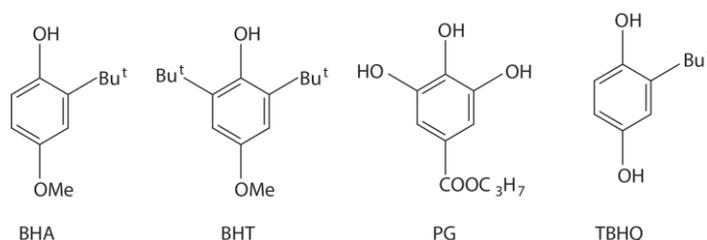


Figura 12: Estructura química de los antioxidantes sintéticos.

FUENTE: Adaptado de Gunstone 2013.

El galato de propilo (PG) es un polvo cristalino inodoro de color blanco a casi blanco con un sabor ligeramente amargo y se oscurece en presencia de sales de hierro. Es un irritante que puede causar sequedad de la piel, dermatitis y sensibilización; y su inhalación puede causar neumonía química. El PG se usa para estabilizar cosméticos, materiales de envasado de alimentos y alimentos, incluyendo grasas, aceites, mayonesa y otras emulsiones, manteca vegetal, productos horneados, dulces, carne seca, cerdo fresco, salchichas y leche en polvo. Su actividad antioxidante es sinérgica con ácidos, BHA y BHT (Ramis-Ramos, 2003).

El TBHQ es un polvo beige o un cristal de color blanco a marrón, es estable al calor y se considera el antioxidante más eficaz para prevenir la oxidación de aceites para fritura y una alternativa o suplemento a la hidrogenación del aceite para aumentar la estabilidad oxidativa. Además, presenta una excelente sinergia con el ácido cítrico (Shahidi y Zhong, 2005b).

El BHA comercialmente está disponible generalmente como una mezcla que contiene dos isómeros posicionales, 3-terc-butil-4-metoxifenol (mayor al 85 por ciento) y 2-terc-butil-4-metoxifenol (menor al 15 por ciento). Es un sólido ceroso blanco o ligeramente amarillo, con sabor ligeramente amargo y se degrada con la exposición prolongada a la luz. Es tóxico por ingestión, y existe evidencia de ser carcinogénico en animales. Muestra sinergismo con

ácidos, BHT, galatos de alquilo, hidroquinona, metionina, lecitina y ácido tiodipropiónico. En bajas concentraciones, se usa como antioxidante en alimentos que contienen grasa, en grasas y aceites comestibles y como conservante y antioxidante en formulaciones cosméticas (Ramis-Ramos, 2003). Su aplicación en frituras es limitada debido a su volatilidad, pero es particularmente útil para proteger el olor y el sabor de los aceites esenciales, y se ha reportado que posee actividad antimicrobiana (Shahidi y Zhong, 2005b).

El BHT es un polvo cristalino blanco, y es más soluble en aceites y grasas que el BHA y TBHQ. Combina bajos costos con estabilidad térmica, buena actividad antioxidante y alta solubilidad en grasas, sin embargo, la preocupación por su seguridad ha resultado en una disminución de su uso. Según la intensidad y duración de su exposición, sus efectos pueden variar desde irritación leve hasta destrucción severa del tejido (Ramis-Ramos, 2003).

Para aplicaciones alimentarias, los antioxidantes sintéticos deben ser suficientemente activos como para usarse a bajas concentraciones (por debajo del 0.02 por ciento del contenido de grasa) y no pueden ser tóxicos. Generalmente son más efectivos que los antioxidantes naturales y pueden usarse en concentraciones más bajas, son menos costosos, su uso no afecta el sabor, color y aroma del producto final (Frankel, 2005d). Sin embargo, algunos siguen atrayendo la controversia sobre su seguridad para la salud humana (Schyvens, 2014), así por ejemplo, a pesar de que el BHT y BHA son aprobados en la FDA y reconocidos como GRAS, los estudios de toxicología animal han revelado una variedad de eventos adversos (Weber, 2014), se ha reportado el efecto carcinogénico en ratas debido a la presencia de BHA y BHT en concentraciones extremadamente altas (Makahleh *et al.*, 2015).

2.6.3. ANTIOXIDANTES NATURALES

Los antioxidantes naturales han sido de interés durante muchos años debido a su capacidad para retrasar el desarrollo de sabores desagradables en los alimentos. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un aumento del interés en estos debido a su importancia en la prevención de enfermedades mediadas por reacciones de radicales libres (Gordon, 2003).

A pesar que los antioxidantes sintéticos son eficientes y relativamente baratos, se ha prestado especial atención al uso de antioxidantes naturales debido a las reacciones adversas de los antioxidantes sintéticos, a la tendencia mundial de evitar o minimizar el uso de aditivos artificiales, y por sus potenciales beneficios como agentes anticancerígenos e inhibidores de

reacciones de oxidación biológicamente dañinas en el cuerpo. Entre sus ventajas se incluyen la seguridad por ser reconocidos como GRAS (generalmente reconocido como seguro), mayores concentraciones permitidas, aceptación mundial y menor volatilidad en alimentos calentados; y como desventajas toxicidad no probada, gran variación en la concentración de los componentes activos según su origen y método de extracción, baja solubilidad en aceite y efectos indeseables en sabores, colores y olores en los alimentos (Frankel, 2005d).

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos vegetales que pueden aparecer en todas las partes de las plantas, y pueden actuar como eliminadores de radicales, quelantes de metales, desactivadores de oxígeno singlete o agentes reductores (Gordon, 2003). Otros antioxidantes naturales son los tocoferoles, ácido ascórbico, extracto de romero y otras especias, flavonoides y catequinas del té verde (Frankel, 2005d).

Los tocoferoles (Figura 13) se agregan a algunos alimentos como antioxidantes, siendo muy eficaces en emulsiones, pero menos efectivos en aceites. Su actividad depende de la concentración, del sistema alimentario y de la presencia de metales pesados, ya que pueden actuar como prooxidantes con hierro o cobre (Gordon, 2003). Su actividad también depende de la temperatura y está en el orden decreciente de δ -, γ -, β - y α -tocoferol. Son reconocidos como GRAS y se consideran como aditivos alimentarios seguros, sin embargo, su adición excesiva puede conducir a efectos prooxidantes (Shahidi y Zhong, 2005b).

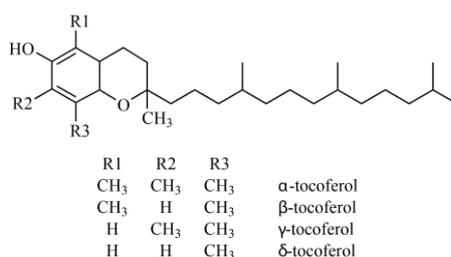


Figura 13: Estructura química de los tocoferoles.

FUENTE: Adaptado de Shahidi y Zhong 2005b.

El ácido ascórbico (Figura 14) es un polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo utilizado para estabilizar bebidas, frutas y vegetales, sin embargo, en grasas y aceites su uso es limitado por su insolubilidad. Actúa desactivando diversas formas de oxígeno, reduciendo radicales libres y regenerando antioxidantes primarios. Su efecto en la estabilidad de los lípidos se debe principalmente a interacciones sinérgicas, muestra una excelente sinergia con el α -tocoferol, ácido cítrico, BHA, BHT y quelantes metálicos (Shahidi y Zhong, 2005b).

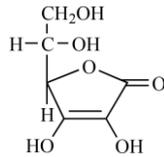


Figura 14: Estructura química del ácido ascórbico.

FUENTE: Shahidi y Zhong (2005b).

Los carotenoides (Figura 15) pueden actuar tanto como antioxidantes primarios mediante la captura de radicales libres o como antioxidantes secundarios mediante la desactivación del oxígeno singlete. En los alimentos generalmente actúan como un antioxidante secundario, sin embargo, a baja presión parcial de oxígeno (menor a 150 mmHg, en ausencia de oxígeno singlete) pueden atrapar radicales libres y actuar como un antioxidante primarios. El oxígeno singlete transfiere preferentemente energía al β -caroteno para producir β -caroteno en estado triplete a través de un mecanismo de intercambio de electrones, el cual libera energía en forma de calor y vuelve a su estado de energía normal (Shahidi y Wanasundara, 2005). Se ha reportado que otros carotenoides como el α -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina, pueden mostrar mayor efecto que el β -caroteno en la supresión del desarrollo de varios tipos de cáncer como el cáncer de pulmón, mama y estómago (Gordon, 2003).

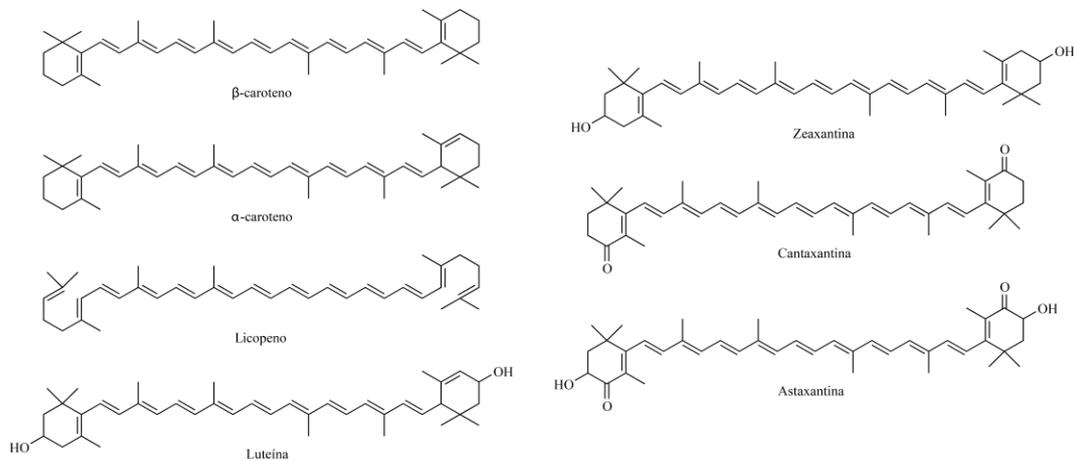


Figura 15: Estructura química de los carotenoides.

FUENTE: Adaptado de Shahidi y Zhong 2005b.

2.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante corresponde a la capacidad total de eliminación de radicales de una solución de prueba, independientemente de las constantes de actividad antioxidante individuales (Ghiselli *et al.*, citados por Craft *et al.*, 2012). En alimentos es el resultado neto de las actividades antioxidantes de todos los antioxidantes que se encuentran potencialmente

en un alimento en particular (Tsao, 2015), como las vitaminas, polifenoles, carotenoides, terpenoides, compuestos de Maillard y las trazas de minerales (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

Las interacciones entre los diferentes antioxidantes pueden ser sinérgicas, aditivas y antagonicas. La interacción antioxidante sinérgica es el efecto antioxidante de dos o más antioxidantes que cuando se aplican juntos es mayor que la suma de los efectos antioxidantes individuales; la interacción aditiva es el efecto antioxidante de dos o más antioxidantes que cuando se aplican juntos es igual a la suma de los efectos antioxidantes individuales; y la interacción antagonista es el efecto antioxidante de dos o más antioxidantes que cuando se aplican juntos es menor que la suma de los efectos antioxidantes individuales (Tsao, 2015).

Dadas las diferentes químicas involucradas en cada grupo de antioxidantes y las diferentes velocidades de reacciones en las reacciones de eliminación de radicales, la elección del método para medir la capacidad antioxidante puede tener un gran efecto sobre los resultados obtenidos. No todos los métodos y fuentes de antioxidantes son compatibles, y las mismas especies antioxidantes pueden dar resultados diferentes en diferentes ensayos. Además, la no uniformidad de los estándares utilizados en las curvas de calibración, modificaciones en los ensayos empleados y las diferentes formas de expresión de resultados contribuyen a datos inconsistentes y dificultan la comparación con los resultados reportados en la literatura (Craft *et al.*, 2012). Inclusive para un mismo ensayo pueden haber diferencias en la preparación de muestras, la extracción de antioxidantes (solvente, temperatura), tiempo de reacción y la expresión de resultados, por lo que la comparación entre los valores informados por diferentes laboratorios puede ser bastante difícil (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

A pesar que ningún ensayo de capacidad antioxidante refleja verdaderamente la "capacidad antioxidante total" de una muestra en particular (Moharram y Youssef, 2014), cuando se eligen y realizan de forma adecuada pueden producir datos de capacidad antioxidante *in vitro* valiosos que involucran las capacidades potenciales de los compuestos antioxidantes *in vivo* (Craft *et al.*, 2012), por lo que pueden ser un parámetro clave tanto para la ciencia de los alimentos como para la tecnología y estudios nutricionales (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

2.7.1. MÉTODOS *IN VITRO* PARA MEDIR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos, los términos de actividad antioxidante y capacidad antioxidante se usan a menudo indistintamente, pero estos tienen

diferentes significados. La actividad hace referencia a la constante de velocidad de una reacción entre un antioxidante específico y un oxidante específico, mientras que la capacidad es una medida de la cantidad (como mol) de un determinado radical libre eliminado por muestra (MacDonald-Wicks *et al.*, citados por Gülçin, 2012).

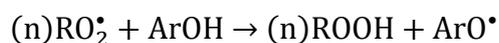
La capacidad antioxidante se mide generalmente en extractos de alimentos obtenidos con solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, cloroformo, entre otros). Sin embargo, no existe un solvente que sea completamente satisfactorio para la extracción de todos los antioxidantes presentes en un alimento, especialmente los asociados con carbohidratos complejos y proteínas. En el caso de la capacidad antioxidante total de los aceites vegetales no es necesario realizar una extracción, y las mediciones se pueden realizar directamente sobre el aceite después de diluirlo en acetato de etilo o n-hexano. Asimismo, es posible determinar la capacidad antioxidante asociada con compuestos polares y no polares por separado, para lo cual es necesaria la extracción con metanol (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

Los métodos para medir la capacidad antioxidante total se pueden clasificar según dos mecanismos, transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de electrones (SET), y algunos de los métodos basados en estos mecanismos se utilizan ampliamente para medir la capacidad antioxidante total de suero o plasma humano. Los resultados finales de los métodos basados en HAT y SET son los mismos, pero la cinética y las reacciones secundarias pueden variar entre estos dos mecanismos (Dasgupta y Klein, 2014).

a. TRANSFERENCIA DE ÁTOMOS DE HIDRÓGENO (HAT)

En los métodos HAT, se mide la capacidad de los antioxidantes para desactivar los radicales libres, generalmente radicales peroxilo los cuales son considerados biológicamente más relevantes, donando átomos de hidrógeno (Moharram y Youssef, 2014). Estas reacciones son independientes del pH, solvente y generalmente son reacciones rápidas que se completan en segundos o minutos. La reactividad relativa está determinada por la energía de disociación del enlace del grupo donador de hidrógeno del antioxidante. La mayoría de los métodos HAT aplican un esquema de reacción competitivo donde el antioxidante y sustrato compiten por radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de un compuesto azo. Si el antioxidante puede atrapar radicales peroxilo la señal no disminuirá, por lo que la magnitud de la reducción de la señal (en su mayoría fluorescencia) se correlaciona inversamente con la capacidad antioxidante de la muestra (Dasgupta y Klein, 2014).

En los métodos HAT, el antioxidante (abreviado como un componente aromático Ar y un componente hidroxilo OH) dona un átomo de hidrógeno (H) a un radical libre inestable (RO_2^\bullet) convirtiéndolo en un radical libre más estable (ArO^\bullet), el cual es menos probable que propague más reacciones de radicales con sustratos de iniciación (Craft *et al.*, 2012).



Algunos antioxidantes reaccionan con dos radicales peroxilo por molécula como la vitamina E o el ácido L-ascórbico en el cual ocurren dos transferencias de hidrógenos secuenciales dando como resultado el ácido deshidroascórbico y dos hidroperóxidos (Craft *et al.*, 2012).

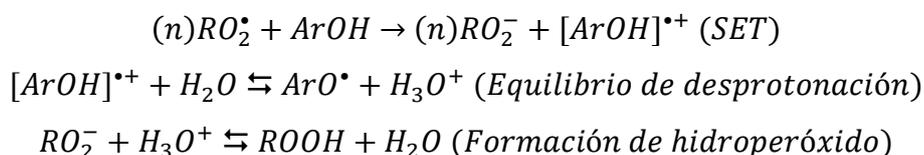
Uno de los métodos que sigue este mecanismo es el ORAC, el cual ofrece ventajas sobre otros debido a que utiliza radicales peroxilo, los cuales son mejores modelos de reacciones antioxidantes con lípidos oxidantes y ROS en los alimentos e *in vivo*, y proporciona la generación continua de radicales en una escala de tiempo realista (Schaich *et al.*, 2015), por lo que es considerado más relevante para la biología humana (Prior *et al.*, 2005).

b. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES (SET)

En los métodos SET, la capacidad de un antioxidante se mide por su capacidad de transferir un electrón para reducir radicales libres, carbonilos o iones metálicos. La reactividad relativa depende del potencial de ionización del grupo funcional reactivo en la molécula antioxidante, por lo que las reacciones son dependientes del pH, y en general el potencial de ionización disminuye con el aumento del pH, lo que indica una mayor capacidad de donación de electrones con la desprotonación (Gülçin, 2012). Cuando el antioxidante reacciona con el reactivo cromogénico se produce un cambio de color (variación de absorbancia) el cual se correlaciona con la concentración de antioxidantes; en los ensayos ABTS y DPPH la absorbancia disminuye, mientras que en los ensayos de Folin-Ciocalteu, FRAP y CUPRAC aumenta a una longitud de onda determinada (Moharram y Youssef, 2014). Las reacciones SET son generalmente lentas y pueden requerir largos tiempos para alcanzar el final de la reacción, por lo que los cálculos de la capacidad antioxidante por lo general se basan en el porcentaje de disminución de los productos en lugar de la cinética (Prior *et al.*, 2005).

En los métodos SET, el antioxidante transfiere un electrón a una especie reactiva de oxígeno (RO_2^\bullet), formándose un compuesto radical catiónico antioxidante, el cual se desprotona

mediante interacción con agua formando un ión hidronio quien reacciona con el RO_2^- formando agua y un hidroperóxido (Craft *et al.*, 2012).



c. MECANISMOS MIXTOS HAT Y SET

Las reacciones de SET y HAT pueden ocurrir en paralelo, y el mecanismo que domina en un sistema dado será determinado por la estructura y propiedades antioxidantes; la solubilidad y el coeficiente de partición; y el solvente del sistema (Prior *et al.*, 2005). Zhang y Ji, citados por Craft *et al.* (2012) mencionan que en medios polares próticos la interacción de la vitamina E con el radical DPPH $^\bullet$ mostraron reacciones termodinámicamente favorables tanto de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) como de pérdida de un protón y transferencia de un electrón (SPLET).

En el Cuadro 4 se muestran algunos ensayos de capacidad antioxidante según su mecanismo de acción y el radical o ión involucrado en cada uno.

Cuadro 4: Ensayos de capacidad antioxidante según su mecanismo de acción

ENSAYO	RADICAL/IÓN MEDIDO
Mecanismo HAT	
Ensayos de quimioluminiscencia (CL)	RO_2^\bullet
Fotoquimioluminiscencia (PCL)	O_2^\bullet
Reactividad antioxidante total (TAR)	RO_2^\bullet
Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC _{FL})	RO_2^\bullet
Potencial de atrapamiento total de radicales (TRAP)	RO_2^\bullet
Blanqueamiento del β -caroteno o crocina	RO_2^\bullet
Capacidad total de eliminación de oxi-radicales (TOSC)	RO_2^\bullet y HO^\bullet
Sistemas modelo de liposomas	RO_2^\bullet y HO^\bullet
Modelos de oxidación de lipoproteínas de baja densidad	RO_2^\bullet y HO^\bullet
Mecanismo SET	
Capacidad antioxidante reductor de ion cúprico (CUPRAC)	$Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ (complejo)
Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)	$Fe^{3+}\text{-TPTZ} \rightarrow Fe^{2+}\text{-TPTZ}$
Mecanismo mixto HAT y SET	
TEAC	ABTS $^{\bullet+}$
DPPH	DPPH $^\bullet$

FUENTE: Adaptado de Craft *et al.* 2012.

2.7.2. LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS *IN VITRO*

A pesar de que los ensayos antioxidantes se diseñaron para identificar qué antioxidantes deberían proporcionar los mayores efectos protectores contra los radicales libres *in vivo*, la eliminación de radicales observada en los ensayo *in vitro* probablemente no ocurra *in vivo*. La mayoría de antioxidantes se absorben poco o se conjugan rápidamente y son eliminados en la orina (Schaich *et al.*, 2015).

Una segunda limitación es que los objetivos químicos y moleculares de la mayoría de ensayos *in vitro* no son relevantes en las condiciones *in vivo*. Las concentraciones de antioxidantes usadas son más altas que las que se encontrarían *in vivo*, además, usan radicales estables con impedimento estérico (ABTS^{•+} o DPPH), en lugar de radicales pequeños fácilmente accesibles como HO[•], O₂^{•-}, o radicales oxilo que son activos *in vivo* y siguen tiempos de reacción mucho más cortos que van desde 10 segundos para radicales peroxilo a 10⁻⁹ segundos para radicales hidroxilo. Si un antioxidante requiere de muchos minutos a horas para extinguir los radicales, su acción como desactivador de radicales debe ser irrelevante *in vivo* en las células o incluso *in situ* en los alimentos (Schaich *et al.*, 2015).

Una tercera limitación es que los ensayos *in vivo* no abordan las reacciones radicales en los lípidos, cuando estos están implicados en la oxidación de las membranas y alimentos. Se han desarrollado algunas versiones lipofílicas de los ensayos, pero estos enfoques solubilizan principalmente los antioxidantes lipófilos para la reacción en fase acuosa en lugar de las fases lipídicas, por lo que existe relativamente poca información disponible sobre cómo los antioxidantes naturales se dividen dentro e interactúan con los lípidos (Schaich *et al.*, 2015).

La mayoría de los ensayos miden la estequiometría en lugar de la cinética de las reacciones antioxidantes, es decir, cuánto reacciona en lugar de qué tan rápido, lo cual puede conducir a una evaluación incorrecta de la actividad antioxidante cuantitativa y cualitativamente. Cada laboratorio tiene procedimientos adaptados para trabajar con la instrumentación y las capacidades disponibles, lo que resulta en la no estandarización de los procedimientos experimentales, particularmente en la expresión de resultados (Schaich *et al.*, 2015).

2.7.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AL TROLOX (TEAC)

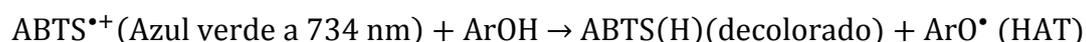
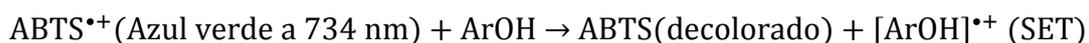
Los ensayos TEAC miden la capacidad antioxidante como la capacidad de los antioxidantes para disminuir el color al radical ABTS^{•+} al interceptar la oxidación inicial y prevenir la

producción de radicales $ABTS^{•+}$, o al reaccionar directamente con el radical $ABTS^{•+}$ (Schaich *et al.*, 2015). Los resultados de estos ensayos son expresados en relación al Trolox (Prior *et al.*, 2005), son ensayo de punto final y debido a su simplicidad son ampliamente utilizados en diversos laboratorios para medir la capacidad antioxidante total de diferentes compuestos y componentes de alimentos (Dasgupta y Klein, 2014).

Una de las ventajas del ensayo ABTS para medir la capacidad antioxidante es que el radical $ABTS^{•+}$ puede solubilizarse en medios acuosos y orgánicos, en los que la capacidad antioxidante se puede medir debido a la naturaleza hidrófila y lipófila de los compuestos en las muestras, mientras que otros cromógenos como el DPPH solo se puede disolver en medios orgánicos (especialmente en medios alcohólicos), lo cual es una limitación cuando se requiere interpretar el papel de los antioxidantes hidrófilos (Arnao, 2000). Entre las desventajas de este método se menciona que el radical $ABTS^{•+}$ utilizado no se encuentra en la biología de los mamíferos y por lo tanto representa una fuente de radicales "no fisiológico". Además, termodinámicamente un compuesto puede reducir $ABTS^{•+}$ si tiene un potencial redox inferior a la del ABTS (0.68 V), por lo que muchos compuestos fenólicos con bajos potenciales redox y pueden reaccionar con el radical $ABTS^{•+}$ (Prior *et al.*, 2005).

a. FUNDAMENTO DEL ENSAYO ABTS

El ensayo ABTS se basa en la capacidad que tienen los antioxidantes de eliminar el radical $ABTS^{•+}$ (Prior *et al.*, 2005). Es un método de transferencia de electrones (SET), en el que el radical catiónico $ABTS^{•+}$, formado a partir del 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sufónico) (ABTS), es reducido a ABTS al reaccionar con los antioxidantes de la muestra, disminuyendo su color desde un azul oscuro hasta incoloro, el cual puede ser medido por espectrofotometría (Dasgupta y Klein, 2014). Sin embargo, a pesar de que se acepta generalmente como un ensayo SET, el $ABTS^{•+}$ puede neutralizar mediante los mecanismos SET y HAT, los cuales se muestran en las siguientes ecuaciones (Schaich *et al.*, 2015):



Los máximos de absorción del $ABTS^{•+}$ se encuentran en longitudes de onda de 415, 645, 734, y 815 nm (Prior *et al.*, 2005). Sin embargo, se prefiere la determinación a 734 nm porque minimiza la interferencia de otros componentes y la turbidez de la muestra (Gülçin, 2012).

Para la reacción, la solución del radical $ABTS^{*+}$ es diluida a una absorbancia de 0.7 (Gülçin, 2012) o 1.0 a 734 nm, que se registra como el punto de partida. El antioxidante se agrega y produce una la disminución de absorbancia, la cual es medida después del tiempo de reacción del antioxidante con el $ABTS^{*+}$ pudiendo variar de minutos a horas (Schaich *et al.*, 2015).

La capacidad antioxidante es reportada como Trolox equivalente comparando la disminución de la absorbancia de la prueba antioxidante con la disminución de la absorbancia del estándar Trolox, o la concentración de antioxidante que da la misma respuesta que 1 mM Trolox (Schaich *et al.*, 2015). El Trolox es el análogo soluble en agua de la vitamina E, en presencia de este antioxidante el color azul verde del $ABTS^{*+}$ puede cambiar a incoloro (la absorbancia disminuye) debido a que puede reducir el $ABTS^{*+}$ en ABTS (Dasgupta y Klein, 2014).

b. VERSIONES DEL ENSAYO TEAC

El radical $ABTS^{*+}$ puede generarse por reacciones enzimáticas (peroxidasa, mioglobina) o químicas (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP) (Arnao, 2000). La generación química requiere un largo tiempo (hasta 16 horas para la generación de $K_2S_2O_8$) o altas temperaturas (60 °C para la generación por ABAP), mientras que la generación por enzimas es más rápida y las condiciones de reacción son más suaves (Gülçin, 2012). Esto da lugar a diferentes versiones del ensayo TEAC según la forma de preparar el radical $ABTS^{*+}$.

TEAC I: Se utiliza metamioglobina y H_2O_2 para generar radicales hidroxilo que oxida al ABTS a su forma de radical $ABTS^{*+}$, el cual presenta un color azul verde. Al reaccionar con los antioxidantes da como resultado la pérdida del color (Figura 16) (Schaich *et al.*, 2015).

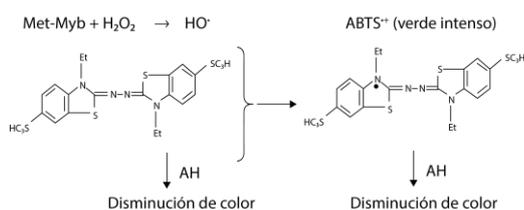


Figura 16: Reacción de decoloración del $ABTS^{*+}$ en TEAC I.

FUENTE: Adaptado de Schaich *et al.* 2015.

TEAC II: El radical $ABTS^{*+}$ se forma filtrando la solución de ABTS en buffer fosfato salino (PBS) a través de dióxido de manganeso (MnO_2). La solución es llevada a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm formándose el color azul verde del radical $ABTS^{*+}$, el cual disminuirá su color al reaccionar con los antioxidantes de la muestra (Schlesier *et al.*, 2002).

TEAC III: El radical $ABTS^{*+}$ se prepara mezclando una solución de ABTS (7 mM en agua) con persulfato de potasio 2.45 mM (Figura 17) (Gülçin, 2012). Esta solución permanece en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 horas produciendo una solución de color azul oscuro, la cual puede ser diluida con etanol o buffer fosfato (pH 7.4) hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 a 734 nm, presentando una coloración azul verde, la cual disminuirá al reaccionar con los antioxidantes de la muestra (Erel, citado por Dasgupta y Klein, 2014).

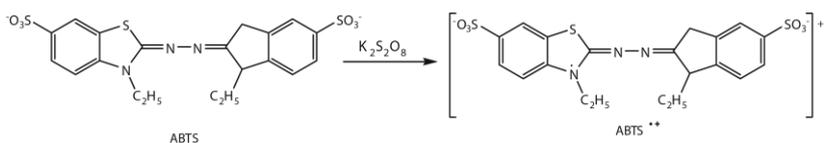


Figura 17: Oxidación del ABTS con $K_2S_2O_8$ para formar el radical $ABTS^{*+}$.

FUENTE: Gülçin (2012).

Existen otras modificaciones en las metodologías, desde la longitud de onda que se utiliza para controlar la reacción, el uso de diferentes solventes para adaptar el método a la medición de la capacidad antioxidante de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, entre otras (Prior *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, Ozgen *et al.* (2006) utilizaron buffer acetato a pH 4.5 para diluir el radical $ABTS^{*+}$ en lugar de buffer fosfato a pH 7.4, obteniendo un radical más estable. Algunos de estos métodos modificados no utilizan el nombre "TEAC", pero comparten el mismo mecanismo de reacción y utilizar el mismo catión radical $ABTS^{*+}$ (Prior *et al.*, 2005).

c. TIEMPO DE REACCIÓN EN EL ENSAYO ABTS

Los valores de capacidad antioxidante dependen del tiempo de reacción, por lo que con el fin de obtener resultados fiables las mediciones de absorbancia deben tomarse en el punto final a la reacción establecida entre los antioxidantes de la muestra y las especies oxidantes, sin embargo, este no ha recibido mucha atención en la literatura. La mayoría de los ensayos descritos aplican tiempos de reacción cortos, siendo la mayoría de ellos distantes del punto final de la reacción, proporcionando valores erróneos de capacidad antioxidante. Esta es una de las razones de la gran diversidad de resultados publicados para muestras similares y lo que limita la comparación de datos entre diferentes trabajos (Magalhães *et al.*, 2012).

La Figura 18 muestra los diferentes resultados de capacidad antioxidante que se pueden obtener al llevar las absorbancias obtenidas en diferentes tiempos de reacción a la curva de calibración del Trolox. Debido a esto, la cinética de oxidación de las muestras debe examinarse primero y las mediciones de absorbancia deben tomarse en un momento cuando

la reacción ha alcanzado las condiciones del punto final (valores de absorbancia constante) para proporcionar la capacidad antioxidante total de la muestra. Sin embargo, para casi todas las muestras de alimentos, este enfoque requiere mucho tiempo y no es adecuado para el análisis de rutina (Magalhães *et al.*, 2012).

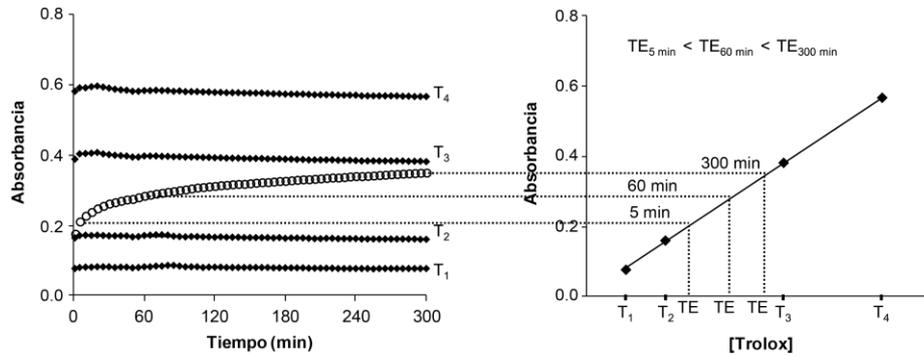


Figura 18: Dependencia de la capacidad antioxidante con el tiempo de reacción.

FUENTE: Adaptado de Magalhães *et al.* 2012.

La Figura 19 muestra diferentes casos de cinéticas de reacción, los antioxidantes que actúan por mecanismo SET y que tienen pleno acceso al $ABTS^{*+}$ reaccionan en milisegundos. Las reacciones se ralentizan por la presencia de múltiples grupos OH y anillos, aductos, altas concentraciones de antioxidantes y transferencia de átomos de hidrógeno. En mecanismos con HAT dominante no se produce una reacción rápida inicial, sino una caída gradual desde la absorbancia inicial (Schaich *et al.*, 2015).

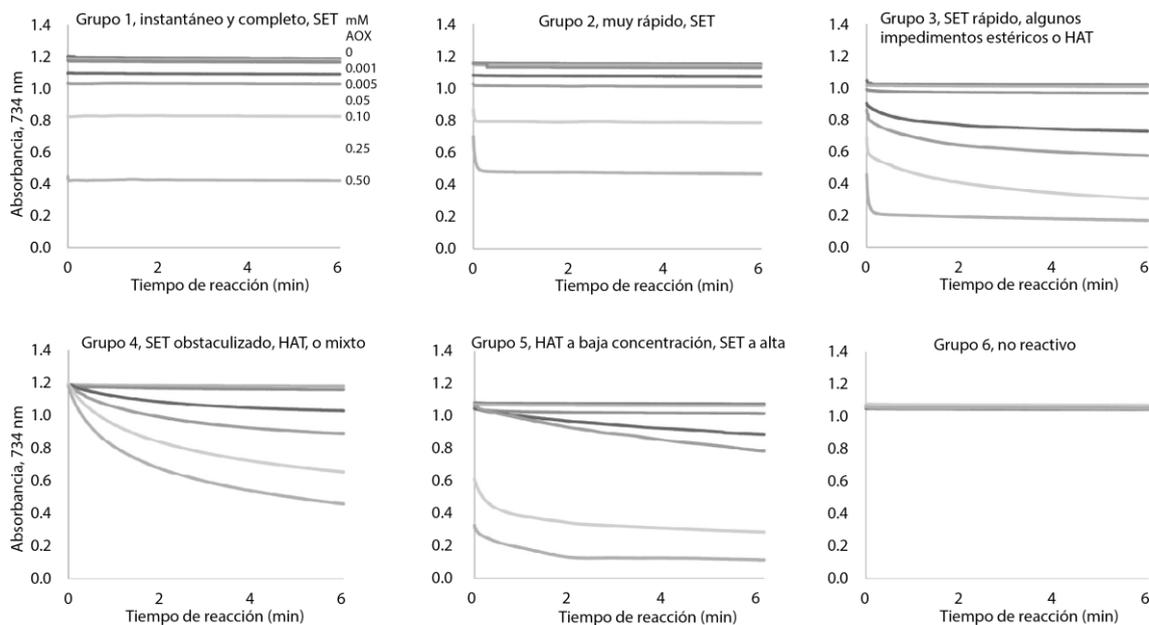


Figura 19: Cinéticas de reacción que muestran los antioxidantes con el $ABTS^{*+}$.

FUENTE: Adaptado de Schaich *et al.* 2015.

2.8. TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más importantes comercialmente en todo el mundo, pertenece a la familia de las Solanáceas o Solanaceae que incluyen más de 3000 especies en la cual se incluyen otras especies populares como la papa, tabaco, pimientos y berenjena. El tomate es la única especie domesticada de la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* que consta de 13 especies o subespecies (Padmanabhan *et al.*, 2016).

El tomate es una planta nativa de los trópicos americanos que alcanzó su mayor importancia y desarrollo fuera de su área de origen y los trópicos. Se originó en la región de los Andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú) donde se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres. Sin embargo, México es considerado por el mundo como el centro de domesticación de tomates más importante, siendo la palabra tomate proveniente de la palabra náhuatl "tomatl" (Galicia-Cabrera, 2007). Tradicionalmente, se cree que los tomates son rojos, pero naturalmente también se producen las variedades rosa, anaranjado, amarillo, blanco e inclusive negro. El color rojo típico es causado por el licopeno, que suele ser el pigmento predominante (McGlasson, 2003).

2.8.1. TAXONOMÍA Y BOTÁNICA

El tomate, generalmente conocido como *Lycopersicum Esculentum* Mill. (syn. *Solanum lycopersicum* L.), pertenece a la familia Solanaceae, a la subfamilia Solanoideae y a la tribu Solaneae. El género taxonómico correcto aún se encuentra en debate, pero estudios recientes sugieren que Linneo fue correcto al atribuirlos a *Solanum* (González *et al.*, 2011).

El tomate es un dicotiledóneo diploide perenne de vida corta, cultivado como anual por sus frutos (González *et al.*, 2011). Tiene un tallo leñoso débil y crece a una altura de 1 a 3 m, sus hojas son pinnadas de 10 a 25 cm longitud y con 5 a 9 folíolos en el peciolo, cada folíolo tiene un borde aserrado. Sus flores son amarillas de 1 a 2 cm de diámetro (Attokaran, 2011).

2.8.2. CRECIMIENTO Y MADURACIÓN

El tomate es un vegetal de clima cálido que es intolerante a las heladas; el rango de temperatura del suelo debe ser de 12 a 16 °C, con un máximo de 30 °C, y la temperatura del aire para su desarrollo debe oscilar entre 21 y 24 °C, con la temperatura óptima de 22 °C; el crecimiento se atrofia a temperaturas inferiores a 15 °C y superiores a 35 °C. La temperatura

óptima para la maduración de la fruta es de 18 a 24 °C. Si la temperatura es inferior a 13 °C tiende a madurar mal, y si la temperatura es superior a 32 °C durante el almacenamiento, la coloración roja (licopeno) se inhibe y la fruta se vuelve amarilla (Galicia-Cabrera, 2007).

Los tomates tardan 6 a 7 semanas desde la floración en alcanzar su tamaño completo, dependiendo de la temperatura. La división celular continúa durante aproximadamente dos semanas después de la floración, pero la mayor parte del aumento en el tamaño de la fruta es el resultado de la expansión celular. En cultivares normales, la primera aparición de color rojo o rosado en el extremo de la flor de la fruta indica la finalización del crecimiento y el comienzo de la maduración (McGlasson, 2003).

El fruto del tomate es climatérico y puede cosecharse en diferentes etapas de maduración, desde su etapa verde a la roja (Galicia-Cabrera, 2007). La maduración es acompañada de un aumento tanto de la respiración como en la producción de etileno. Un aumento natural en la producción endógena de etileno inicia la maduración y regula o integra muchos de los eventos bioquímicos en la maduración (McGlasson, 2003).

En la Figura 20 se muestran los cambios en el metabolismo y la composición durante la maduración del tomate. En los eventos bioquímicos de la maduración del tomate, el fruto verde inmaduro de sabor ácido se convierten en una fruta suave con sabor y aroma dulce; el tomate se ablanda y este ablandamiento es acompañado de cambios en la pectina y las hemicelulosas. Un aumento en la respiración, aumento en la producción de etileno, cambios en la acidez de la fruta, desaparición del contenido de almidón, destrucción de la clorofila y la síntesis de licopeno, aroma y poligalacturonasa (PG), son algunos cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración (McGlasson, 2003, Padmanabhan *et al.*, 2016).

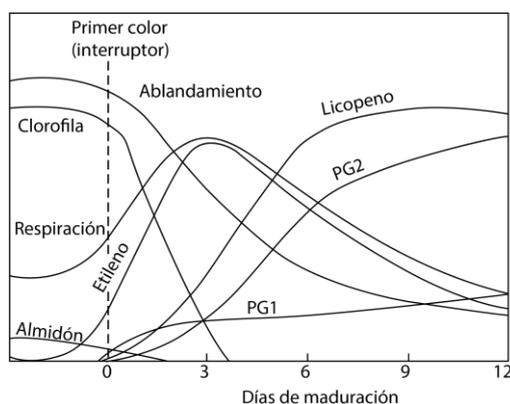


Figura 20: Cambios durante la maduración del tomate.

FUENTE: Adaptado de McGlasson 2003.

El tomate desarrolla la coloración siguiendo una secuencia típica de maduración. En la mayoría de los cultivares de color rojo, después de la etapa verde, la punta del extremo de la flor cambia a un color amarillo rosado, que se conoce como la “etapa interruptor”. Posteriormente toda la fruta se vuelve rosa, seguida por rojo claro y finalmente rojo intenso causado por la alta concentración de licopeno (Padmanabhan *et al.*, 2016). El licopeno se presenta como cristales alargados en forma de aguja en los tomates maduros dándoles la coloración típicas de ellos (Shi y Le Maguer, 2000).

2.8.3. COMPOSICIÓN Y VALOR NUTRICIONAL

La composición de un tomate depende de la variedad, etapa de maduración, condiciones climáticas de crecimiento, luz, temperatura, suelo, fertilización e irrigación. El contenido de agua oscila entre 90 y 96 por ciento, mientras que su contenido de sólidos totales oscila entre 5 y 6 por ciento; aproximadamente la mitad de estos sólidos son azúcares reductores, con una cantidad ligeramente más alta de fructosa que de glucosa, y sacarosa generalmente del 0.1 por ciento. Un cuarto del total de sólidos son aminoácidos, ácido cítrico, málico y dicarboxílico, lípidos y minerales; mientras que el resto está compuesto de proteínas, sustancias pécticas, celulosa y hemicelulosa (Galicia-Cabrera, 2007).

El tomate contiene importantes compuestos bioactivos, entre ellos los carotenoides, como el licopeno, que son responsables del color rojo, también se encuentran la zeaxantina, luteína y β -caroteno que presenta actividad provitamina A; polifenoles incluyendo flavonoles y flavonoides, los cuales son potentes antioxidantes; y vitaminas como el ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferoles (vitamina E). Todos estos compuestos presentes en el tomate dan como resultado diferentes beneficios para la salud humana (León-García *et al.*, 2018).

Estudios epidemiológicos han indicado que el tomate tiene una de las mayores correlaciones inversas con el riesgo de cáncer y la enfermedad cardiovascular, incluido el accidente cerebrovascular (Giovannucci *et al.*, citados por Yahia *et al.*, 2018).

En el Cuadro 5 se muestran los datos de composición de tomates frescos de mercado representativos de tipos cultivados al aire libre en países como Estados Unidos y Australia. La concentración de cada nutriente puede variar significativamente con el patrimonio genético, variedad, la etapa de maduración, condiciones agronómicas y el manejo poscosecha (León-García *et al.*, 2018).

Cuadro 5: Composición de nutrientes del tomate

NUTRIENTE	CONTENIDO (POR 100 g DE PORCIÓN COMESTIBLE^a)
Energía ^b (kJ)	56
Constituyentes (g)	
Agua	94.7
Proteína ^c	1.0
Grasa	0.1
Fibra dietaria	1.6
Carbohidratos (g)	
Glucosa	0.9
Fructuosa	1.0
Sacarosa	0
Almidón	0
Ácidos orgánicos (g)	
Cítrico	0.43
Málico	0.08
Oxálico	0
Otros	0
Vitaminas (mg)	
Vitamina C	18
Tiamina	0.04
Riboflavina	0.02
Ácido nicotínico	0.7
β-caroteno (equivalente) ^d	0.34
Minerales (mg)	
Potasio	200
Sodio	6
Calcio	8
Magnesio	10
Hierro	0.3
Zinc	0.2

^aLa porción comestible es el 99% de la fruta.

^bLa energía se calculó como g ((proteína x 17) + (grasa x 37) + (monosacáridos x 16) + (disacáridos x 16.8) + (almidón x 17.6) + (ácidos orgánicos x 10)).

^cLa proteína se calculó como porcentaje de N x 6.25.

^dEl β-caroteno se calculó como mg β-caroteno + 0.5 x mg (β-caroteno + criptoxantina).

FUENTE: Adaptado de McGlasson 2003.

2.9. LICOPENO

El licopeno es un fitoquímico responsable de los pigmentos rojos que se encuentran en las plantas (Shi *et al.*, 2010). Es uno de los más de 600 carotenoides encontrados en la naturaleza, de los cuales aproximadamente 40 se encuentran presentes en una dieta típica humana (Rao *et al.*, 2006). Su nombre deriva de la clasificación de las especies de tomate, *Lycopersicon esculentum* (Diener y Christian, 2008).

Los carotenoides son pigmentos naturales que pueden ser sintetizados por plantas, algas y bacterias, y que llegan a los tejidos animales solo a través de la alimentación, por lo que los humanos no pueden sintetizar carotenoides y el nivel de estos en el plasma depende del consumo de diferentes fuentes de carotenoides en la dieta (Cámara *et al.*, 2013).

Se ha demostrado el efecto protector antioxidante del licopeno y tomates *in vitro* e *in vivo*, por lo que los alimentos que contienen licopeno son de considerable interés (Shi *et al.*, 2010). Estudios epidemiológicos sugieren que una mayor ingesta de licopeno reduce el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Kaur y Kaur, 2015). Diener y Christian (2008) mencionan estudios donde se evidencia la relación inversa entre el consumo de tomate y productos a base de este con el riesgo de cáncer de próstata, pulmonar y pleural, estómago, colorrectal, páncreas, esófago, cuello uterino y precursores, mama, oral, laringe y de faringe.

2.9.1. FUENTES DE LICOPENO

A diferencia de otros carotenoides consumidos por los seres humanos, el licopeno se puede encontrar en un número limitado de alimentos, como algunas frutas, verduras y alimentos procesados (Cuadro 6), variando su color desde el rosa hasta un rojo intenso (Rocha *et al.*, 2015), siendo los tomates y productos a base de estos los que representan más del 85 por ciento de todas las fuentes de licopeno en la dieta (Sgherri *et al.*, 2015). El contenido de licopeno en los diferentes productos es influenciado por el lugar de crecimiento de la planta, maduración de la fruta, y por el tipo y condiciones de procesamiento (Sgherri *et al.*, 2015).

Cuadro 6: Contenido de licopeno en diferentes fuentes

FRUTAS Y VERDURAS	LICOPENO (mg/kg)	ALIMENTOS PROCESADOS	LICOPENO (mg/kg)
Tomate crudo	9-150	Salsa de tomate	60-180
Sandía	23-120	Pasta de tomate	54-1500
Guayabas	53	Sopa de tomate	20-80
Toronja roja	14-34	Jugo de tomate	50-116
Papayas	20-53	Tomates secos en aceite	465
Zanahorias rojas	61	Tomate cocinado	37
Pitanga	73	Ketchup	42-172
Olivo de otoño	150-540		
Escaramujo	22		
Melón amargo	411		
Gác	348-1902		

FUENTE: Adaptado de Sgherri *et al.* 2015.

Además de las fuentes naturales de licopeno, se ha reportado la producción de licopeno biotecnológico, pero en la mayoría de los casos a escala de laboratorio. Algunos microorganismos como *Streptomyces chrestomyceticus*, *Candida utilis*, *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides*, *Mycobacterium aurum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum molischianum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli* genéticamente modificada, *Pichia pastoris* y especies de *Flavobacterium* han sido reportados con importantes capacidades de producción de licopeno. Asimismo, se han reportado diferentes vías sintéticas para la producción de licopeno, pero con diferentes desventajas como bajos rendimientos, inestabilidad del producto, baja calidad del producto y procesos económicamente poco atractivos (Papaioannou *et al.*, 2016).

2.9.2. QUÍMICA DEL LICOPENO

El licopeno es un carotenoide acíclico apolar cuya fórmula molecular es $C_{40}H_{56}$, presenta 11 dobles enlaces conjugados y 2 no conjugados (Figura 21). Es insoluble en agua, casi insoluble en metanol y etanol, y soluble en solventes orgánicos como disulfuro de carbono, éter etílico, éter de petróleo, cloroformo y benceno (Cámara *et al.*, 2013). Su estructura carece del anillo β -ionona presente en aproximadamente 50 de los 600 carotenoides conocidos, razón por la cual no presenta actividad provitamina A (Rocha *et al.*, 2015).

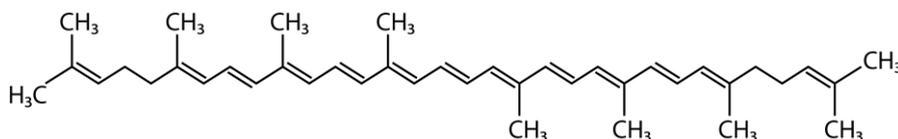


Figura 21: Estructura química del licopeno.

FUENTE: Sgherri *et al.* (2015).

El licopeno se produce naturalmente en forma trans, debido a su mayor estabilidad, pero posee una gran variedad de isómeros geométricos, habiéndose identificado más de 72 isómeros de licopeno (Cámara *et al.*, 2013). La forma trans puede cambiar a isómeros mono-cis o poli-cis después de estar expuesto a altas temperaturas, catalizadores, ácidos o contacto con el oxígeno, siendo las formas isoméricas más comunes el -trans, 9-cis, 5-cis, 13-cis y 15-cis (Figura 22) (Rocha *et al.*, 2015). El licopeno existe predominantemente en un 80 a 97 por ciento en configuración trans (E) en tomates, frutas y verduras, y en el plasma humano y tejidos corporales se encuentra como una mezcla de 50 por ciento cis (Z) y 50 por ciento trans (Kaur y Kaur, 2015).

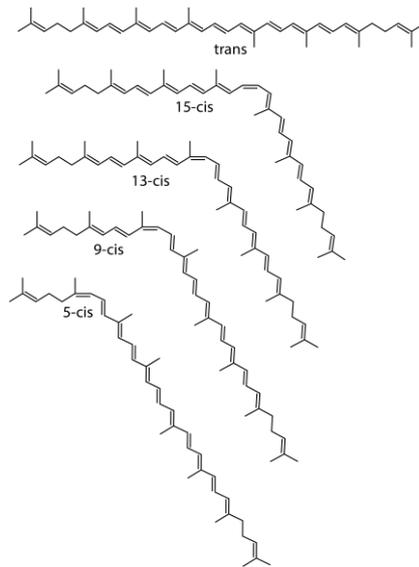


Figura 22: Formas isoméricas del licopeno.

FUENTE: Rocha *et al.* (2015).

Una de las principales funciones del licopeno en el cuerpo es el de antioxidante, desactivando el oxígeno singlete y eliminando los radicales libres, lo que impide la secuencia de reacciones en cadena de estos, eliminando los intermedios e inhibiendo otras reacciones de oxidación que pueden dañar las células y provocar cáncer, razón por la cual se cree que es el principal antioxidante en el grupo de los carotenoides (Rocha *et al.*, 2015).

Durante el procesamiento y almacenamiento se puede esperar que el licopeno sufra dos cambios: la isomerización a los isómeros mono-cis o poli-cis, y la oxidación; cambios que son influenciados principalmente por las temperaturas elevadas, exposición a la luz y oxígeno. Los isómeros cis del licopeno tienen características físicas y comportamientos químicos distintos de su contraparte trans, incluida la disminución de la intensidad del color, menores puntos de fusión, mayor polaridad, menor tendencia a la cristalización y mayor solubilidad en disolventes de hidrocarburos y petróleo; mientras que la autooxidación del licopeno es irreversible y conduce a la fragmentación de la molécula, produciendo acetona, metilheptenona, aldehído levulínico y probablemente glioxal, lo que causa una aparente pérdida de color (Shi y Xue, 2008).

2.9.3. LICOPENO COMO ANTIOXIDANTE

El licopeno tiene la capacidad de desactivar el oxígeno singlete y eliminar los radicales libres, por lo que tiene un sólido sistema de defensa antioxidante, atribuido además a su estructura acíclica, numerosos dobles enlaces conjugados y alta hidrofobicidad, lo que da

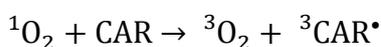
protección y estabilización de biomoléculas como ADN, proteínas, lípidos y lipoproteínas (Kaur y Kaur, 2015), los cuales, si sufren daño oxidativo, son implicados en el desarrollo de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la osteoporosis (Rao *et al.*, 2006). Sgherri *et al.* (2015) mencionan que la efectividad del licopeno en la prevención del daño oxidativo del ADN de linfocitos, las membranas celulares y las células HT29 puede relacionarse con su capacidad para eliminar el anión superóxido, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete, así como inhibir la peroxidación lipídica.

Como antioxidante natural, al igual que los demás carotenoides, pueden mejorar la estabilidad y extender la vida útil de los alimentos (Rodríguez-Amaya, 2015). Existen algunos indicios de que la prevalencia de isómeros cis aumenta la capacidad antioxidante de los productos vegetales. Se ha demostrado que el isómero 5-cis demostró tener propiedades antioxidantes más elevadas seguidas por el 9-cis, 7-cis, 13-cis, 11-cis y los isómeros trans (Sgherri *et al.*, 2015).

a. DESACTIVACIÓN DEL OXÍGENO SINGLETE

El licopeno, al igual que otros carotenoides, puede actuar como antioxidante al desactivar el oxígeno singlete (1O_2). En sistemas biológicos, varios sensibilizadores (clorofila, riboflavina, mioglobina) pueden absorber energía de la luz y promover la transformación del oxígeno triplete (3O_2) a oxígeno singlete (1O_2). El oxígeno singlete participa en la fotooxidación de aceites vegetales y alimentos que contienen aceite. La adición de varios carotenoides a los alimentos que contienen ácidos grasos insaturados mejoran su vida útil, principalmente debido a la desactivación del oxígeno singlete (Rodríguez-Amaya, 2015).

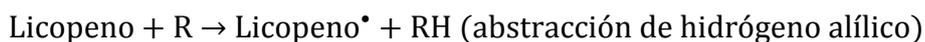
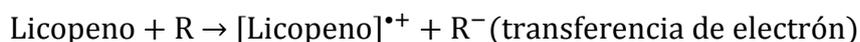
La capacidad de desactivar el oxígeno singlete puede darse por quenching físico o químico. El quenching físico es más efectivo e implica la transferencia de la energía de excitación desde el 1O_2 hasta el carotenoide, resultando en 3O_2 y el carotenoide de estado triplete excitado ($^3CAR^*$). La energía de excitación se disipa a través de interacciones rotacionales y vibratorias entre el $^3CAR^*$ y el solvente circundante, produciendo el carotenoide en estado fundamental y energía térmica. El carotenoide permanece intacto y puede someterse a ciclos adicionales de desactivación de oxígeno singlete (Rodríguez-Amaya, 2015).



En el quenching químico, el carotenoide se combina con el oxígeno o se oxida, lo que lleva a destrucción del carotenoide. La desactivación del oxígeno singlete de los carotenoides aumenta con el número de dobles enlaces conjugados, razón por la cual el licopeno presentan una mayor capacidad de desactivación del oxígeno singlete dos veces más alta que β -caroteno y 10 veces mayor que la de α -tocoferol (Rodríguez-Amaya, 2015).

b. ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES

Sgherri *et al.* (2015) mencionan que los mecanismos antioxidantes del licopeno pueden implicar una transferencia de electrones para generar el radical catiónico [Licopeno]^{•+}, una abstracción de hidrógeno para formar el radical carotenoide, y la adición radicalaria para generar el radical aducto [R^{•••} Licopeno][•].



El radical catiónico licopeno y radical aducto son estabilizados por resonancia, por lo que son relativamente no reactivos en comparación con los radicales libres, y experimentan una decadencia bimolecular lenta a productos no radicales (Sgherri *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el licopeno elimina el radical sulfoniltililo a una mayor velocidad que los otros carotenoides, y que por la interacción con el catión radical estable ABTS^{•+}, la clasificación de los carotenoides como antioxidantes sigue la siguiente secuencia: licopeno > β -caroteno = β -criptoxantina (-3-ol) > luteína/zeaxantina (-3,3'-diol) > echinenone (-4-ona) > cantaxantina (-4,4'-diona) = astaxantina (-3,3'-dihidroxi-4,4'-diona); y que la reactividad del licopeno hacia el superóxido resulta mucho más significativa que la del β -caroteno (Sgherri *et al.*, 2015). Además, es dos veces más eficiente que el β -caroteno en la eliminación de radicales de dióxido de nitrógeno (Rodríguez-Amaya, 2015).

2.9.4. EXTRACCIÓN DE LICOPENO

La extracción, almacenamiento, manipulación y análisis del licopeno deben realizarse bajo factores ambientales controlados para minimizar las pérdidas de licopeno mediante oxidación o isomerización (Choksi y Joshi, 2007).

Debido a que el licopeno es liposoluble, generalmente se extrae con solventes orgánicos como cloroformo, hexano, acetona, benceno, éter de petróleo o disulfuro de carbono. Cuando la extracción con solvente es lenta e incompleta, se puede usar la molienda del material para facilitar la extracción completa. Los dobles enlaces conjugados de licopeno hacen que sean inestables, especialmente sensibles a la luz, calor, oxígeno y ácidos, por lo que las extracciones deben llevarse a cabo con poca iluminación y en una atmósfera inerte. El calentamiento de la solución de licopeno debe mantenerse al mínimo para evitar la oxidación e isomerización del licopeno. La muestra extraída se debe almacenar en la oscuridad bajo nitrógeno y temperaturas de congelación (-20 °C). Después de la extracción, un paso de saponificación es el método más efectivo para eliminar los lípidos, clorofilas y otras impurezas no deseadas, este procedimiento no afecta el licopeno porque generalmente es estable a los álcalis (Shi y Le Maguer, 2000).

Los procedimientos existentes para extraer licopeno de fuentes vegetales que usan solventes orgánicos presentan desventajas considerables. Algunos solventes orgánicos son tóxicos y deben eliminarse por completo del material agotado, además, deben tratarse como un residuo especial después de la extracción y no pueden reutilizarse, lo que genera grandes volúmenes de desechos peligrosos que deben ser eliminados bajo estrictas pautas ambientales. Los solventes orgánicos no son específicos para el licopeno, por lo que al mismo tiempo se extraen simultáneamente otros pigmentos o compuestos hidrófobos como carotenos, xantofilas y grasas presentes en el material natural original (Papaioannou *et al.*, 2016).

Debido a la tendencia de utilizar tecnologías que no generen un impacto negativo con el medio ambiente, se han desarrollado tecnologías eficientes para la extracción de licopeno, entre las cuales la extracción mediante fluidos supercríticos ha sido ampliamente estudiada (Konar *et al.*, 2012), inclusive la recuperación de licopeno puede aumentar por el uso de enzimas en combinación la técnica de fluidos supercríticos (Lenucci *et al.*, 2015).

Una de las consideraciones más importantes en el desarrollo de nuevos procesos y tecnología para la extracción de licopeno, y carotenoides en general, es el tema de seguridad de los productos finales cuando se usan como alimentos o nutraceuticos, por lo que en las últimas décadas se han introducido e investigado técnicas de extracción alternativas que se afirma son mejores en términos de eficiencia, tiempo de extracción y consumo de solventes. Estas técnicas incluyen la extracción asistidas por microondas, extracción por solventes a alta

presión, extracción a altas presiones, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por enzimas y la extracción asistida con surfactante (Papaioannou *et al.*, 2016).

2.9.5. CUANTIFICACIÓN DE LICOPENO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

La separación cromatográfica de licopeno es la mejor opción para el análisis e identificación de licopeno, incluidos sus isómeros trans y cis. Estos métodos incluyen cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía en papel, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta performance (HPLC), utilizando varios tipos de adsorbentes y fases móviles (Shi y Le Maguer, 2000). Las ventajas del HPLC incluyen la eficiencia, tiempos de ejecución cortos y sensibilidad (Pfander y Riesen, citados por Kopec *et al.*, 2012).

El arreglo de diodos es el detector más utilizado para el análisis de carotenoides por HPLC, aunque pueden usarse otros detectores, tales como detectores electroquímicos, fluorescencia, espectrómetros de masas y resonancia magnética nuclear (Kopec *et al.*, 2012). El detector de arreglo de diodos se utiliza una longitud de onda de 200 a 600 nm (Choksi y Joshi, 2007).

Se han utilizado columnas C18, las cuales a menudo son suficientes para separar diferentes carotenoides, aunque las columnas C30 tienden a producir mejores separaciones, especialmente de compuestos muy similares; y la HPLC de fase inversa es la más utilizada, aunque se han desarrollado algunos métodos de fase normal (Kopec *et al.*, 2012).

En la separación de carotenoides se ha demostrado que las columnas poliméricas C18 son más selectivas hacia los isómeros en comparación con las columnas monoméricas. Sin embargo, en los años 80 y 90, se desarrolló una fase estacionaria de 30 carbonos (columna C30) y se le denominó la "columna de carotenoides" debido a su forma de selectividad y capacidad superior para separar no solo las diferentes especies de carotenoides, sino también sus isómeros (Figura 23). El orden de elución del licopeno varía mucho entre las columnas C18 y C30, en una columna C18 el licopeno se eluye antes que el α -caroteno y el β -caroteno. Por el contrario, en una columna C30 el licopeno se retiene y eluye en último lugar, lo que permite la separación eficiente de los isómeros (Sander *et al.*, citados por Kopec *et al.*, 2012).

La mayoría de los métodos C30 utilizan alguna combinación de metil tert-butil éter (MTBE), metanol y una pequeña cantidad de agua y emplean un gradiente para la separación óptima de diferentes especies de carotenoides y sus isómeros (Kopec *et al.*, 2012).

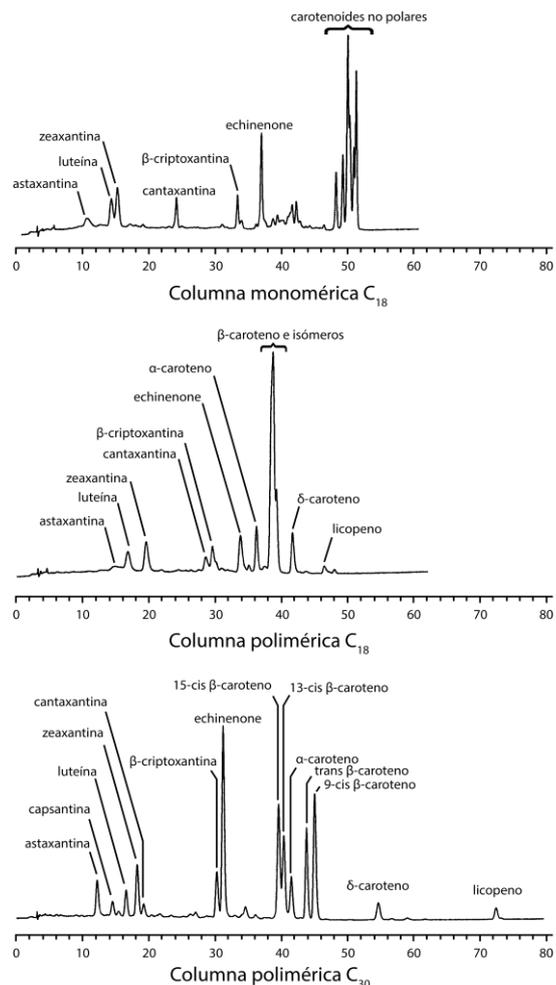


Figura 23: Comparación de la separación de los estándares de carotenoides en columna monomérica C18, polimérica C18 y columna de carotenoides C30.

FUENTE: Adaptado de Sander *et al.*, citados por Kopec *et al.* 2012.

2.10. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La extracción con fluido supercrítico (SFE) es una técnica basada en el uso de solventes a temperaturas y presiones superiores a sus puntos críticos. Es un método rápido, eficiente y limpio para la extracción de productos naturales de diferentes matrices. La facilidad de ajustar las condiciones de funcionamiento para aumentar el poder de solvatación lo vuelve una buena opción para la recuperación de diferentes analitos de interés (Ibáñez *et al.*, 2016). Machmudah *et al.* (2015) mencionan que las ventajas de esta tecnología son:

- Los fluidos supercríticos tienen un mayor coeficiente de difusión y una menor viscosidad que los líquidos, lo que ayuda a una mejor transferencia de masa.
- La ausencia de tensión superficial permite su rápida penetración en los poros de las matrices sólidas, lo que mejora la eficiencia de las extracciones.

- Las condiciones de extracción pueden manipularse variando la temperatura y presión que afectan a la solubilidad de los diversos componentes en el fluido supercrítico.
- No deja residuos químicos, por lo que es un proceso amigable con el medio ambiente.
- Se usa gas dióxido de carbono, el cual puede reciclarse y usar nuevamente.

2.10.1. REGIÓN SUPERCRÍTICA Y FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La Figura 24 muestra el diagrama general presión-temperatura (PT) del CO₂ con los tres estados comunes de la materia (sólido, líquido y gaseoso) divididos por distintos límites de fase. En estas líneas, dos fases están en equilibrio y los tres estados coexisten en el punto triple. La curva de equilibrio vapor-líquido o punto de ebullición, termina en el punto crítico con una temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c). Por encima de este punto se encuentra la región supercrítica, en la cual no existen límites de fase y solo existe una fase homogénea independientemente de la presión y la temperatura, por lo tanto, es posible que una sustancia pase de un estado líquido al estado gaseoso a través de la región supercrítica sin ninguna transición de fase como se muestra con los puntos A y B del diagrama PT (Erkey, 2011).

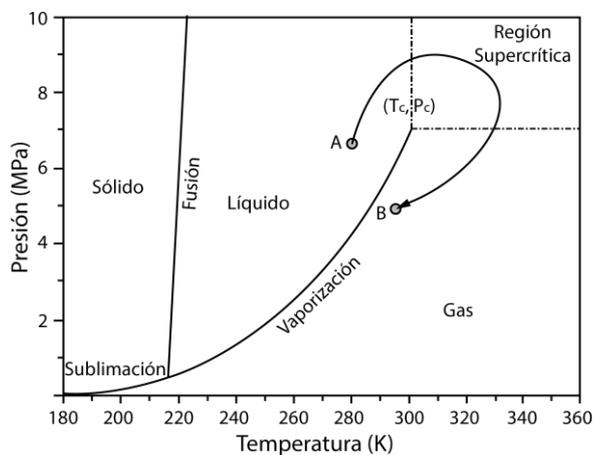


Figura 24: Diagrama Presión-Temperatura del CO₂.

FUENTE: Adaptado de Erkery 2011.

Un fluido supercrítico (FSC) es un fluido con una temperatura y presión mayor que su temperatura y presión crítica (Erkey, 2011). Presentan un comportamiento intermedio entre un líquido y un gas. Sus propiedades relacionadas a la capacidad de solubilización, como la densidad, se vuelven similares a las de un líquido; y las relacionadas con el transporte de materia, como la difusividad y viscosidad, son similares a las de un gas. Por lo que los FSC son excelentes solventes al combinar el poder de solvencia de los líquidos con la alta difusividad y baja viscosidad de los gases (Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes, 2015).

La Figura 25 muestra el diagrama presión-volumen (PV) del CO₂, donde la curva a la izquierda del área que termina en el punto crítico representa a los líquidos saturados en su punto de ebullición, y la curva a la derecha del área representa los vapores saturados en su temperatura de condensación. A temperaturas inferiores a T_c, las isoterms constan de tres segmentos, en el que el segmento horizontal muestra todas las posibles mezclas de vapor y líquido; mientras que a temperaturas y presiones de T_c y P_c, las isoterms son lisas y no cruzan ningún límite de fase (Erkey, 2011).

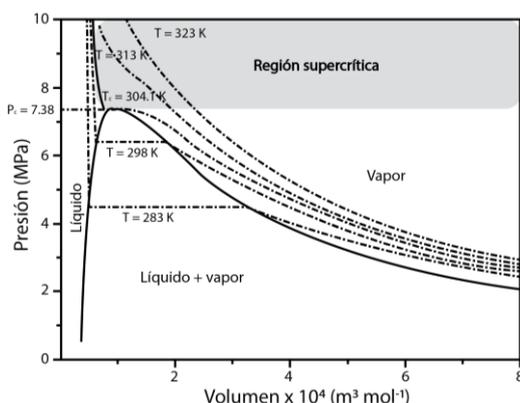


Figura 25: Diagrama Presión-Volumen del CO₂.

FUENTE: Adaptado de Erkery 2011.

El Cuadro 7 muestra las propiedades críticas (T_c, P_c, ρ_c) de las sustancias puras que pueden utilizarse como FSC. A pesar de haberse investigado todos estos compuestos en su estado supercrítico y algunos de ellos inclusive se han utilizado a escala industrial para diversas aplicaciones, el dióxido de carbono (CO₂) supercrítico es el más utilizado (Erkey, 2011).

Cuadro 7: Condiciones críticas de algunos fluidos supercríticos de uso común

FLUIDO	T _c (°C)	P _c (MPa)	ρ _c (kg/m ³)
Dióxido de carbono	31.2	7.38	468
Amoniaco	132.4	11.29	235
Agua	374.1	22.1	317
Etileno	9.5	5.06	220
Etano	32.5	4.91	212
Propano	96.8	4.26	225
n-Pentano	196.6	3.37	232
Cliclohexano	279.9	4.03	270
Metanol	240.0	7.95	275
Etanol	243.1	6.39	280
Isopropanol	235.6	5.37	274
Acetona	235.0	4.76	273

FUENTE: Adaptado de Erkery 2011.

El CO₂ supercrítico presenta diversas ventajas sobre otros FSC debido a que se lo considera como GRAS (Machmudah *et al.*, 2015). Brunner, citado por Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes (2005) menciona las siguientes ventajas de usar CO₂:

- Es inerte, por lo que es inofensivo para los productos que se extraen del material vegetal y para el cuerpo humano, bajo las condiciones de operación aplicadas.
- Tiene condiciones moderadas en su punto crítico con una T_c alrededor de 31 °C y una P_c de 73 bar, lo que permite operaciones a temperaturas relativamente bajas.
- No es tóxico ni inflamable, y está disponible en alta pureza a bajo costo.
- Permite el procesamiento de materias primas termolábiles debido a su baja T_c.
- Asegura la calidad de las materias primas que son sensibles a diferentes factores de degradación, como la oxidación, que pueden afectar la calidad del producto final.
- No genera desechos industriales indeseables que requieren tratamiento antes de su eliminación o que contaminan el medio ambiente.
- Se puede separar fácilmente del solvente después del proceso de extracción.

2.10.2. PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Las propiedades físicas de mayor relevancia en el proceso de SFE, desde el punto de vista de la transferencia de masa son la densidad, viscosidad y difusividad del soluto en el solvente. Estas variables son extremadamente sensibles a cualquier cambio en la temperatura y la presión (Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes, 2005)

Las propiedades de un FSC se rigen principalmente por su densidad, que es una función de la temperatura y presión. Para casi todas las aplicaciones, el comportamiento de fase de la mezcla del compuesto de interés y del FSC dicta la viabilidad técnica y económica del proceso. Gran parte de los estudios sobre el comportamiento de fase de las mezclas en los FSC se ha centrado en la solubilidad de los sólidos y las mezclas de sólidos en los FSC. La solubilidad aumenta al incrementar la presión y, por lo tanto, la densidad; y por el incremento de la temperatura a una densidad constante. Cambios moderados en la presión o temperatura próximas al punto crítico pueden alterar la capacidad de solvencia en un amplio rango, siendo esta característica lo que diferencia a los FSC de los solventes convencionales (Erkey, 2011).

Las propiedades de transporte de los FSC también varían con los cambios de presión y temperatura. El cambio de viscosidad con un aumento de temperatura a presión constante es

mucho más pronunciado que el cambio por el aumento de temperatura a densidad constante. La viscosidad del CO₂ supercrítico es menor que la viscosidad de los solventes orgánicos convencionales, lo que da como resultado caídas de presión más bajas en las tuberías que transportan los fluidos y en los recipientes de lecho compacto, facilitando el contacto entre las dos fases fluidas y contribuyendo a la mejor transferencia de masa (Erkey, 2011).

Otra propiedad de transporte importante es el coeficiente de difusión binaria (D_{12}) del soluto de interés en el FSC, el cual es función de la temperatura, presión y concentración del soluto en el FSC. En general, los D_{12} se miden e informan en el límite de dilución infinita, los cuales disminuyen al aumentar la presión. Una gran disminución con un ligero cambio en la presión se debe al gran cambio en la densidad del CO₂ con la presión en dicha región. Los valores más altos de D_{12} para los FSC indican mejores velocidades de transferencia de masa en la interfase en comparación con los solventes orgánicos convencionales, especialmente cuando la resistencia a la transferencia de masa se encuentra en el lado del fluido (Erkey, 2011).

2.10.3. PROCEDIMIENTO GENERAL DE EXTRACCIÓN

Al inicio de la SFE, el FSC es absorbido por la matriz sólida cambiando el espesor de la estructura celular y reduciendo la resistencia de la membrana, lo que conduce a un aumento del diámetro de los canales intercelulares y reduce la resistencia a la transferencia de masa. Los compuestos a extraer se transfieren por difusión desde el interior de la matriz sólida hacia su superficie, pasando después a través de la superficie externa, donde puede ocurrir un cambio de fase. Las sustancias extraíbles se transfieren al FSC y se extraen sucesivamente del extractor, en el que se da la separación de los constituyentes disueltos en el solvente supercrítico, a partir de la reducción de la densidad con la disminución de la presión o el aumento de la temperatura (Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes, 2015).

La Figura 26 muestra un esquema básico del equipo utilizado para realizar la SFE, el cual consiste en un recipiente del solvente de extracción (A) (usualmente CO₂), una bomba para presurizar el fluido (B), un horno que contiene el recipiente de extracción (C) y un restrictor para mantener la alta presión dentro del sistema (D). Debido a la acción del horno y la bomba, el CO₂ cambia de líquido a la condición supercrítica. La recuperación consiste en un recipiente de captura (E), donde la presión se reduce a una presión de gas equivalente. Opcionalmente, puede incluir un segundo recipiente de captura (F), un sistema de reciclado de CO₂ (G) y una bomba modificadora (H) (Ibáñez *et al.*, 2016).

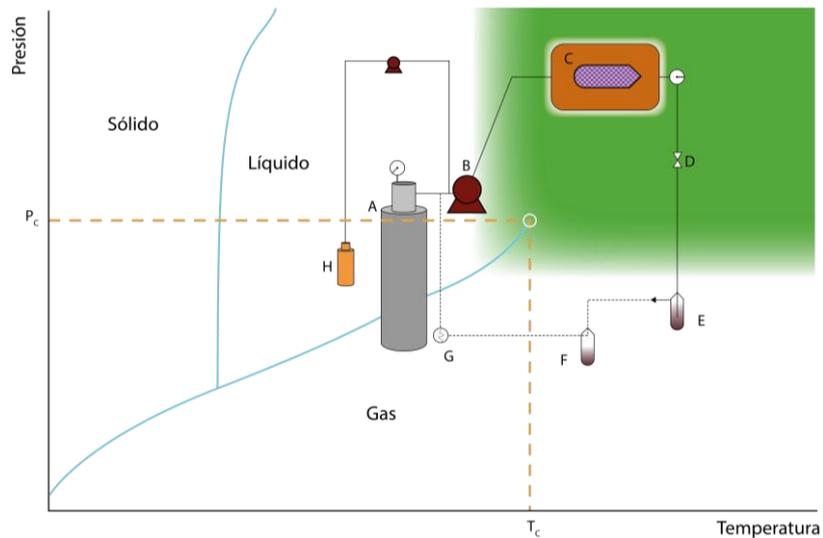


Figura 26: Esquema de un extractor de FSC

FUENTE: Adaptado de Ibáñez *et al.* 2016.

2.10.4. APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La SFE se ha aplicado a escala industrial en el fraccionamiento de compuestos de alto valor agregado como ésteres de ácidos grasos ω -3, antioxidantes como tocoferoles y tocotrienoles, vitaminas liposolubles (A y E), escaleno, pigmentos como carotenoides; también se ha utilizado en la extracción de aceites esenciales, producción de café descafeinado, té, cervezas y vinos sin alcohol, mejora del sabor de jugos y bebidas, producción de carne y papas fritas sin grasa, preparación y encapsulación de especias, purificación, entre otros (Brunner, citado por Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes (2015)). Asimismo, el CO_2 supercrítico se ha utilizado principalmente a escala industrial para reemplazar los solventes orgánicos tóxicos utilizados en la industria alimentaria (Erkey, 2011), razón por la cual ha adquirido una creciente importancia en los mercados internacionales, llevado a mejoras tecnológicas, principalmente en los sectores alimentario, farmacéutico e industria química (Veggi *et al.*, citados por Vasconcelos dos Santos y da Silva Lannes, 2015).

La SFE también se ha utilizado ampliamente para valorar los subproductos agrícolas y alimentarios generados como residuos durante la elaboración de alimentos. La generación de una gran variedad de residuos de subproductos durante las actividades industriales hace imprescindible encontrar nuevos usos para estos materiales con el fin de reducir su impacto ambiental. En este sentido, la SFE se ha desarrollado para recuperar productos de alto valor en los residuos de alimentos como tocoferoles, compuestos fenólicos, cafeína, aceites esenciales, carotenos como el β -caroteno, luteína, licopeno, entre otros (Ibáñez *et al.*, 2016).

2.10.5. FACTORES QUE AFECTAN LA SFE DE CAROTENOIDES

a. MATERIA PRIMA Y PRETRATAMIENTO

La naturaleza y propiedades de las materias primas vegetales o sus flujos de procesamiento (incluyendo la maduración, cultivar, variedad, condiciones edafoclimáticas) tienen un efecto sustancial en la extracción de carotenoides a partir de muestras sólidas. Se han reportado diferencias en la calidad en los extractos obtenidos por SFE debido al origen de las muestras, condiciones de almacenamiento y contenido de humedad de la materia prima durante la extracción de carotenoides (Machmudah *et al.*, 2015).

En muestras sólidas, el diámetro de partícula, forma y porosidad del material sólido son de importancia. Pequeñas partículas aumentan la velocidad de extracción, pero demasiado pequeñas pueden compactar el lecho aumentando la resistencia interna de transferencia de masa y causar canalización en el lecho de extracción, resultando en una disminución de la velocidad de extracción, por lo que en algunas ocasiones se utilizan agentes dispersantes, como la arena de mar PA, para evitar la obstrucción de la muestra o adsorber y/o retener los compuestos interferentes presentes en la matriz, como agua o lípidos (Ibáñez *et al.*, 2016).

b. SOLUBILIDAD, TEMPERATURA Y PRESIÓN

Una de las principales ventajas de la utilización de los FSC es la posibilidad de ajuste de la solubilidad, que es dependiente de relación presión-temperatura, y por tanto, de la densidad. La solubilidad de la mayoría de los componentes en los FSC aumentan con el aumento de densidad, lo que se logra incrementando la presión de extracción (Ibáñez *et al.*, 2016).

Con el aumento de la temperatura a presión constante existe una mejora en la transferencia de masa y en el rendimiento de extracción. Además, provoca una reducción en la densidad del solvente, y aumento de la presión de vapor de los compuestos extraíbles pudiendo pasar fácilmente a la región supercrítica, incrementando el rendimiento total de extracción (Machmudah *et al.*, 2015). Sin embargo, a una mayor temperatura de extracción se ha reportado que el licopeno sufre degradación e isomerización (Shi *et al.*, 2010).

Los aumentos de presión a temperatura constante alteran la solubilidad del soluto y la presión de vapor del soluto disminuye (Machmudah *et al.*, 2015). Dependiendo de la presión de trabajo, se observan diferentes efectos: cerca de la presión crítica, la densidad del fluido es

el efecto predominante, y un aumento moderado de la temperatura conduce a una importante disminución de la densidad y solubilidad del soluto; mientras que a altas presiones, la presión de vapor es el efecto predominante, por lo que la solubilidad aumenta con la temperatura (Ibáñez *et al.*, 2016). Un exceso de presión puede aumentar la compacidad de la matriz de la muestra, reduciendo el tamaño de los poros y, aparentemente, el transporte de masa que con el tiempo disminuye el rendimiento (Tonthubthimthong *et al.*, citados por Shi *et al.*, 2010).

c. MODIFICADORES Y COSOLVENTES

Los carotenoides presentan una solubilidad baja a moderada con el CO₂ supercrítico, dependiendo de su peso molecular y número de enlaces polares (Reverchon y De Marco, citados por Machmudah *et al.*, 2015). Por lo que, la adición de modificadores o cosolventes puede mejorar la extracción, teniendo como regla general que la cantidad utilizada de cosolvente sea menor del 10 a 15 por ciento (Ibáñez *et al.*, 2016) en relación al CO₂.

Los cosolventes interactúan fuertemente con los analitos (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y otras interacciones) resultando en una mejora significativa de los rendimientos de extracción, siendo los más usados el etanol y metanol, los cuales son incorporados al proceso de extracción mezclándose con el flujo de CO₂ (Machmudah *et al.*, 2015). Asimismo, en la extracción de carotenos se han utilizado modificadores químicos (agua, etanol, cloruro de metileno y hexano) para mejorar el proceso de extracción, los cuales son similares a los cosolventes, pero estos se añaden directamente a la muestra antes de la extracción (Rozzi *et al.*, 2002). Se ha reportado el uso de aceites de semilla de almendra, maní, avellana y girasol como modificadores en la SFE de licopeno de tomates secos (Vasapollo *et al.*, 2004).

d. TIEMPO DE EXTRACCIÓN

El tiempo de extracción es el tiempo total en que se lleva a cabo la extracción supercrítica desde que se alcanzan las condiciones establecidas. Es un parámetro importante que debe optimizarse para garantizar una extracción completa de los carotenoides y maximizar los rendimientos, depende del tipo de material, concentraciones de soluto en la matriz, flujo de CO₂ y las condiciones de operación (Machmudah *et al.*, 2015). La duración e intensidad del tratamiento térmico se correlacionan directamente con el grado de isomerización y la degradación de los compuestos específicos, por lo que para minimizar el efecto de degradación, es aconsejable reducir el tiempo de extracción tanto como sea posible.

Asimismo, optimizar las condiciones de extracción hacia el tiempo de extracción más corto posible con la máxima recuperación de la extracción es ideal desde el punto de vista de la calidad del extracto y del costo de procesamiento (Shi *et al.*, 2010).

e. CAUDAL DE CO₂

El proceso de transferencia de masa está controlado por el equilibrio entre la fase sólida y la fase fluida. Al aumentar el caudal, se reduce el espesor de la capa de película alrededor de las partículas sólidas, la resistencia a la transferencia de masa que rodea a la partícula se vuelve pequeña lo que conduce a un aumento en el rendimiento de extracción (Machmudah *et al.*, 2015). El caudal afecta en gran medida a la solubilidad de los componentes extraídos en el fluido y al equilibrio de difusión entre el solvente y los componentes extraídos. Si la concentración de los componentes extraídos es mucho mayor que el solvente, la solubilidad de los componentes extraídos en el solvente podría ser limitada y ralentizar el proceso de extracción, por lo que la optimización del caudal es importante para el tiempo de extracción y la rentabilidad (Shi *et al.*, 2010).

2.11. VIDA ÚTIL EN ALIMENTOS

La vida útil se define como el tiempo, en condiciones de almacenamiento definidas, durante el cual los alimentos permanecen seguros, conservan las características sensoriales, químicas, físicas y biológicas deseadas, y cumplen con cualquier declaración de etiqueta (Lanzocco *et al.*, 2010). También puede ser definida como un tiempo finito después de la producción (en algunos casos después de la maduración o envejecimiento) y el envasado, durante el cual el producto alimenticio conserva un nivel de calidad requerido bajo condiciones de almacenamiento bien definidas, lo que permite que el producto sea aceptable para el consumo (Figura 27) (Nicoli, 2012).

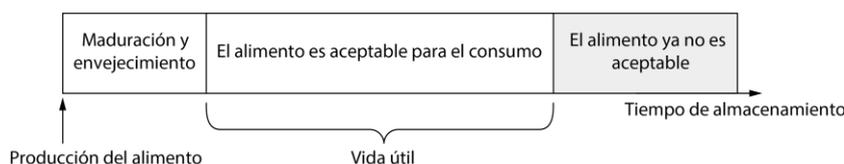


Figura 27: Etapas de la vida de un producto alimenticio.

FUENTE: Adaptado de Nicoli 2012.

Cualquier producto alimenticio debe tener un nivel de calidad definido, el cual discrimina productos que sean aún aceptables para el consumo de aquellos que ya no lo son. Este nivel

de calidad se define generalmente como el límite de aceptabilidad, el tiempo necesario para alcanzar el nivel de calidad correspondiente al límite de aceptabilidad es la vida útil, es decir, la vida útil primaria. El término vida útil secundaria se define como el período después de la apertura del envase durante el cual un producto alimenticio mantiene un nivel de calidad aceptable (Figura 28) (Nicoli, 2012).

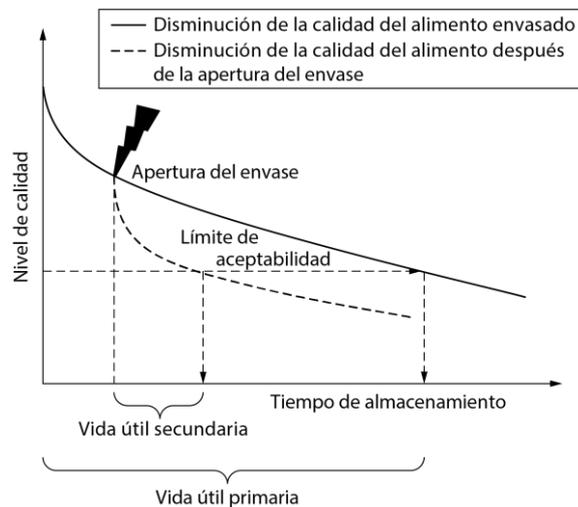


Figura 28: Variación de la calidad de los alimentos durante el almacenamiento.

FUENTE: Adaptado de Nicoli 2012.

Para conocer la vida útil esperada de un alimento, se deben comprender las reacciones microbiológicas, enzimáticas y fisicoquímicas que se producen simultáneamente en un alimento determinado, identificar los mecanismos responsables del deterioro o la pérdida de características deseables, como textura, sabor, olor o nutrientes, e implementar modelos para estimar el período en que mantendrá un nivel aceptable de calidad alimentaria desde una perspectiva de seguridad y sensorial (Singh y Cadwallader, 2002).

2.11.1. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL

Un estudio de vida útil de los alimentos se articula en tres pasos fundamentales. De manera preliminar, se debe identificar el evento crítico más importante que lleva a la disminución de la calidad del producto, y un límite de aceptabilidad relevante. A continuación, es necesario evaluar los cambios en el indicador de calidad seleccionado como una función del tiempo en condiciones que imitan las condiciones esperadas de almacenamiento (en tiempo real) o en condiciones ambientales capaces de acelerar la disminución de la calidad (pruebas aceleradas de vida útil (ASLT)). Finalmente, los datos se modelan para obtener una estimación o predicción de la vida útil, respectivamente (Manzocco *et al.*, 2016).

La Figura 29 muestra las estrategias de evaluación de vida útil que pueden ser aplicados a aceites/grasas y alimentos a base a estos.

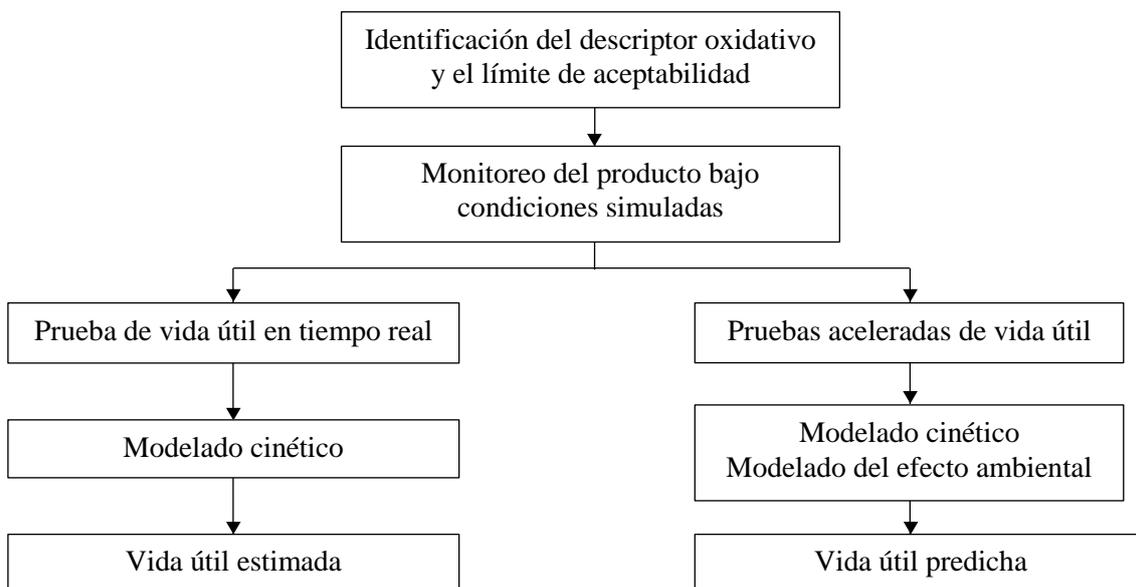


Figura 29: Pasos fundamentales en las estrategias de evaluación de la vida útil.

FUENTE: Adaptado de Manzocco *et al.* 2016.

El primer paso implica la identificación de índices oxidativos que sean fácilmente medibles y estén correlacionados con la percepción sensorial de la oxidación. Se pueden sugerir diferentes indicadores que permitan monitorear los productos de oxidación primarios y secundarios (Lanzocco *et al.*, 2010). El Cuadro 8 muestra diferentes pruebas de oxidación de lípidos clasificados según su utilidad para predecir la vida útil de un alimento.

Cuadro 8: Métodos para medir la oxidación de lípidos en estudios de vida útil

MÉTODO	SENSIBILIDAD	PRECISIÓN	INFORMACIÓN
Sensorial	Alta	Baja	Alta
Volátiles por GC	Alta	Baja	Alta
Absorción en UV	Alta	Alta	Baja
Carbonilos	Baja	Alta	Baja
Índice de p-anisidina	Baja	Alta	Baja
Índice de peróxido	Baja	Alta	Baja
Absorción de oxígeno	Baja	Alta	Baja
TBA	Baja	Alta	Baja
Blanqueamiento de caroteno	Alta	Baja	Baja
Ácidos volátiles (Rancimat)	Baja	Baja	Baja

FUENTE: Adaptado de Frankel 2005c.

Una vez identificado el indicador de oxidación apropiado, es necesario estimar el tiempo necesario para alcanzar un valor crítico. Este paso, generalmente definido como prueba de vida útil, implica el monitoreo continuo de los cambios del indicador oxidativo durante el almacenamiento de los alimentos bajo condiciones controladas (Lanzocco *et al.*, 2010). Los datos obtenidos se modelan para obtener los parámetros que describen/predicen la cinética de oxidación (Manzocco *et al.*, 2016).

El límite de aceptabilidad es definido como el nivel de calidad que discrimina a los productos que aún son aceptables para el consumo de los que no lo son (Lanzocco *et al.*, 2010). El Cuadro 9 presenta algunos criterios para definir el límite de aceptabilidad en alimentos que experimentan reacciones de oxidación.

Cuadro 9: Criterios para definir los límites de aceptabilidad en alimentos que experimentan reacciones oxidativas

FIN DE LA VIDA DEL PRODUCTO	NATURALEZA DEL LÍMITE DE ACEPTABILIDAD	SUJETO QUE DECIDE EL LÍMITE DE ACEPTABILIDAD	LÍMITE DE ACEPTABILIDAD
Requerimientos legales	Obligatorio	Autoridad	Valor indicado por la regulación actual
Declarado en la etiqueta	Obligatorio	Productor	Concentración de nutrientes declarados por el productor
Estándares de la empresa	Voluntario	Productor	Nivel de oxidación considerado crítico para la comercialización del producto
Rechazo excesivo de los consumidores	Voluntario	Productor	Nivel de oxidación correspondiente a un determinado porcentaje de consumidores que rechazan o no compran el producto

FUENTE: Adaptado de Lanzocco *et al.* 2010.

Al abordar la definición del límite de aceptabilidad para la evaluación de la vida útil de los alimentos no deberían considerarse los valores límite para el consumo seguro de alimentos indicado por los organismos reguladores. Durante el almacenamiento, cualquier producto que supere los valores límites de seguridad informados por la regulación ha llegado al final

de su "vida segura". En la Figura 30 se muestran dos períodos durante el almacenamiento de un alimento perecedero: un período durante el cual el producto es seguro; y un período donde no lo es. Sería un error considerar el límite que discrimina la condición segura de la no segura como límite de aceptabilidad. La vida útil es un problema de calidad no relacionado con la seguridad, por lo que es un período incluido en el tiempo de seguridad en el cual el producto conserva características de calidad aceptables. La vida útil del producto debe terminar ampliamente antes de que surja cualquier riesgo para la salud del consumidor, siendo la vida útil mucho más corta que la vida segura en los alimentos (Manzocco *et al.*, 2012).

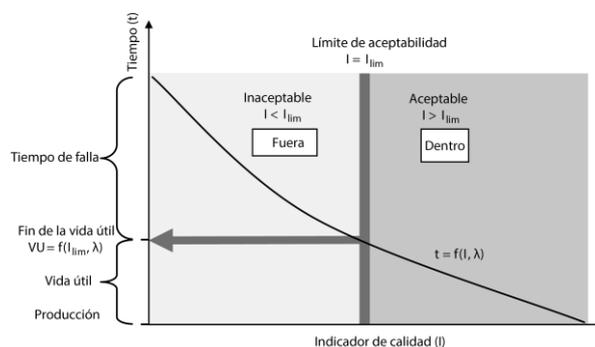


Figura 30: Vida útil dentro de la vida segura de los alimentos.

FUENTE: Adaptado de Manzocco *et al.* 2012.

El estudio de vida útil en tiempo real se basa en la medida directa de la vida útil en condiciones de almacenamiento que simula los que realmente experimenta el producto, se puede usar fácilmente cuando el deterioro de la calidad ocurre en tiempos bastante cortos (alimentos perecederos); mientras que la predicción de la vida útil a largo plazo se obtiene tradicionalmente acelerando los experimentos de vida útil mediante condiciones capaces de acelerar el deterioro de la calidad (pruebas aceleradas) (Lanzocco *et al.*, 2010).

2.11.2. PRUEBAS ACELERADAS EN EL ESTUDIO DE VIDA ÚTIL

La oxidación en un alimento a menudo procede muy lenta en condiciones reales de almacenamiento, por lo que es conveniente acelerar las pruebas de vida útil analizando los alimentos en condiciones que aceleren el deterioro de calidad y extrapolando los resultados a condiciones que usualmente experimenta el producto, este tipo de pruebas son referidas como pruebas aceleradas. En estas pruebas, la velocidad de oxidación varía en función del factor de aceleración, mientras que otras variables se mantienen constantes; existe un modelo cinético/descriptivo preciso para la oxidación durante el almacenamiento; y la relación entre el factor de aceleración y la velocidad de oxidación es conocida (Lanzocco *et al.*, 2010).

En el caso de las reacciones oxidativas, la temperatura es el factor de aceleración más utilizado debido a su papel crítico en la cinética de oxidación, y la disponibilidad de una ecuación teórica que describe la sensibilidad de la temperatura a las velocidades de reacción (Manzocco *et al.*, 2016). Sin embargo, factores como la concentración de oxígeno, humedad, pro-oxidantes y luz también han sido utilizados (Frankel, citado por Lanzocco *et al.*, 2010).

a. MODELO CINÉTICO DE ATRIBUTOS DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

La velocidad de las reacciones químicas es factor importante para evaluar los cambios en la calidad de los alimentos y la vida útil. La cinética química implica el estudio de la velocidad y mecanismos por los cuales una especie química se convierte en otra. Se caracteriza por la constante de velocidad (k) y el orden de la reacción (n). La velocidad de una reacción química o el deterioro de un indicador de calidad, se define como el cambio de concentración de un reactivo (o factor de calidad) (C) en un tiempo dado (t) (Kong y Singh, 2016):

$$-\frac{dC}{dt} = kC^n$$

Conforme a los principios cinéticos, la velocidad de cambio de un indicador oxidativo (I_{ox}) puede calcularse integrando la ecuación general de cinética (Lanzocco *et al.*, 2010):

$$\int_{I_{ox_0}}^{I_{ox}} \frac{dI_{ox}}{I_{ox}^n} = \pm \int_0^t k dt$$

La ley de velocidad general puede integrarse para obtener las ecuaciones del orden pseudo cero, uno, dos o n (Cuadro 10). En los estudios cinéticos experimentales, los valores de I_{ox} , $\ln(I_{ox})$, $1/I_{ox}$, $1/I_{ox(n-1)}$ se representan en función del tiempo para estimar la constante de velocidad de reacción (k) mediante análisis de regresión lineal. Al resolver las formas integradas como una función del tiempo, se puede calcular la vida útil en las condiciones reales de almacenamiento, según la siguiente ecuación (Lanzocco *et al.*, 2010):

$$Vida\ útil = \frac{\int_{I_{ox_0}}^{I_{ox}} \frac{dI_{ox}}{I_{ox}^n}}{\pm k}$$

donde I_{ox_0} es el valor del indicador de calidad de los alimentos inicial, I_{ox} es el valor del indicador de calidad correspondiente al límite de aceptabilidad.

Cuadro 10: Ecuaciones de cinética de reacción

ORDEN DE REACCIÓN	ECUACIÓN INTEGRADA	ECUACIÓN DE VIDA ÚTIL
n = 0	$I_{ox} = \pm kt + I_{ox_0}$	$SL = \frac{I_{ox} - I_{ox_0}}{\pm k}$
n = 1	$\ln(I_{ox}) = \pm kt + \ln(I_{ox_0})$	$SL = \frac{\ln(I_{ox}) - \ln(I_{ox_0})}{\pm k}$
n = 2	$\frac{1}{I_{ox}} = \pm kt + \frac{1}{I_{ox_0}}$	$SL = \frac{\frac{1}{I_{ox}} - \frac{1}{I_{ox_0}}}{\pm k}$
n ≠ 1	$\frac{1}{I_{ox}^{n-1}} - \frac{1}{I_{ox_0}^{n-1}} = \pm(n-1)kt$	$SL = \frac{\frac{1}{I_{ox}^{n-1}} - \frac{1}{I_{ox_0}^{n-1}}}{\pm k}$

FUENTE: Adaptado de Lanzocco *et al.* 2010.

En las reacciones de orden cero la tasa de pérdida del factor de calidad es constante, un ejemplo es la formación de color marrón en los alimentos como resultado de la reacción de Maillard. Las reacciones de primer orden se informan con frecuencia e incluyen la oxidación de lípidos, crecimiento microbiano, pérdida de vitaminas en alimentos secos y pérdida de calidad de proteína. Las reacciones de segundo orden son relativamente menos comunes, los ejemplos reportados incluyen cambios de aminoácidos implicados en la reacción de Maillard y la descomposición de la tiamina durante el calentamiento (Kong y Singh, 2016).

Debido a que las reacciones de oxidación son muy complejas y existe una gran cantidad de factores que pueden afectar la velocidad de reacción, la cinética de cualquier indicador de oxidación frente al tiempo puede ser el resultado de diferentes reacciones que se producen simultáneamente o consecutivamente, razón por la que el orden de reacción no da ninguna indicación sobre los verdaderos mecanismos de reacción implicados, por lo que k se considera como una constante de velocidad "aparente" (Lanzocco *et al.*, 2010).

b. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL MODELO DE ARRHENIUS

El amplio uso de la temperatura como factor de aceleración de las reacciones de oxidación en las pruebas aceleradas se debe a que es uno de los factores más críticos para muchos productos, y a la disponibilidad de una base teórica para el desarrollo de una descripción matemática de la sensibilidad de las velocidades de reacción a la temperatura (Lanzocco *et al.*, 2010). El aumento en la temperatura de almacenamiento acelerará muchas reacciones de deterioro de calidad en los alimentos, y la relación entre la constante de velocidad de reacción

y la temperatura puede describirse mediante la ecuación de Arrhenius (Kong y Singh, 2016). La ecuación de Arrhenius fue desarrollada sobre la base molecular de reacciones químicas reversibles, ha demostrado empíricamente una amplia gama de fenómenos químicos y físicos complejos que ocurren en los alimentos (Labuza y Riboh, citados por Lanzocco *et al.*, 2010).

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

donde k es la constante de velocidad de reacción; R es la constante universal de los gases ideales (8.31 J/mol K), T es la temperatura absoluta (K); E_a es la energía de activación (J/mol) y k_0 es el factor pre-exponencial. La posibilidad de aplicar la ecuación de Arrhenius para describir la dependencia de la temperatura de las constantes de velocidad de oxidación puede evaluarse graficando el $\ln(k)$ como una función de la inversa de la temperatura, observándose una relación lineal entre estas variables cuando el comportamiento de Arrhenius se ha completado (Lanzocco *et al.*, 2010). Por lo que, la vida útil de un producto puede predecirse a una temperatura deseada mediante la medición de las constantes de velocidad de oxidación en al menos tres temperaturas diferentes, y extrapolando la constante de velocidad de reacción a la temperatura deseada (Figura 31) (Manzocco *et al.*, 2016).

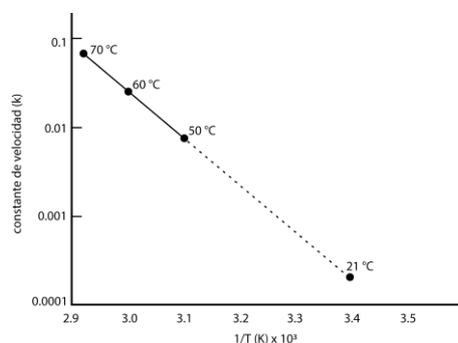


Figura 31: Gráfica del modelo de Arrhenius para predecir la vida útil.

FUENTE: Adaptado de Frankel 2005c.

La aplicación exitosa del modelo de Arrhenius es debido a que los alimentos pueden resistir el aumento de la temperatura sin provocar un desarrollo dramático de fenómenos distintos a las reacciones oxidativas responsables de la inacceptabilidad del producto a las temperaturas de almacenamiento habituales (Lanzocco *et al.*, 2010). Se ha utilizado con éxito para estimar la dependencia de la temperatura a la tasa de oxidación de aceites/grasas y alimentos a base de estos (Manzocco *et al.*, 2016). Sin embargo, existen situaciones en las que el efecto de la temperatura sobre la pérdida de calidad de los alimentos no sigue este comportamiento, las cuales a menudo implican un cambio de fase, como fusión de las grasas, cristalización de

carbohidratos y desnaturalización de las proteínas. Estos cambios aumentan o disminuyen la movilización de los reactivos, lo que complica el efecto de la temperatura, por lo que es importante probar la validez de la ecuación de Arrhenius siempre que se use para modelar el efecto de la temperatura, siendo particularmente importante cuando se utiliza el resultado de pruebas aceleradas para estimar las características de deterioro en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (Mizrahi, citado por Kong y Singh, 2016).

La Figura 32 muestra las posibles desviaciones del comportamiento de Arrhenius. La situación representada en la Figura 32a describe una desviación positiva del comportamiento de Arrhenius, la cual es particularmente peligrosa ya que puede causar una sobreestimación de la velocidad de reacción a la temperatura de almacenamiento real del producto. Por el contrario, la Figura 32b muestra un ejemplo de una desviación negativa de la ecuación de Arrhenius, en este caso existe una subestimación de la velocidad de reacción en las condiciones reales de almacenamiento (Calligaris *et al.*, 2012). La desviación de la linealidad de las ecuaciones de Arrhenius puede detectarse no solo en condiciones de almacenamiento acelerado sino también cerca de la temperatura de almacenamiento real, por lo que la extrapolación de las velocidades de oxidación a las temperaturas de almacenamiento habituales deben realizarse únicamente dentro del rango de temperatura comprobado experimentalmente conforme al modelo de Arrhenius. Asimismo, la ecuación de Arrhenius ha sido modificada para las diferentes circunstancias específicas de los producto en estudio (Lanzocco *et al.*, 2010).

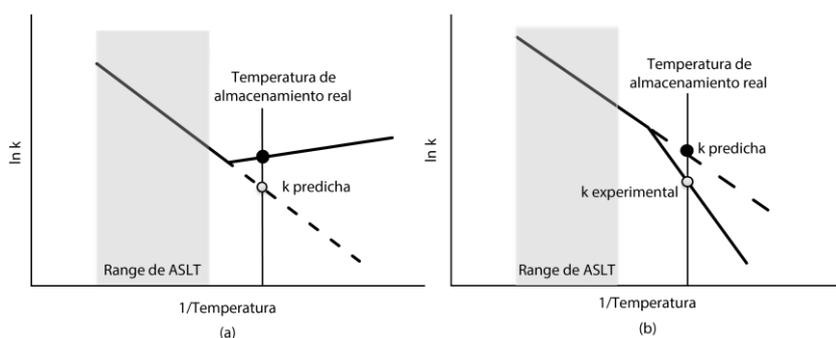


Figura 32: Posibles desviaciones en la gráfica de Arrhenius.

FUENTE: Adaptado de Calligaris *et al.* 2012.

Una forma alternativa de expresar la dependencia de la temperatura es usar el concepto de Q_{10} , el cual relaciona las constantes de velocidad de reacción a temperaturas que difieren en 10 °C. Indica qué tan rápido ocurrirá una reacción si la temperatura se eleva en 10 °C, por lo que puede usarse para predecir la vida útil de un producto (Kong y Singh, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en el laboratorio de Físicoquímica del Instituto Tecnológico de la Producción y el laboratorio de Biotecnología de la facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Asimismo, se recibió el apoyo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Universidad Nacional del Santa y la Universidad de Milán (L'Università degli Studi di Milano) de Italia.

3.2. MATERIA PRIMA

- Linaza variedad marrón procedente del departamento de Ayacucho (Perú).
- Tomate orgánico variedad Perseo procedente del huerto de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.3.1. MATERIALES

- Bagueta
- Balón de vidrio de 125 mL
- Balón para evaporador rotatorio de 100 y 500 mL
- Bandeja metálica
- Bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD)
- Bolsas para sellado al vacío
- Botellas ámbar de 100 y 250 mL
- Celda de vidrio de 10 mm
- Celda de cuarzo de 10 mm
- Chupón de jefe para pipetas Pasteur de vidrio
- Columna AcclaimTM C₃₀ 3 μ m (4.6 x 150 mm)

- Columna Alltima Si 5 μm (7.5 mm x 4.6 mm)
- Columna de protección Alltima SI 5 μm (250 mm x 4.6 mm)
- Columna Supelcowax 10 de sílice fundida (30 m de longitud, 0.25 μm de espesor y 0.25 mm de diámetro interno)
- Crisol
- Cucharilla espátula de metal
- Dedal de celulosa
- Desecador
- Embudo de vidrio
- Encapsulador de viales
- Filtro de membrana de PTFE de 0.22 μm y 13 mm de diámetro
- Filtro de membrana PTFE de 0.45 μm y 13 mm de diámetro
- Fiolas de 10, 25 y 100 mL
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes de nitrilo
- Jeringa de 5 mL
- Mascarilla de gases con filtro (6003, 3M)
- Matraz de Erlenmeyer de 125 y 250 mL
- Matraz de Erlenmeyer esmerilado de 250 mL
- Microbureta de 5 mL
- Microtubo Eppendorf de 2 mL
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel libre de nitrógeno
- Parafilm
- Pera de decantación de 50 mL
- Perlas de vidrio
- Pesafiltro (50/8, 30 mL)
- Pinza de crisol
- Pipetas pasteur de plástico de 3 mL
- Pipetas pasteur de vidrio de vástago largo
- Piseta

- Placa Petri de vidrio
- Probeta de 10, 50 y 100 mL
- Refrigerante en serpentín
- Sensor de temperatura tipo T
- Soporte universal
- Tamiz de laboratorio de 25 mesh
- Tips de 100, 1000 y 5000 mL
- Tubo de vidrio graduado de 10 mL para centrífuga
- Tubos de ensayo ámbar de 15 mL con tapa rosca
- Tubos de ensayo de vidrio de 10 mL
- Vasos de precipitado de 10, 50 y 100 mL
- Vial ámbar de 1.5 mL

3.3.2. REACTIVOS

- 2,6-Di-terc-butyl-4-metilfenol (BHT) (Merck, Alemania)
- Acetato de etilo, PA (Merck, Alemania)
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico 98.1 % (Trolox), HPLC (Merck, Alemania)
- Ácido acético glacial, ACS (Merck, Alemania)
- Ácido clorhídrico 36.5 - 38 %, ACS (J.T. Backer, USA)
- Ácido gálico monohidratado ≥ 98.0 %, ACS (Sigma-Aldrich, USA)
- Ácido sulfúrico 95 - 98 %, PA (Scharlau, Alemania)
- Agua destilada Q.P. (Palacio de aguas, Perú)
- Alcohol isopropílico, HPLC (Fisher Scientific, USA)
- Almidón (para yodometría), PA (Fermont, México)
- Argón Ultra puro (Indura, Perú)
- Azul de metilo, Baker Analyzed (J.T. Backer, USA)
- Carbonato de sodio, ACS (J.T. Backer, USA)
- Celite 545 (Wako, Japón)
- Cloroformo, PA (Merck, Alemania)
- Cloruro de sodio, ACS (Merck, Alemania)
- Dióxido de Carbono Ultra puro (Indura, Perú)

- Estándar de licopeno ≥ 90 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Estándar de α -Tocoferol ≥ 98 % (Extrasynthese, Francia)
- Estándar de β -Tocoferol ≥ 98 % (Extrasynthese, Francia)
- Estándar de γ -Tocoferol ≥ 98 % (Extrasynthese, Francia)
- Estándar de δ -Tocoferol ≥ 98 % (Extrasynthese, Francia)
- Etanol absoluto, PA (Merck, Alemania)
- Éter de petróleo (35 - 60 °C), ACS (Tedia, USA)
- Fenoltaleína, ACS (Merck, Alemania)
- Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA)
- Hexano, ACS (Fermont, México)
- Hidrógeno de alta pureza (Indura, Perú)
- Hidróxido de potasio, pellets para análisis (Scharlau, Alemania)
- Hidróxido de sodio, pellets para análisis (Merck, Alemania)
- Isooctano, Espectroscopía (Merck, Alemania)
- Metanol, HPLC (Tedia, USA)
- Metil tert-butil éter, PA (Merck, Alemania)
- Mix de ésteres metílicos de ácidos grasos C₄-C₂₄ (Sigma-Aldrich, USA)
- Nitrógeno Ultra puro (Indura, Perú)
- p-Anisidina (Sigma-Aldrich, USA)
- Persulfato de potasio, PA (Merck, Alemania)
- Pirogalol, HPLC (Sigma-Aldrich, USA)
- Rojo de metilo, ACS (J.T. Backer, USA)
- Sal diamónica 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sufónico) ≥ 98 % (ABTS), HPLC (Sigma-Aldrich, USA)
- Sulfato de cobre (II), PA (Merck, Alemania)
- Sulfato de sodio, ACS (Merck, Alemania)
- Tiosulfato de sodio pentahidratado, PA (Merck, Alemania)
- Yoduro de potasio, PA (Merck, Alemania)

3.3.3. EQUIPOS

- Agitador vórtex plano (M16700, Barnstead International, USA)
- Balanza analítica (DV214CD, Ohaus, USA)

- Balanza de plataforma (AFM, Sores, Perú)
- Balanza de precisión (GF-6100, AND, Japón)
- Baño de agua (VW10, Memmert, Alemania)
- Bomba cosolvente (2776 0000, Top Industrie, Francia)
- Bureta digital de 50 mL (Titrette, Brand, Alemania)
- Campana extractora (ChemGARD FH5, The Baker Company, USA)
- Centrífuga (Centra CL2, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chiller (ProfiCool Primus PCPR 013, Lab, Alemania)
- Colorímetro (CR-400, Konica Minolta, Japón)
- Congeladora vertical (CS-20, Torrey, Perú)
- Cromatógrafo de gases (Autosystem XL, Perkin Elmer, USA)
- Destilador por arrastre de vapor (Vapodest 10S, Gerhardt, Alemania)
- Digestor Kjeldahl (Kjeldatherm KB20S, Gerhardt, Alemania)
- Dispensador de 2.5 - 25 mL (Dispensette III Digital, Brand, Alemania)
- Equipo multisolvente (2802.0000, Top Industrie, Francia)
- Espectrofotómetro UV/VIS (Lambda 650, Perkin Elmer, USA)
- Estufa de convección natural (ED 115, Binder, Alemania)
- Estufa de vacío (Vacucell 22, MMM, Alemania)
- Evaporador rotatorio (Laborota 4003, Heidolph, Alemania)
- Hormilla de plancha (KI 8/16, Gerhardt, Alemania)
- Incubadora múltiple (Japón)
- Micropipeta regulable de 10 a 100 μ L y 100 a 1000 mL (Transferpette, Brand, Alemania)
- Micropipeta regulable de 500 a 5000 mL (Labopette, Hirschmann, Alemania)
- Molino analítico (A 11 Basic, IKA, USA)
- Mufla (F48000, Barnstead International, USA)
- Prensa expeller Komet (CA 59 G, IBG Monforts Oekotec, Alemania)
- Rancimat (743, Metrohm, Suiza)
- Refractómetro de ABBE (Modell I, aus Jena, Alemania)
- Refrigeradora (NR-BT48, Panasonic, Japón)
- Secador de bandejas (Perú)
- Sellador de bolsas (SF-300S, Samwin, Perú)

- Selladora al vacío (C200, Multivac, Alemania)
- Sistema de agua ultrapura (D11911, Barnstead International, USA)
- Sistema HPLC (1200 Infinity Series, Agilent, USA)
- Soxtherm (416, Gerhardt, Alemania)
- Termómetro digital (HI 93552R, Hanna Instruments, España)

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

a. HUMEDAD

Para las muestras de linaza y el tomate seco en polvo la determinación de humedad se realizó en estufa según el método y las recomendaciones descritas por la FAO (1986) con algunas modificaciones. La muestra de linaza fue molida en un molino analítico previo al análisis, y el tomate seco en polvo fue usado directamente.

Se pesaron entre 3 a 4 g de las muestras dentro de los pesafiltros y fueron expandidos uniformemente. Los pesafiltros fueron colocados en una estufa a 101 ± 1 °C, en donde las muestras fueron secadas hasta peso constante. Posteriormente, se retiraron los pesafiltros con las muestras de la estufa y fueron colocados en un desecador donde se enfriaron a temperatura ambiente (aproximadamente por 30 min) y finalmente, fueron pesados.

Para la muestra de aceite se siguió la metodología AOCS Ca 2d-25 (AOCS, 1998). Utilizando una pipeta pasteur de plástico se pesó 5 g de aceite en un pesafiltro. El pesafiltro se colocó en una estufa de vacío a una temperatura de 20 a 25 °C por encima del punto de ebullición del agua a la presión de trabajo, la cual fue menor a 100 mm de mercurio. Posteriormente se retiró el pesafiltro con la muestra y se enfrió a temperatura ambiente en un desecador por 30 min, pasado el tiempo se pesó el pesafiltro con la muestra. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar el peso constante, el cual se alcanza cuando la pérdida de peso es menor al 0.05 por ciento en períodos sucesivos de secado de una hora.

Para ambos casos el porcentaje de humedad fue calculado con la siguiente fórmula:

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

Donde:

A: Peso de la muestra (g)

B: Peso del pesafiltro más la muestra antes del secado (g)

C: Peso del pesafiltro más la muestra después del secado (g)

b. PROTEÍNA BRUTA

Se realizó según el método Kjeldahl descrito por la FAO (1986) con algunas modificaciones. La muestra de linaza fue molida en un molino analítico previo al análisis, y el tomate seco en polvo fue usado directamente.

Para la etapa de digestión se pesó 1 g de muestra con precisión de 0.1 mg en papel libre de nitrógeno, se colocó en un tubo digestor, se agregó 5 g de catalizador (sulfato de cobre:sulfato de sodio 1:9) y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se digestó la muestra a una temperatura de 200 °C por una hora y después a 400 °C por dos horas en un digestor (Kjeldatherm) hasta que la solución se encontró de un color verde claro. Se dejó enfriar, se transfirió a una fiola de 100 mL y se enrazó con agua destilada.

Para la etapa de destilación se llevó el tubo digestor al destilador (Vapodest), en el cual se colocó un matraz de 125 mL que contenía 5 mL de ácido sulfúrico 0.1 N y 6 gotas de indicador Tashiro (1 g de rojo de metilo, 0.25 g de azul de metileno en 1 L de etanol). Se digestó por 5 min, recuperando por lo menos 50 mL de solución en el matraz.

Para la etapa de titulación, el ácido sulfúrico remanente en el matraz de destilado se tituló con NaOH 0.02 N hasta viraje incoloro. Se realizó un blanco que contenía ácido sulfúrico, catalizador y papel libre de nitrógeno. Finalmente, se anotaron los gastos de la titulación y el porcentaje de proteínas fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \frac{(B - S) \times N \times F \times 0.014 \times 20}{M} \times 100 \times Fc$$

Donde:

B: Gasto (mL) de solución de hidróxido de sodio usado para el blanco

S: Gasto (mL) de solución de hidróxido de sodio usado para la muestra

N: Normalidad de NaOH

F: Factor de NaOH

0.014: meq-g de nitrógeno

20: Factor de dilución (5 mL de muestra digerida llevado a 100 mL)

M: Peso de la muestra (g)

Fc: Factor de conversión de proteínas

Los factores de conversión de proteínas utilizados fueron 6.25 para la muestra de tomate seco en polvo y 5.30 para la linaza (FAO, 1986).

c. GRASA BRUTA

Se realizó según el método descrito por la FAO (1986) con algunas modificaciones. La muestra de linaza fue molida en un molino analítico previo al análisis, y el tomate seco en polvo fue usado directamente.

Se pesó entre 3 a 4 g de las muestras en un balón de vidrio de 125 mL. Se agregó perlas de vidrio al balón y se realizó la digestión en una hormilla de plancha con 20 mL de ácido clorhídrico 6 N por 30 min con reflujo. Posteriormente, se agregó 1 g de celite, se agitó el balón y se filtró la muestra lavando con agua desionizada, quedando en el papel filtro toda la materia no polar. El papel filtro con la materia no polar se colocó en una placa Petri, se secó por 1 h en una estufa a 101 °C, y se llevó a un desecador.

Las muestras en el papel filtro se colocaron en dedales de celulosa y posteriormente en los frascos del equipo Soxtherm. La muestra es sumergida en hexano y hierve por 1 h 30 min, para luego comenzar a lavar la muestra y evaporar el solvente por 4 h. Una vez terminado este tiempo se eliminó el solvente residual con nitrógeno y se colocó en un desecador.

Finalmente, se pesó el frasco del equipo Soxtherm y el porcentaje de grasa fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Grasa bruta (\%)} = \frac{(W_2 - W_1)}{S} \times 100$$

Donde:

W₁: Peso del frasco vacío (g)

W₂: Peso del frasco más el contenido graso después del secado (g)

S: Peso de la muestra (g)

d. CENIZAS TOTALES

Se realizó según el método descrito por la FAO (1986) con algunas modificaciones. La muestra de linaza fue molida en un molino analítico previo al análisis, y el tomate deshidratado en polvo fue usado directamente.

Se pesó 5 g de muestra con aproximación de 0.1 mg en un crisol y se llevó a una hornilla de plancha dentro de una campana de extractora, se incrementó la temperatura gradualmente hasta que la muestra quede carbonizada (no desprenda vapor). Posteriormente, se colocó en un horno de mufla a una temperatura de 550 °C por 12 h. El crisol se colocó en un desecador hasta que se enfríe a temperatura ambiente y se pesó con una aproximación de 0.1 mg.

El porcentaje de cenizas totales fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas totales (\%)} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Donde:

m₀: Peso del crisol vacío (g)

m₁: Peso del crisol más la muestra (g)

m₂: Peso del crisol más las cenizas (g)

e. CARBOHIDRATOS

Se determinó por diferencia de 100 por ciento menos los resultados de los análisis de humedad, proteína bruta, grasa bruta y cenizas totales.

f. ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Se siguió la metodología AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1998) con algunas modificaciones. Se pesó 7.05 ± 0.05 g de aceite en un matraz de 250 mL. Se utilizó etanol caliente (95 por ciento) previamente neutralizado con 2 mL de fenolftaleína (1 por ciento) y suficiente NaOH 0.02 N hasta una ligera coloración rosa permanente. Se agregó 75 mL del etanol 95 por

ciento al matraz con la muestra de aceite, y finalmente, se tituló con NaOH 0.02 N hasta una ligera coloración rosa permanente.

El porcentaje de ácidos grasos libres expresado como porcentaje de ácido oleico fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Ácidos grasos libres (\% de Ácido oleico)} = \frac{V \times N \times F \times 28.2}{W}$$

Donde:

V: Volumen de NaOH gastado en la titulación (mL)

N: Normalidad de NaOH

F: Factor de NaOH

W: Peso de aceite (g)

g. ÍNDICE DE PERÓXIDO

Se siguió la metodología AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1998). Se pesó 5 ± 0.05 g de aceite en un matraz esmerilado de 250 mL. Se agregó 30 mL de la mezcla Ácido acético glacial:Cloroformo (3:2 v/v) y se agitó hasta disolver. Se agregó 500 μ L de solución saturada de KI (10 g de KI en 6 mL de agua destilada), se dejó en reposo en oscuridad por 1 min exacto e inmediatamente se adicionó 30 mL de agua destilada. Finalmente se agregó 2 mL de solución de almidón (1 por ciento) y procedió a titular con Tiosulfato de sodio 0.01 N agitando vigorosamente para liberar todo el yodo de la capa de cloroformo hasta que la fase superior quede incolora. Se preparó un blanco al que se siguió el mismo procedimiento, pero sin la muestra de aceite

El índice de peróxido fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de peróxido} \left(\frac{\text{m eq } O_2}{\text{kg de aceite}} \right) = \frac{S \times N \times F \times 1000}{W}$$

Donde:

S: Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado en la titulación (mL) y corregido con el blanco

N: Normalidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

F: Factor de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

W: Peso de aceite (g)

h. ÍNDICE DE P-ANISIDINA

Previo al análisis, el aceite se mezcló con sulfato de sodio y fue filtrado para eliminar trazas de agua que puedan interferir en el análisis según la ISO 3656 (ISO, 2016).

Se siguió la metodología IUPAC 2.504 (IUPAC, 1987). Se pesó entre 0.5 a 4 g de aceite con precisión de 1 mg en una fiola de 25 mL y se enrazó con isooctano grado espectrofotométrico. Se leyó la absorbancia de esta solución a 350 nm en celdas de cuarzo de 10 mm, teniendo como blanco del espectrofotómetro al isooctano. Se colocó 5 mL de esta solución en un tubo de ensayo y se añadió 1 mL de reactivo de p-anisidina (25 mg/10 mL de ácido acético glacial). Se preparó un tubo blanco con 5 mL de isooctano grado espectrofotométrico y 1 mL de reactivo p-anisidina. Todos los tubos fueron agitados en vortex y después de 10 min de reposo se leyeron las absorbancias a 350 nm en celdas de cuarzo de 10 mm.

El índice de p-anisidina fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de p - anisidina} = \frac{25 \times (1.2 \times A_s - A_b)}{m}$$

Donde:

A_s: Diferencia entre la absorbancia de la solución de aceite en isooctano (después de la reacción con el reactivo de p-anisidina) con la absorbancia del blanco de reacción

A_b: Absorbancia de la solución de aceite en isooctano

m: Peso de la muestra de aceite (g)

i. COEFICIENTES DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k₂₃₂ Y k₂₆₈)

Se siguió la metodología ISO 3656 (ISO, 2011). Se pesó 0.25 g de aceite con precisión de 1 mg en una fiola de 25 mL y se enrazó con isooctano grado espectrofotométrico. Se leyó la absorbancia de la solución a 232 y 268 nm en una celda de cuarzo de 10 mm, teniendo como blanco del equipo al isooctano grado espectrofotométrico.

Los coeficientes de extinción al ultravioleta fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$K_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{C \times s}$$

Donde:

A_λ: Absorbancia a la longitud de onda λ

C: Concentración de la solución de aceite (g/100 mL)

s: Espesor de la cubeta de cuarzo (1 cm)

j. COLOR

Se midió en el espacio de color CIELAB mediante el uso del colorímetro Minolta CR-400, previamente calibrado con una placa de calibración blanca. La muestra de aceite fue colocada en una celda de vidrio de 10 mm y se registraron las coordenadas L*, a* y b*.

k. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Se siguió la metodología AOAC 921.08 (AOAC, 2016), utilizando el refractómetro de ABBE. Se colocó gotas de aceite en el prisma del refractómetro, se dejó reposar 1 min para que la temperatura de la muestra sea la misma del instrumento y se leyó el índice de refracción por el ocular del refractómetro.

Se calculó el índice de refracción a 20 °C según la siguiente fórmula:

$$R = R' + K(T' - T)$$

Donde:

R: IR corregido a la temperatura deseada

R': IR a la temperatura medida

T: Temperatura deseada

T': Temperatura a la que fue medida el IR

K: 0.000385

l. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS

Para la extracción de las fases hidrofílicas y lipofílicas de los aceites se siguió la metodología descrita por Marfil Navarro (2008), para lo cual se pesó 2 g de la muestra de aceite dentro

de un tubo graduado de 10 mL para centrífuga. Se agregó 2 mL de hexano y se llevó a agitación en vortex hasta disolución completa. Se agregó 2 mL de MeOH 80 por ciento y se llevó a agitación en vortex. Se centrifugó a 2500 RPM (987 g) por 10 min. Finalmente, se anotó los volúmenes de las dos fases formadas, y se separó la fase metanólica (extracto hidrofílico situado en la parte inferior del tubo) de la fase hexánica (extracto lipofílico situado en la parte superior del tubo). Asimismo, para la capacidad antioxidante total, las muestras de aceites se diluyeron en hexano en proporción de 1:4, y el extracto de licopeno de tomate se diluyó en hexano en proporción de 1:200.

El ensayo de capacidad antioxidante por ABTS se realizó según la metodología descrita por Marfil Navarro (2008) con algunas modificaciones, para lo cual se preparó soluciones de ABTS 7 mM (38.4 mg de sal diamónica de ABTS en 10 mL de agua desionizada) y persulfato de potasio 2.45 mM (66.2 mg de $K_2S_2O_8$ en 100 mL de agua desionizada).

Se preparó el radical $ABTS^{*+}$ (10 mL de la solución de ABTS 7mM y 10 mL de Persulfato de potasio 2.45 mM). Esta mezcla se almacenó en oscuridad y a temperatura ambiente por 16 horas antes de su uso. Posteriormente, se diluyó la solución del radical $ABTS^{*+}$ con metanol, hasta una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm y 30 °C; la cual se obtuvo aproximadamente con 600 μ L de $ABTS^{*+}$ y 30 mL de metanol (Relación 1:50). Cuando la absorbancia estuvo por encima del valor indicado se diluyó con metanol; y en el caso contrario, cuando la absorbancia se encontraba por debajo del valor indicado, se agregó la solución de $ABTS^{*+}$, hasta obtener la absorbancia mencionada.

Para la reacción se prepararon tubos de ensayo de 10 mL forrados con papel aluminio, los cuales contenían 30 μ L de cada muestra con 3 mL de $ABTS^{*+}$ diluido. Se preparó un blanco el cual contenía 30 μ L de metanol en lugar de la muestra. Se leyó la absorbancia a 734 nm después de terminado el tiempo de reacción de cada muestra. Se empleó metanol como blanco del espectrofotómetro.

Se elaboró una curva de calibración con Trolox, para lo cual se preparó una solución madre de Trolox 4 mM (10 mg de Trolox en 10 mL de metanol), y a partir de esta se preparó concentraciones comprendidas entre 0.1 a 2.0 mM. Cada punto se preparó igual que las muestras, es decir 30 μ L de cada dilución y 3 mL de $ABTS^{*+}$ diluido. Se agitaron en un agitador vortex y posteriormente, se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente. La lectura de absorbancia a 734 nm se realizó al final del tiempo de reacción de las muestras.

Para determinar el tiempo de reacción de cada muestra se leyó cada 10 min la absorbancia de la muestra y el blanco de la reacción. Se detuvo las lecturas cuando se observó que la diferencia de absorbancias entre el blanco y la muestra era constante o no presentaban cambios significativos; siendo el último valor de absorbancia el empleado para el cálculo de la capacidad antioxidante.

La disminución de absorbancia debido a los antioxidantes de la muestra o diluciones de Trolox se calculó con la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{ Abs} = \text{Abs}_{\text{Blanco}} - \text{Abs}_{\text{Muestra}}$$

Donde:

$\Delta \text{ Abs}$: Diferencia de absorbancias.

Abs blanco: Absorbancia del ABTS⁺ diluido por el efecto del metanol después del tiempo de reacción.

Abs Muestra: Absorbancia del ABTS⁺ diluido por el efecto de la muestra o diluciones de Trolox después del tiempo de reacción.

La curva de calibración se elaboró con el valor de $\Delta \text{ Abs}$ de cada dilución de Trolox y sus respectivas concentraciones.

La capacidad antioxidante se calculó utilizando la curva de calibración de Trolox y los resultados fueron expresados como μmol de Trolox equivalente/g de muestra, según la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad antioxidante } (\mu \text{ mol TE/g}) = \frac{\text{mM TE} \times V \times \text{Fd}}{W}$$

Donde:

mM TE: Valor obtenido al reemplazar el $\Delta \text{ Abs}$ de la muestra en la ecuación de regresión de la curva de calibración de Trolox

V: Volumen de reacción (mL) (Volumen total de solvente y muestra)

Fd: Factor de dilución

W: Peso de la muestra (g)

m. POLIFENOLES TOTALES

Se determinó por el método de Folin-Ciocalteu mencionado por Marfil Navarro (2008) con algunas modificaciones. Se pesó 1.5 g de aceite en un tubo de ensayo, se agregó 2 mL de hexano y se llevó a agitación en un agitador vortex. Se trasvasó a una pera de decantación de 50 mL y se agregó un volumen total de 5 mL de metanol 60 por ciento fraccionado en partes de 1.5, 1.5 y 2 mL. Se recolectó la fase metanólica en una probeta de 10 mL para anotar el volumen recolectado.

Para la reacción se agregó a tubos de ensayo de 10 mL forrados con papel aluminio 50 μ L de las muestras, 250 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu, y se dejó en reposo por 5 min en oscuridad. Pasado el tiempo se adicionó 1 mL de carbonato de sodio al 20 por ciento y 3.7 mL de agua desionizada. Se leyó la absorbancia a 725 nm después de terminado el tiempo de reacción de cada muestra. Se empleó agua desionizada como blanco del equipo.

Se elaboró una curva de calibración con ácido gálico, para lo cual se preparó una solución de ácido gálico de 0.5 g/L, y a partir de esta se preparó concentraciones comprendidas entre 50 a 250 mg/L. Cada punto se preparó igual que las muestras, es decir 50 μ L de cada dilución, 250 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu, y se dejó en reposo por 5 min en oscuridad. Pasado el tiempo se adicionó 1 mL de carbonato de sodio 20 por ciento y 3.7 mL de agua desionizada. La lectura de absorbancia a 725 nm se realizó al final del tiempo de reacción de las muestras.

Para determinar el tiempo de reacción de cada muestra se leyó cada 10 min la absorbancia de la muestra. Se detuvo las lecturas cuando se observó que las absorbancias de la muestra eran constantes o no presentaban cambios significativos. Siendo el último valor de absorbancia el empleado para el cálculo de polifenoles totales.

Los polifenoles totales se calcularon utilizando la curva de calibración de ácido gálico y los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente/kg de aceite, según la siguiente fórmula:

$$\text{Polifenoles totales (mg GAE/kg)} = \frac{\frac{\text{mg GAE}}{\text{L}} \times V \times Fd}{W}$$

Donde:

mg GAE/L: Valor obtenido al reemplazar la absorbancia de la muestra en la ecuación de regresión de la curva de calibración de ácido gálico

V: Volumen de reacción (mL) (Volumen total de solvente y muestra)

Fd: Factor de dilución

W: Peso de aceite (g)

n. TOCOFEROLES

El análisis del tocoferoles se realizó siguiendo el método de HPLC propuesto por Panfili *et al.* (2003) con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo ámbar de vidrio de 15 ml con tapa rosca se pesaron exactamente 2 g de aceite y se añadieron los siguientes reactivos: 5 ml de solución de pirogalol en etanol (60 g/L) como un antioxidante, 2 ml de etanol (95 por ciento), 2 ml de NaCl al 1 por ciento y 2 ml de KOH al 60 por ciento, se agitó utilizando un agitador Vortex después de cada adición. Posteriormente, se adicionó nitrógeno al interior del tubo y la muestra se sometió a saponificación en un baño de agua a 70 °C por 45 min, cada 10 min se agitó el tubo en un agitador Vortex. El tubo fue enfriado, se añadió 15 mL de NaCl al 1 por ciento, y se transfirió a una pera de decantación, llevándose a cabo dos extracciones consecutivas, cada una con 15 mL de una mezcla de hexano:acetato de etilo (9:1 v/v). Los extractos obtenidos en cada lavado individual se colocaron en un balón de evaporador rotatorio. Utilizando un evaporador rotatorio, el solvente se evaporó a vacío a 38 °C y posteriormente se terminó de evaporar el solvente residual con nitrógeno. Se adicionó 5 mL de hexano:alcohol isopropílico (99:1 v/v) y se filtró en una membrana de PTFE de 0.22 μm y 13 mm de diámetro.

El análisis por HPLC se llevó a cabo utilizando un sistema compuesto por: inyector Rheodyne que montaba un loop de 50 μL , bomba LaChrom Elite L-2130, detector de fluorescencia 821 FP en las longitudes de onda de excitación a 290 nm y emisión de 330 nm e integrador D-7500. El análisis se llevó a cabo utilizando una columna Alltima Si 5 μm (250 mm x 4.6 mm), con una precolumna Alltima SI 5 μm (7.5 mm x 4.6 mm), y una fase móvil de hexano:acetato de etilo:ácido acético (97.3:1.8:0.9 v/v/v) con flujo de 1.6 mL/min. Después de cada 10 inyecciones, la columna se regeneró con hexano:isopropanol (90:10 v/v) durante 30 min con un flujo de 0.6 mL/min. Los resultados fueron expresados por cada isómero de tocoferol (α , β , γ , δ) como mg/100 g de aceite.

o. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Se siguió la metodología LABS-ITP-FQ-002-98 (ITP, 1998). En un tubo de ensayo de vidrio de 10 mL se colocó 50 mg de aceite, se agregó 3 mL de éter de petróleo (35 - 60 °C), y se llevó a agitación en un agitador vortex hasta disolver. Se agregó 250 µL de NaOH 2 N en metanol y se agitó por 1 min en agitador vortex. Se llevó a un baño de agua a 50 °C por 20 s. Se agregó 350 µL de HCl 2 N en metanol y se agitó por 1 min en agitador vortex. Se centrifugó a 3000 RPM (1421 g) por 8 min. El sobrenadante fue recolectado con ayuda de una pipeta pasteur de vidrio y llevado a un vial ámbar de cromatografía.

Los viales con las muestras se colocaron en el autosampler del cromatógrafo de gases. Se inyectó 2 µL de las muestras, con un Split de 99:1, es decir que el 1 por ciento de lo inyectado va a la columna. La temperatura del inyector fue de 250 °C, y la del detector de ionización de llama (FID) fue de 270 °C. Se utilizó una columna Supelcowax 10 de sílice fundida de 30 m de longitud, 0.25 µm de espesor y 0.25 mm de diámetro interno. Se utilizó gas hidrógeno como gas de arrastre y una presión de 10 psi.

El horno del cromatógrafo de gases empezó con una temperatura de 90 °C, la cual se mantuvo por 2 min, para posteriormente seguir la siguiente rampa de temperatura: se incrementó la temperatura hasta 180 °C a razón de 30 °C/min y se mantuvo esta temperatura por 10 min, pasado este tiempo se incrementó la temperatura hasta 220 °C a razón de 1 °C/min, y finalmente, se incrementó la temperatura hasta 230 a razón de 2 °C/min.

Se utilizó un Mix de ésteres metílicos de ácidos grasos con el cual se identificaron los diferentes ácidos grasos por comparación de los tiempos de retención del estándar con los tiempos de retención de la muestra, y los resultados fueron expresados en porcentaje de cada ácido graso.

p. CUANTIFICACIÓN DE LICOPENO

Se realizó siguiendo el método HPLC propuesto por Gupta *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se pesó 10 mg de estándar de licopeno y fue disuelto en 100 mL de metanol:metil tert-butil éter (60:40) y luego diluido 5 en 100. Se pesaron 30 mg extracto de licopeno de tomate y de aceite de linaza con licopeno, los cuales fueron disueltos en 25 mL de metanol:metil tert-butil éter (60:40) y luego diluidos 5 en 25. El estándar y las muestras fueron filtradas (0.45 µm) y colocadas en viales para cromatografía.

Los viales con el estándar y las muestras se colocaron en el autosampler e inyector del sistema HPLC, se inyectó 20 µL de cada uno. Como fase móvil, se utilizó una mezcla de metanol:agua (98:2, v/v) (canal A), metanol:agua (95:5, v/v) (canal B) y metil terc-butil éter (canal C) con 1 mL/min de caudal.

El análisis se inició con una gradiente de elusión de 80 % A, 20 % C, seguido de una gradiente lineal de 60 % A, 40 % C hasta los 2 min, una gradiente lineal de 60 % B, 40 % C hasta los 12 min, una gradiente lineal de 100 % C hasta los 13 min, y finalmente se volvió a las condiciones iniciales con un tiempo de reequilibrio de 7 min. Se utilizó una columna Acclaim™ C₃₀ de 4.6 x 150 mm que se mantuvo en una temperatura de 20 °C. Para todas las muestras se tuvo como criterio de identificación de licopeno la similitud de 99 % utilizando un detector de arreglo de diodos a 472 nm en comparación con el estándar de licopeno. La cuantificación de licopeno se calculó a partir del tiempo de retención, medición del área de pico en cada cromatograma y los resultados fueron expresados como g de licopeno/100 g de extracto y ppm para el extracto de licopeno de tomate y el aceite de linaza con licopeno, respectivamente.

q. ÍNDICE DE ESTABILIDAD OXIDATIVA (OSI)

Se siguió la metodología AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 1998) con algunas modificaciones. Se utilizó el equipo Rancimat 743, el cual cuenta con el software StabNet desde donde se programaron las condiciones de temperatura y flujo de aire a trabajar.

Se llenaron los frascos de agua del equipo con 50 mL de agua desionizada y se colocaron las sondas para la medición de su conductividad. Posteriormente, el bloque calefactor del equipo se encendió.

Se pesó 3 g de la muestra de aceite en los tubos de reacción del equipo con pipetas pasteur procurando que la muestra no toque las paredes del tubo, y se colocaron sus tapas por las cuales pasa el tubo de la entrada de aire, en los cuales se colocó un protector de espuma. Los tubos se introdujeron en el bloque calefactor del equipo y se esperó 10 min para que la temperatura a utilizar se estabilice; se utilizaron temperaturas de 90, 100 y 110 °C en los diferentes análisis. Una vez terminado el tiempo de estabilización se encendió flujo de aire a un caudal de 20 L/h y se inició el análisis. El valor de OSI fue reportado en horas.

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1. FLUJO DE OPERACIONES

a. EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LINAZA

La extracción de aceite de linaza se realizó por prensado en frío, tomando como referencia que el aceite extraído por prensa expeller no debe sobrepasar los 50 °C de temperatura para ser considerado como prensado en frío (Zheng *et al.*, 2003, Obranović *et al.*, 2015).

Se siguió el flujo de operaciones mostrado en la Figura 33, el cual comprende las siguientes operaciones:

Recepción: La linaza se recibió en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Industrias Alimentarias.

Secado: Se colocaron las semillas de lino en una bandeja metálica a 50 °C por una hora para disminuir la humedad de esta.

Almacenamiento: Las semillas de lino fueron almacenadas en bolsas de PEBD por 24 h (Singh *et al.*, 2011) a temperatura de refrigeración (4 °C). Esta operación se realizó para poder estabilizar la humedad final de la semilla (Zheng *et al.*, 2003, Singh *et al.* 2011), una vez estabilizada la humedad real se prosiguió con el prensado de las semillas.

Prensado: La extracción del aceite linaza prensado en frío se realizó en la prensa expeller Komet del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Industrias Alimentarias. Para la extracción en frío se utilizó una velocidad de tornillo de 24 RPM (Zheng *et al.*, 2003) y un diámetro de boquilla de 8 mm (Zheng *et al.*, 2003, Tostenson *et al.*, 2004, Singh *et al.* 2011). Previo a la extracción se precalentó el cabezal de la prensa con un anillo de calentamiento de resistencia eléctrica a una temperatura de 60 °C por 30 min (Zheng *et al.*, 2003). Una vez precalentada la boquilla de salida se apagó la resistencia y se procedió con la extracción del aceite. Antes de comenzar la extracción se pasó muestra de linaza por la prensa expeller para poder conseguir un flujo continuo en la extracción del aceite (Singh *et al.*, 2011). La extracción se realizó por triplicado.

Centrifugado: El aceite de linaza se centrifugó a 3000 RPM (1421 g) por 15 min para eliminar las impurezas presentes en el aceite extraído.

Almacenamiento: El aceite de linaza prensado en frío fue almacenado en envases ámbar de 250 mL con atmósfera de nitrógeno y en refrigeración a 4 °C (van Ruth *et al.*, 2001).

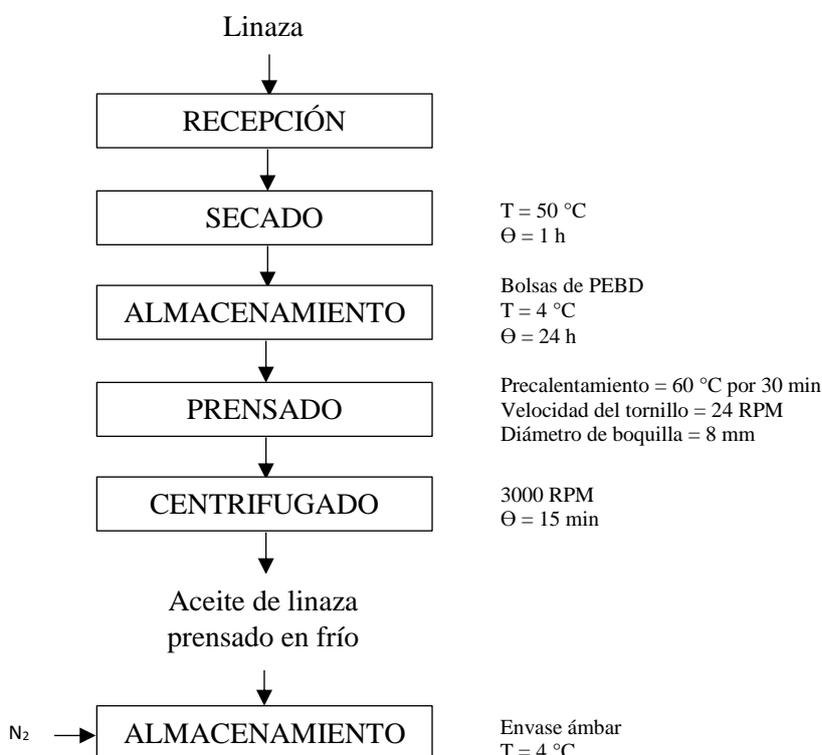


Figura 33: Flujo de operaciones para la obtención de aceite de linaza prensado en frío.

b. EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO DE LICOPENO DE TOMATE

La extracción del extracto de licopeno de tomate se realizó mediante la técnica de extracción por fluidos supercríticos, en el cual se utilizó CO₂.

Se siguió el flujo de operaciones mostrado en la Figura 34, el cual comprende las siguientes operaciones:

Lavado: Los tomates variedad Perseo cultivados en el huerto de la UNALM fueron lavados con el fin de eliminar la suciedad e impurezas que quedaron del huerto.

Trozado: Se trozaron los tomates para facilitar la siguiente operación.

Secado: El tomate trozado fue secado en el secador de bandejas de la Planta Piloto de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias a una temperatura de 60 °C por 24 horas.

Molido: El tomate seco se molió en un molino analítico con el fin de disminuir el tamaño de partícula para facilitar la extracción.

Tamizado: Se tamizó la muestra molida por un tamiz de 25 mesh (0.71 mm) de tamaño de partícula. La muestra de tomate seco en polvo se selló al vacío y se guardó a temperatura de congelación (-20 °C) hasta el momento de la extracción (Lenucci *et al.*, 2015).

Extracción: Se pesó 50 g de la muestra de tomate seco en la celda de extracción del equipo multisolvente del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), utilizando un reductor de volumen de capacidad de 100 mL. El total de la muestra fue introducido a la celda de extracción intercalando con perlas de vidrio, siendo colocada una parte de la muestra, seguido de una cantidad de perlas de vidrio, de esta forma hasta llegar a los 50 g de muestra.

La celda de extracción fue colocada en el reactor del equipo y se programó la condición de temperatura de trabajo desde el software de la computadora. Posteriormente se procedió a encender el Chiller y cuando se llegó a una temperatura entre -3 a -4 °C se procedió a abrir la válvula del balón de CO₂ presurizando el sistema a la presión del CO₂ (60 bar), y finalmente se incrementó la presión del reactor hasta el valor deseado. Se comenzó a controlar el tiempo de extracción desde el momento en que se llegaron a las condiciones de trabajo. La bomba cosolvente se encendió después de iniciada la extracción.

Las condiciones de trabajo fueron una temperatura de 55 °C, presión de 300 bar (Baysal *et al.*, 2000), flujo de CO₂ de 40 g/min y tiempo de 6 horas de extracción desde que se llegó a las condiciones deseadas. Se utilizó como cosolvente al etanol absoluto en una cantidad de 8 por ciento respecto al total de CO₂ utilizado en la extracción, con un flujo de 3.5 mL/min. El extracto etanólico de la extracción se recuperó a partir de tres separadores en un balón de evaporador rotatorio de 500 mL, el cual estaba forrado con papel aluminio para proteger el extracto de la luz. Los separadores registraron una temperatura de 35 °C y presión de 60 bar.

Evaporación: El extracto etanólico obtenido se llevó a un evaporador rotatorio a una temperatura de 35 °C por 40 min para eliminar el solvente, y el solvente residual se eliminó con nitrógeno.

Almacenado: El extracto de licopeno de tomate se mantuvo almacenado en un microtubo eppendorf, el cual fue forrado con papel aluminio y almacenado a -20 °C (Kassama *et al.*, 2008).

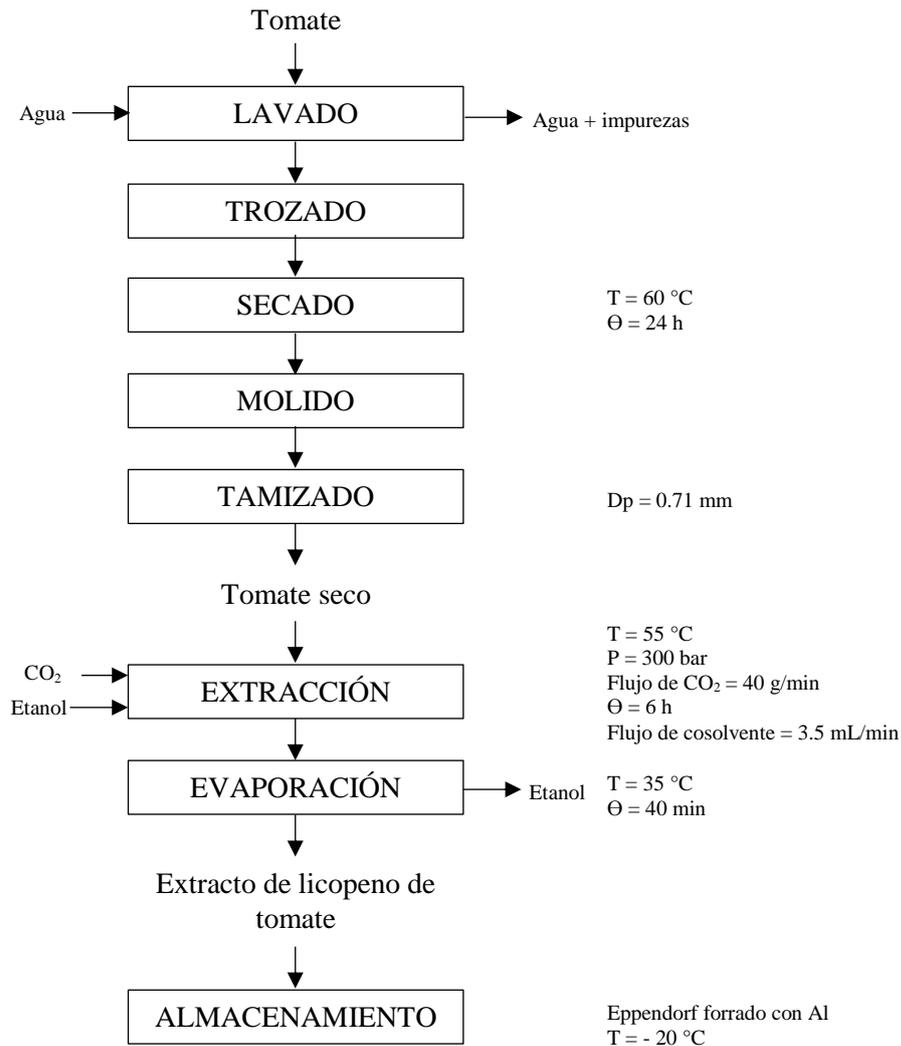


Figura 34: Flujo de operaciones para la obtención del extracto de licopeno de tomate.

3.5.2. ESQUEMA EXPERIMENTAL

En la Figura 35 se muestra el esquema experimental de la investigación, la cual fue dividida en cuatro etapas:

a. ETAPA I: CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS Y EXTRACCIÓN DE ACEITE Y EXTRACTO DE LICOPENO

Se realizó la composición químico proximal (humedad, proteína bruta, grasa bruta, cenizas totales y carbohidratos) de la linaza y tomate seco en polvo. Se realizó la extracción del aceite de linaza por prensado en frío en el equipo expeller, y el extracto de licopeno de tomate por extracción con CO₂ supercrítico según los flujos de operaciones indicados en las Figuras

33 y 34, respectivamente. Se determinó el rendimiento de extracción en el caso del aceite de linaza y la cuantificación de licopeno por HPLC del extracto de licopeno de tomate.

b. ETAPA II: EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE LINAZA CON EL EXTRACTO DE LICOPENO DE TOMATE

El extracto de licopeno de tomate se disolvió en aceite de linaza obteniendo un aceite con 240 ppm de licopeno, del cual se realizaron diluciones con aceite de linaza para obtener las concentraciones de 40, 80 y 120 ppm. El contenido de licopeno en cada aceite de linaza se midió por HPLC.

Se utilizó el equipo Rancimat para medir el índice de estabilidad oxidativa (OSI) del aceite de linaza con 40, 80 y 120 ppm de licopeno, teniendo como control negativo al aceite de linaza y como control positivo al aceite de linaza con 200 ppm de BHT.

El aceite de linaza con la concentración de licopeno cuyo índice de estabilidad oxidativa no presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba de Duncan con el índice de estabilidad oxidativa del control positivo pasó a la siguiente etapa. El aceite de linaza sin adición de antioxidante también pasó a la siguiente etapa para evaluar los cambios en el aceite de linaza al adicionar el extracto de licopeno de tomate.

c. ETAPA III: CARACTERIZACIÓN DE ACEITES

Los aceites de linaza y linaza con licopeno fueron caracterizados con los análisis de humedad, índice de refracción, color, ácidos grasos libres, índice de peróxido, índice de p-Anisidina, k_{232} , k_{268} , capacidad antioxidante por el método ABTS, polifenoles totales, tocoferoles y perfil de ácidos grasos.

d. ETAPA IV: ESTUDIO DE VIDA ÚTIL

Se predijo la vida útil del aceite de linaza y aceite de linaza con licopeno por dos métodos:

- **PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL POR RANCIMAT**

Se utilizó el equipo Rancimat para la predicción de la vida útil, para lo cual se determinó el índice de estabilidad oxidativa (OSI) de los aceites a tres temperaturas diferentes (90, 100 y 110 °C) con un flujo de aire de 20 L/h. Con estas temperaturas el software StabNet del equipo

realizó la predicción de vida útil por la extrapolación del índice de estabilidad oxidativa a 25 °C de cada aceite.

La ecuación que relaciona el índice de estabilidad oxidativa (OSI) con la temperatura, y con la cual es realizada la extrapolación para la predicción de vida útil es mencionada por Farhoosh (2007b):

$$\text{Log(OSI)} = A(T) + B$$

Donde:

OSI: Índice de estabilidad oxidativa (h)

T: Temperatura (°C)

• **PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL POR PRUEBAS ACELERADAS EN ESTUFA**

Los aceites de linaza y linaza con licopeno se almacenaron en botellas ámbar de 100 mL y con atmósfera de Argón, los cuales fueron colocados en una incubadora múltiple a tres temperaturas diferentes, cantidad mínima de temperaturas para poder predecir la vida útil (Manzocco *et al.*, 2016). Se utilizaron las temperaturas de 40, 50 y 60 °C, siendo 60 °C la temperatura máxima recomendada por Frankel, citado por Manzocco *et al.* (2016) para la predicción de vida útil por pruebas aceleradas en estufa para aceites poliinsaturados, y con una diferencia de 10 °C entre cada temperatura según lo mencionado por Talbot (2011).

Los aceites se almacenaron por un tiempo de 40, 60 y 90 días a las temperaturas de 60, 50 y 40 °C, respectivamente, y cada 4, 6 y 9 días, respectivamente, se realizaron los análisis por duplicado de ácidos grasos libres, índice de peróxidos, índice de p-Anisidina, k_{232} y k_{268} en cada aceite, análisis recomendados por Kristott (2000) para la predicción de vida útil en aceites, teniendo un total de 11 puntos al graficar la variación de los análisis en el tiempo por cada temperatura, con lo que se determinó el orden de reacción que sigue cada análisis de cada aceite.

Para el procesamiento de datos se determinó el orden de la cinética de reacción siguiendo la ecuación mencionada por Robertson (2010):

$$\frac{dA}{dt} = \pm kA^n$$

Donde:

A: Valor del atributo

t: Tiempo

k: Constante de cinética de reacción

n: Orden de reacción

Se probaron las ecuaciones de orden de reacción cero y uno.

La ecuación de cinética de reacción para el orden cero, la cual sigue una tendencia lineal, es la siguiente:

$$A = A_0 \pm k \cdot t$$

Donde:

A: Valor de atributo

A₀: Valor inicial del atributo

k: Constante de cinética de reacción

t: Tiempo

La ecuación de cinética de reacción para el orden uno, la cual sigue una tendencia exponencial, es la siguiente:

$$A = A_0 \cdot e^{\pm k \cdot t}$$

Teniendo como forma linealizada la siguiente ecuación:

$$\ln(A) = \ln(A_0) \pm k \cdot t$$

Donde:

A: Valor de atributo

A₀: Valor inicial del atributo

k: Constante de cinética de reacción

t: Tiempo

El orden de reacción para cada análisis se eligió basándose en el mayor coeficiente de determinación (R^2) (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

Una vez determinado el orden de reacción para cada análisis en cada aceite, los datos de cada uno fueron ajustados al modelo de Arrhenius que relaciona la temperatura con la velocidad de reacción, la cual sigue la siguiente ecuación mencionada por Robertson (2010):

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Teniendo como forma linealizada la siguiente ecuación:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

Donde:

k: Constante de cinética de reacción

k₀: Factor pre-exponencial

E_a: Energía de activación (kJ/mol)

R: Constante universal de los gases ideales (0.008314 KJ/mol k)

T: Temperatura absoluta (K)

Se determinó la constante de cinética de reacción (k) a 25 °C para cada uno de los cinco análisis realizados a los aceites, y el valor de cada uno fue introducido en las ecuaciones de cinética de reacción del orden determinado previamente para cada análisis y de cada aceite para el cálculo de la vida útil predicha.

Debido a que comercialmente los aceites de linaza no se rigen a una norma específica (Choo *et al.*, 2007a), para los límites de aceptabilidad se tomaron como referencia las normas del Codex Alimentarius (2017a, 2017b) para aceites prensados en frío y vírgenes para el caso de los análisis de ácidos grasos libres (2 por ciento), índice de peróxidos (15 meq O₂/kg), k_{232} (2.6) y k_{268} (0.25), y para el análisis de p-anisidina se tomó como referencia el límite de dos mencionado por Choo *et al.* (2007a), Schaich (2016) y Gupta (2017b).

Se obtuvo un total de cinco resultados de vida útil para cada aceite. Finalmente, el resultado de la vida útil predicha para cada aceite fue el menor valor de vida útil, redondeado por defecto, de los cinco análisis realizados (Fernández Sobrados, 2018).

Etapa I Caracterización de las materias primas y extracción de aceite y extracto de licopeno	Etapa II Evaluación de la estabilidad oxidativa del AL con el ELT	Etapa III Caracterización de aceites	Etapa IV Estudio de Vida útil	
<p>Linaza -----> Aceite de Linaza (AL) -----></p> <p>Tomate -----> Extracto de licopeno de tomate (ELT) -----></p>	<p>Control (-): AL -----></p> <p>Control (+): AL + BHT 200 ppm -----></p> <p>[T1: AL + Licopeno 40 ppm T2: AL + Licopeno 80 ppm T3: AL + Licopeno 120 ppm] -----></p>	<p>AL -----></p> <p>X -----></p>	<p>Temperaturas</p> <p>Prueba acelerada en estufa -----> T1 = 40 °C -----> T2 = 50 °C -----> T3 = 60 °C</p> <p>Rancimat -----> T1 = 90 °C -----> T2 = 100 °C -----> T3 = 110 °C</p> <p>Prueba acelerada en estufa -----> T1 = 40 °C -----> T2 = 50 °C -----> T3 = 60 °C</p> <p>Rancimat -----> T1 = 90 °C -----> T2 = 100 °C -----> T3 = 110 °C</p>	<p>Almacenamiento/Análisis</p> <p>90 días, análisis cada 9 días 60 días, análisis cada 6 días 40 días, análisis cada 4 días</p> <p>90 días, análisis cada 9 días 60 días, análisis cada 6 días 40 días, análisis cada 4 días</p> <p>Estimación de vida útil</p> <p>Los datos de cada análisis se ajustaron al modelos de Arrhenius.</p> <p>Los datos de cada análisis se ajustaron al modelos de Arrhenius.</p>
<p>Controles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento de aceite • Contenido de licopeno <p>Análisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Humedad • Proteína • Grasa • Cenizas totales • Carbohidratos 	<p>Análisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Índice de estabilidad oxidativa 	<p>Análisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Humedad • Índice de Refracción • Color • Ácidos grasos libres • Índice de Peróxido • Índice de p-Anisidina • k232 y k268 • Capacidad antioxidante • Polifenoles totales • Tocoferoles • Perfil de ácidos grasos 	<p>Análisis para pruebas aceleradas (Descriptoros críticos):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos grasos libres • Índice de peróxido • Índice de p-Anisidina • k232 • k268 <p>Análisis con el equipo Rancimat:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Índice de estabilidad oxidativa 	<p>Análisis de datos para pruebas aceleradas en estufa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinación del Orden de Reacción (n) • Ajuste al modelo de Arrhenius • Determinación de la constante de velocidad de reacción (k) a temperatura de 25 °C

AL: Aceite de linaza

ELT: Extracto de licopeno de tomate

X: AL con la concentración de ELT que no presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) con el índice de estabilidad oxidativa del control (+)

Figura 35: Esquema experimental de la investigación.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la mejor concentración de licopeno en el aceite de linaza se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de las concentraciones de los antioxidantes en los valores de OSI de los aceites, seguido por la prueba de múltiple rango de Duncan a un nivel de significancia del cinco por ciento para evaluar las diferencias significativas entre los valores promedio de los valores de OSI de los aceites.

En los análisis de caracterización, capacidad antioxidante, polifenoles totales, tocoferoles y perfil de ácidos grasos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de la adición de licopeno en el aceite de linaza en cada análisis, seguido por la prueba de múltiple rango de Student-Newman-Keuls a un nivel de significancia del cinco por ciento para evaluar las diferencias significativas entre los valores promedio de cada análisis.

Los datos obtenidos del estudio de vida útil en estufa del aceite de linaza y linaza con licopeno se analizaron estadísticamente aplicando el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), teniendo como bloques al número de días donde se realizaron los análisis (ácidos grasos libres, índice de peróxido, índice de p-Anisidina, k_{232} y k_{268}) y los tratamientos a las diferentes temperaturas de almacenamiento (40, 50 y 60 °C).

Todas las pruebas se analizaron un nivel de significancia del cinco por ciento y los datos fueron procesados en el software Statgraphics Centurion versión 18.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICO PROXIMAL DE LA LINAZA Y TOMATE SECO

En el Cuadro 11 se muestran los resultados de la composición químico proximal de la linaza y tomate seco en polvo expresados tanto en base húmeda como en base seca.

Cuadro 11: Composición químico proximal de la linaza y tomate seco

ANÁLISIS	LINAZA		TOMATE SECO	
	% B.H.	% B.S.	% B.H.	% B.S.
Humedad	7.38 ± 0.09	-	4.81 ± 0.39	-
Proteína bruta	17.24 ± 0.02	18.61 ± 0.02	12.13 ± 0.06	12.75 ± 0.05
Grasa bruta	42.12 ± 0.47	45.48 ± 0.36	1.29 ± 0.27	1.36 ± 0.20
Cenizas totales	3.32 ± 0.01	3.59 ± 0.00	10.73 ± 0.48	11.27 ± 0.35
Carbohidratos	29.94 ± 0.53	32.33 ± 0.40	71.04 ± 0.53	74.63 ± 0.40

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

4.1.1. LINAZA

La linaza mostró un contenido de humedad de 7.38 ± 0.09 por ciento. El MINSa *et al.* (2017) reportaron un valor de 8.1 por ciento en linaza de Perú; Morris (2007) un valor de 7.7 por ciento en linaza variedad marrón de Canadá, siendo valores superiores al obtenido para la linaza de Perú utilizada en la investigación. Sin embargo, también se han reportado valores inferiores de 6.2 por ciento en linaza de China (Zhang *et al.*, 2013), y 6.4 por ciento en linaza de Turquía (Bozan y Temelli, 2008). De forma general, los diferentes valores reportados en la literatura sobre la composición de la linaza se deben a factores genéticos, entorno de cultivo, procesamiento de las semillas y métodos de análisis (Bernacchia *et al.*, 2014).

El contenido de proteína bruta de la linaza fue de 17.24 ± 0.02 por ciento (b.h.). El MINSa *et al.* (2017) reportaron un contenido de 21 por ciento en linaza de Perú; Morris (2007) un contenido de 20 por ciento para la linaza variedad marrón de Canadá; Mueller *et al.* (2010) indicaron contenidos de 23.4 y 23.3 por ciento en base seca para linaza variedad marrón y amarilla de Alemania, respectivamente; Oomah y Mazza (1998) reportaron un contenido de

20.34 por ciento en linaza de Canadá; Bozan y Temelli (2008) reportaron un contenido de 17.9 por ciento en linaza de Turquía, siendo el contenido de proteínas de la linaza utilizada en la investigación inferior a los reportados en la literatura. Sin embargo, Shim *et al.* (2014) mencionan que el contenido de proteínas varía ampliamente entre valores de 10 al 31 por ciento. Los diferentes contenidos de proteínas reportados en las investigaciones mencionadas pueden atribuirse tanto a la genética como al medio ambiente (Ganorkar y Jain, 2013). Asimismo, Herchi *et al.* (2012) determinaron que el contenido de proteínas en la linaza aumenta con el paso de los días después de la floración de la semilla, reportando un valor máximo de 30 por ciento a los 49 días después de la floración. El contenido de proteínas también puede variar por el factor de conversión de nitrógeno total a proteína bruta, el cual es tomado como 6.25 en su mayoría (Morris, 2007, Bozan y Temelli, 2008, Herchi *et al.*, 2012), sin embargo, Oomah y Mazza (1998) toman el valor de 5.41 como factor de conversión. Además, Bekhit *et al.* (2018) menciona que el valor de proteína bruta no representa la cantidad de proteína verdadera debido a que incluye nitrógeno no proteico, el cual se puede encontrar como algunas vitaminas, sinapina, colina y glucósidos cianogénicos en cantidades significativas en la linaza.

El contenido de grasa bruta de la linaza fue de 42.12 ± 0.47 por ciento (b.h.), el cual es cercado a los valores de 42.5 por ciento en linaza de Perú (MINSa *et al.*, 2017); 41 por ciento para la linaza variedad marrón de Canadá (Morris, 2007); 45.2 y 44.0 por ciento en base seca para linaza variedad marrón y amarilla de Alemania, respectivamente (Mueller *et al.*, 2010); y 43.79 por ciento en linaza de Canadá (Oomah y Mazza, 1998). Shim *et al.* (2014), mencionan que el contenido de aceite de la linaza varía entre 38 a 44 por ciento debido al genotipo y condiciones ambientales. Sin embargo, Bozan y Temelli (2008) reportaron un contenido de 33.6 por ciento en linaza de Turquía, el cual es inferior al determinado para la linaza de Perú y al de las investigaciones mencionadas. Asimismo, Ganorkar y Jain (2013) mencionan que este contenido puede variar a través de los métodos tradicionales del cultivo de las plantas, y se ve afectado por la geografía, siendo los climas fríos por lo general los que resultan en un alto contenido de aceite y bajo contenido de proteína en las semillas (Bernacchia *et al.*, 2014).

El contenido de cenizas totales fue de 3.32 ± 0.01 por ciento (b.h.), el cual es un valor similar al 3.4 por ciento para la linaza variedad marrón de Canadá mencionado por Morris (2007); y al 3.50 y 3.38 por ciento en base seca para la linaza variedad marrón y amarilla de

Alemania, respectivamente reportados por Mueller *et al.* (2010). Sin embargo, es superior al 2.9 por ciento para linaza de Perú reportado por el MINSA *et al.* (2017); e inferior a los valores de 3.90 por ciento en linaza de Turquía (Bozan y Temelli, 2008), y 4.81 por ciento en linaza de Canadá (Oomah y Mazza, 1998). Las cenizas son el contenido rico en minerales, entre los cuales se han reportado en mayor proporción el calcio, magnesio, fósforo y potasio en muestras de linaza (Bernacchia *et al.*, 2014), siendo las diferencias reportadas en las diferentes investigaciones debidas a los mismos factores antes mencionados.

El contenido de carbohidratos totales fue de 29.94 ± 0.53 por ciento (b.h.), el cual es un valor similar al 29 por ciento para la linaza variedad marrón de Canadá mencionado por Morris (2007). Sin embargo, es superior a los valores de 27.8 y 29.4 por ciento en base seca para linazas variedad marrón y amarilla de Alemania, respectivamente reportados por Mueller *et al.* (2010); e inferior al 38.1 por ciento indicado por Bozan y Temelli (2008) en linaza de Turquía. El contenido de carbohidratos totales de la linaza consiste en carbohidratos no digeribles, a menudo denominados fibra dietaria, y una pequeña proporción de carbohidratos digeribles (Bekhit *et al.*, 2018), como azúcares y almidones (Morris, 2007); y las diferencias entre los diferentes valores reportados se deben de igual manera a los factores mencionados anteriormente.

4.1.2. TOMATE SECO

El tomate seco presentó en base húmeda un contenido de humedad del 4.81 ± 0.39 por ciento, proteína bruta de 12.13 ± 0.06 por ciento, grasa bruta de 1.29 ± 0.27 por ciento, ceniza total de 10.73 ± 0.48 por ciento, y carbohidratos totales de 71.04 ± 0.53 por ciento, después de 24 horas de secado a 60 °C.

Los valores de la composición químico proximal pueden diferir en gran medida con los reportados en la literatura para tomates secos según el contenido de humedad final después del secado realizado por cada estudio; siendo la humedad del tomate seco un parámetro crítico en la extracción del extracto de licopeno utilizando CO₂ supercrítico debido a que puede mejorar o no el rendimiento de extracción (Shi *et al.*, 2010). Así por ejemplo, Jorge *et al.* (2014) secaron tomates de larga duración procedentes de Brasil a 70 °C por 24 horas, reportando valores de 15.70 por ciento de humedad, 7.09 por ciento de cenizas, 10.46 por ciento de proteínas, y 65.75 por ciento de carbohidratos; mientras que Surendar *et al.* (2018) indicaron contenidos de 5.51 por ciento de humedad, 13.96 por ciento de proteínas, 2.80 por

ciento de grasa, y 10.78 por ciento de cenizas en tomates variedad Vaishali de la India. Las diferencias entre la composición químico proximal del tomate fresco están relacionadas a las diferentes variedades, el método de cultivo (intensivo, orgánico, hidropónico), la región de cultivo y tiempo de cosecha (Hernández Suarez *et al.*, 2008).

4.2. EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LINAZA

La extracción del aceite de linaza por prensa expeller dio un rendimiento de 33.38 ± 0.98 por ciento (p/p). Este valor es inferior al contenido total de grasa determinado en el análisis químico proximal de la linaza (Cuadro 11). Se han reportado diversos factores que influyen en la recuperación del aceite de linaza, Zheng *et al.* (2003) mencionan que en la extracción con prensa expeller Komet influyen principalmente el contenido de humedad, el uso de semilla entera o descascarillada, y la variedad.

La humedad de la semilla influye significativamente en la recuperación del aceite, Singh *et al.* (2011) utilizaron humedades desde 13.8 a 6.5 por ciento (b.s.) en la extracción de aceite de linaza de la India utilizando prensa expeller, encontrando que al ir disminuyendo la humedad se recuperaba mayor cantidad de aceite, sin embargo, al tener la humedad de 6.5 por ciento (b.s.) la prensa expeller se taponaba y dificultaba la extracción de aceite. Resultados similares han sido reportados por Tostenson *et al.* (2004) obteniendo una mayor recuperación de aceite a 8.1 por ciento de humedad (b.s.). Por este motivo, antes de la extracción de aceite como tratamiento previo se disminuyó el contenido de humedad de la linaza de 7.97 ± 0.07 hasta un 7.52 ± 0.27 por ciento (b.s.).

Elegir una correcta humedad implica una mayor recuperación de aceite y por lo tanto menor aceite residual en la torta (Singh *et al.*, 2011). Singh y Bargale (2000) mencionan que al extraer aceite con la prensa expeller se queda aproximadamente entre un 8 a 14 por ciento de aceite en la torta; es por esto que se pudo haber obtenido un mayor rendimiento de aceite si a la torta se le extraía el aceite residual con ayuda de solventes, siendo el hexano el más utilizado (Mueller *et al.*, 2010, Khattab y Zeitoun, 2013). Sin embargo, como menciona Kochhar, citado por Shim *et al.* (2015), los aceites que son prensados y seguidos de una extracción con solventes son usados para fines industriales, mientras que los que son para fines alimentarios son los prensados en frío; esto también debido a que el ácido α -Linolénico presente en el aceite de linaza es sensible a altas temperaturas, por lo que su contenido puede verse afectado por la extracción de aceite de linaza a altas temperaturas (Mridula *et al.*,

2015). Otra forma de aumentar la recuperación de aceite es descascarillar una parte de la linaza, Mridula *et al.* (2015) determinaron que a un 70 por ciento de descascarillado se recuperaba mayor cantidad de aceite en comparación a la extracción con semillas enteras o descascarilladas.

Es importante controlar la temperatura involucrada en la extracción debido a que los aceites ricos en ácidos grasos ω -3 deben ser extraídos a las temperaturas más bajas posibles para mantener una calidad y estabilidad alta (Shukla, citado por Khattab y Zeitoun, 2013). Tostenson *et al.* (2004) mencionan que al extraer aceite de linaza por prensado en frío se recupera menos aceite, pero es necesario para poder obtener un aceite de alta calidad con sabor suave, agradable y de color dorado, el cual puede almacenarse durante varios meses en botellas oscuras bajo refrigeración. Es por esta razón que fue necesario controlar la temperatura de salida del aceite, para verificar que no sobrepase los 50 °C, valor límite tomado como referencia en diferentes estudios para ser considerado como aceite prensado en frío (Zheng *et al.*, 2003, Obranović *et al.*, 2015).

La humedad influye en la temperatura de salida del aceite, Zheng *et al.* (2003) mencionan que en la extracción de aceite de linaza a partir de semillas enteras, valores de humedad superiores a 7.5 por ciento (b.s.) dieron como resultado aceites con temperaturas que variaban entre 49 a 51 °C, mientras que con humedades entre 6.1 a 7.5 por ciento (b.s.) la temperatura aumentó significativamente alcanzando hasta 67 °C con la humedad de 6.1 por ciento (b.s.). Esto debido a que como mencionan Singh *et al.* (2002), un alto contenido de humedad actúa como lubricante durante el prensado por lo que un bajo contenido de humedad provoca una alta resistencia a la fricción lo que aumenta la temperatura del aceite que se va extrayendo. En la extracción realizada con una humedad inicial de 7.52 ± 0.27 por ciento (b.s.) se llegó hasta una temperatura de 43.7 °C. Zheng *et al.* (2003) mencionan que una forma de llegar a temperaturas más bajas en el aceite recuperado es el descascarillado de las semillas, debido a la menor fricción que se realiza, sin embargo, se obtiene menor recuperación de aceite, razón por la cual no se realizó esta operación.

Khattab y Zeitoun (2013) evaluaron los rendimientos de aceite de linaza de Egipto por extracción con CO₂ supercrítico, extracción acelerada con solventes, y soxhlet utilizando hexano como solvente; encontrando rendimientos de 36.49, 42.40 y 42.40 por ciento (p/p). Estos valores fueron superiores al rendimiento del aceite de linaza extraído por prensa expeller. Sin embargo, como menciona Nykter y Kymäläinen (2006), los diferentes

rendimientos citados anteriormente son debidos principalmente a las diferencias en las variedades de la linaza y los tratamientos previos a la extracción del aceite; por la calidad de las semillas utilizadas (Wiesenborn *et al.*, 2005); o por las condiciones climáticas debido a que las temperaturas y precipitaciones afectan al desarrollo de la linaza en sus diferentes etapas de crecimiento (Zajac *et al.*, citados por Anastasiu *et al.*, 2016).

4.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL LICOPENO DE TOMATE

Bajo las condiciones de extracción de 300 bar, 55 °C y 8 por ciento de etanol como cosolvente se obtuvo un extracto oleoso (extracto de licopeno de tomate) de 5.34 ± 0.04 g de licopeno/100 g de extracto según el análisis por HPLC, lo que equivale a 219.95 ± 1.76 µg licopeno/g de tomate (Cromatogramas en Anexos 1 y 2).

Cadoni *et al.* (2000) utilizando una temperatura de 40 °C, presión de 4000 psi (275.79 bar), y cosolvente cloroformo extrajeron 149.2 µg de licopeno/g de tomate utilizando la variedad Camone de la isla Cerdeña en Italia; mientras que Lenucci *et al.* (2010) evaluaron el contenido de licopeno en seis cultivares de tomate comunes y seis cultivares de alto contenido de licopeno de Italia, encontrando en promedio 196 µg de licopeno/g de tomate en las variedades de alto licopeno, y en promedio 99 µg de licopeno/g de tomate en las variedades comunes, en condiciones de extracción de temperatura entre 65 a 70 °C, 450 bar de presión, flujo de CO₂ de 18 a 20 kg/h y 3 horas de extracción. El contenido de 219.95 ± 1.76 µg de licopeno/g de tomate obtenido en la extracción es superior a los valores antes mencionados, por lo que se podría considerar que el tomate orgánico variedad Perseo del huerto de la UNALM es de alto contenido de licopeno.

Las diferencias entre los contenidos de licopeno reportados en la literatura son bastante variables y dependen de diferentes factores como el tipo de tomate y su temperatura de maduración (Cadoni *et al.*, 2000); el estado de madurez del tomate, debido a que el contenido de licopeno al igual que varios carotenoides aumentan con el avance de la madurez (Choksi y Joshi, 2007); el uso del tomate en su totalidad, o partes de esta (cáscara, pulpa y/o semillas) en la extracción (Zuknik *et al.*, 2012); el pretratamiento de la muestra como el secado, molienda y tamizado (Vasapollo *et al.*, 2004); y de los parámetros de extracción supercrítica, siendo los principalmente la temperatura de extracción, presión, y el uso o no de los cosolventes o modificadores (Konar *et al.*, 2012).

Uno de los tratamientos previos antes de la extracción fue el secado del tomate en un secador de bandejas por aire caliente a 60 °C durante 24 horas. El tiempo y temperatura de secado del tomate influyen en la extracción de licopeno debido a que durante el secado se puede producir la isomerización y oxidación del licopeno (Shi *et al.*, citados por Lenucci *et al.*, 2010). Asimismo, Nguyen y Schwartz, citados por Lenucci *et al.* (2010) mencionan que el secado de tomates a una temperatura moderada no produce pérdidas de licopeno, es por esta razón que en la literatura se reporta la liofilización como el método de secado más utilizado entre los tratamientos previos a la extracción supercrítica (Konar *et al.*, 2012). Sin embargo, Chang *et al.* (2006) utilizando tomates variedad I-Tien-Hung y Sheng-Neu de China, mencionan que con el secado por liofilización a -50 °C por 24 horas a 5 Pa se obtenían tomates secos con menor contenido de licopeno en comparación a los secados por aire caliente a 80 °C por 2 horas seguido de 6 horas a 60 °C; misma tendencia es reportada por Jorge *et al.* (2017), mencionando que en el secado con aire caliente a 70 °C por 20 horas contenía un mayor contenido de licopeno que los que fueron secados por liofilización a -56 °C por 48 horas a 8.8×10^{-6} MPa en tomates de larga duración procedentes de Brasil.

En la extracción se utilizó tomate seco con una humedad de 4.81 ± 0.39 (b.h.). La humedad es un punto crítico en la extracción, debido a que un elevado contenido resulta perjudicial para la extracción eficiente de licopeno (Lenucci *et al.*, 2010), reportándose contenidos de humedad desde 0.8 a 10.6 por ciento en la literatura para la extracción supercrítica de licopeno (Konar *et al.*, 2012). Vasapollo *et al.* (2004) encontraron trazas de licopeno cuando fueron extraídas de tomates con 60 por ciento de humedad, mientras que al secarlos hasta una humedad de 6 por ciento el rendimiento de licopeno aumentó significativamente. Con un mayor contenido de humedad, la probabilidad de formación de una fina película de agua entre la matriz y la fase del fluido supercrítico aumenta, lo que genera un aumento en la distancia que el licopeno debe viajar para alcanzar el CO₂ (Shi *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que reducir el tamaño de partícula tiene un efecto beneficioso en el rendimiento de extracción, debido a que se aumenta la relación superficie/volumen de la muestra y en consecuencia se aumenta el contacto entre la fase sólida y líquida (Lenucci *et al.*, 2010), siendo los diámetros de 1 mm o inferiores a este los más utilizados en las extracciones de licopeno (Konar *et al.*, 2012). Sin embargo, Zhang *et al.* (2011a) mencionan que no es recomendable utilizar un diámetro demasiado pequeño, recomendando que este sea hasta de un 0.30 mm, esto debido a que como mencionan Zuknik *et al.* (2012), se puede

producir el fenómeno de canalización lo que resulta en una extracción ineficiente por la disminución del contacto entre el CO₂ y la muestra. El diámetro de partícula de 0.71 mm del tomate seco utilizado en la investigación, el cual fue determinado por pruebas preliminares, concuerda con lo indicado por los autores mencionados.

La extracción se realizó a 300 bar, se ha reportado que las extracciones de licopeno se llevan entre presiones de 200 a 450 bar, tendiendo mayor recuperación de licopeno entre 300 a 400 bar (Konar *et al.*, 2012). Vasapollo *et al.* (2004) trabajando a temperatura constante encontraron que al aumentar la presión el rendimiento de licopeno aumentaba, esta misma tendencia es descrita por Zhang *et al.* (2011a), esto debido al aumento en la densidad del CO₂ que da como resultado el aumento de su capacidad de disolución.

Con respecto a la temperatura de extracción, el extracto de licopeno fue extraído a 55 °C; se han reportado temperaturas de extracción entre 50 a 110 °C, siendo el más frecuente 80 °C (Konar *et al.*, 2012). Gómez-Prieto *et al.* (2003) mencionan que aumentar las temperaturas de extracción ayudan a elevar la solubilidad del licopeno en el CO₂ supercrítico, pero la elevada temperatura junto a un tiempo de extracción largo pueden llevar a la isomerización del *cis*-licopeno, el cual es menos estable y puede sufrir degradación oxidativa. Asimismo, Huang *et al.* (2008) mencionan que con temperaturas más altas se obtienen mayores rendimientos de licopeno, pero su bioactividad podría ser baja.

Cadoni *et al.* (2000) encontraron que al aumentar la temperatura de extracción se lograba extraer mayor cantidad de licopeno, llegando a obtener 644.1 µg licopeno/g de tomate a temperatura de 80 °C y 4000 psi. Sin embargo, como mencionan Yi *et al.* (2009), la elevada temperatura de extracción ocasiona que el licopeno sufra degradación o isomerización afectando significativamente a su capacidad antioxidante, encontrando que al trabajar con temperaturas entre 40 a 70 °C la capacidad antioxidante no cambiaba significativamente, pero en el rango de 70 a 100 °C esta disminuía. Konar *et al.* (2012) mencionan de forma similar que a temperaturas menores de 70 °C no se ve un efecto negativo en la capacidad antioxidante, es por esto que se optó por no usar una temperatura muy elevada en la extracción.

La temperatura, presión, y la interacción entre temperatura, presión y tiempo de extracción influyen en el rendimiento de licopeno (Huang *et al.*, 2008; Kassama *et al.*, 2008). Los parámetros de 55 °C y 300 bar utilizados en la extracción se encuentran en el rango de 40 a

70 °C de temperatura y 200 a 400 bar de presión mencionados por Yi *et al.* (2009) con los cuales obtuvieron un mayor contenido de licopeno de cáscara y semillas de tomate procedentes de Canadá con capacidad antioxidante elevada.

El uso de solventes orgánicos como cloroformo (Cadoni *et al.*, 2000), tetrahidrofurano, acetona (Konar *et al.*, 2012), hexano, diclorometano (Zuknik *et al.*, 2012), han sido reportados como cosolventes en la extracción de licopeno por fluidos supercríticos, los cuales pueden ayudar a la mejorar la solubilidad de los compuestos bioactivos (Huang *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso de los solventes mencionados puede dejar trazas de estos, Cadoni *et al.* (2000) determinaron por análisis CG/MS que existían trazas de cloroformo en el extracto oleoso de licopeno que obtuvieron por extracción supercrítica utilizando cloroformo como modificador. En el caso de la extracción realizada se utilizó un 8 por ciento de etanol absoluto como cosolvente, este solvente presenta algunas ventajas frente a los solventes anteriores debido a su efecto no tóxico, lo cual es ideal para productos alimentarios (Lamin *et al.*, citados por Huang *et al.*, 2008); reportándose su uso entre 5 a 16 por ciento como cosolvente (Konar *et al.*, 2012). Lenucci *et al.* (2010) mencionan que la recuperación de licopeno por lo general no excede del 20 por ciento de la cantidad total de carotenoides, pero este aumenta a un rango entre 50 a 70 por ciento cuando se utiliza etanol o aceite vegetal como cosolvente. Del mismo modo, Huang *et al.* (2008) mencionan que el uso de etanol da como resultado rendimientos altos de licopeno con un alto nivel de bioactividad.

4.4. ESTABILIDAD OXIDATIVA CON RANCIMAT

En el Cuadro 12 se muestran los índices de estabilidad oxidativa (OSI) del aceite de linaza con diferentes concentraciones de licopeno, el control negativo (aceite de linaza), y el control positivo (aceite de linaza con 200 ppm de BHT), medidos a 110 °C por el equipo Rancimat.

Cuadro 12: Índice de estabilidad oxidativa (OSI) a 110 °C de los aceites

MUESTRA	OSI A 110 °C (h)
Aceite de Linaza	2.18 ± 0.05 ^a
Aceite de Linaza (BHT 200 ppm)	2.94 ± 0.03 ^b
Aceite de Linaza (Licopeno 40 ppm)	2.65 ± 0.04 ^c
Aceite de Linaza (Licopeno 80 ppm)	2.91 ± 0.07 ^b
Aceite de Linaza (Licopeno 120 ppm)	3.06 ± 0.04 ^d

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3)

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencia significativa (p < 0.05) según la prueba Duncan

La adición de antioxidante BHT en 200 ppm y licopeno en 40, 80 y 120 ppm al aceite de linaza aumentaron su valor de OSI, siendo la concentración de 120 ppm la que presentó un mayor valor de OSI. Sin embargo, incorporar mayores concentraciones de un antioxidante implica mayores costos en el escalamiento a nivel industrial, razón por la cual todos los análisis siguientes de aceite de linaza con licopeno están referidos a la concentración de 80 ppm de licopeno debido a que esta concentración no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el valor de OSI del antioxidante BHT a 200 ppm (Anexo 3).

Los valores de OSI del aceite de linaza son inferiores a los de muchos aceites comerciales, Kostadinović Veličkowska *et al.* (2015) reportaron valores de OSI a 120 °C, mencionando valores de 7.6 h para aceite de albaricoque, 4.2 h para aceite de ajonjolí, 3.1 h para aceite de colza, 2.6 h para aceite de girasol, y 1.5 h para aceite de linaza de Macedonia; Bozan y Temelli (2008) indicaron valores de OSI a 110 °C de 5.53 h para aceite de adormidera, 2.87 h para aceite de cártamo, y 1.57 h para aceite de linaza de Turquía; Shadyro *et al.* (2017) reportaron valores de OSI a 100 °C de 59.65 h para aceite de oliva, 23.44 h para aceite de ajonjolí, 19.15 h para aceite de maíz, 18.7 h para aceite de colza, 9.30 h para aceite de girasol, y 4.25 h para aceite de linaza de Bielorrusia; Wagner y Elmadfa (2000) reportaron valores de OSI a 120 °C de 6.07 y 1.13 h para aceite de oliva y linaza de Austria, respectivamente. Esto indica que el aceite de linaza presenta una baja estabilidad oxidativa frente a otros aceites, principalmente por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Kostadinović Veličkowska *et al.*, 2015), por lo que para mejorar su estabilidad oxidativa existe la necesidad de adicionar antioxidantes.

La adición de BHT en concentración de 200 ppm en diferentes muestras de aceites ha sido reportado en diversos estudios de estabilidad oxidativa (Li *et al.*, 2011, Taghvaei *et al.*, 2014, Shadyro *et al.*, 2017). Además, como menciona Lecos, citado por Weber (2014), la FDA limita su uso en alimentos, ya sea solo o en combinación con otros antioxidantes, a una concentración menor o igual a 200 ppm del contenido total de grasa o aceite, por lo que es tomado como límite en muchos estudios. Sin embargo, se han utilizado otros antioxidantes sintéticos en estudios de estabilidad oxidativa, Shadyro *et al.* (2017) estudiaron el empleo de TBHQ, DTBHQ, propil galato, 2,2'-metileno-bis (4 metil-6-tert-butilfenol), BHT, palmitato ascorbilo y estearato ascorbilo en aceite de linaza de Bielorrusia, encontrando que 200 ppm de BHT en el aceite de linaza incrementaba en menor medida su valor de OSI a 100 °C en comparación con los demás antioxidantes sintéticos mencionados.

Symoniuk *et al.* (2016b) reportaron valores de OSI de 1.43 a 1.52 h para aceites de linaza de Polonia prensados en frío, y Bozan y Temelli (2008) reportaron un valor de OSI de 1.57 h para aceites de linaza de Turquía, siendo estos valores inferiores al 2.18 ± 0.05 h del aceite de linaza extraído por prensa expeller. Sin embargo, Tańska *et al.* (2016) reportan valores entre 2.00 a 2.78 h para aceites de linaza comerciales de Polonia; en estas investigaciones los valores de OSI fueron determinados de igual manera a 110 °C por Rancimat. Estos diferentes valores reportados por los autores se deben principalmente a la diferente composición de ácidos grasos que posee cada aceite de linaza (Tańska *et al.*, 2016), así como también del contenido de componentes menores, el método de procesamiento de aceite, la calidad de las semillas y su tiempo de almacenamiento (Shadyro *et al.*, 2017). Asimismo, Wagner y Elmadfa (2000) mencionan que el valor de OSI depende de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados/saturados (P/S) y del contenido de antioxidantes; al tener una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, como el aceite de linaza, los valores de OSI disminuirán, mientras que una mayor proporción de ácidos grasos saturados dará como resultado valores de OSI más altos a una misma temperatura.

En el rango de 40 a 120 ppm de licopeno existe una tendencia a aumentar el valor de OSI en el aceite de linaza, misma tendencia es reportada por Li *et al.* (2011) en el rango de 100 a 400 ppm de licopeno en aceite de soya. Laguerre *et al.* (2015) mencionan que la eficacia de un antioxidante en el aceite aumenta con la concentración hasta que se alcanza un umbral, por lo que por encima de esta concentración crítica cualquier aumento de concentración es acompañado de una disminución de la eficacia antioxidante y del valor de OSI. Esta actividad prooxidante del licopeno es reportada por Henry *et al.* (1998) en aceite de cártamo, en donde la adición de 100 ppm incrementaba el valor de OSI del aceite, pero concentraciones de 500, 1000 y 2000 ppm disminuían significativamente el valor de OSI del aceite. De igual manera, Wagner y Elmadfa (2000) reportaron que al adicionar γ -tocoferol al aceite de linaza prensado en frío de Austria en una concentración de 100 mg/100 g de aceite, el valor de OSI aumentaba respecto al aceite sin antioxidante, pero al aumentar la concentración del antioxidante a 140 mg/100 g de aceite, el valor de OSI disminuía significativamente.

Lavecchia y Zuorro (2006) mencionan que la estabilidad del licopeno en un aceite vegetal está influenciada por el perfil de ácidos grasos del aceite, del tipo y contenido de antioxidantes; por lo que existe una relación entre la velocidad de degradación de los

carotenoides y el grado de insaturación del aceite; siendo los aceites con un alto contenido de ácidos grasos insaturados, tales como aceites de girasol, soya y semilla de uva, los que dan como resultado una degradación más rápida, mientras que velocidades de degradación más bajas son reportadas en Myritol® 312 y aceite de parafina, que contienen solo compuestos saturados; y un comportamiento intermedio en aceites de almendras y oliva. Esto podría indicar que la adición de licopeno en el aceite de linaza no podría tener una buena estabilidad, debido a que como mencionan Lavecchia y Zuorro (2006), las especies altamente reactivas como los radicales alquilo y peroxilo pueden interactuar con los carotenoides experimentando escisión, dando como resultados productos de degradación de licopeno, siendo los apolicopenales los principales productos de degradación. Sin embargo, en el rango de 40 a 120 ppm de licopeno se pudo observar un aumento de la estabilidad oxidativa en el aceite de linaza debido a la adición del antioxidante.

La mejora de la estabilidad oxidativa por la adición de licopeno también se ha reportado en otros aceites. Li *et al.* (2011) adicionaron 100, 200 y 400 ppm de licopeno al aceite de soya refinado, reportando que las tres concentraciones aumentaban el tiempo de inducción del aceite de soya medido por Rancimat, siendo el tiempo de inducción de la concentración de 100 ppm menor que la del aceite de soya con 200 ppm de BHT, pero el tiempo de inducción del aceite de soya con 200 ppm de BHT fue menor que la del aceite con 200 y 400 ppm de licopeno. Sin embargo, también se ha observado el efecto contrario, Omer *et al.* (2014) reportaron que la adición de 1000 ppm de licopeno en aceite refinado de girasol disminuyó hasta un 73.27 por ciento del valor de OSI medido por Rancimat del aceite sin antioxidante licopeno; de igual forma Kaur *et al.* (2015) reportaron el efecto prooxidante del licopeno en el aceite refinado de soya después de la adición de 100 y 200 ppm, concentraciones en las que el valor de OSI a 120 °C medido por Rancimat disminuyó significativamente respecto al control sin antioxidante.

El licopeno no es el único antioxidante que al ser incorporado en el aceite de linaza logra mejorar su estabilidad oxidativa, se han utilizado otros tipo de antioxidantes como los compuestos fenólicos, Michotte *et al.* (2011) utilizaron miricetina, (+)-catequina, genisteína y ácido cafeico en concentraciones de 555 µmol/kg en aceite de linaza refinado, encontrando que la miricetina retardaba más la disminución de ácido α -Linolénico. van Ruth *et al.* (2001) utilizaron un extracto metanólico de soya en aceite de linaza de Estados Unidos, logrando disminuir la cantidad de productos primarios de oxidación en un 30 por ciento, y productos

secundarios en un 99 por ciento mejorando la estabilidad del aceite. Asimismo, se ha reportado aceites de linaza comerciales enriquecidos con mezclas de tocoferoles en los cuales el valor de OSI era superior al aceite de linaza sin antioxidantes (Tańska *et al.*, 2016).

4.5. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES

En el Cuadro 13 se presentan los valores de los diferentes análisis de la caracterización de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno (cromatograma en Anexo 4).

Cuadro 13: Caracterización de los aceites de linaza y linaza con licopeno

ANÁLISIS	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO
Humedad (%)	0.52 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.01 ^b
Índice de refracción (20 °C)	1.481 ± 0.000 ^a	1.480 ± 0.000 ^b
Color (L*)	36.23 ± 0.35 ^a	20.97 ± 0.01 ^b
Color (a*)	-1.40 ± 0.26 ^a	5.21 ± 0.05 ^b
Color (b*)	24.43 ± 0.78 ^a	4.70 ± 0.02 ^b
Ácidos grasos libres (% ácido oleico)	0.48 ± 0.03 ^a	0.50 ± 0.02 ^a
Índice de peróxido (meq O ₂ /kg)	0.29 ± 0.04 ^a	0.30 ± 0.01 ^a
Índice de p-Anisidina	0.17 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.01 ^b
k ₂₃₂	1.21 ± 0.06 ^a	1.31 ± 0.02 ^b
k ₂₆₈	0.09 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3)

* Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0.05) según la prueba Student-Newman-Keuls

4.5.1. HUMEDAD

El aceite de linaza mostró un contenido de humedad de 0.52 ± 0.02 por ciento, el cual no presentó diferencia significativa (p > 0.05) respecto al valor de humedad de 0.61 ± 0.01 por ciento del aceite de linaza con licopeno (Anexo 5).

Tańska *et al.* (2016) reportaron valores de 0.13 a 0.75 por ciento de humedad en aceites de linaza comerciales de Polonia, mientras que Choo *et al.* (2007a) reportaron valores de 0.45 a 1.08 por ciento en aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda, encontrándose en estos rangos los valores de aceite de linaza y linaza con licopeno.

Un elevado contenido de humedad en el aceite de linaza puede ser perjudicial para la calidad del aceite debido a como mencionan Choo *et al.* (2007a), el agua contribuye a la hidrólisis en el manejo y procesamiento, generando ácidos grasos libres; inclusive puede llegar a ser

una interferencia para algunos análisis, por ejemplo, en el análisis de p-Anasidina la reacción entre la p-anisidina y los aldehídos da la formación de agua por lo que una elevada humedad en la muestra puede producir una reacción incompleta dando valores bajos (IUPAC, 1987) o inclusive valores negativos (Osawa *et al.*, 2008).

4.5.2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El aceite de linaza presentó un valor de índice de refracción medido a 20 °C de 1.481 ± 0.000 , el cual presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al valor de 1.480 ± 0.00 de índice de refracción a 20 °C del aceite de linaza con licopeno (Anexo 6).

Sin embargo, a pesar de existir diferencia significativa ($p < 0.05$), ambos valores se encuentran en el rango de 1.478 - 1.482 mencionado por Kochhar (2002) para aceite de linaza de alto linolénico. Asimismo, Przybylski (2005) menciona un valor de 1.475; y Zhang *et al.* (2011b) reportan un valor de 1.4791 para aceite de semillas de lino de variedades para fibra de China; siendo los valores de índice de refracción del aceite de linaza y linaza con licopeno superiores a los mencionados por los autores, pero similares al valor de 1.4805 para aceite de semillas de lino de variedades para aceite de China (Zhang *et al.*, 2011b). Además, debido a la dependencia con la temperatura (Tan y Nehdi, 2012), se ha reportado el índice de refracción del aceite de linaza en otras temperaturas como 25 °C (Firestone, 2013, Gunstone, 2013) y 40 °C (Bockisch, 1998, Firestone, 2013, Gunstone, 2013).

4.5.3. COLOR

Todos los parámetros del espacio de color CIELAB mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Anexos 7, 8 y 9) en los aceites de linaza y linaza con licopeno; siendo el aceite de linaza con licopeno el que mostró menos luminosidad, mayor tendencia al color rojo y menor tendencia al color amarillo.

El valor -1.40 ± 0.26 para el parámetro a^* en el aceite de linaza indica una pequeña tendencia al color verde, esto es debido a que el aceite de linaza presenta pequeñas cantidades de clorofila (Obranović *et al.*, 2015; Raczuk *et al.*, 2016; Symoniuk *et al.*, 2017). Con la adición del extracto de licopeno al aceite de linaza, este valor incrementó a 5.21 ± 0.005 , lo cual fue evidenciado por el color rojo que tomó el aceite de linaza. Sin embargo, el valor b^* disminuyó de 24.43 ± 0.78 a 4.70 ± 0.02 , lo cual fue evidenciado por la disminución del

color amarillo; y de la misma manera el valor L* disminuyó de 36.23 ± 0.35 a 20.97 ± 0.01 , indicando la disminución de la luminosidad en el aceite de linaza con licopeno.

Choo *et al.* (2007a) reportaron valores de 60.05 a 63.71 para el parámetro L*, 3.28 a 9.56 para el parámetro a*, y 91.08 a 99.80 para el parámetro b* en aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda, siendo valores superiores a los determinados en el aceite de linaza utilizado en la investigación. Los diferentes valores de cada parámetro del espacio de color CIELAB se deben a las diferentes concentraciones de los pigmentos del aceite de linaza, Tura *et al.*, citados por Symoniuk *et al.* (2017) mencionan que las diferencias en el contenido de los pigmentos clorofila y carotenoides se deben principalmente a las diferentes variedades y condiciones ambientales de cultivo. Además, existe otro tipo de aceite de linaza más claro, el cual es obtenido de linaza Solin, debido a que presenta un menor contenido de clorofila (Hosseinian *et al.*, citados por Nykter y Kymäläinen, 2006).

4.5.4. ACIDOS GRASOS LIBRES

El aceite de linaza presentó un contenido de ácidos grasos libres de 0.48 ± 0.03 por ciento de ácido oleico, el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el contenido de 0.50 ± 0.02 por ciento de ácido oleico del aceite de linaza con la adición de 80 ppm de licopeno (Anexo 10).

Esmailifard *et al.* (2017) reportaron un contenido de ácidos grasos libres de 0.74 por ciento de ácido oleico en aceite de linaza extra virgen y refinado de Irán; Mridula *et al.* (2015) reportaron valores altos de 1.07 a 2.70 por ciento de ácido oleico en aceite de linaza de la India extraído a temperaturas de 80 a 120 °C; Khattab y Zeitoun (2013) indicaron valores de 0.89, 0.96 y 0.94 por ciento de ácido oleico en aceites de linaza de Egipto obtenidos por extracción por soxhlet utilizando hexano, CO₂ supercrítico, y extracción acelerada con solventes, respectivamente; siendo los valores de los aceites de linaza y linaza con licopeno inferiores a los reportados por los diferentes autores mencionados, lo que indicaría una menor rancidez hidrolítica. Sin embargo, también se han reportado contenidos inferiores a los determinados en ambos aceites, Wiesenborn *et al.* (2005) reportaron contenidos de 0.05 hasta 0.10 por ciento de ácidos grasos libres en aceites de linaza prensados en frío y 0.12 por ciento de un aceite de linaza comercial de Estados Unidos; Esmailifard *et al.* (2017) indicaron un contenido de 0.07 por ciento de ácido oleico en aceite de linaza refinado de Irán; Zheng *et al.* (2003) indicaron valores entre 0.05 a 0.23 por ciento en aceites de linaza

tanto de variedades de linaza de color marrón como de color amarillo (omega) provenientes de Estados Unidos; Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) reportaron un contenido de 0.1 por ciento en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia.

Los diferentes valores referidos se deben a los diferentes métodos de extracción de los aceites, variedades y lugares donde fueron cultivadas las semillas de lino. Sin embargo, Herchi *et al.* (2012) mencionan que la mayor variación se debe a la madurez de la semilla, debido a que encontraron que a los 7 días después de la floración de las semillas, se obtuvo un aceite de 1.46 por ciento de ácidos grasos libres, valor que disminuyó hasta 0.34 por ciento después de 56 días después de la floración de las semillas.

4.5.5. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

El índice de peróxidos determinado en el aceite de linaza fue de 0.29 ± 0.04 meq de O_2/kg , el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el valor de 0.30 ± 0.01 meq de O_2/kg del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 11), siendo en ambos casos valores inferiores al límite de 15 meq de O_2/kg establecido por el Codex Alimentarius (2017a) para aceites prensados en frío.

En la literatura se han reportados valores peróxidos con una amplia diferencia entre cada autor, Esmailifard *et al.* (2017) indicaron valores de 3.60 y 3.10 meq de O_2/kg en aceite de linaza extra virgen refinado y en aceite de linaza refinado de Irán, respectivamente; Raczyk *et al.* (2016) reportaron valores de 0.48 a 1.63 meq de O_2/kg en aceites de linaza comerciales de Polonia; Wiesenborn *et al.* (2005) reportaron valores de 0.8 hasta 7.5 meq de O_2/kg en aceites de linaza prensados en frío y 0.2 meq de O_2/kg en aceite de linaza comercial de Estados Unidos; Zheng *et al.* (2003) reportaron valores entre 0.14 a 0.31 meq de O_2/kg en aceites de linaza tanto de variedades de linaza de color marrón como de color amarillo (omega) provenientes de Estados Unidos; Symoniuk *et al.* (2017) mencionan valores entre 1.23 y 4.50 meq de O_2/kg en aceites de linaza comerciales prensados en frío de Polonia; Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) reportaron un valor de 2.38 meq de O_2/kg en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia; Zhang *et al.* (2011b) reportan valores de 1.96 y 1.59 meq de O_2/kg para aceite de semillas de lino de variedades para fibra y variedades para aceites de China, respectivamente; Shadyro *et al.* (2017) reportaron valores de 0.75 a 1.28 meq de O_2/kg en aceites de linaza de Bielorrusia; Khattab y Zeitoun (2013) reportaron valores de 6.96, 5.42 y 7.20 meq de O_2/kg en aceites de semilla de linaza de Egipto obtenidos

por extracción por soxhlet utilizando hexano, CO₂ supercrítico, y extracción acelerada con solventes, respectivamente. En la mayoría de los casos los valores de índice de peróxidos reportados por los diferentes autores son superiores a los valores determinados en el aceite de linaza y linaza con licopeno, lo cual indicaría un menor contenido de compuestos de oxidación primaria como los hidroperóxidos en ambos aceites.

La diferencia entre los valores de índice de peróxido se deben principalmente al tipo de extracción del aceite de linaza debido a que algunos de los autores citados utilizan temperaturas elevadas en la extracción, lo que podría llevar a la formación de compuestos de oxidación primaria incrementando el índice de peróxidos. Otras razones que explican los diferentes valores mencionados son las diferentes variedades utilizadas y sus lugares de cultivo, asimismo, Herchi *et al.* (2012) mencionan que en la maduración de las semillas de lino, los valores de índice de peróxido del aceite obtenido aumentan y disminuyen conforme avanzan los días después de la floración de las semillas.

4.5.6. ÍNDICE DE P-ANISIDINA

El índice de p-Anisidina en el aceite de linaza fue de 0.17 ± 0.02 , el cual presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con el valor de 0.21 ± 0.01 del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 12).

A pesar de existir diferencia significativa ($p < 0.05$), ambos valores fueron menores en su mayoría a los reportados en otras investigaciones; Choo *et al.* (2007a) reportaron valores entre 0.36 a 0.74 en aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda; Raczyk *et al.* (2016) reportaron valores desde 0.28 a 1.50 para aceites de linaza comerciales de Polonia; Esmaeilifard *et al.* (2017) indicaron valores de 0.26 y 2.30 en aceite de linaza extra virgen refinado y en aceite de linaza refinado de Irán, respectivamente; Khattab y Zeitoun (2013) reportaron valores de 1.62, 1.68 y 1.66 en aceites de semilla de linaza de Egipto obtenidos por extracción por soxhlet utilizando hexano, CO₂ supercrítico, y extracción acelerada con solventes, respectivamente; Symoniuk *et al.* (2017) reportaron valores entre 0.07 a 1.43 en aceites de linaza comerciales prensados en frío de Polonia; Shadyro *et al.* (2017) reportaron valores de 0.45 a 1.14 en aceites de linaza de Bielorrusia.

Los valores bajos en el índice de p-Anisidina son típicos de aceites que fueron prensados en frío, debido a que no fueron expuestos a altas temperaturas en el momento de su extracción

(Raczyk *et al.*, 2016) lo cual indicaría que los aceites de linaza y linaza con licopeno presentan un bajo contenido de compuestos de oxidación secundaria, especialmente 2-alquenaes (Tańska *et al.*, 2016).

4.5.7. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k_{232})

El coeficiente de extinción medido a 232 nm (k_{232}) presentó un valor de 1.21 ± 0.06 en el aceite de linaza, el cual presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con el valor k_{232} de 1.31 ± 0.02 del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 13).

Se han reportado valores de k_{232} de 1.69 a 1.86 en muestras comerciales de aceite de linaza prensados en frío de Polonia (Tańska *et al.*, 2016); 2.38 en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia (Kostadinović Veličkovska *et al.*, 2015); 2.1 y 2.3 en aceites de linaza prensados en frío de Nueva Zelanda (Choo *et al.*, 2007b); siendo los valores determinados para los aceites de linaza y linaza con licopeno inferiores a los reportados por los autores, lo que indicaría una menor presencia de compuestos de oxidación primaria (Herchi *et al.*, 2012) como dienos conjugados (Tańska *et al.*, 2016).

La diferencia entre los valores k_{232} se debe a los diferentes procesos de extracción del aceite, variedad y lugares donde fueron cultivadas. Asimismo, Herchi *et al.* (2012) mencionan que el estado de madurez de la semilla con la que se extrae el aceite puede influir en el valor k_{232} , debido a que determinaron que el valor k_{232} disminuye de 2.74 a 1.92 entre los días 7 y 56 después de la floración de la semilla.

4.5.8. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k_{268})

El coeficiente de extinción medido a 268 nm (k_{268}) presentó un valor de 0.09 ± 0.01 en el aceite de linaza, el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el valor k_{268} de 0.10 ± 0.01 del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 14).

Se han reportado valores de k_{268} de 0.17 a 0.26 en muestras comerciales de aceite de linaza prensados en frío de Polonia (Tańska *et al.*, 2016); 0.23 en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia (Kostadinović Veličkovska *et al.*, 2015); 0.3 en valores k_{270} de aceites de linaza prensados en frío de Nueva Zelanda (Choo *et al.*, 2007b); siendo los valores determinados para los aceites de linaza y linaza con licopeno inferiores a los reportados por los autores, lo que indicaría una menor presencia de compuestos de oxidación secundaria

como compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas) (Herchi *et al.*, 2012) y trienos conjugados (Tańska *et al.*, 2016).

La diferencia entre los valores k_{268} se deben de igual manera a la de los valores k_{232} . Del mismo modo, Herchi *et al.* (2012) mencionan que el valor k_{270} disminuye con el estado de madurez de la semilla a la que se le extraerá el aceite, encontrando una disminución de 0.42 a 0.16 entre los días 7 y 56 después de la floración de la semilla.

4.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En el Cuadro 14 se muestran los resultados de la capacidad antioxidante de los aceites de linaza, linaza con 80 ppm de licopeno, y del extracto de licopeno, determinados por el método ABTS (curva de calibración en el Anexo 15).

Cuadro 14: Capacidad antioxidante por el método ABTS del aceite de linaza, linaza con licopeno y del extracto de licopeno

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	ACEITE DE LINAZA ($\mu\text{mol TE/g}$)	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO ($\mu\text{mol TE/g}$)	EXTRACTO DE LICOPENO ($\mu\text{mol TE/g}$)
Hidrofílica	0.57 ± 0.04^a	0.66 ± 0.01^b	-
Lipofílica	1.85 ± 0.05^a	2.67 ± 0.03^b	-
Total	2.48 ± 0.08^a	3.39 ± 0.01^b	14.46 ± 0.03

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar ($n = 3$)

* Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba Student-Newman-Keuls

El extracto de licopeno de tomate presentó un valor de capacidad antioxidante de $14.46 \pm 0.03 \mu\text{mol TE/g}$ de extracto, siendo superior al valor de capacidad antioxidante total del aceite de linaza. La incorporación del extracto de licopeno al aceite de linaza en un equivalente a 80 ppm de licopeno dio como resultado el incremento de la capacidad antioxidante, presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) en las capacidades antioxidantes hidrofílica, lipofílica y total (Anexos 16, 17 y 18).

Lenucci *et al.* (2010) caracterizaron la oleorresina obtenida en la extracción supercrítica de licopeno de tomate procedente de Italia, encontrando que aparte de licopeno, esta contenía otros carotenoides como el β -caroteno y la luteína. Sin embargo, el principal efecto antioxidante estaría dado por el licopeno debido a que como mencionan Choudhari y Singhal, citados por Konar *et al.* (2012), el licopeno es el carotenoide con mayor tasa de

inhibición del oxígeno singlete, por lo que estaría aportando mayor capacidad antioxidante en el extracto de licopeno.

La capacidad antioxidante hidrofílica del aceite de linaza fue de 0.57 ± 0.04 $\mu\text{mol TE/g}$, valor que incrementó a 0.66 ± 0.01 $\mu\text{mol TE/g}$ después de la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza. La capacidad antioxidante hidrofílica de los aceites está relacionada principalmente a los compuestos fenólicos (Herchi *et al.*, 2011), siendo estos muy importantes para la estabilidad oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados de aceites vegetales (Siger *et al.*, 2008). Kostadinović Veličkowska *et al.* (2015) reportaron un valor de 55.14 mg TE equivalente/kg medido al extracto metanólico obtenido del aceite de linaza, lo cual puede entenderse como capacidad antioxidante hidrofílica, este valor puede ser expresado como 0.22 $\mu\text{mol TE/g}$, siendo inferior a los valores determinados de capacidad antioxidante hidrofílica tanto del aceite de linaza como del aceite de linaza con licopeno.

La diferencia entre los resultados con los de la literatura en general se deben a que al no haber un procedimiento estandarizado en este ensayo al igual que en otros métodos que miden la capacidad antioxidante, los diferentes autores pueden seguir metodologías que difieren en el tiempo de reacción, estándar utilizado en la curva de calibración (Magalhães *et al.*, 2012), solvente empleado en la extracción de los antioxidantes (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008, Dawidowicz y Olszowy, 2013), la forma de preparar el radical ABTS^{•+} (Schaich y Xie, 2015), la absorbancia a la que es medida el ensayo (Arnao, 2000), o en la expresión de los resultados (Schaich *et al.*, 2015). Además, como mencionan Pérez-Jiménez *et al.* (2008) las capacidades antioxidantes de los aceites solo deben compararse cuando los análisis se han realizado utilizando el mismo medio de extracción y el mismo método de medición, razón por lo que cual puede existir una amplia diferencia entre los resultados obtenidos con los reportados en la literatura inclusive siendo el mismo ensayo.

La capacidad antioxidante lipofílica en el aceite de linaza fue de 1.85 ± 0.05 $\mu\text{mol TE/g}$, el cual, de igual manera que en la capacidad antioxidante hidrofílica, incrementó su valor a 2.67 ± 0.03 $\mu\text{mol TE/g}$ después de la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza. La capacidad antioxidante lipofílica en aceites vegetales está relaciona con el contenido de tocoferoles (El-Beltagi y Salama, 2011), los cuales desempeñan un rol importante en la estabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados de los aceites (Khattab y Zeitoun, 2013). Lenucci *et al.* (2010) mencionan que el licopeno posee sinergia con otros compuestos naturales como el α -tocoferol, por lo que este isómero de tocoferol presente en el aceite de

linaza podría estar ejerciendo el efecto sinérgico en el aceite de linaza con licopeno, lo que explicaría el aumento de la capacidad antioxidante lipofílica en este aceite. Aparte de los tocoferoles, Choo *et al.* (2007a) mencionan que el plastocromanol-8 es otro antioxidante lipofílico importante presente en el aceite de linaza, según Obranović *et al.* (2015) y Kostadinović Veličkovića *et al.* (2015) es el segundo tococromanol más abundante después del γ -tocoferol. Entre otros antioxidantes de naturaleza lipofílica se encuentran los carotenoides que actúan como antioxidantes atrapando los hidropéroxidos y deteniendo reacciones en cadena en la autooxidación (Obranović *et al.*, 2015).

Las capacidades antioxidantes lipofílicas determinadas en los aceites de linaza y linaza con licopeno es mayor a sus capacidades antioxidantes hidrofílicas, esta tendencia ha sido reportada del mismo modo en otros aceites como en los aceites de nuez, almendras, avellanas, cacahuete y pistacho (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008), así como también en aceites de uva, maíz, maní, calabaza, colza, soya, girasol y oliva (Tuberoso *et al.*, 2007), en ambos casos determinados por el ensayo DPPH, el cual presenta similar mecanismo de acción que el ensayo ABTS (Craft *et al.*, 2012).

Las capacidades antioxidantes totales en las muestras de aceite de linaza y linaza con licopeno fueron de 2.48 ± 0.08 y 3.39 ± 0.01 $\mu\text{mol TE/g}$, respectivamente; siendo estos valores superiores a los determinados por la suma de las partes hidrofílicas y lipofílicas en ambos aceites. Debido al efecto en conjunto de todos los antioxidantes presentes en una matriz, se puede obtener como resultado una notable sinergia entre estos (Lenucci *et al.*, 2010, Shadyro *et al.*, 2017), lo cual podría indicar que al estar juntas las partes hidrofílicas y lipofílicas en los aceites de linaza y linaza con licopeno, estarían ejerciendo un efecto sinérgico que incrementaría sus capacidades antioxidantes.

Tanto la capacidad antioxidante hidrofílica como lipofílica en ambos aceites mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) (Anexos 16 y 17), para poder dar una mejor explicación de este cambio se evaluaron los cambios en los antioxidantes hidrofílicos (polifenoles totales) y lipofílicos (tocoferoles). Sin embargo, no son los únicos compuestos bioactivos que pueden encontrarse en el aceite de linaza, se ha reportado que también posee esteroides (β -sitosterol, cicloartenol, campesterol, Δ^5 -avenasterol, estigmasterol), escualeno y carotenoides (Tańska *et al.*, 2016); siendo el contenido de esta diversidad de compuestos antioxidantes naturales y la sinergia que existe entre ellos lo que brinda la capacidad antioxidante total al aceite de linaza prensado en frío.

4.7. EVALUACIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES EN LOS ACEITES

En el Cuadro 15 se muestran los contenidos de polifenoles totales en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, determinados por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (curva de calibración en Anexo 19).

Cuadro 15: Polifenoles totales en los aceites de linaza y linaza con licopeno

MUESTRA	POLIFENOLES TOTALES (mg GAE/kg)
Aceite de Linaza	56.39 ± 2.73 ^a
Aceite de Linaza con Licopeno	55.16 ± 1.76 ^a

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3)

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencia significativa (p < 0.05) según la prueba Student-Newman-Keuls

El aceite de linaza presentó un valor de 56.39 ± 2.73 mg GAE/kg, el cual no presentó diferencia significativa (p > 0.05) con el valor de 55.16 ± 1.76 mg GAE/kg en el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 20). Esto se puede explicar por la naturaleza del licopeno, el cual al ser un carotenoide estaría brindando antioxidantes de tipo lipofílicos al aceite de linaza.

Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) reportaron un contenido de 72.54 mg GAE/kg en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia; Herchi *et al.* (2016) indicaron un contenido de 84 mg GAE/kg en aceite de cáscaras de linaza de Túnez; Zhang *et al.* (2011b) reportaron valores de 76.33 y 114.67 mg GAE/kg para aceite de semillas de lino de variedades para fibra y variedades para aceites de China, respectivamente; siendo estos valores superiores a los reportados tanto para el aceite de linaza como para el aceite de linaza con licopeno.

El contenido bajo de polifenoles totales puede deberse a que como mencionan Khattab y Zeitoun (2013), tanto el secoisolariciresinol diglicósido (SDG) como algunos ácidos fenólicos encontrados en las semillas de lino, no se extraen fácilmente ya sea por prensado en frío o con hexano, quedando retenidos en las cáscaras de las semillas. Los mismos autores mencionan que el aceite de linaza extraído con CO₂ supercrítico y utilizando etanol como cosolvente, presentó un mayor valor de compuestos fenólicos, esto debido al uso del solvente polar que facilita su extracción dando como resultado un aceite con mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en comparación con otros métodos de extracción. Además, Gunstone (2013) menciona que los aceites prensados pueden llegar a

tener un mayor contenido de compuestos fenólicos que los aceites extraídos con solventes, como el hexano, debido a la naturaleza polar de los compuestos fenólicos.

Las diferencias entre los resultados con las de otras investigaciones dependen mucho de la forma de extracción de los compuestos fenólicos del aceite, y la metodología para cuantificarlos. Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) extrajeron los compuestos fenólicos con metanol 80 por ciento (v/v), y la lectura de absorbancia de la reacción fue a las tres horas de haberse iniciado; Herchi *et al.* (2016) utilizaron metanol 60 por ciento (v/v) en la extracción de compuestos fenólicos, y la lectura de absorbancia fue pasada una hora de reacción; mientras que en el ensayo realizado para la determinación de polifenoles totales del aceite de linaza y linaza con licopeno se utilizó metanol 60 por ciento (v/v) en la extracción de compuestos fenólicos, y un tiempo de reacción de una hora. Además, el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con muchos compuestos no fenólicos, como el ácido ascórbico, que tienen la capacidad de reducir el ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico a un complejo azul, lo cual podría generar una sobreestimación de resultados por este método (Padda y Picha, citados por Herchi *et al.*, 2011). Asimismo, Herchi *et al.* (2011) indican que el contenido de polifenoles totales con el pasar de los días después de la floración de la semilla comienza a disminuir, por lo que la maduración de las semillas es otro factor a considerar en los diferentes valores reportados en la literatura.

Al igual que en el ensayo de ABTS, en el ensayo de Folin-Ciocalteu también influyen en los resultados el tiempo de reacción y el estándar utilizado en la metodología, por lo que estos son otros factores que ocasionan las grandes variaciones en los resultados al compararlos con la literatura (Magalhães *et al.*, 2012). En las diferentes investigaciones, no solo se ha reportado el contenido de polifenoles totales como equivalente de ácido gálico, sino también como equivalentes a ácido ferúlico (Symoniuk *et al.*, 2017; Choo *et al.*, 2007a, 2007b), D-catequina (Tańska *et al.*, 2016), y ácido cafeico (Herchi *et al.*, 2011, Siger *et al.*, 2008), debido a los diferentes compuestos fenólicos reportados en el aceite de linaza. Herchi *et al.* (2011) mencionan que entre los principales compuestos fenólicos en aceite de linaza de Túnez se encuentran los lignanos como el difillin, secoisolariciresinol, matairesinol y pinoresinol; y ácidos fenólicos como el ácido vanílico, ácido ferúlico y vainillina. Asimismo, Khattab y Zeitoun (2013) mencionan la presencia de secoisolariciresinol diglicósido (SDG) y algunos ácidos fenólicos como el ácido p-hidroxibenzoico, trans sinápico, y trans-p-cumárico en aceite de linaza de Egipto.

4.8. EVALUACIÓN DE TOCOFEROLES DE LOS ACEITES

En el Cuadro 16 se muestran los contenidos de los cuatro isómeros de tocoferol (α , β , γ , δ) en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, determinados por HPLC (cromatogramas en Anexos 21 y 22).

Cuadro 16: Contenido de tocoferoles en los aceites de linaza y linaza con licopeno

ISÓMERO DE TOCOFEROL	ACEITE DE LINAZA (mg/100 g)	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO (mg/100 g)
α -tocoferol	0.35 \pm 0.00 ^a	1.56 \pm 0.02 ^b
β -tocoferol	0.59 \pm 0.00 ^a	0.60 \pm 0.03 ^a
γ -tocoferol	57.15 \pm 2.51 ^a	56.08 \pm 2.01 ^a
δ -tocoferol	0.78 \pm 0.11 ^a	0.68 \pm 0.03 ^a

* Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n = 2)

* Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0.05) según la prueba Student-Newman-Keuls

El contenido del α -tocoferol fue de 0.35 \pm 0.00 mg/100 g en el aceite de linaza, el cual presentó diferencia significativa (p < 0.05) con el contenido de 1.56 \pm 0.02 mg/100 g del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 23).

Obranović *et al.* (2015) reportaron un contenido de 0.3 mg de α -tocoferol/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Croacia; Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) indicaron un contenido de 0.2 mg/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia, siendo valores cercanos al determinado para el aceite de linaza; Tuberoso *et al.* (2007) reportaron un valor de 0.95 mg/100 g de aceite de linaza prensado en frío de Polonia, Bozan y Temelli (2008) indicaron un valor de 0.59 mg/100 g en aceite de linaza de Turquía, siendo valores superiores al del aceite de linaza, pero inferiores al valor del aceite de linaza con licopeno; mientras que Shadyro *et al.* (2017) reportan valores superiores de 0.78 a 2.30 mg/100 g en aceites de linaza de Bielorrusia; Choo *et al.* (2007a) indicaron valores de 0.50 a 9.11 mg/100 g en aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda, rangos en el que se encuentra el aceite de linaza con licopeno. Sin embargo, Gliszczyńska-Świgło *et al.* (2007) no detectaron la presencia del α -tocoferol en aceite de linaza prensado en frío de Polonia; de igual forma, Choo *et al.* (2007a) no lo detectaron en algunos aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda.

Las diferencias entre los contenidos de α -tocoferol del aceite de linaza con los citados en las investigaciones mencionadas pueden deberse a la maduración de las semillas, debido a que

como mencionan Obranović *et al.* (2015), el α -tocoferol aumenta con la temperatura y luz solar durante la maduración de la semilla, y disminuye con el aumento de lluvias.

El contenido del γ -tocoferol fue de 57.15 ± 2.51 mg/100 g en el aceite de linaza, el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el contenido de 56.08 ± 2.01 mg/100 g del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 24), siendo en ambos casos el isómero de tocoferol con mayor presencia en el aceite. Además, Esmailifard *et al.* (2017) mencionan que las propiedades antioxidantes del aceite de linaza son debidas al alto contenido de γ -tocoferol que contienen.

Bozan y Temelli (2008) reportaron un contenido de 75.67 mg/100 g de γ -tocoferol/100 g en aceites de linaza de Turquía; Shadyro *et al.* (2017) reportan valores de 46.17 a 65.32 mg/100 g en aceites de linaza de Bielorrusia, siendo los contenidos de γ -tocoferol del aceite de linaza y linaza con licopeno en su mayoría superiores a los referidos en las investigaciones mencionadas, pero cercanos al valor de 57.5 mg/100 g reportado por Tuberoso *et al.* (2007) en aceite de linaza prensado en frío de Polonia. Asimismo, se han reportado contenidos inferiores a los determinados en la investigación; Choo *et al.* (2007a) indicaron valores de 10.56 a 15.00 mg/100 g en aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda; Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) reportaron un contenido de 40.4 mg/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia; Obranović *et al.* (2015) reportaron un contenido de 51.8 mg/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Croacia; Daun *et al.*, citados por Nykter y Kymäläinen (2006) reportan valores de γ -tocoferol entre 8.5 a 39.5 mg/100 g.

Las diferencias entre los contenidos de γ -tocoferol, al igual que en el α -tocoferol, pueden deberse a la maduración de las semillas. Obranović *et al.* (2015) mencionan que las semillas de lino sembradas en Croacia al aumentar la temperatura y luz solar dieron un aceite con un mayor contenido de γ -tocoferol en comparación con las semillas que durante su maduración estuvieron en presencia de lluvias.

El contenido del δ -tocoferol fue de 0.78 ± 0.11 mg/100 g en el aceite de linaza, el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el contenido de 0.68 ± 0.03 mg/100 g del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 25).

Tuberoso *et al.* (2007) reportaron un valor de 0.41 mg de δ -tocoferol/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Polonia; Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) indicaron un

contenido de 0.4 mg/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Macedonia, siendo los valores determinados de δ -tocoferol del aceite de linaza y linaza con licopeno superiores, pero inferiores al rango de 0.8 a 1.66 mg/100 g en aceites de linaza de Bielorrusia reportados por Shadyro *et al.* (2017), y al contenido de 5.2 mg/100 g en aceite de linaza prensado en frío de Polonia indicado por Gliszczyńska-Świąło *et al.* (2007). La diferencia entre los valores de δ -tocoferol se deben a las diferentes condiciones de maduración de las semillas de lino, la disminución de la luz solar y lluvia da como resultado el aumento de δ -tocoferol (Obranović *et al.* (2015).

El contenido del β -tocoferol fue de 0.59 ± 0.00 mg/100 g en el aceite de linaza, el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el contenido de 0.60 ± 0.03 mg/100 g del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 26).

En la mayoría de investigaciones, el contenido de β -tocoferol es el más bajo entre los isómeros de tocoferol del aceite de linaza, sin embargo, en el aceite de linaza utilizado en la investigación se determinó un mayor contenido β -tocoferol que de α -tocoferol. Kostadinović Veličkovska *et al.* (2015) y Bozan y Temelli (2008) no detectaron la presencia del β -tocoferol en aceites de linaza prensado en frío de Macedonia y aceites de linaza de Turquía, respectivamente. En algunas investigaciones es común reportar el contenido del β -tocoferol en adición con el γ -tocoferol (Gliszczyńska-Świąło *et al.*, 2007, Khattab y Zeitoun, 2013) debido a que estos isómeros no se pueden separar completamente mediante la cromatografía líquida en fase reversa, siendo su separación más fácil en columnas de fase normal (Abidi, citados por Khattab y Zeitoun, 2013).

Las grandes variaciones entre el contenido de los diferentes isómeros de tocoferol reportados en la literatura podrían deberse a los diferentes lugares de cosecha y variedades, tecnologías de extracción o tiempo de almacenamiento de los aceites (Tańska *et al.*, 2016, Obranović *et al.*, 2015), o tratamientos posteriores a la extracción de aceite como la desodorización del aceite, la cual puede llevar a una pérdida del contenido de tocoferoles que puede variar de 19.8 a 51.2 por ciento dependiendo de las condiciones utilizadas (O'Brien, 2009).

Rozzi *et al.* (2002) reportaron que el extracto obtenido de la extracción de licopeno de semillas y cáscara de tomate de Estados Unidos con CO₂ supercrítico, aparte de licopeno contenía α -tocoferol y β -caroteno. Esto podría explicar el aumento del contenido de α -tocoferol en el aceite de linaza al adicionar el extracto de licopeno, y la razón por la cual no

se observó diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de los demás isómeros de tocoferoles en los aceites de linaza y linaza con licopeno.

4.9. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

En el Cuadro 17 se muestra el perfil de ácidos grasos de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, determinados por cromatografía de gases (cromatogramas en Anexos 27 y 28).

Cuadro 17: Perfil de ácidos grasos de los aceites de linaza y linaza con licopeno

ÁCIDO GRASO	ACEITE DE LINAZA (%)	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO (%)
C 16:0 (Palmítico)	4.70 ± 0.06 ^a	4.81 ± 0.04 ^a
C 18:0 (Estearico)	4.14 ± 0.01 ^a	4.10 ± 0.03 ^a
C 18:1 (ω9) (Oleico)	19.12 ± 0.14 ^a	19.26 ± 0.01 ^a
C 18:1 (ω7) (Vaccénico)	0.59 ± 0.10 ^a	0.66 ± 0.00 ^a
C 18:2 (ω6) (Linoleico)	15.40 ± 0.03 ^a	15.74 ± 0.00 ^b
C 18:3 (ω3) (α-Linolénico)	55.90 ± 0.25 ^a	55.29 ± 0.01 ^a
C 20:0 (Araquídico)	0.15 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.00 ^a

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

* Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba Student-Newman-Keuls

El ácido graso principal fue el α-Linolénico en ambos aceites, con un contenido de 55.90 ± 0.25 por ciento en el aceite de linaza, el cual no mostró diferencia significativamente ($p > 0.05$) con el contenido de 55.29 ± 0.01 por ciento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 29).

Los valores obtenidos para el ácido α-Linolénico son similares a los reportados en diferentes estudios. Anastasiu *et al.* (2016) estudiaron el perfil de ácidos grasos de aceites obtenidos de diferentes cultivares de linaza de Rumania, reportando valores desde 47.50 a 64.10 por ciento; Shadyro *et al.* (2017) reportaron valores entre 48.99 a 63.76 por ciento en aceites de linaza de Bielorrusia; Raczyk *et al.* (2016) indicaron valores entre 44.86 a 60.67 por ciento en aceites de linaza de Polonia; Choo *et al.* (2007a) mencionaron valores de 51.80 a 60.42 por ciento en aceites de linaza comerciales de Nueva Zelanda; Symoniuk *et al.* (2017) reportaron valores entre 44.90 a 64.62 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia; Symoniuk *et al.* (2016b) indicaron valores entre 55.35 a 56.33 por ciento en aceites de linaza

de Polonia; Kostadinović Veličkowska *et al.* (2015) reportaron un valor de 55.14 por ciento en aceite de linaza de Macedonia; Bozan y Temelli (2008) mencionaron un contenido de 58.31 por ciento en aceites de linaza de Turquía; Zhang *et al.* (2011b) indicaron un contenido de 58.03 por ciento para aceite de semillas de lino de variedades para aceites de China, los valores de aceite de linaza y linaza con licopeno se encuentran en los rangos mencionados por los autores. Sin embargo, en algunas investigaciones se reportan valores más bajos, Herchi *et al.* (2016) indicaron un contenido de 47.19 por ciento en aceite de cáscaras de linaza de Túnez; Zhang *et al.* (2011b) reportaron un contenido de 47.37 por ciento para aceite de semillas de lino de variedades para fibra de China; Tańska *et al.* (2016) reportan valores entre 36.66 a 53.19 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia. Asimismo, existen aceites donde se ha modificado el contenido de este ácido graso, reportándose desde valores de 1.6 hasta 39.1 por ciento (Nykter y Kymäläinen, 2006).

El contenido de 55.90 ± 0.25 por ciento de ácido linoleico del aceite de linaza fue el único ácido graso que presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al contenido de 55.29 ± 0.01 por ciento de ácido linoleico del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 30). El contenido de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, vaccénico y araquídico del aceite de linaza no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) con el contenido de estos ácidos grasos en el aceite de linaza con licopeno (Anexos 31, 32, 33, 34 y 35).

Anastasiu *et al.* (2016) indicaron diferentes valores para los ácidos grasos palmítico (4.07 a 6.02 por ciento), esteárico (2.44 a 4.79 por ciento), oleico (14.38 a 27.76 por ciento), linoleico (13.84 a 18.87 por ciento) y araquídico (trazas hasta 0.12 por ciento) en aceites obtenidos de diferentes cultivares de linaza de Rumania; rangos y contenidos similares son reportados por diferentes autores (Choo *et al.*, 2007a, Bozan y Temelli, 2008, Zhang *et al.*, 2011b, Khattab y Zeitoun, 2013, Kostadinović Veličkowska *et al.*, 2015, Herchi *et al.*, 2016, Raczyk *et al.*, 2016, Symoniuk *et al.*, 2016b, Tańska *et al.*, 2016, Shadyro *et al.*, 2017, Symoniuk *et al.*, 2017); y los cuales son similares en su mayoría a los valores determinados para los aceites de linaza y linaza con licopeno.

Las diferencias en el perfil de ácidos grasos citados por los autores mencionados se debe a las diferentes variedades de linaza utilizadas en los estudios (Symoniuk *et al.*, 2017). Sin embargo, no solo los diferentes cultivares pueden ocasionar diferencias en los contenidos de cada ácido graso, también depende mucho de las condiciones de temperatura y niveles de precipitación del año en que fueron cultivadas las semillas (Anastasiu *et al.*, 2016). Nykter

y Kymäläinen (2006) mencionan que los aceites con más contenido de α -Linolénico se encuentran en semillas de lino cultivadas en latitudes septentrionales, por lo que la región donde son cultivadas también influye en el contenido de este ácido graso.

Esmailifard *et al.* (2017) indicaron valores de 40.25 y 39.92 por ciento de ácido α -Linolénico en aceite de linaza extra virgen refinado y en aceite de linaza refinado de Irán, respectivamente, siendo valores inferiores a los determinados en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno; sin embargo, el contenido de ácido oleico fue de 25.84 y 28.24 por ciento en los mismos aceites, respectivamente, los cuales son valores superior a los encontrados en los aceites estudiados. Esta tendencia también se ha reportado por Choo *et al.* (2007a) quienes mencionan que cuando existe una disminución del contenido de ácido α -Linolénico en el aceite de linaza, el contenido de ácido oleico aumenta, y viceversa. Esto se puede observar en menor medida con la adición del licopeno al aceite de linaza, a pesar de no existir diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el contenido de estos ácidos grasos (Anexos 29 y 33).

El tipo de extracción también influye en el perfil de ácidos grasos, Bozan y Temelli, citados por Ganorkar y Jain (2013) encontraron que el contenido del ácido graso α -Linolénico en el aceite de linaza extraído con CO₂ supercrítico era superior al del aceite extraído por soxhlet; del mismo modo Khattab y Zeitoun (2013) a pesar de obtener un menor rendimiento en la extracción de aceite de linaza de Egipto con CO₂ supercrítico en comparación con la extracción acelerada con solventes y extracción por soxhlet utilizando hexano, el aceite obtenido presentó un mayor contenido de α -Linolénico que el aceite extraído por los otros métodos.

Rozzi *et al.* (2002) mencionan que en la extracción de licopeno a partir de semillas y cáscara de tomate de Estados Unidos con CO₂ supercrítico obtuvieron un extracto en cuyo perfil de ácidos grasos predominaban el palmítico (21.58 por ciento) y linoleico (47.19 por ciento); esto podría explicar la diferencia significativa ($p < 0.05$) encontrada en el ácido linoleico entre ambos aceites (Anexo 30), por lo que sería mayor en el aceite de linaza con licopeno debido a que posiblemente el ácido linoleico sea el ácido graso predominante en el extracto de licopeno de tomate obtenido.

En el Cuadro 18 se muestra el porcentaje de los tipos de ácidos grasos presentes en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno.

Cuadro 18: Tipos de ácidos grasos de los aceites de linaza y linaza con licopeno

TIPO DE ÁCIDO GRASO	ACEITE DE LINAZA (%)	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO (%)
Saturados	8.99 ± 0.05 ^a	9.05 ± 0.01 ^a
Monoinstaruados	19.71 ± 0.24 ^a	19.92 ± 0.01 ^a
Poliinsaturados	71.30 ± 0.28 ^a	71.03 ± 0.01 ^a

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

* Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0.05) según la prueba Student-Newman-Keuls

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados fue de 71.30 ± 0.28 por ciento en el aceite de linaza, el cual no mostró diferencia significativamente (p > 0.05) con el contenido de 71.03 ± 0.01 por ciento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 36). Este tipo de ácidos grasos fue el que predominó en ambos aceites, siendo el ácido graso α -Linolénico el de mayor contenido en este grupo, y la razón del elevado interés del aceite de linaza en diferentes industrias.

Raczyk *et al.* (2016) reportaron valores de 65.26 a 76.35 por ciento de ácidos grasos poliinsaturados en aceites de linaza comerciales de Polonia; Shadyro *et al.* (2017) indicaron valores entre 65.54 a 79.03 por ciento en aceites de linaza de Bielorrusia; Symoniuk *et al.* (2017) mencionan valores entre 65.30 a 77.42 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia; Symoniuk *et al.* (2016b) reportaron valores entre 70.88 a 72.35 por ciento en aceites de linaza de Polonia; Khattab y Zeitoun (2013) reportaron valores de 71.88, 72.96 y 72.08 por ciento en aceites de semilla de linaza de Egipto obtenidos por extracción por soxhlet utilizando hexano, CO₂ supercrítico, y extracción acelerada con solventes, respectivamente, rango y valores similares a los contenidos de ácidos grasos poliinsaturados determinados en los aceites de linaza y linaza con licopeno. Sin embargo, se han reportado contenidos inferiores, Esmailifard *et al.* (2017) indicaron valores de 59.14 y 57.41 por ciento de ácidos grasos poliinsaturados en aceite de linaza extra virgen refinado y en aceite de linaza refinado de Irán, respectivamente; Herchi *et al.* (2016) indicaron un contenido de 60.91 por ciento en aceite de cáscaras de linaza de Túnez; Tańska *et al.* (2016) reportan valores entre 52.09 a 70.72 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia.

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados fue de 19.71 ± 0.24 por ciento en el aceite de linaza, el cual no mostró diferencia significativamente (p > 0.05) con el contenido de 19.92 ± 0.01 por ciento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 37). Entre los

ácidos grasos monoinsaturados determinados en ambos aceites se encuentran el palmítico, esteárico y araquídico.

Raczyk *et al.* (2016) mencionaron contenidos entre 15.21 a 23.29 por ciento de ácidos grasos monoinsaturados en aceites de linaza de Polonia; Symoniuk *et al.* (2017) reportaron valores entre 12.21 a 23.76 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia; Tańska *et al.* (2016) reportan valores entre 17.39 a 29.66 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia, entrándose en estos rangos los contenidos determinados de ácidos grasos monoinsaturados de los aceites de linaza y linaza con licopeno. Sin embargo, fueron inferiores a los valores de 25.84 y 28.24 por ciento en aceite de linaza extra virgen refinado y en aceite de linaza refinado de Irán, respectivamente (Esmaeilifard *et al.*, 2017); 26.33 por ciento en aceite de cáscaras de linaza de Túnez (Herchi *et al.*, 2016); y superiores los contenidos entre 17.61 a 18.33 por ciento en aceites de linaza de Polonia (Symoniuk *et al.*, 2016b); 18.30, 18.82 y 18.41 por ciento en aceites de semilla de linaza de Egipto obtenidos por extracción por soxhlet utilizando hexano, CO₂ supercrítico, y extracción acelerada con solventes, respectivamente (Khattab y Zeitoun, 2013).

Tańska *et al.* (2016) mencionan que la variación en el contenido de ácidos grasos se debe principalmente a las variedades utilizadas, y las condiciones climáticas, siendo los climas más fríos en donde se obtienen mayores contenidos de ácidos grasos insaturados. El elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de α -Linolénico, es la razón principal de la alta susceptibilidad a la oxidación del aceite de linaza, debido a que se oxida y polimeriza fácilmente en presencia de oxígeno, luz y temperaturas elevadas (Tostenson *et al.*, 2004), lo que lo conduce a un sabor y olor desagradable (Nykter y Kymäläinen, 2006).

El contenido de ácidos grasos saturados fue de 8.99 ± 0.05 por ciento en el aceite de linaza, el cual no mostró diferencia significativamente ($p > 0.05$) con el contenido de 9.05 ± 0.01 por ciento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 38). Entre los ácidos grasos saturados determinados en ambos aceites se encuentran el palmítico, esteárico y araquídico. Sin embargo, en otras investigaciones se han reportado cantidades trazas de ácidos mirístico, behénico y lignocérico en el aceite de linaza (Choo *et al.*, 2007a, Khattab y Zeitoun, 2013, Kostadinović Veličkovska *et al.*, 2015, Anastasiu *et al.*, 2016, Raczyk *et al.*, 2016, Tańska *et al.*, 2016).

Raczyk *et al.* (2016) reportaron valores de 8.40 a 11.40 por ciento de ácidos grasos saturados en aceite de linaza de Polonia; Symoniuk *et al.* (2017) indicaron valores entre 8.54 y 11.05 por ciento en aceite de linaza comercial de Polonia; Khattab y Zeitoun (2013) mencionan valores de 9.82, 8.22 y 9.51 por ciento en aceites de semilla de linaza de Egipto obtenidos por extracción por Soxhlet utilizando hexano, CO₂ supercrítico, y extracción acelerada con solventes, respectivamente; Zhang *et al.* (2011b) reportaron un contenido de 8.52 para aceite de semillas de lino de variedades para aceites de China, siendo los rangos y valores similares a los valores determinados tanto en el aceite de linaza como el de linaza con licopeno. Sin embargo, en algunas investigaciones se determinaron valores más altos de ácidos grasos saturados, Esmailifard *et al.* (2017) indicaron valores de 13.64 y 13.69 por ciento de ácidos grasos saturados en aceite de linaza extra virgen refinado y en aceite de linaza refinado de Irán, respectivamente; Herchi *et al.* (2016) indicaron un contenido de 11.37 por ciento en aceite de cáscaras de linaza de Túnez; Symoniuk *et al.* (2016b) reportaron valores entre 9.79 a 10.41 por ciento en aceites de linaza de Polonia; Tańska *et al.* (2016) reportan valores entre 11.90 a 19.06 por ciento en aceites de linaza comerciales de Polonia; Zhang *et al.* (2011b) mencionan un contenido de 15.55 para aceite de semillas de lino de variedades para fibra de China.

4.10. PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL POR RANCIMAT

En el Cuadro 19 se muestran los índices de estabilidad oxidativa (OSI) de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno medidos a las temperaturas de 90, 100 y 110 °C por el equipo Rancimat.

Cuadro 19: Valores de OSI (h) para la predicción de vida útil

TEMPERATURA (°C)	ÍNDICE DE ESTABILIDAD OXIDATIVA (OSI)	
	ACEITE DE LINAZA (h)	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO (h)
90	11.24 ± 0.02 ^a	14.72 ± 0.06 ^b
100	4.07 ± 0.01 ^a	6.40 ± 0.05 ^b
110	2.18 ± 0.05 ^a	2.91 ± 0.07 ^b

* Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 3)

* Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencia significativa (p < 0.05) según la prueba Student-Newman-Keuls

Los valores de OSI a 90, 100 y 110 °C del aceite de linaza presentaron diferencia significativamente ($p < 0.05$) con los valores de OSI del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno (Anexo 39, 40 y 41). Esto se puede evidenciar con el aumento de los valores de OSI por la adición del licopeno en 80 ppm al aceite de linaza en todas las temperaturas de trabajo, logrando retardar la oxidación del aceite de linaza. Asimismo, conforme aumenta la temperatura de trabajo los valores de OSI disminuyen en ambos aceites; Zhang *et al.* (2013) reportaron una degradación más rápida del ácido α -Linolénico al aumentar la temperatura de calentamiento del aceite de linaza, esta disminución se ve reflejada en la disminución de la relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados, razón por la cual los valores de OSI son cada vez menores al incrementar la temperatura de la prueba.

Symoniuk *et al.* (2016b) reportaron valores de OSI de 7.47 a 9.20, 3.84 a 4.65, y 1.43 a 1.52 horas medidos a 90, 100 y 110 °C, respectivamente en aceites de linaza de Polonia prensados en frío; Raczyk *et al.* (2016) reportaron valores de 3.47 a 5.63 horas medidos a 100 °C para aceites de linaza comerciales de Polonia; Shadyro *et al.* (2017) reportaron valores de 3.51 a 7.90 horas medidos a 100 °C para aceites de linaza de Bielorrusia; siendo en su mayoría valores inferiores a los determinados tanto en los aceites de linaza y linaza con licopeno.

Las diferencias entre los valores de OSI de las diferentes investigaciones mencionadas se deben a la diferente composición de ácidos grasos de cada aceite de linaza estudiado (Raczyk *et al.*, 2016), debido a que Shadyro *et al.* (2017) reportaron que los valores de OSI aumentaban en aceites de linaza de Bielorrusia cuyo contenido de ácido α -Linolénico era menor; o del estado del aceite en el momento de su análisis, debido a que el valor de OSI determinado mediante el método Rancimat corresponde con el final de la etapa de propagación y el inicio de la etapa de terminación de la oxidación del aceites (Symoniuk *et al.*, 2017), por lo que si el aceite analizado ya tiene cierto nivel de rancidez dará valores de OSI menores.

Schaich (2016) menciona que a temperaturas elevadas como 120 °C, los valores de OSI pueden ser demasiado cortos para ser medidos con precisión. En general, los valores de OSI no deberían ser inferiores a 0.5 h, e idealmente, deben ser de al menos 2 h para minimizar la desviación entre los análisis (Verleyen *et al.*, 2005); lo cual concuerda con las temperaturas de 90, 100 y 110 °C utilizadas para la extrapolación de vida útil. Además, Symoniuk *et al.* (2016b) reportaron valores de OSI de 0.14 a 0.16 min y 33.62 a 39.04 h, medidos a 140 y 70

°C, respectivamente, siendo estos valores no recomendados al momento de realizar la extrapolación de la vida útil por Rancimat (Cabré Cabré y Massó Maresch, 1992).

El Cuadro 20 muestra la vida útil predicha a 25 °C de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno por el equipo Rancimat, obtenida por extrapolación del valor de OSI a 25 °C en la gráfica que relaciona el logaritmo de los valores de OSI con las temperaturas del ensayo (Anexos 42 y 43).

Cuadro 20: Vida útil extrapolada a 25 °C por Rancimat

MUESTRA	VIDA ÚTIL A 25 °C (DÍAS)
Aceite de Linaza	90.60
Aceite de Linaza con Licopeno	118.76

La adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza logró incrementar la vida útil predicha a 25 °C del aceite de linaza de un valor de 90.60 a 118.76 días, lo cual representa un incremento del 31.08 de la vida útil predicha. Sin embargo, estos valores fueron menores a los reportados por Arias Nuñuvero y López Carranza (2015), quienes indicaron una vida útil predicha a 25 °C de 134 y 100 días en aceite de linaza de Perú proveniente de Corongo (Ancash) y Otuzco (La Libertad), respectivamente; los mismos autores reportaron una mayor vida útil predicha a 25 °C con la disminución de 20 a 15 L/h de flujo de aire en el ensayo, llegando a tiempos de 159 y 124 días en los aceites de linaza de Corongo (Ancash) y Otuzco (La Libertad), respectivamente. Las diferencias pueden deberse al uso de diferentes velocidades de flujo de aire, o al menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las muestras de aceite (Symoniuk *et al.*, 2016b).

La extrapolación para predecir la vida útil de aceites ha sido estudiada en diferentes tipos de aceites como el de soya refinada (Farhoosh, 2007b), colza (Matthäus, 2010), pistacho (Dini *et al.*, 2016); en cuales se extrapoló la vida útil a 20, 20 y 25 °C, respectivamente. Sin embargo, las predicciones de vida útil por Rancimat pueden dar lugar a una sobreestimación o subestimación según el tipo de aceite debido a los diferentes mecanismos de peroxidación que ocurren en las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente con las condiciones del ensayo Rancimat (Farhoosh, 2007b), en donde las reacciones como la polimerización y la ciclación pasan a primer plano, las cuales no son comparables a las reacciones en condiciones normales de almacenamiento. Además, a temperaturas mayores a 150 °C, el logaritmo del valor de OSI pierde su respuesta lineal a la temperatura (Matthäus,

2010). Asimismo, en el aceite de linaza al utilizar temperaturas elevadas en el método Rancimat pueden dar reacciones de polimerización que implican reticulación, las cuales cambian la densidad del aceite y generan la formación de un gel, dificultando las medición de los valores OSI (Symoniuk *et al.*, 2016b), las cuales podrían llevar a un error en la extrapolación de vida útil en los aceites de linaza.

4.11. PREDICCIÓN DE LA VIDA ÚTIL POR PRUEBAS ACELERADAS

4.11.1. PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL SEGÚN CADA ANÁLISIS REALIZADO EN LOS ACEITES

a. ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Las Figuras 36, 37 y 38 muestran las variaciones del contenido de los ácidos grasos libres en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno en el almacenamiento a 40, 50 y 60 °C, respectivamente; los valores de cada día se muestran en el Anexo 44. En las tres temperaturas de almacenamiento se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los contenidos de ácidos grasos libres de ambos aceites por efecto de la temperatura, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 45, 46 y 47). Asimismo, se observa que la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza logra retardar el aumento de ácidos grasos libres en el aceite de linaza en las tres temperaturas de almacenamiento.

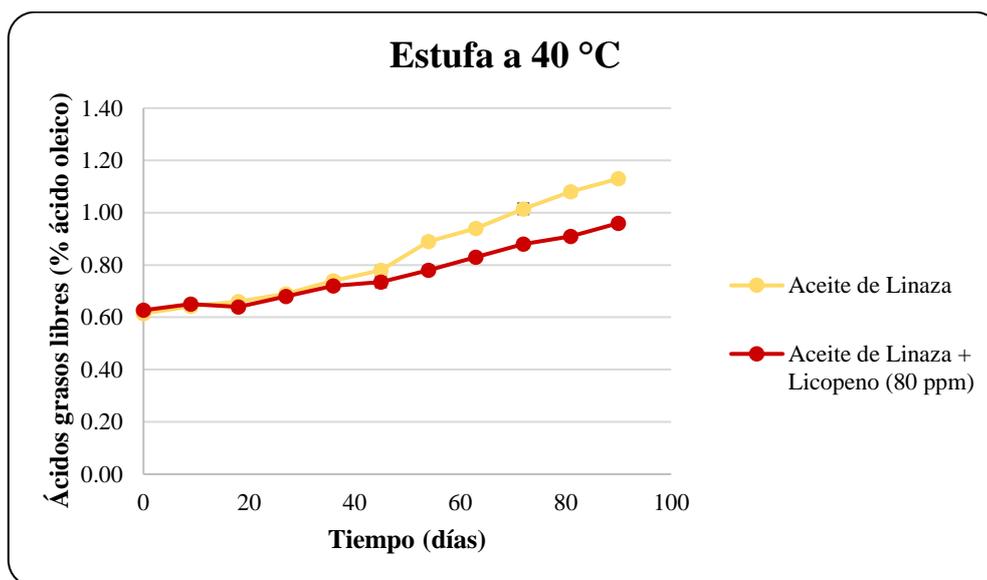


Figura 36: Variación de ácidos grasos libres en el almacenamiento a 40 °C.

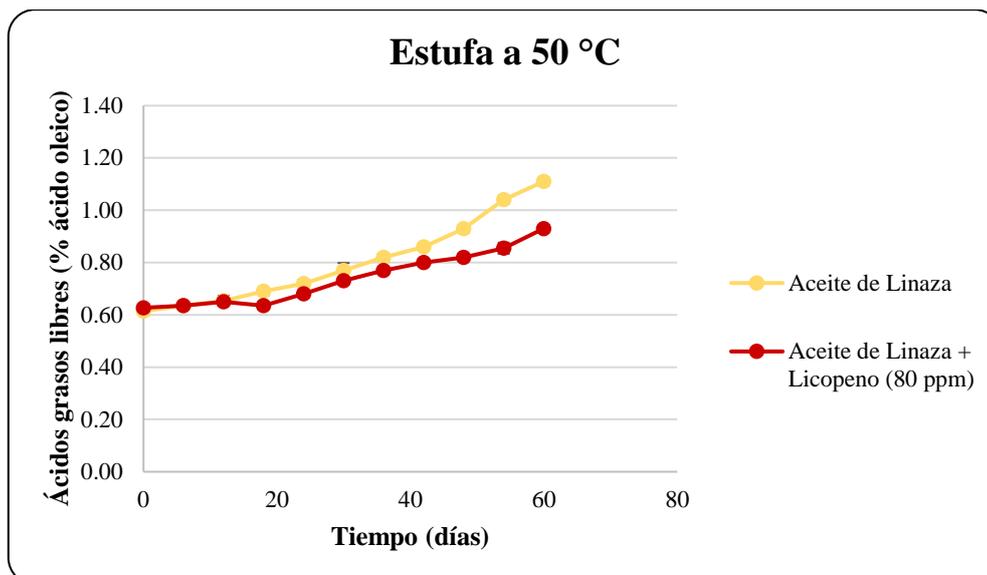


Figura 37: Variación de ácidos grasos libres en el almacenamiento a 50 °C.

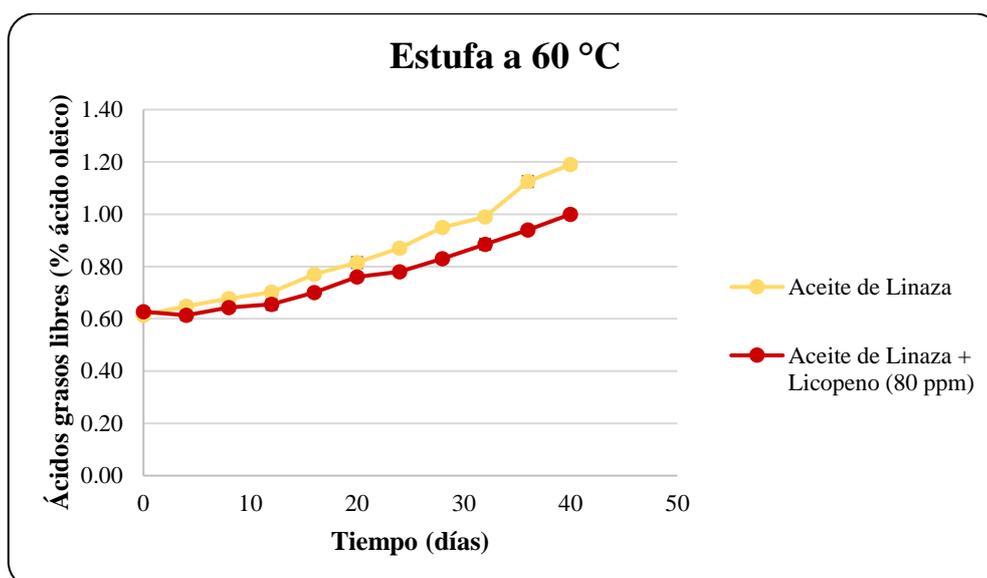


Figura 38: Variación de ácidos grasos libres en el almacenamiento a 60 °C.

Las Figuras 39 y 40 muestran las variaciones del contenido de ácidos grasos libres por las temperaturas de almacenamiento en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, respectivamente. Se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los contenidos de ácidos grasos libres por influencia de las tres temperaturas de almacenamiento en ambos aceites, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 48 y 49).

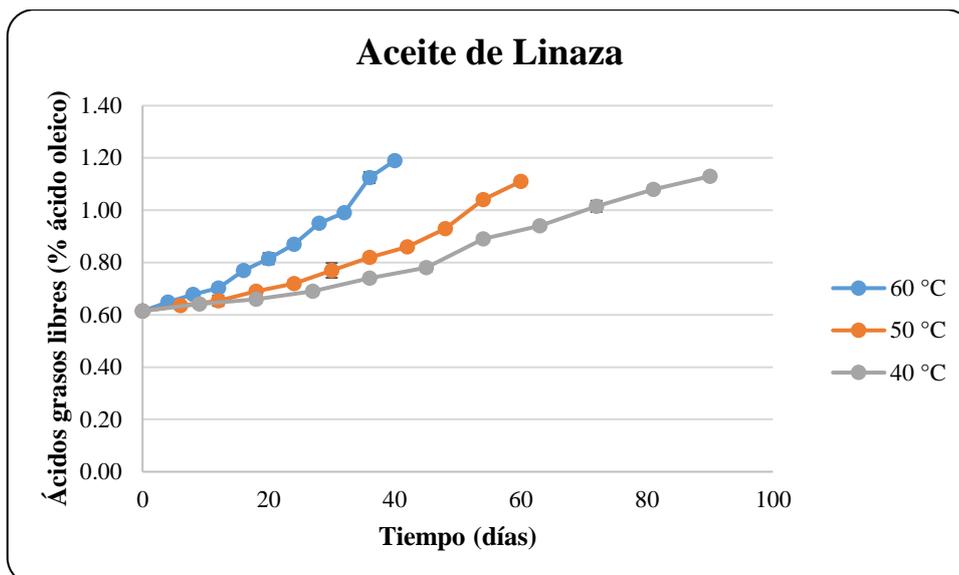


Figura 39: Variación de ácidos grasos libres en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.

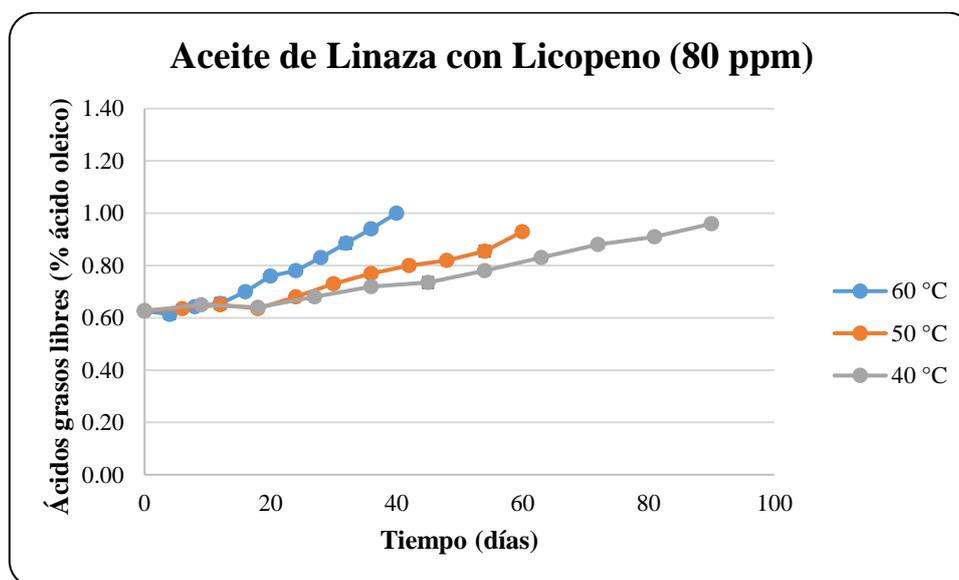


Figura 40: Variación de ácidos grasos libres en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.

El Cuadro 21 muestra los coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción cero y uno, determinados con los datos de ácidos grasos libres de cada aceite en las temperaturas de almacenamiento.

Cuadro 21: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de ácidos grasos libres

ACEITE	ORDEN DE REACCIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)		
		40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0	0.9683	0.9456	0.9635
	1	0.9826	0.9758	0.9879
Linaza con 80 ppm de licopeno	0	0.9664	0.9409	0.9568
	1	0.9777	0.9518	0.9712

El mayor coeficiente de determinación (R^2) en ambos aceites se dio según el orden de reacción uno, por lo cual se eligió en ambos aceites orden de reacción uno para el cálculo de las constantes de velocidad de reacción (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

El Cuadro 22 muestra las constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno, determinado con los datos de ácidos grasos libres de cada aceite por cada temperatura de almacenamiento, los cuales aumentaron con el incremento de la temperatura.

Cuadro 22: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de ácidos grasos libres

ACEITE	CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN (k)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0.0073	0.0099	0.0168
Linaza con 80 ppm de licopeno	0.0050	0.0067	0.0127

El Cuadro 23 muestra los coeficientes de determinación (R^2) de los valores de k ajustados al modelo de Arrhenius, la energía de activación y la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de ácidos grasos libres.

Cuadro 23: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de ácidos grasos libres

DATOS DEL AJUSTE AL MODELO DE ARRHENIUS	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO
R^2	0.9728	0.9533
Ea (kJ/mol)	35.94	40.54
Vida útil a 25 °C (días)	337	542

Los valores de las constantes de velocidad de reacción ajustados al modelo de Arrhenius en ambos aceites presentaron un elevado coeficiente de determinación. Según este modelo, la energía de activación en el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue superior al del aceite de linaza; y teniendo como límite de aceptabilidad el valor de dos por ciento según el Codex Alimentarius (2017b), la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de ácidos grasos libres para el aceite de linaza fue de 337 días y para el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue de 542 días, lo cual representa un incremento del 60.83 por ciento.

b. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Las Figuras 41, 42 y 43 muestran las variaciones del índice de peróxidos en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno en el almacenamiento a 40, 50 y 60 °C, respectivamente; los valores de cada día se muestran en el Anexo 50. En las tres temperaturas de almacenamiento se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de índice de peróxidos de ambos aceites por efecto de la temperatura, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 51, 52 y 53). Asimismo, se observa que la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza logra retardar el aumento del índice de peróxidos en el aceite de linaza en las tres temperaturas de almacenamiento.

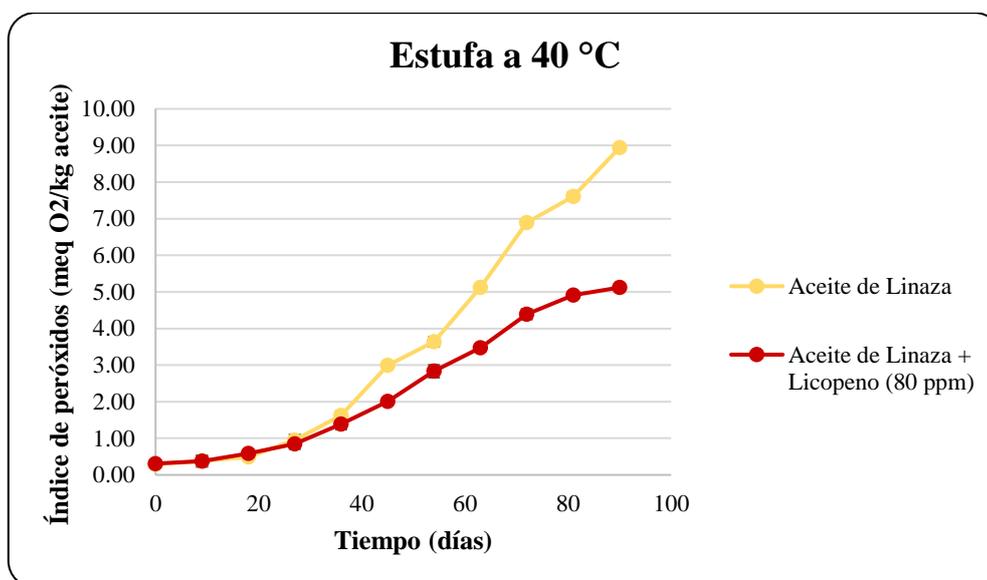


Figura 41: Variación del índice de peróxidos en el almacenamiento a 40 °C.

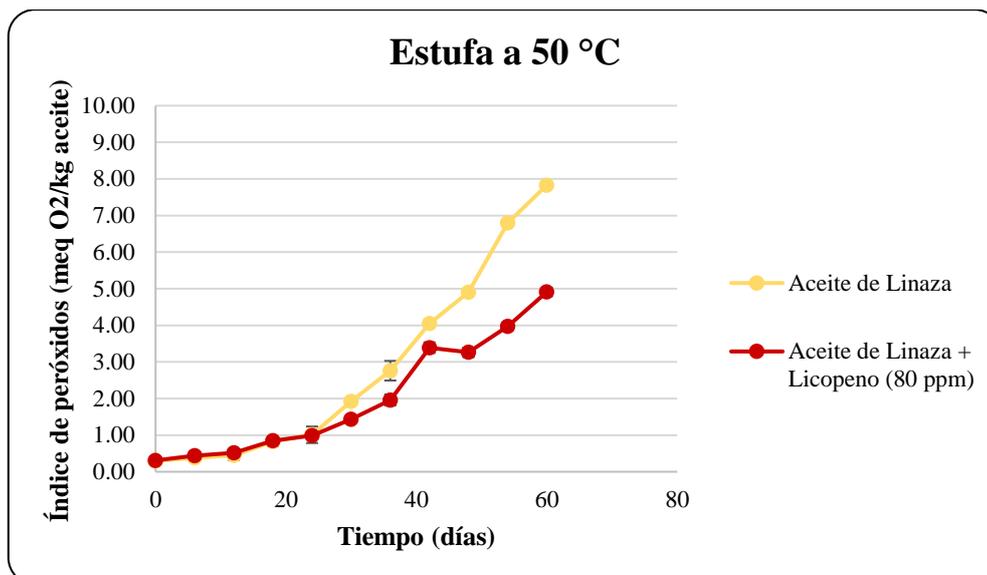


Figura 42: Variación del índice de peróxidos en el almacenamiento a 50 °C.

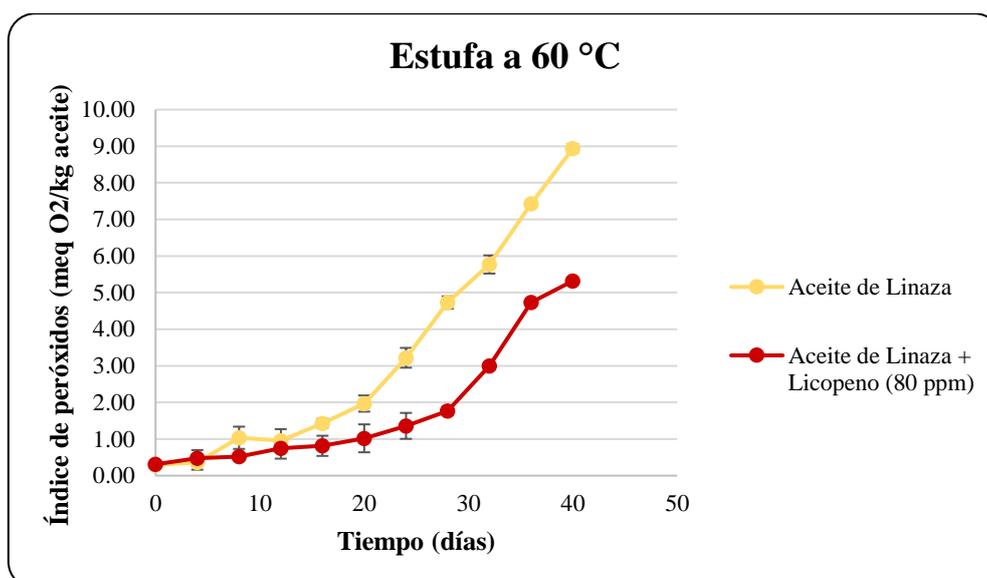


Figura 43: Variación del índice de peróxidos en el almacenamiento a 60 °C.

Las Figuras 44 y 45 muestran las variaciones del índice de peróxidos por las temperaturas de almacenamiento en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, respectivamente. Se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de índice de peróxidos por influencia de las tres temperaturas de almacenamiento en ambos aceites, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 54 y 55).

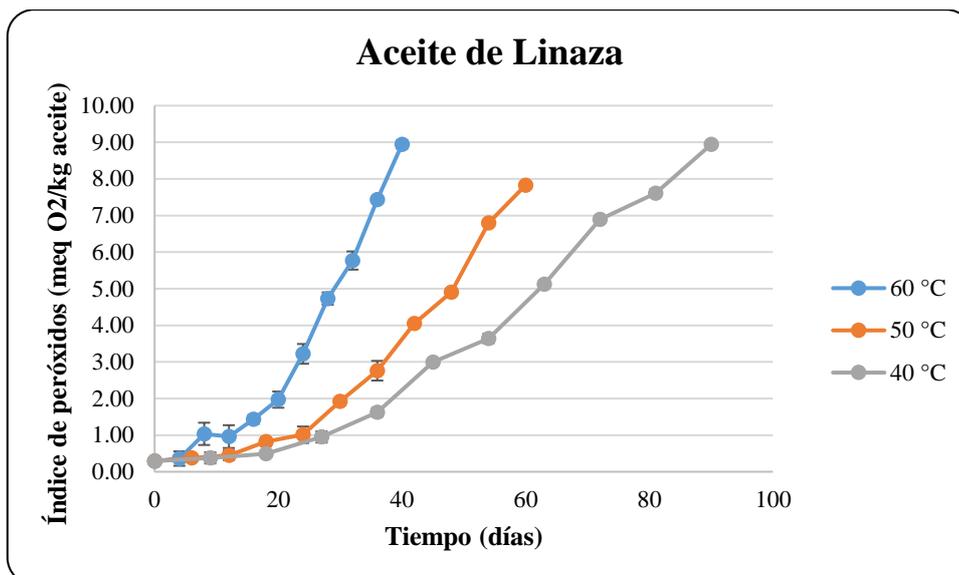


Figura 44: Variación del índice de peróxidos en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.

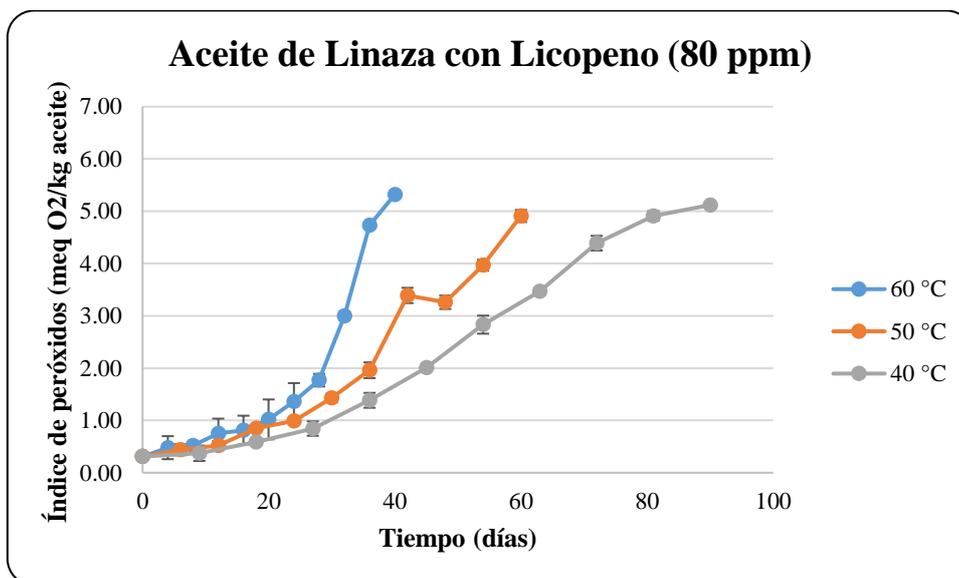


Figura 45: Variación del índice de peróxidos en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.

El Cuadro 24 muestra los coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción cero y uno, determinados con los datos de índice de peróxidos de cada aceite en las temperaturas de almacenamiento.

Cuadro 24: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de índice de peróxidos

ACEITE	ORDEN DE REACCIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)		
		40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0	0.9408	0.9005	0.9069
	1	0.9646	0.9855	0.9713
Linaza con 80 ppm de licopeno	0	0.9623	0.9228	0.7982
	1	0.9630	0.9812	0.9755

El mayor coeficiente de determinación (R^2) en ambos aceites se dio según el orden de reacción uno, por lo cual se eligió en ambos aceites orden de reacción uno para el cálculo de las constantes de velocidad de reacción (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

El Cuadro 25 muestra las constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno, determinado con los datos de índice de peróxidos de cada aceite por cada temperatura de almacenamiento, los cuales aumentaron con el incremento de la temperatura.

Cuadro 25: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de índice de peróxidos

ACEITE	CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN (k)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0.0417	0.0597	0.0873
Linaza con 80 ppm de licopeno	0.0343	0.0478	0.0701

El Cuadro 26 muestra los coeficientes de determinación (R^2) de los valores de k ajustados al modelo de Arrhenius, la energía de activación y la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de índice de peróxidos.

Cuadro 26: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de índice de peróxidos

DATOS DEL AJUSTE AL MODELO DE ARRHENIUS	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO
R^2	0.9988	0.9967
E_a (kJ/mol)	32.02	31.00
Vida útil a 25 °C (días)	177	208

Los valores de las constantes de velocidad de reacción ajustados al modelo de Arrhenius en ambos aceites presentaron un elevado coeficiente de determinación. Según este modelo, la energía de activación presentó una ligera variación en ambos aceites; y teniendo como límite de aceptabilidad el valor de 15 meq O₂/kg según el Codex Alimentarius (2017a), la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de índice de peróxidos para el aceite de linaza fue de 177 días y para el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue de 208 días, lo cual representa un incremento del 17.51 por ciento.

c. ÍNDICE DE P-ANISIDINA

Las Figuras 46, 47 y 48 muestran las variaciones del índice de p-Anisidina en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno en el almacenamiento a 40, 50 y 60 °C, respectivamente; los valores de cada día se muestran en el Anexo 56. En las tres temperaturas de almacenamiento se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de índice de p-Anisidina de ambos aceites por efecto de la temperatura, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 57, 58 y 59). Asimismo, se observa que la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza logra retardar el aumento del índice de p-Anisidina en el aceite de linaza en las tres temperaturas de almacenamiento.

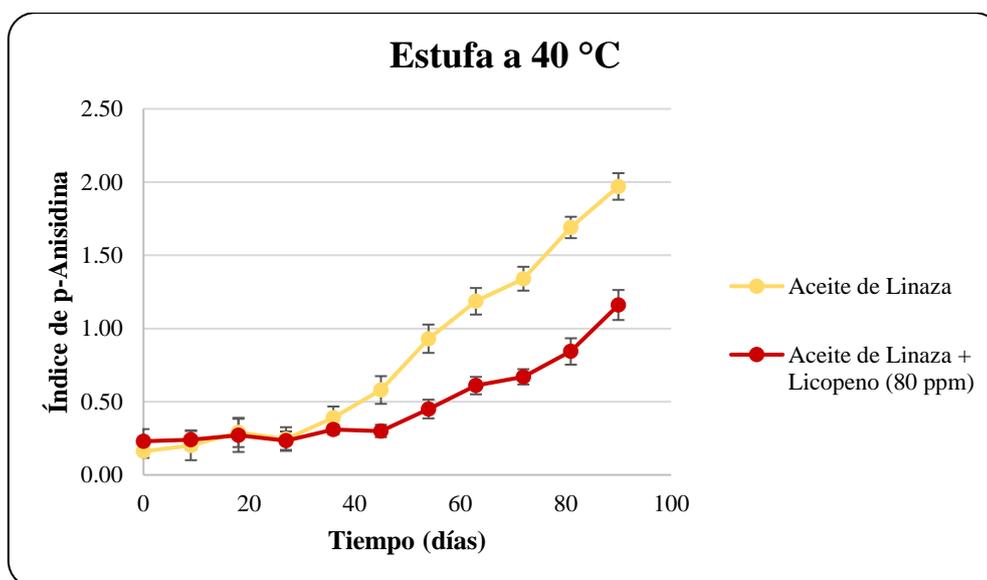


Figura 46: Variación del índice de p-Anisidina en el almacenamiento a 40 °C.

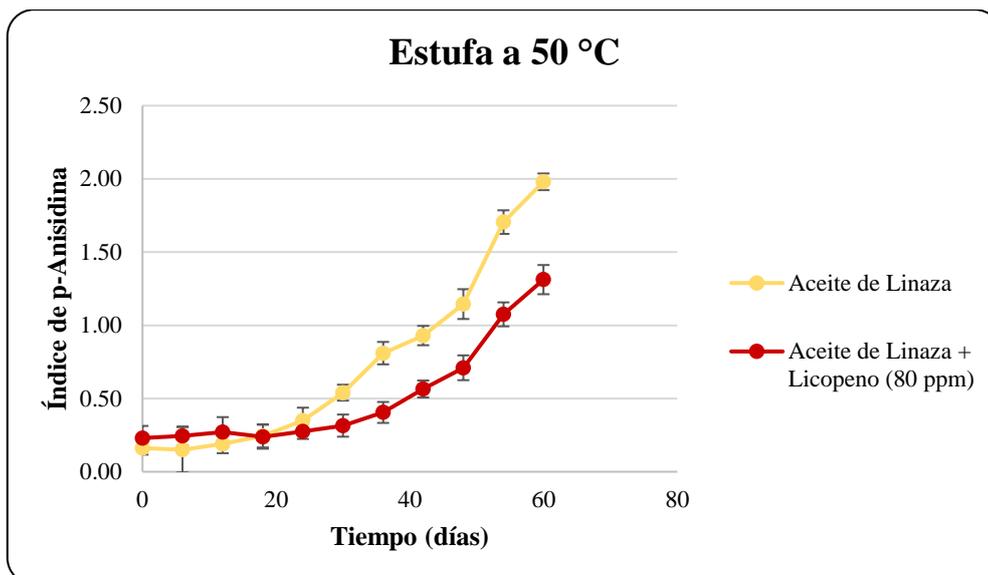


Figura 47: Variación del índice de p-Anisidina en el almacenamiento de a °C.

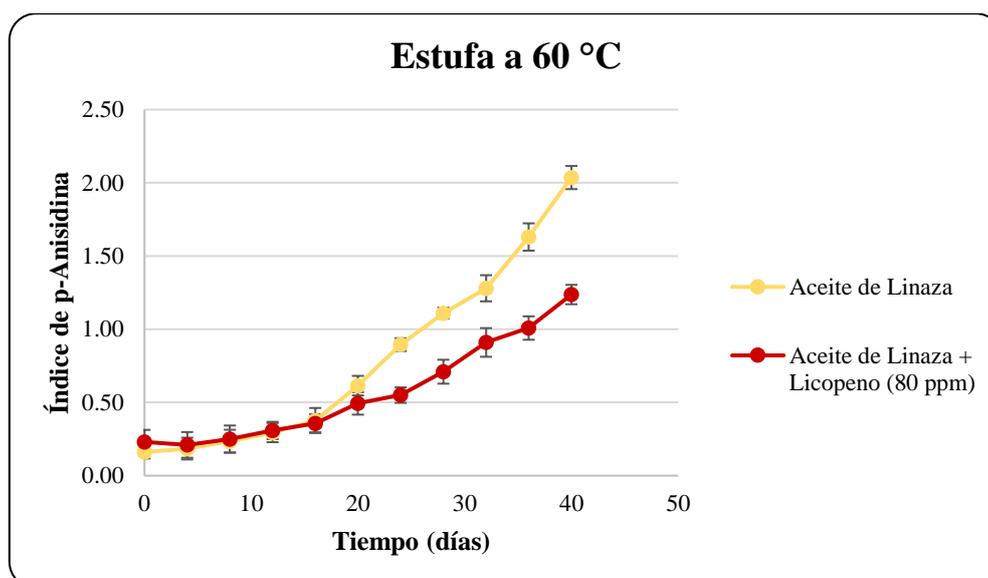


Figura 48: Variación del índice de p-Anisidina en el almacenamiento a 60 °C.

Las Figuras 49 y 50 muestran las variaciones del índice de p-Anisidina por las temperaturas de almacenamiento en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, respectivamente. Se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de índice de p-Anisidina por influencia de las tres temperaturas de almacenamiento en ambos aceites, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 60 y 61).

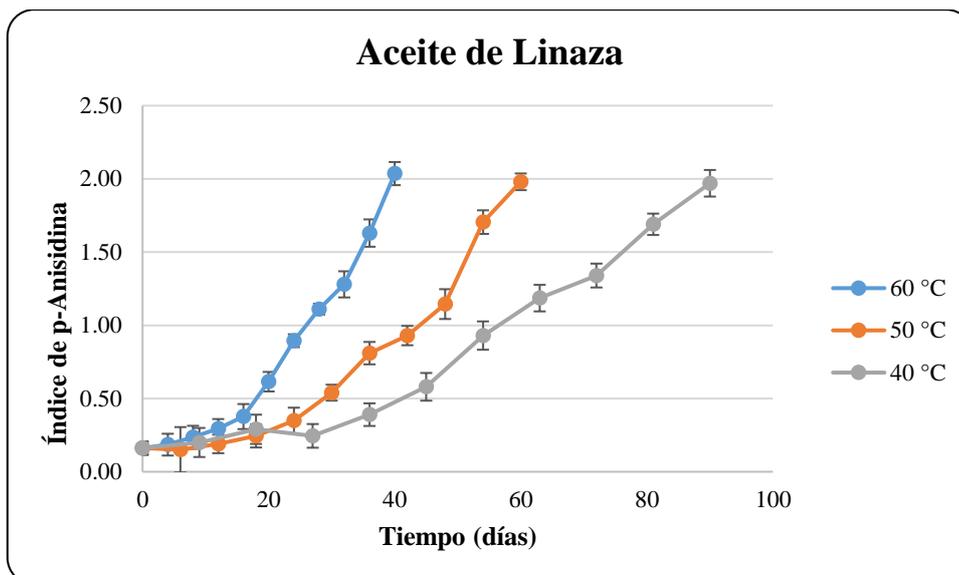


Figura 49: Variación del índice de p-Anisidina en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.

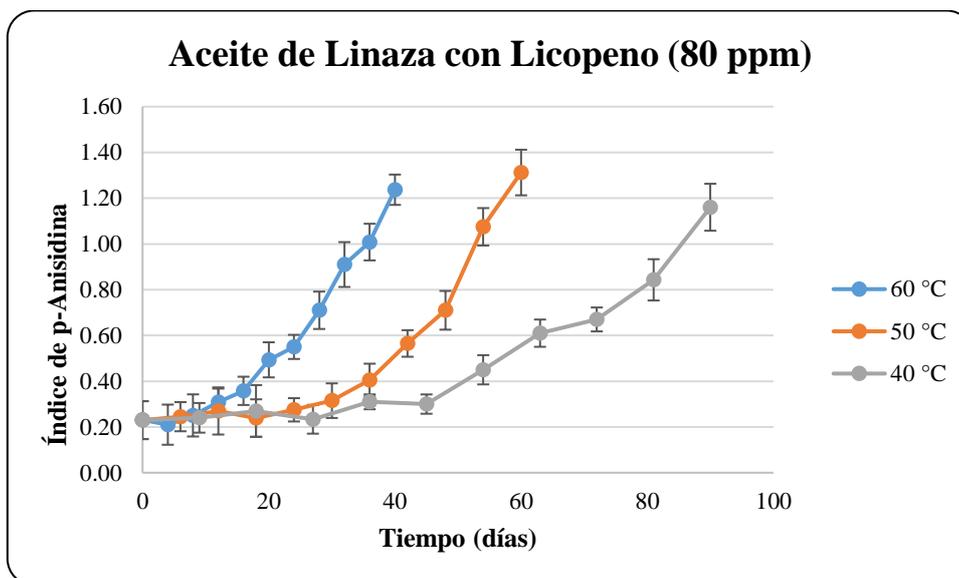


Figura 50: Variación del índice de p-Anisidina en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.

El Cuadro 27 muestra los coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción cero y uno, determinados con los datos de p-Anisidina de cada aceite en las temperaturas de almacenamiento.

Cuadro 27: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de índice de p-Anisidina

ACEITE	ORDEN DE REACCIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)		
		40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0	0.9234	0.8886	0.9203
	1	0.9725	0.9800	0.9866
Linaza con 80 ppm de licopeno	0	0.8155	0.7677	0.9206
	1	0.9070	0.8815	0.9799

El mayor coeficiente de determinación (R^2) en ambos aceites se dio según el orden de reacción uno, por lo cual se eligió en ambos aceites orden de reacción uno para el cálculo de las constantes de velocidad de reacción (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

El Cuadro 28 muestra las constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno, determinado con los datos de índice de p-Anisidina de cada aceite por cada temperatura de almacenamiento, los cuales aumentaron con el incremento de la temperatura.

Cuadro 28: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de índice de p-Anisidina

ACEITE	CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN (k)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0.0300	0.0472	0.0682
Linaza con 80 ppm de licopeno	0.0183	0.0297	0.0469

El Cuadro 29 muestra los coeficientes de determinación (R^2) de los valores de k ajustados al modelo de Arrhenius, la energía de activación y la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de índice de p-Anisidina.

Cuadro 29: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de índice de p-Anisidina

DATOS DEL AJUSTE AL MODELO DE ARRHENIUS	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO
R^2	0.9981	1.0000
Ea (kJ/mol)	35.63	40.77
Vida útil a 25 °C (días)	165	259

Los valores de las constantes de velocidad de reacción ajustados al modelo de Arrhenius en ambos aceites presentaron un elevado coeficiente de determinación. Según este modelo, la energía de activación en el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue superior al del aceite de linaza; y teniendo como límite de aceptabilidad el valor de dos según Choo *et al.* (2007a), Schaich (2016) y Gupta (2017b), la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de índice de p-Anisidina para el aceite de linaza fue de 165 días y para el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue de 259 días, lo cual representa un incremento del 56.97 por ciento.

d. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k_{232})

Las Figuras 51, 52 y 53 muestran las variaciones del valor de k_{232} en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno en el almacenamiento a 40, 50 y 60 °C, respectivamente; los valores de cada día se muestran en el Anexo 62. En las tres temperaturas de almacenamiento se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de k_{232} de ambos aceites por efecto de la temperatura, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 63, 64 y 65). Asimismo, se observa que la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza logra retardar el aumento de los valores de k_{232} en el aceite de linaza en las tres temperaturas de almacenamiento.

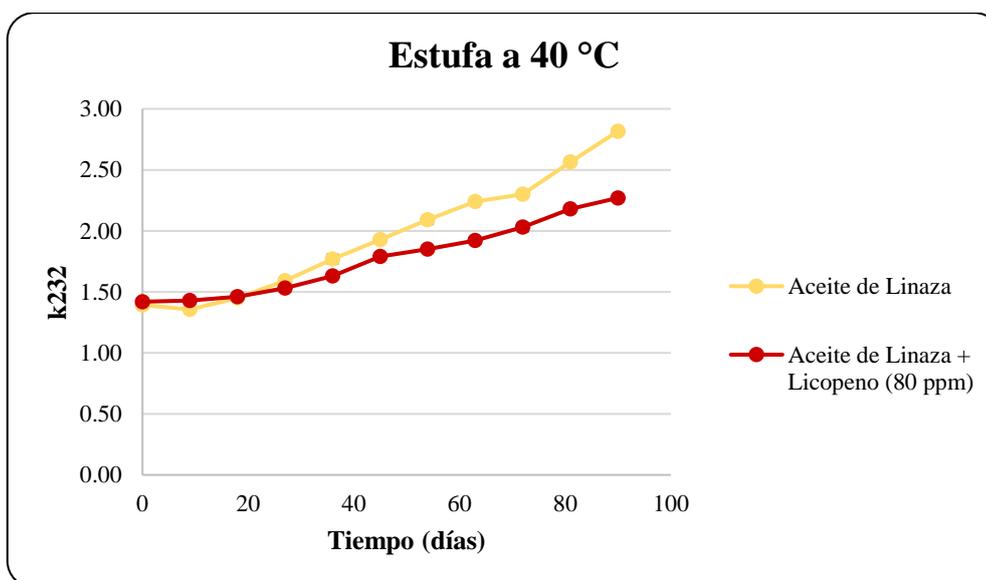


Figura 51: Variación del valor de k_{232} en el almacenamiento a 40 °C.

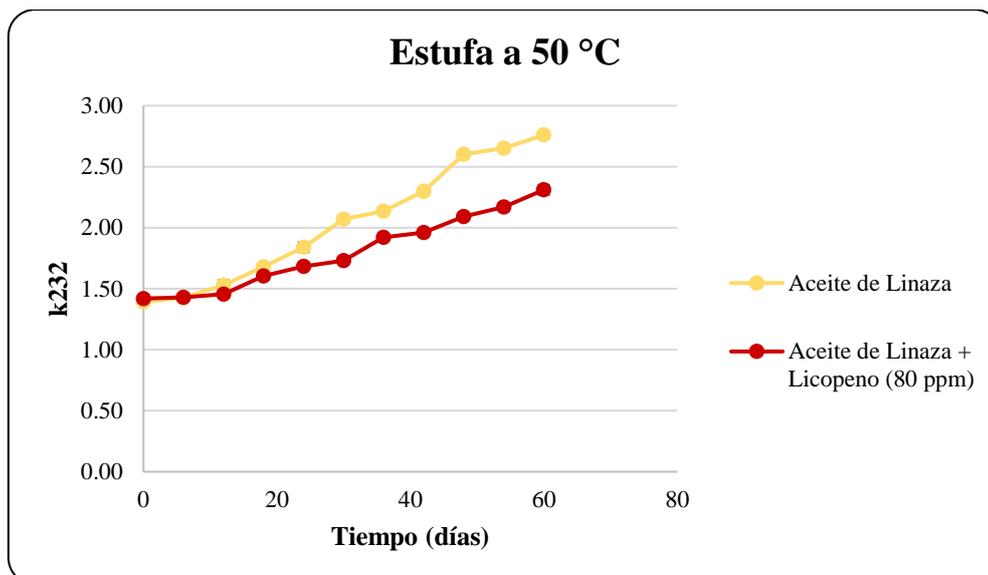


Figura 52: Variación del valor de k₂₃₂ en el almacenamiento a 50 °C.

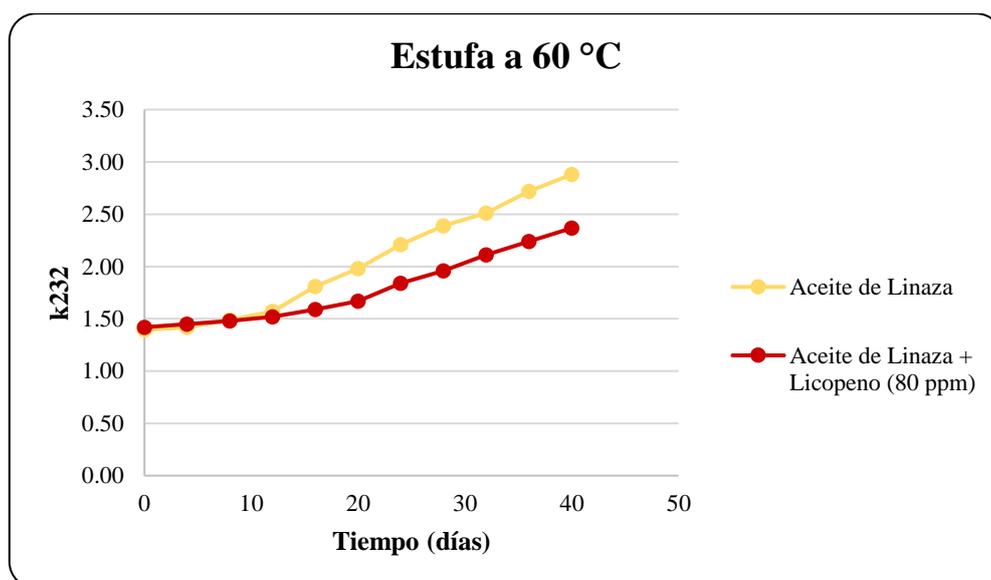


Figura 53: Variación del valor de k₂₃₂ en el almacenamiento a 60 °C.

Las Figuras 54 y 55 muestran las variaciones de los valores de k₂₃₂ por las temperaturas de almacenamiento en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, respectivamente. Se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de k₂₃₂ por influencia de las tres temperaturas de almacenamiento en ambos aceites, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 66 y 67).

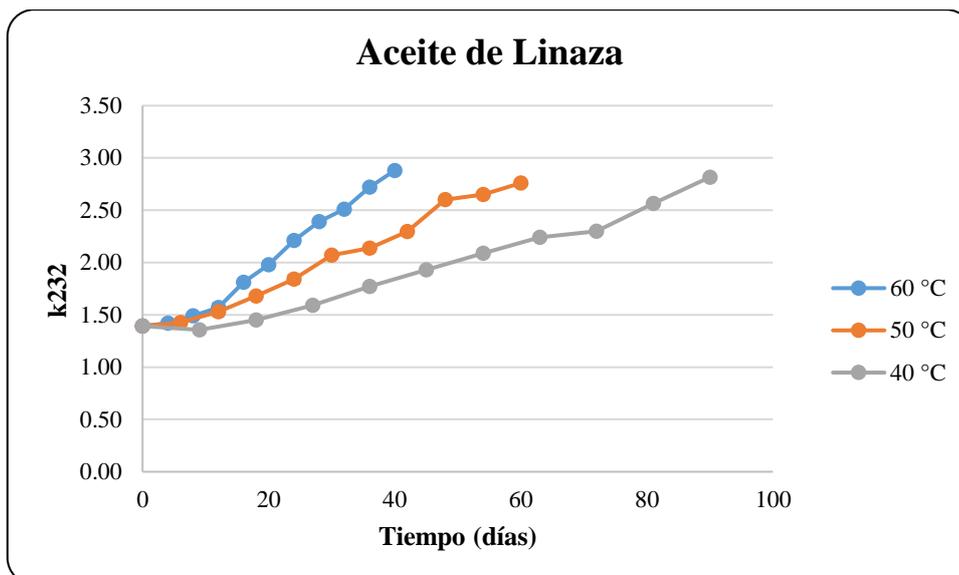


Figura 54: Variación del valor de k_{232} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.

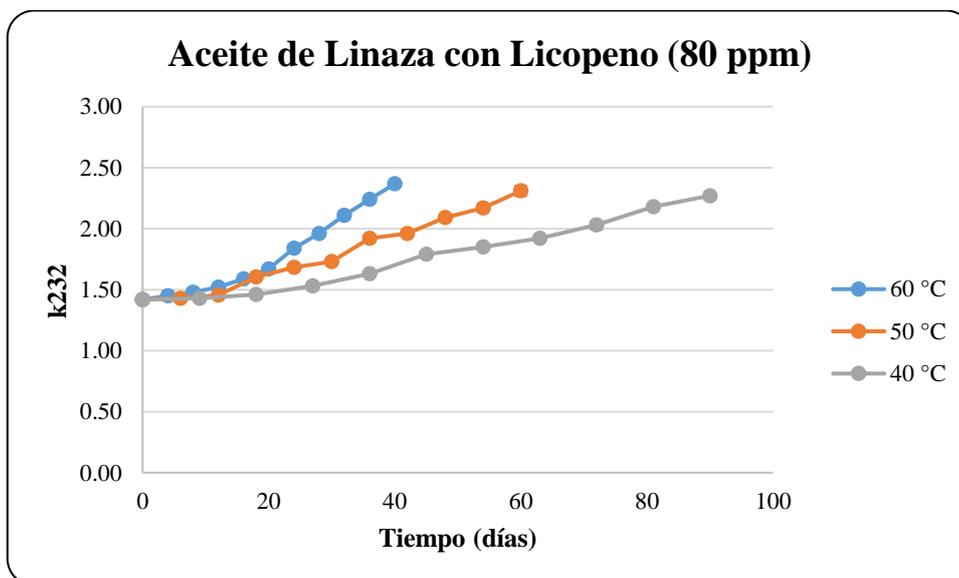


Figura 55: Variación del valor de k_{232} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.

El Cuadro 30 muestra los coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción cero y uno, determinados con los datos de k_{232} de cada aceite en las temperaturas de almacenamiento.

Cuadro 30: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de k_{232}

ACEITE	ORDEN DE REACCIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)		
		40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0	0.9724	0.9842	0.9783
	1	0.9832	0.9860	0.9838
Linaza con 80 ppm de licopeno	0	0.9739	0.9791	0.9461
	1	0.9820	0.9844	0.9652

El mayor coeficiente de determinación (R^2) en ambos aceites se dio según el orden de reacción uno, por lo cual se eligió en ambos aceites orden de reacción uno para el cálculo de las constantes de velocidad de reacción (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

El Cuadro 31 muestra las constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno, determinado con los datos de k_{232} de cada aceite por cada temperatura de almacenamiento, los cuales aumentaron con el incremento de la temperatura.

Cuadro 31: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de k_{232}

ACEITE	CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN (k)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0.0084	0.0125	0.0201
Linaza con 80 ppm de licopeno	0.0057	0.0087	0.0137

El Cuadro 32 muestra los coeficientes de determinación (R^2) de los valores de k ajustados al modelo de Arrhenius, la energía de activación y la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de índice de k_{232} .

Cuadro 32: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de k_{232}

DATOS DEL AJUSTE AL MODELO DE ARRHENIUS	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO
R^2	0.9958	0.9986
E_a (kJ/mol)	37.80	38.15
Vida útil a 25 °C (días)	157	225

Los valores de las constantes de velocidad de reacción ajustados al modelo de Arrhenius en ambos aceites presentaron un elevado coeficiente de determinación. Según este modelo, la energía de activación presentó una ligera variación en ambos aceites; y teniendo como límite de aceptabilidad el valor de 2.6 según el Codex Alimentarius (2017b), la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de k_{232} para el aceite de linaza fue de 157 días y para el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue de 225 días, lo cual representa un incremento del 43.41 por ciento.

e. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA (k_{268})

Las Figuras 56, 57 y 58 muestran las variaciones del valor de k_{268} en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno en el almacenamiento a 40, 50 y 60 °C, respectivamente; los valores de cada día se muestran en el Anexo 68. En las tres temperaturas de almacenamiento se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de k_{268} de ambos aceites por efecto de la temperatura, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 69, 70 y 71). Asimismo, se observa que la adición de 80 ppm de licopeno al aceite de linaza logra retardar el aumento de los valores de k_{268} en el aceite de linaza en las tres temperaturas de almacenamiento.

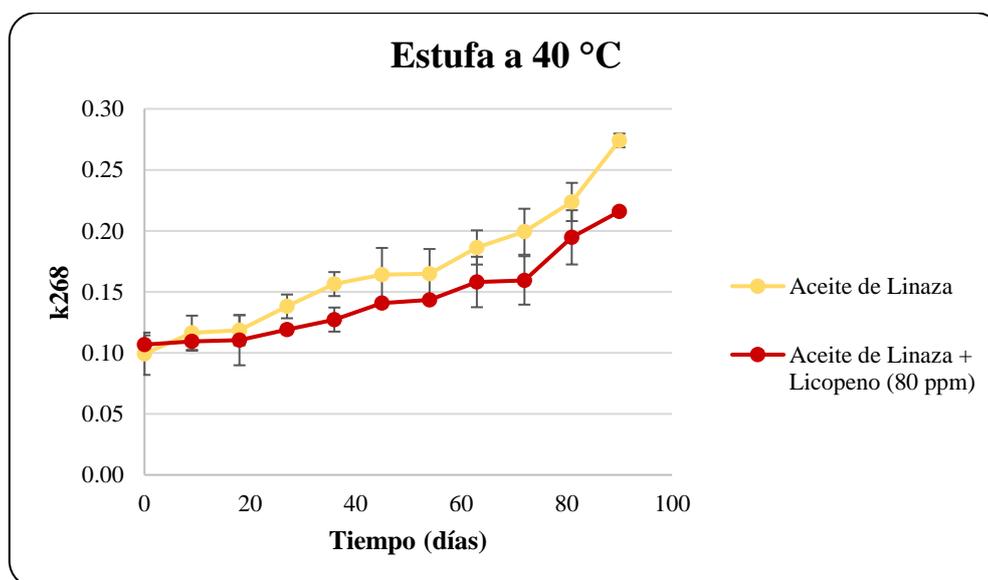


Figura 56: Variación del valor k_{268} en el almacenamiento a 40 °C.

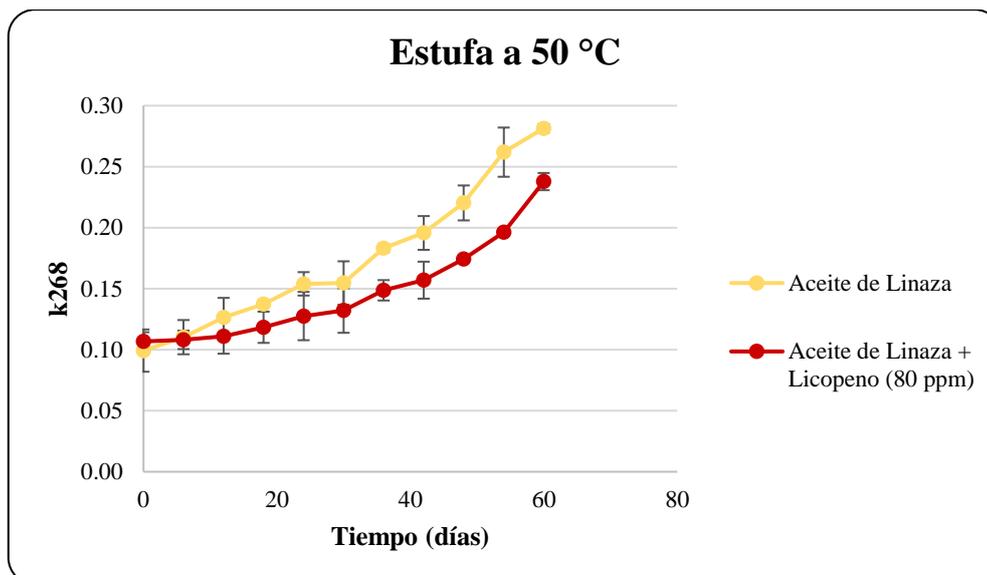


Figura 57: Variación del valor k₂₆₈ en el almacenamiento a 50 °C.

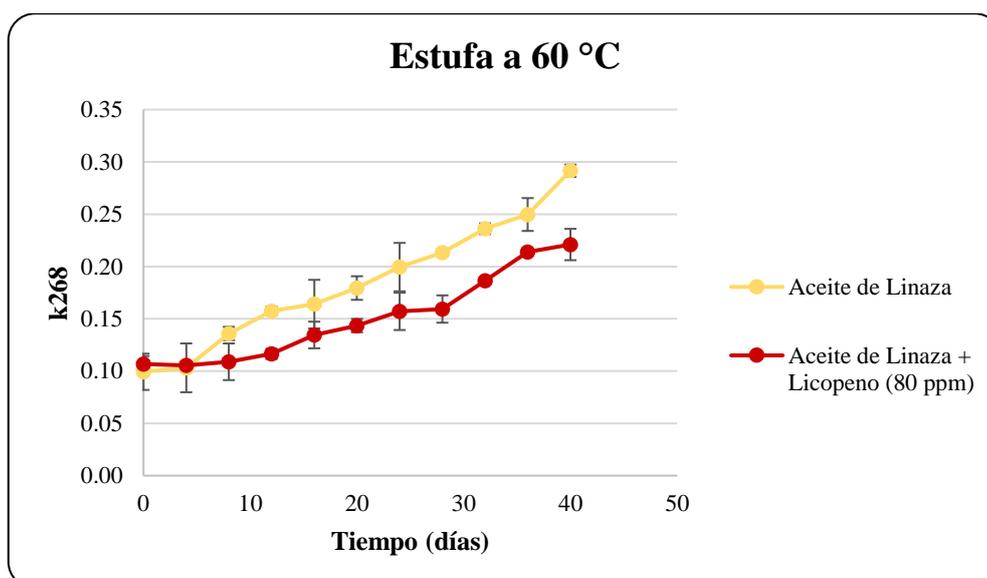


Figura 58: Variación del valor k₂₆₈ en el almacenamiento a 60 °C.

Las Figuras 59 y 60 muestran las variaciones de los valores de k₂₃₂ por las temperaturas de almacenamiento en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, respectivamente. Se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de k₂₆₈ por influencia de las tres temperaturas de almacenamiento en ambos aceites, según la prueba Student-Newman-Keuls (Anexos 72 y 73).

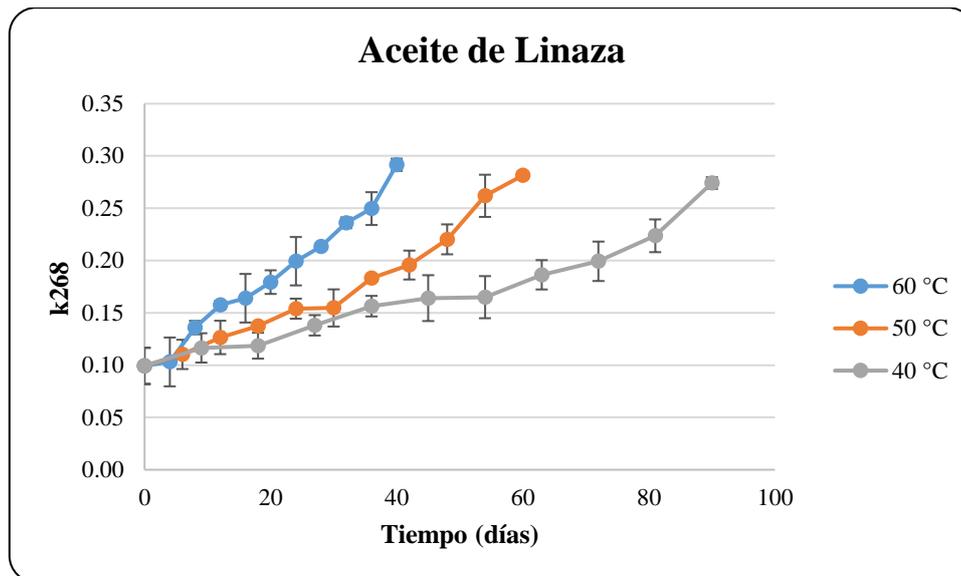


Figura 59: Variación del valor de k_{268} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza.

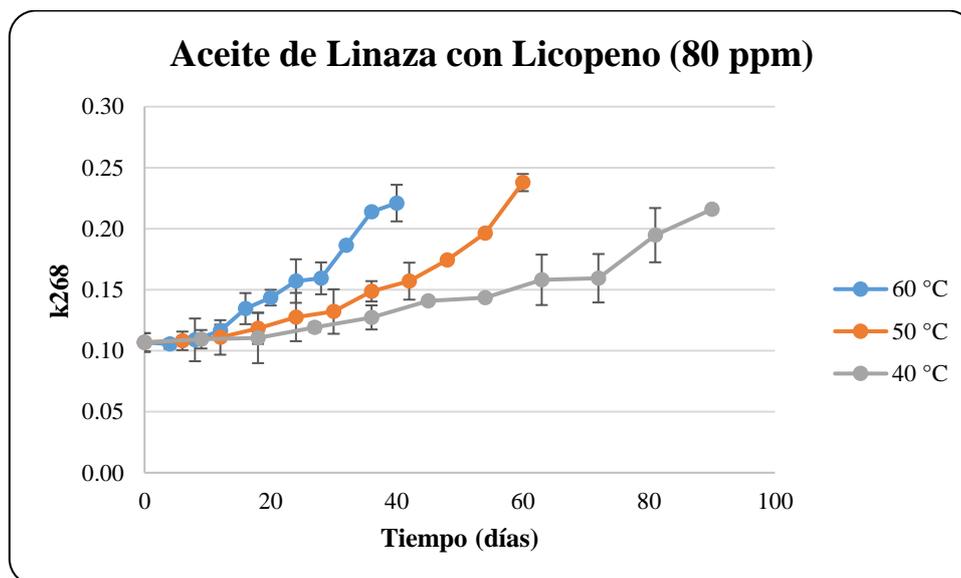


Figura 60: Variación del valor de k_{268} en las temperaturas de almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno.

El Cuadro 33 muestra los coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción cero y uno, determinados con los datos de k_{268} de cada aceite en las temperaturas de almacenamiento.

Cuadro 33: Coeficientes de determinación (R^2) según el orden de reacción de la data de k_{268}

ACEITE	ORDEN DE REACCIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)		
		40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0	0.9327	0.9556	0.9822
	1	0.9730	0.9897	0.9705
Linaza con 80 ppm de licopeno	0	0.9037	0.8793	0.9389
	1	0.9505	0.9418	0.9671

El mayor coeficiente de determinación (R^2) en ambos aceites se dio según el orden de reacción uno, por lo cual se eligió en ambos aceites orden de reacción uno para el cálculo de las constantes de velocidad de reacción (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

El Cuadro 34 muestra las constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno, determinado con los datos de k_{268} de cada aceite por cada temperatura de almacenamiento, los cuales aumentaron con el incremento de la temperatura.

Cuadro 34: Constantes de velocidad de reacción (k) según el orden de reacción uno de la data de k_{268}

ACEITE	CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REACCIÓN (k)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Linaza	0.0100	0.0170	0.0259
Linaza con 80 ppm de licopeno	0.0077	0.0128	0.0201

El Cuadro 35 muestra los coeficientes de determinación (R^2) de los valores de k ajustados al modelo de Arrhenius, la energía de activación y la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de índice de k_{268} .

Cuadro 35: Datos obtenidos del ajuste de los valores de k al modelo de Arrhenius según el análisis de k_{268}

DATOS DEL AJUSTE AL MODELO DE ARRHENIUS	ACEITE DE LINAZA	ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO
R^2	0.9977	0.9997
E_a (kJ/mol)	41.24	41.73
Vida útil a 25 °C (días)	202	246

Los valores de las constantes de velocidad de reacción ajustados al modelo de Arrhenius en ambos aceites presentaron un elevado coeficiente de determinación. Según este modelo, la energía de activación presentó una ligera variación en ambos aceites; y teniendo como límite de aceptabilidad el valor de 0.25 según el Codex Alimentarius (2017b), la vida útil predicha a 25 °C según el análisis de k_{268} para el aceite de linaza fue de 202 días y para el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno fue de 246 días, lo cual representa un incremento del 21.78 por ciento.

4.11.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LOS ANÁLISIS DE VIDA ÚTIL

El efecto del aumento de la temperatura fue evidenciado en todos los análisis realizados (ácidos grasos libres, índice de peróxidos, índice de p-Anisidina, k_{232} y k_{268}) a los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno. Ambos aceites empezaron con valores bajos en los respectivos análisis evaluados y fueron incrementando en el tiempo de almacenaje, siendo esto importante en estudios de vida útil por pruebas aceleradas debido a que como mencionan Douny *et al.* (2016), los aceites deben estar lo menos oxidado posible antes de empezar las pruebas de estabilidad en estufa.

El incremento de la oxidación en los aceites de linaza y linaza con licopeno según los análisis evaluados sigue la misma tendencia reportada por Herchi *et al.* (2016), quienes sometieron a calentamiento muestras de aceite de cáscaras de linaza procedente de Túnez a 110 °C por 12 h, encontrando un aumento en los valores de ácidos grasos libres de 0.9 a 1.7 por ciento de ácido oleico, índice de peróxido de 1.85 a 5.2 meq O₂/kg, índice de p-Anisidina de 1.10 a 8.50, k_{232} de 1.50 y 2.35, y k_{270} de 0.24 a 0.30, lo cual evidencia el efecto negativo que tiene una temperatura elevada sobre las características fisicoquímicas del aceite de linaza. Sin embargo, el incremento de la oxidación a temperaturas más bajas no es tan evidente; al respecto, Wiesenborn *et al.* (2005) evaluaron dos almacenamientos en el aceite de linaza de Estados Unidos, encontrando un valor de índice de peróxidos de 1.6 en el almacenamiento por 7 días a temperatura ambiente, y 2.2 en almacenamiento por 15 semanas a 4 °C, mientras que el porcentaje de ácidos grasos libres de 0.08 no varió en ambos almacenamientos. Asimismo, los compuestos antioxidantes como polifenoles totales, flavonoides, catotenoides y clorofilas en el aceite de linaza también disminuyen significativamente por el calentamiento del aceite, lo cual se ve reflejado en la disminución de la capacidad antioxidante del aceite (Herchi *et al.*, 2016). Además del nivel de oxidación alcanzado en las pruebas aceleradas, la degradación térmica de los compuestos minoritarios con actividad pro

o antioxidante puede volverse crítica ya que pueden modificar la dependencia de la temperatura de la velocidad de oxidación global de los lípidos (Lanzocco *et al.*, 2010).

La influencia de la temperatura es evidenciada también por el incremento de las constantes de velocidad de reacción (k), los cuales incrementaron con el aumento de la temperatura en todos los análisis realizados a los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno. Misma tendencia es reportada en aceite de oliva almacenado a temperaturas entre 25 a 75 °C (Gómez-Alonso *et al.*, 2004), y aceite de oliva extra virgen almacenado a temperaturas entre 25 a 60 °C (Mancebo-Campos *et al.*, 2008).

La energía de activación en todos los análisis realizados varió entre 31 y 41.73 kJ/mol, encontrándose dentro del rango de energía de activación de 9 a 200 kJ/mol para indicadores de oxidación mencionado por Calligaris *et al.* (2012). Un mayor valor de energía de activación indica que por cada aumento de 10 °C habrá un mayor incremento de la constante de velocidad de reacción (Calligaris *et al.*, 2012), sin embargo, la energía de activación en cada análisis realizado a los aceites no presentó un gran cambio, por lo que a pesar de haber disminuido la constante de velocidad de reacción, la cinética de oxidación sigue siendo similar en ambos aceites.

En el caso de los ácidos grasos libres e índice de peróxidos, ninguno de los dos análisis llegaron al límite de aceptabilidad definido en el tiempo del estudio de vida útil, lo cual podría deberse a que como mencionan Douny *et al.* (2016), el almacenamiento acelerado a 60 °C subestima los productos de oxidación primarios, en comparación con un almacenamiento en tiempo real a 20 °C, mientras que los productos secundarios se sobreestiman a 60 °C, esto debido a que los productos de oxidación primarios se acumulan en el aceite durante el almacenamiento en tiempo real, mientras que se transforman en otros compuestos durante el almacenamiento acelerado, principalmente productos secundarios de oxidación. Además, los dienos conjugados e hidroperóxidos son muy inestables a altas temperaturas, pudiendo interactuar con otros compuestos transformándose rápidamente en productos de oxidación secundaria, por lo que podría estar ocurriendo una subestimación de estos valores en ambos aceites debido a que no llegan al límite de aceptabilidad definido, mientras que en los otros análisis en su mayoría si logran llegar al límite que les corresponde. Sin embargo, el valor k_{232} que hace referencia a los dienos conjugados (productos de oxidación primaria), llegó a superar el valor límite de aceptabilidad en el caso del aceite de linaza, esto podría deberse a que como menciona Frankel (2005c), en etapas más avanzadas

de oxidación, los hidroperóxidos se descomponen en productos secundarios y poliméricos que también absorben a 234 nm, por lo que este valor sigue aumentando durante el almacenamiento a pesar que la cantidad de dienos conjugados formados tengan la misma subestimación que los hidroperóxidos o ácidos grasos libres en las condiciones de almacenamiento de las muestras.

El incremento del índice de peróxidos por efecto de la temperatura ha sido estudiado ampliamente tanto en estudios de estabilidad oxidativa como en estudios de vida útil. Así por ejemplo, Zhang *et al.* (2013) estudiaron el efecto de la temperatura en aceite de linaza de China, encontrando que a temperaturas de 35 °C el incremento de los valores peróxidos era lento, pero incrementaba significativamente a las 36 horas; y a temperaturas de 75 y 105 °C los incrementos eran similares, superando los 60 meq O₂/kg. Estos incrementos drásticos no se observaron en el almacenamiento de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm, los cuales llegaron a valores de índice de peróxidos de 8.94 ± 0.11 y 5.32 ± 0.02 meq O₂/kg, respectivamente, en el almacenamiento a 60 °C; esto principalmente puede deberse a que los autores citados colocaron el aceite de linaza en beakers de vidrio siendo en estas condiciones de almacenamiento expuestos no solo directamente a la temperatura, sino también al oxígeno, factor de oxidación que se inhibió por la adición de Argón a las botellas que contenían los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno.

Omer *et al.* (2014) utilizaron nitrógeno y almacenamiento en oscuridad para evaluar solo el efecto de la temperatura en la variación del índice de peróxidos del aceite refinado de girasol con licopeno, evitando la influencia del oxígeno y la luz como factores de oxidación. Sin embargo, en esta investigación se utilizó gas inerte argón de alta pureza debido a que como menciona Schaich (2016), el uso de argón de alta pureza como gas inerte proporciona una atmósfera mucho más protectora que otros gases inertes como el nitrógeno debido a que es más pesado que el aire y, por lo tanto, no se escapa fácilmente de soluciones o recipientes, mientras el nitrógeno es menos denso que el aire, por lo que se escapa más rápido, y el oxígeno incluso en nitrógeno de alta pureza es suficiente para impulsar la oxidación de los lípidos. Además, el argón no contiene los rastros de oxígeno presentes en el nitrógeno, y su solubilidad tanto en agua como en aceite es el doble o más que la del nitrógeno.

Douny *et al.* (2016) evaluaron por 6 meses muestras de aceite de linaza refinado de Bélgica, y muestras del mismo aceite con adición de antioxidantes miricetina y BHT (555 μmol/kg de aceite, para cada antioxidante), los cuales fueron almacenados a 20 y 60 °C por 6 meses

y 6 días, respectivamente, teniendo como resultados un aumento drástico de 1.8 a 254.3 meq O₂/kg para el aceite control, y valores finales de 113.2 y 18.9 meq O₂/kg para los aceites con antioxidantes BHT y miricetina, respectivamente; y para el almacenamiento a 60 °C obtuvieron valores de 2.4 a 65.2 meq O₂/kg para el aceite control, y valores finales de 57.2 y 26.4 meq O₂/kg para los aceites con antioxidantes BHT y miricetina, respectivamente. Sin embargo, los valores obtenidos tanto para el aceite de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno no mostraron un cambio tan drástico en los índices de peróxidos en ninguna de las tres temperaturas de almacenamiento, esto puede deberse a que el aceite de linaza estudiado por Douny *et al.* (2016) fue un aceite refinado, y como menciona Esmailifard *et al.* (2017) una de las etapas de la refinación es la desodorización, la cual implica la eliminación de los compuestos fenólicos, los tocoferoles y los esteroides, lo cual reduce la vida útil del aceite.

Shadyro *et al.* (2017) almacenaron aceite de linaza de Bielorrusia en botellas ámbar a 20 °C, reportando un incremento de 1.18 a 12.4 meq O₂/kg después de 18 meses de almacenamiento; Omar *et al.* (2010) almacenaron aceite de linaza de China en botellas ámbar a 60 °C, reportando un incremento de 5.35 a 142.19 meq O₂/kg después de 20 días de almacenamiento, siendo de igual manera incrementos en los índices de peróxidos no observados en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno. Otros antioxidantes utilizados en aceite de linaza que lograron retardar el incremento del índice de peróxidos bajo condiciones de almacenamiento acelerado han sido reportados por Pu y Sathivel (2011) quienes utilizaron astaxantina, Bera *et al.* (2006) quienes utilizaron antioxidante de ajowan, y Nag (2000) que utilizó antioxidante de Capsicum.

Al igual que el índice de peróxidos, se han reportado incrementos drásticos en el índice de p-Anisidina; Douny *et al.* (2016) reportaron cambios de 2.2 a 23.7 en almacenamiento a 20 °C por 6 meses y de 1.1 a 38.3 en el almacenamiento a 60 °C por 6 días en aceites de linaza refinado de Bélgica; Omar *et al.* (2010) indicaron un incremento de 7.80 a 112.80 en aceite de linaza de China almacenados por 20 días en botellas ámbar a 60 °C. Estos incrementos al igual que el caso de los valores de índice de peróxidos se alejan en gran medida a los encontrados en el almacenamiento a las tres temperaturas estudiadas para la predicción de la vida útil de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, llegando a valores de 2.04 ± 0.08 y 1.24 ± 0.07, respectivamente, en el almacenamiento a 60 °C; siendo las diferencias debido a las diferentes condiciones de almacenamiento. Sin embargo, Shadyro *et al.* (2017) almacenaron aceite de linaza de Bielorrusia en botellas ámbar a 20 °C, reportando un

incremento de 0.83 a 0.91 después de 18 meses de almacenamiento, el cual es un menor incremento que en el caso de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno.

Del mismo modo, Zhang *et al.* (2013) reportaron incrementos drásticos de los valores de k_{232} y k_{270} a temperaturas de 105 y 135 °C, llegando a valores de k_{232} y k_{270} de 37.51 y 9.90, respectivamente, después de 32 horas a 135 °C. Al igual que los anteriores análisis el incremento drástico no se observó en los resultados obtenidos de los almacenamientos a 40, 50 y 60 °C de los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno, debido principalmente a las diferentes condiciones de almacenamiento de muestra (uso de gas inerte Argón y botellas ámbar).

4.11.3. EFECTO DEL LICOPENO EN EL ACEITE DE LINAZA

La adición de 80 ppm de licopeno en el aceite de linaza logró retardar el aumento de los ácidos grasos libres, índice de peróxido, índice de p-Anisidina, valores k_{232} y k_{268} en las tres temperaturas de almacenamiento de los aceites, lo cual es evidenciado por la disminución de las constantes de velocidad de reacción en el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno en comparación con el aceite de linaza sin licopeno. La adición de licopeno en otros aceites ha presentado tendencias similares, Li *et al.* (2011) reportaron que los valores de índice de peróxidos del aceite de soya fueron menores en el aceite con 100, 200 y 400 ppm de licopeno en comparación con el aceite sin antioxidante durante 15 días de almacenamiento a 60 °C; Steenson y Min (2000) reportaron que el licopeno en concentraciones de 5, 25 y 50 ppm en el aceite de soya retardó el incremento de los valores de índice de peróxidos en el almacenamiento a 25 °C con una lámpara fluorescente con intensidad de 1650 lúmenes por 24 horas; Montesano *et al.* (2006) reportaron menores valores de índice de peróxido del aceite de oliva extra virgen con 5 y 10 ppm de licopeno en comparación con el aceite sin antioxidante después de 37 semanas de almacenamiento en botellas ámbar y en temperatura ambiente, además de preservar mejor su contenido de polifenoles, α -tocoferol y la capacidad antioxidante. Un comportamiento similar podría estar ocurriendo en el almacenamiento del aceite de linaza con 80 ppm de licopeno. Sin embargo, Kaur *et al.* (2015) reportaron que en el almacenamiento por 11 días del aceite de soya a 60 °C en estufa de aire forzado, la adición de 100 y 200 ppm de licopeno al aceite actuó como prooxidante incrementando los valores de índice de peróxidos en comparación al aceite sin antioxidante licopeno.

La principal causa de la degradación del licopeno en los sistemas alimentarios es la isomerización y la oxidación, esto da como resultado productos degradados de licopeno que no poseen suficientes enlaces dobles conjugados para absorber eficientemente la energía del oxígeno singlete y reducirlo a su estado fundamental de triplete que es menos reactivo, por lo que el oxígeno singlete es capaz de abstraer los electrones de las cadenas de ácidos grasos insaturados que se encuentran en el aceite dando como resultado un aumento en la formación de peróxidos (Omer *et al.*, 2014). Esto mismo es mencionado por Steenson y Min (2000), la degradación térmica del sistema polieno que se encuentra en el licopeno puede aumentar significativamente los valores de índice de peróxido debido a la pérdida de capacidad antioxidante. Esta degradación podría contribuir a que aumente la velocidad de oxidación en el aceite de linaza, sin embargo, los mismos autores también reportaron que tanto el licopeno como los productos de su degradación térmica tenían un efecto antioxidante en una concentración de 50 ppm en aceites de soya almacenados en oscuridad y a una temperatura de 60 °C durante 8 días.

La estabilidad del licopeno en aceites vegetales depende mucho del perfil de ácidos grasos del aceite y de su contenido de antioxidantes. Al respecto, Lavecchia y Zuorro (2006) reportaron que el licopeno presentó poca estabilidad térmica en aceites de salvado de arroz, semillas de uva y semillas de girasol, entre los cuales el de menor grado de insaturación se degradaba más lento en el almacenamiento a 60 °C, sin embargo, a 70 y 75 °C la degradación de licopeno en los aceites era prácticamente la misma. Por lo que se esperaría que en el aceite de linaza donde predominan los ácidos grasos insaturados presente una baja estabilidad, sin embargo, en todas las pruebas el licopeno en el aceite de linaza retardó el incremento de los valores de cada análisis realizado, esto probablemente se hubiera observado en menor medida si se usaban mayores temperaturas en el estudio de vida útil.

El incremento repentino de los valores en los últimos días de análisis para el aceite de linaza con 80 ppm de licopeno podría deberse a la disminución del licopeno en el aceite de linaza durante el almacenamiento, por lo se estaría perdiendo la protección antioxidante que brinda el licopeno al aceite de linaza por su degradación o isomerización. Esta disminución del licopeno añadido en aceites es mencionada por Montesano *et al.* (2006), quienes reportaron que después de 37 semanas de almacenamiento en botellas ámbar y a temperatura ambiente, el contenido de licopeno adicionado en 5 y 10 ppm en aceite de oliva extra virgen disminuyó aproximadamente en un 60 por ciento de su contenido inicial; mientras que Omer

et al. (2014) reportaron que después de 72 horas de almacenamiento en tubos de vidrio con atmósfera de nitrógeno, ausencia de luz y a una temperatura de 80 °C el licopeno añadido en 1000 ppm al aceite refinado de girasol disminuyó hasta un 52.63 por ciento del contenido inicial.

4.11.4. PREDICCIÓN DE VIDA ÚTIL FINAL

Para el aceite de linaza el menor valor de vida útil predicho estuvo determinado por el análisis k_{232} , el cual fue de 157 días a 25 °C, mientras que para el aceite de linaza con licopeno el menor valor de vida útil estuvo determinado por el análisis de índice de peróxido, el cual fue de 208 días a 25 °C. Esto representa un incremento del 32.48 por ciento en la vida útil del aceite de linaza tras la adición de 80 ppm de licopeno.

La vida útil predicha en las pruebas aceleradas se determinó para una botella de vidrio ámbar de 100 mL, este valor puede cambiar significativamente según el tipo de envase en el que será almacenado, siendo afectado por la permeabilidad al oxígeno del envase, la transmisión de la luz a través del envase, la geometría del envase, y la inercia del envase al aceite (Piergiovanni y Limbo, 2010).

La vida útil está relacionada a la temperatura de almacenamiento del aceite, por lo que en la literatura se pueden encontrar diferentes valores de vida útil reportados según la temperatura, Choo *et al.* (2007a) estudiaron las características fisicoquímicas y de calidad de aceites de linaza comerciales prensados en frío de Polonia en los cuales se recomendaba en algunos mantener el aceite en refrigeración una vez abiertos, pudiendo ser utilizarlos por 5, 8 semanas o 3 meses; y en otros se recomendaba mantenerlos por debajo de los 30 °C, o si se mantenía por debajo de los 20 °C podría llegar a tener 12 meses de vida útil. Asimismo, Tańska *et al.*, (2016) estudiaron los cambios en la estabilidad oxidativa en aceites de linaza de Polonia, los cuales tenían declarados una vida útil de 3 meses.

Douny *et al.* (2016) mencionan que se ha demostrado que los parámetros de oxidación obtenidos en un tiempo determinado a 60 °C están linealmente vinculados con los obtenidos a temperatura ambiente, por lo que la extrapolación a la temperatura de 25 °C en los diferentes análisis podría ser adecuada para predecir la cinética de oxidación a esta temperatura. Sin embargo, Gomes-Alonso *et al.* (2004) mencionan que en el estudio cinético de la oxidación de triglicéridos en el aceite de oliva, la ecuación de Arrhenius podría

emplearse para describir la dependencia de la temperatura de la formación de productos de oxidación primaria y secundaria solo entre 25 y 75 °C. Asimismo, Calligaris, citado por Manzocco *et al.* (2016) mencionan una linealidad en la ecuación de Arrhenius en el rango de 25 a 60 °C para los índices de peróxido medidos en aceite de palma con un orden de reacción cero, sin embargo, a 15 °C se mostraba una desviación en la ecuación de Arrhenius volviendo cuestionable la extrapolación a dicha temperatura. Es por esta razón que algunos autores como Calligaris *et al.* (2012) mencionan que la extrapolación de las velocidades de reacción a las temperaturas de almacenamiento habituales a partir de los datos de almacenamiento acelerado debe realizarse solo dentro del rango de temperatura probado experimentalmente para cumplir con el modelo de Arrhenius.

En comparación con la vida útil predicha con el equipo Rancimat, se obtuvo mayores valores con la vida útil predicha por las pruebas aceleradas en estufa. Las diferencias entre ambos resultados podría deberse a errores en la determinación de los valores de OSI debido al perfil de ácidos grasos del aceite de linaza, debido a que como mencionan Symoniuk *et al.* (2016b), los valores de OSI determinados por Rancimat en aceites de linaza pueden estar sujetos a algunos errores en su determinación ocasionado por algunas dificultades en la medición como la polimerización que sufre a las altas temperaturas trabajadas, lo que podría estar llevando a una subestimación de la vida útil predicha en comparación con el obtenido por la pruebas aceleradas en estufa. Los mismos autores recomiendan el uso de la calorimetría de barrido de presión diferencial (PDSC) en la determinación de tiempos de inducción en muestras de aceite de linaza. Además, Farhoosh (2007a) menciona que las predicciones de vida útil en estos métodos a menudo no se correlacionan con la estabilidad en condiciones ambientales debido a la cinética ampliamente divergente de la oxidación de lípidos en condiciones inusuales empleadas en estos métodos, lo que conlleva a errores en esta. Sin embargo, en ambas metodologías se observó un incremento de la vida útil por la adición de 80 ppm de licopeno en el aceite de linaza.

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un rendimiento del 33.38 ± 0.98 por ciento (p/p) en la extracción de aceite de linaza variedad marrón de Ayacucho (Perú).
- Se cuantificó 219.95 ± 1.76 μg licopeno/g de tomate en la extracción de licopeno con CO_2 supercrítico utilizando tomates orgánicos variedad Perseo cultivados en el huerto de la Universidad Nacional Agraria La Molina.
- La incorporación de 80 ppm de licopeno en el aceite de linaza no mostró diferencia significativa ($p > 0.05$) con el valor de OSI de 200 ppm de BHT en el aceite de linaza.
- Se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en las capacidades antioxidantes por ABTS, color, α -tocoferol y ácido linoleico entre los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno.
- La adición de licopeno en 80 ppm al aceite de linaza logró incrementar su vida útil en un 31.08 y 32.48 por ciento según el método Rancimat y por pruebas aceleradas en estufa, respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Determinar el aceite de linaza residual en la torta obtenida luego del prensado en frío de la linaza; de la misma forma, evaluar el contenido de licopeno en la muestra seca de tomate y en el residuo de la extracción con CO₂ supercrítico; en ambos casos para evaluar la recuperación de aceite de linaza y licopeno, respectivamente.
- Optimizar los parámetros de extracción (temperatura, presión y porcentaje de cosolvente) del extracto de licopeno utilizando el método de superficie respuesta teniendo como respuestas el contenido de licopeno y capacidad antioxidante.
- Evaluar el contenido de carotenoides, tocoferoles y perfil de ácidos grasos en el extracto de licopeno de tomate; evaluar la capacidad antioxidante de los aceites y el extracto de licopeno con el ensayo ORAC; evaluar el contenido de carotenoides totales en el aceite de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno.
- Cuantificar la variación de la capacidad antioxidante, polifenoles totales, tocoferoles, carotenoides totales, perfil de ácidos grasos y licopeno en los aceites de linaza y linaza con 80 ppm de licopeno durante el estudio de vida útil por pruebas aceleradas.
- Determinar la vida útil de los aceites por un método sensorial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anastasiu, AE; Chira, NA; Banub, I; Ionescuc, N; Stana, R; Rosca, SI. 2016. Oil productivity of seven Romanian linseed varieties as affected by weather conditions. *Industrial Crops and Products* 86:219-230.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists, Estados Unidos de América). 2016. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International*. 20 ed. Maryland, Estados Unidos de América.
- AOCS (American Oil Chemists' Society, Estados Unidos de América). 1998. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. 5 ed. Champaign, Estados Unidos de América.
- Arain, S; Sherazi, STH; Bhangar, MI; Talpur, FN; Mahesar, SA. 2009. Oxidative stability assessment of Bauhinia purpurea seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods. *Thermochimica Acta* 484(1-2):1-3.
- Arias Nuñuvero, JO; López Carranza, NA. 2015. Estabilidad oxidativa y perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de lino (*Linum usitatissimum*) procedentes de Corongo y Otuzco, extraído por prensado en frío. Tesis Ing. Áncash, Perú, UNS. 179 p.
- Arnao, MB. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology* 11(11):419-421.
- Attokaran, M. 2011. Natural food flavors and colorants. *In* Tomato. *Solanum lycopersicum* L (*Solanaceae*). Iowa, Estados Unidos de América, Blackwell Publishing. p. 387-389.
- Baysal, T; Ersus, S; Starmans, DAJ. 2000. Supercritical CO₂ Extraction of β -Carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(11):5507-5511.

- Bekhit, A.E.D; Shavandi, A; Jodjaja, T; Birch, J; Teh, S; Mohamed Ahmed, IA; Al-Juhaimi, FY; Saeedi, P; Bekhit, AA. 2018. Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13:129-152.
- Bera, D; Lahiri, D; Nag, A. 2006. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *Journal of Food Engineering* 74(4):542-545.
- Bernacchia, R; Preti, R; Vinci, G. 2014. Chemical Composition and Health Benefits of Flaxseed. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences* 2(8):1045-1053.
- Bockisch, M. 1998. Composition, structure, physical data, and chemical reactions of fats and oils, their derivatives, and their associates. *In Fats and oils Handbook*. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. p. 53-120.
- Bozan, B; Temelli, F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology* 99(14):6354–6359.
- Cabré Cabré, P; Massó Maresch, A. 1992. Determinación de la estabilidad a la oxidación de aceites y grasas por el método Rancimat. Suiza, Metrohm. 40 p.
- Cadoni, E; Rita De Giorgi, M; Medda, E; Poma, G. 2000. Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β -carotene from ripe tomatoes. *Dyes and Pigments* 44(1):27-32.
- Calligaris, S; Manzocco, L; Lagazio, C. 2012. Modeling Shelf Life Using Chemical, Physical, and Sensory Indicators. *In Nicoli, MC. 2012. Shelf life assessment of food*. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 75-126.
- Calligaris, S; Manzocco, L; Anese, M; NICOLI, MC. 2016. Shelf-life Assessment of Food Undergoing Oxidation - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(11):1903-1912.
- Cámara, M; de Cortes Sánchez-Mata, M; Fernández-Ruiz, V; Cámara, RM; Manzoor, S; Caceres, JO. Lycopene: A review of chemical and biological activity related to beneficial health effects. *In Rahman, AU. Studies in Natural Products Chemistry*. Oxford, Reino Unido, Elsevier B.V. v. 40, p. 383-426.

- Chang, CH; Lin, HY; Chang, CY; Liu, YC. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering* 77(3):478-485.
- Choe, E. 2017. Effects and Mechanisms of Minor Compounds in Oil on Lipid Oxidation. *In* Akoh, CC. *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 4 ed. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 567-588.
- Choksi, PM; Joshi, VY. 2007. A review on lycopene - extraction, purification, stability and applications. *International Journal of Food Properties* 10(2):289-298.
- Choo, WS; Birch, J; Dufour, JP. 2007a. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3):202-211.
- Choo, WS; Birch, J; Dufour, JP. 2007b. Physicochemical and stability characteristics of flaxseed oils during pan-heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84(8):735-740.
- Ciurlia, L; Bleve, M; Rescio, L. 2009. Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene. *Journal of Supercritical Fluids* 49(3):338-344.
- Cloutier, S. 2016. Linseed: Overview. *In* Wrigley, C; Corke, H; Seetharaman, K; Faubion, J. *Encyclopedia of Food Grains*. 2 ed. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 1, p. 259-264.
- Codex Alimentarius. 2017a. Norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. Norma Codex stan 19-1981. 5 p.
- Codex Alimentarius. 2017b. Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva. Norma Codex stan 33-1981. 9 p.
- Craft, BD; Kerrihard, AL; Amarowicz, R; Pegg, RB. 2012. Phenol-based antioxidants and the *In Vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11(2):149-173.

- Craft, NE. 2016. Tocopherols: Properties and determination. *In* Caballero, B; Finglas, P; Toldrá, F. Encyclopedia of food and health. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 5, p. 309-318.
- Dasgupta, A; Klein, K. 2014. Methods for measuring oxidative stress in the laboratory. *In* Antioxidants in food, vitamins and supplements. Prevention and Treatment of Disease. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 19-40.
- Daun, JK; Barthet, VJ; Chornick, TL; Duguid, S. 2003. Structure, composition, and variety development of flaxseed. *In* Thompson, LU; Cunnane, SC. Flaxseed in human nutrition. 2 ed. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. s.p.
- Dawidowicz, AL; Olszowy, M. 2013. The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *European Food Research and Technology* 236(6):1099-1105.
- Diederichsen, A; Richards, K. 2003. Cultivated flax and the genus *Linum* L. Taxonomy and germplasm conservation. *In* Muir, D; Westcott, ND. Flax. The genus *Linum*. London, Reino Unido, Taylor & Francis. s. p.
- Diener, RM; Christian, MS. 2008. Lycopene Overview: What It Is and What It Does. *In* Preedy, VR; Watson, RR. Lycopene. Nutritional, medicinal and therapeutic properties. Nuevo Hampshire, Estados Unidos de América, Science Publishers. p. 3-15.
- Dijkstra, AJ. 2016. Vegetable oils: Composition and analysis. *In* Caballero, B; Finglas, P; Toldrá, F. Encyclopedia of food and health. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 5, p. 357-364.
- Dini, A; Farrokhi, H; Sedaghat, N; Bagheri, M; Mohammadkhani, N. 2016. Evaluation of oxidative stability and shelf-life prediction of pistachio oil using Rancimat. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 15(5):399-412.
- Douny, C; Razanakolona, R; Ribonnet, L; Milet, J; Baeten, V; Rogez, H; Scippo, ML; Larondelle, Y. 2016. Linseed oil presents different patterns of oxidation in real-time and accelerated aging assays. *Food Chemistry* 208:111-115.

- Dunford, NT. 2015. Hemp and flaxseed oil: Properties and applications for use in food. *In* Talbot, G. Specialty oils and fats in food and nutrition: Properties, processing and applications. Cambridge, Reino Unido, Elsevier. p. 39-63.
- El-Beltagi, HS; Salama, ZA; El-Hariri, DM. 2011. Variations in oil and some phytochemical contents in flaxseed cultivars (*Linum usitatissimum* L.). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10(8):2711-2721.
- Elias, RJ; Decker, EA. 2017. Antioxidants and Their Mechanisms of Action. *In* Akoh, CC. Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 4 ed. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 543-566.
- Erkey, C. 2011. Fundamental aspects of supercritical fluids. *In* Supercritical fluids and organometallic compounds: from recovery of trace metals to synthesis of nanostructured materials. Ámsterdam, Países Bajos, Elsevier B.V. v. 1, p. 11-19.
- Esmailifard, N; Bahmaei, M; Ramezan, Y; Eshratbadi, P. 2017. Quality Characteristics of Iranian Extra Virgin Flaxseed Oil and the Effect of the Refining Stages before Deodorization on its Physicochemical Properties. *Journal of Pharmaceutical and Health Sciences* 5(1):81-89.
- Fan, L; Eskin, NAM. 2015. The use of antioxidants in the preservation of edible oils. *In* Shahidi, F. Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge, Reino Unido, Elsevier. p. 373-388.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1986. Manuals of food quality control. 7. Food analysis: general techniques, additives, contaminants, and composition. *FAO food and nutrition paper* 14(7):1-238.
- Farhoosh, R. 2007a. Shelf-life prediction of edible fats and oils using Rancimat. *Lipid Technology* 19(10):232-234.
- Farhoosh, R. 2007b. The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-Life Prediction of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84(3):205-209.
- Farhoosh, R; Niazmand, R; Rezaei, M; Sarabi, M. 2008. Kinetic parameter determination of

- vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(6):587-592.
- Fernández Sobrados, J. 2018. Extracción enzimática del aceite de moringa (*Moringa oleífera*) con prensa-expeller y determinación de su tiempo de vida en anaquel. Tesis Ing. Lima, Perú, UNALM. 122 p.
- Firestone, D. 2013. Characteristics of oils and fats of plant origin. *In* Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes. 3 ed. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. p. 1-226.
- Fitzpatrick, KC. 2011. Health Benefits of Flaxseed. *In* Hernandez, EM; Hosokawa, M. Omega-3 oils: Applications in functional foods. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. p. 213-264.
- Frankel, EN. 2005a. Free radical oxidation. *In* Lipid oxidation. 2 ed. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 15-24.
- Frankel, EN. 2005b. Stability methods. *In* Lipid oxidation. 2 ed. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 165-186.
- Frankel, EN. 2005c. Methods to determine extent of oxidation. *In* Lipid oxidation. 2 ed. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 99-127.
- Frankel, EN. 2005d. Antioxidants. *In* Lipid oxidation. 2 ed. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 209-258.
- Galicia-Cabrera, RM. 2007. Tomato processing. *In* Hui, YH. Handbook of food products manufacturing. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. p. 1091-1107.
- Ganorkar, PM; Jain, RK. 2013. Flaxseed - a nutritional punch. *International Food Research Journal* 20(2):519-525.
- García-Moreno, PJ; Pérez-Gálvez, R; Guadix, A; Guadix, EM. 2013. Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology* 51(1):303-308.

- Ghatak, PD; Sen, CK. 2017. Antioxidant additives in food preservation and human health. *In* Bagchi, D; Swaroop, A. Food Toxicology. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 377-394.
- Gliszczyńska-Świgło, A; Sikorska, E; Khmelinskii, I; Sikorski, M. 2007. Tocopherol content in edible plant oils. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57(4):157-161.
- Gómez-Alonso, S; Mancebo-Campos, V; Salvador, MD; Fregapane, G. 2004. Oxidation kinetics in olive oil triacylglycerols under accelerated shelf-life testing (25-75 °C). *European Journal of Lipid Science and Technology* 106(6):369-375.
- Gómez-Prieto, MS; Caja, MM; Herraiz, M; Santa-María, G. 2003. Supercritical Fluid Extraction of all-trans-Lycopene from Tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(1):3-7.
- González, M; Cid, C; Lobo, G. 2011. Usage of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds in health. *In* Preedy, VR; Watson, RR; Patel, VB. Nuts & seeds in health and disease prevention. s. 1, Academic Press. p. 1123-1132.
- Gordon, MH. 2003. Antioxidants: Natural antioxidants. *In* Caballero, B; Trugo, LC; Finglas, PM. Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2 ed. s. 1, Academic Press. p. 261-265.
- Griffiths, HR. 2016. Antioxidants: Characterization and Analysis. *In* Caballero, B; Finglas, P; Toldrá, F. Encyclopedia of food and health. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 1, p. 221-226.
- Gülçin, İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* 86(3):345-391.
- Gunstone, FD. 2013. Composition and properties of edible oils. *In* Hamm, W; Hamilton, RJ; Calliauw, G. Edible oil processing. 2 ed. Oxford, Reino Unido, John Wiley. p. 1-39.
- Gupta, MK. 2017a. Basic oil chemistry. *In* Practical guide to vegetable oil processing. 2 ed. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 7-25.
- Gupta, MK. 2017b. Basic oil chemistry. Insight to oil quality management. *In* Practical guide to vegetable oil processing. 2 ed. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 323-340.

- Gupta, P; Sreelakshmi, Y. Sharma, R. 2015. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods* 11(5):1-12.
- Hall, LM; Booker, H; Siloto, RMP; Jhala, AJ; Weselake, RJ. 2016. Flax (*Linum usitatissimum* L.). In McKeon, TA; Hayes, DG; Hildebrand, DF; Weselake, RJ. *Industrial oil crops*. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 157-194.
- Hammond, EW. 2003. Vegetable oils: Types and properties. In Caballero, B; Trugo, LC; Finglas, PM. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2 ed. s. 1, Academic Press. p. 5899-5904.
- Henry, LK; Catignani, GL; Schwartz, SJ. 1998. The influence of carotenoids and tocopherols on the stability of safflower seed oil during heat-catalyzed oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(10):1399-1402.
- Herchi, W; Ben Ammar, K; Bouali, I; Bou Abdallah, I; Guetet, A; Boukhchina, S. 2016. Heating effects on physicochemical characteristics and antioxidant activity of flaxseed hull oil (*Linum usitatissimum* L). *Food Science and Technology* 36(1):(6).
- Herchi, W; Bouali, I; Bahashwan, S; Rochut, S; Boukhchina, S; Kallel, H; Pepe, C. 2012. Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. *Plant Physiology and Biochemistry* 54:1-5.
- Herchi, W; Sakouhi, F; Arráez-Román, D; Segura-Carretero, A; Boukhchina, S; Kallel, H; Fernández-Gutierrez, A. 2011. Changes in the content of phenolic compounds in Flaxseed Oil during development. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88(8):1135-1142.
- Hernández Suárez, M; Rodríguez Rodríguez, EM; Díaz Romer, C. 2008. Chemical composition of tomato (*Lycopersicon esculentum*) from Tenerife, the Canary Islands. *Food Chemistry* 106(1):1046-1056.
- Huang, W; Li, Z; Niu, H; Li, D; Zhang, J. 2008. Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 89(3):298-302.

- Ibáñez, E; Mendiola, JA; Castro-Puyana, M. 2016. Supercritical Fluid Extraction. *In* Caballero, B; Finglas, P; Toldrá, F. Encyclopedia of food and health. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 5, p. 227-233.
- ISO (International Organization for Standardization, Suiza). 2011. Animal and vegetable fats and oils - Determination of ultraviolet absorbance expressed as specific UV extinction. Norma ISO 3656-2011. Ginebra, Suiza. feb. 8 p.
- ISO (International Organization for Standardization, Suiza). 2016. Animal and vegetable fats and oils - Determination of anisidine value. Norma ISO 6885-2016. Ginebra, Suiza. feb. 7 p.
- ITP (Instituto Tecnológico de la Producción, Perú). 1998. Aceites y Grasas: Cromatografía de gases. Callao, Perú.
- IUPAC (International Union Pure Applied Chemistry, Estados Unidos de América).1987. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7 ed. Boston, Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Jorge, A; Almeida, DM; Canteri, MHG; Sequinel, T; Kubaski, ET; Tebcherani, SM. 2014. Evaluation of the chemical composition and colour in long-life tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) dehydrated by combined drying methods. International Journal of Food Science and Technology 49(9):2001-2007.
- Jorge, A; Sauer Leal, E; Sequinel, R; Sequinel, T; Kubaski, ET; Tebcherani, SM; 2017. Changes in the composition of tomato powder (*Lycopersicon esculentum* Mill) resulting from different drying methods. Journal of Food Processing and Preservation 42(5):1-8.
- Kamal Eldin, A. 2010. Methods to determine the extent of lipid oxidation in foods. *In* Decker, EA; Elias, RJ; McClements, DJ. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. v. 1, p. 181-195.
- Kassama, LS; Shi, J; Mittal, GS. 2008. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. Separation and Purification Technology 60(3):278-284.

- Kaur, D; Singh Sogi, D; Wani, A. 2015. Oxidative stability of soybean triacylglycerol using carotenoids and γ -tocopherol. *International Journal of Food Properties*, 18(12):2605-2613.
- Kaur, D; Wani, AA; Singh, DP; Sogi, DS. 2011. Shelf Life Enhancement of Butter, IceCream, and Mayonnaise by Addition of Lycopene. *International Journal of Food Properties* 14(6):1217-1231.
- Kaur, P; Kaur, J. 2015. Potential role of lycopene as antioxidant and implications for human health and disease. *In* Bailey, JR. 2015. Lycopene. Food sources, potential role in human health and antioxidant effects. Nueva York, Estados Unidos de América, Nova Science Publishers. p. 1-38.
- Khattab, RY; Zeitoun, MA. 2013. Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT - Food Science and Technology* 53:338-345.
- Kivevele, T; Huan, Z. 2015. Review of the stability of biodiesel produced from less common vegetable oils of African origin. *South African Journal of Science* 111(9-10):1-7.
- Kochhar, SP. 2002. Sesame, rice-bran and flaxseed oils. *In* Gunstone, FD. 2002. Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses. Oxford, Reino Unido, Blackwell Publishing. p. 297-326.
- Konar, N; Haspolat, I; Poyrazoğlu, ES; Demir, K; Artık, N. 2012. A Review on Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Lycopene from Tomato and Tomato Products. *Karalimas Science and Engineering Journal* 2(1):69-75.
- Kong, F; Singh, RP. 2016. Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages. *In* Subramaniam, P. The stability and shelf life of food. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 43-76.
- Kopec, RE; Cooperstone, JL; Cichon, MJ; Schwartz, SJ. 2012. Analysis methods of carotenoids. *In* Xu, Z; Howard, LR. Analysis of antioxidant-rich phytochemicals. Oxford, Reino Unido, John Wiley. p. 105-148.
- Kostadinović Veličkovska, S; Brühl, L; Mitrev, S; Mirhosseini, H; Matthäus, B. 2015. Quality evaluation of cold-pressed edible oils from Macedonia. *European journal of lipid*

science and technology 117(2):2023-2035.

Kristott, J. 2000. Fats and oils. *In* Kilcast, D; Subramaniam, P. The stability and shelf-life of food. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. s. p.

Laguerre, M; Lecomte, J; Villeneuve, P. 2015. The use and effectiveness of antioxidants in lipids preservation: beyond the polar paradox. *In* Shahidi, F. Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge, Reino Unido, Elsevier. p. 349-372.

Lanzocco, L; Calligaris, S; Nicolo, MC. 2010. Methods for food shelf life determination and prediction. *In* Decker, EA; Elias, RJ; McClements, DJ. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. v. 1, p. 196-222.

Lavecchia, R; Zuorro, A. 2006. Thermal stability of tomato lycopene in vegetable oils. *Chemical Technology: An Indian Journal* 1(2-4):80-87.

Lenucci, MS; Caccioppola, A; Durante, M; Serrone, L; Leonardo, R; Piro, G; Dalessandro, G. 2010. Optimisation of biological and physical parameters for lycopene supercritical CO₂ extraction from ordinary and high-pigment tomato cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(10):1709-1718.

Lenucci, MS; De Caroli, M; Marrese, PP; Iurlaro, A; Rescio, L; Böhm, V; Dalessandro, G; Piro, G. 2015. Enzyme-aided extraction of lycopene from high-pigment tomato cultivars by supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry* 170:193-202.

León-García, E; Del Ángel Coronel, OA; Vela-Gutiérrez, G; De la Cruz Medina, J; García, HS. 2018. Tomato (*Solanum lycopersicum*). *In* Yahia, EM. Fruit and vegetable phytochemicals. Chemistry and human health. 2 ed. Oxford, Reino Unido, John Wiley. v. 2, p. 1259-1277.

Li, X; Liu, C; Sun, Y; Du, J; Xing, Y. 2011. Effects of Lycopene on Oxidative Stability of Soybean Oil. *Advanced Materials Research* 236-238:2303-2306.

Machmudah, S; Wahyudiono; Goto, M. 2015. Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids. *In* Fornari, T; Stateva, RP. High pressure fluid technology for green food processing. Suiza, Springer International Publishing. p. 397-426.

- Magalhães, LM; Barreiros, L; Maia, MA; Reis, S; Segundo, MA. 2012. Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta* 15(97):473-483.
- Maheshwari, P; Kovalchuk, I. 2016. Genetic transformation of crops for oil production. *In* McKeon, TA; Hayes, DG; Hildebrand, DF; Weselake, RJ. *Industrial oil crops*. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 379-412.
- Makahleh, A; Saad, B; Bari, MF. 2015. Synthetic phenolics as antioxidants for food preservation. *In* Shahidi, F. *Handbook of antioxidants for food preservation*. Cambridge, Reino Unido, Elsevier. p. 51-78.
- Mancebo-Campos, V; Fregapane, G; Desamparados Salvador, M. 2008. Kinetic study for the development of an accelerated oxidative stability test to estimate virgin olive oil potential shelf life. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(10):969-976.
- Manzocco, L. 2012. The Acceptability Limit. *In* Nicoli, MC. 2012. *Shelf life assessment of food*. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 37-60.
- Manzocco, L; Calligaris, S; Anese, M; Nicoli, MC. 2016. Determination and prediction of shelf life of oils/fats and oil/fat-based foods. *In* Hu, M; Jacobsen, C. *Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats*. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 133-156.
- Marfil Navarro, R. 2008. *Parámetros de calidad y componentes con interés nutricional del aceite de Argán (Argania spinosa)*. Tesis Dr. Granada, España, UGR. 235 p.
- Matthäus, B. 2010. Oxidation of edible oils. *In* Decker, EA; Elias, RJ; McClements, DJ. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Management in different industry sectors*. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. v. 2, p. 183-238.
- McGlasson, B. 2003. Tomatoes. *In* Caballero, B; Trugo, LC; Finglas, PM. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2 ed. s. 1, Academic Press. p. 5800-5808.
- McVetty, PBE; Lukow, OM; Hall, LM; Rajcan, I; Rahman, H. 2016. Grain Production and Consumption: Oilseeds in North America. *In* Wrigley, C; Corke, H; Seetharaman, K;

- Faubion, J. Encyclopedia of Food Grains. 2 ed. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 1, p. 401-408.
- Michotte, D; Rogez, H; Chirinos, R; Mignolet, E; Campos, D; Larondelle, Y. 2011. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. Food Chemistry 129:1228-1231.
- MINSA (Ministerio de Salud, Perú); INS (Instituto Nacional de Salud, Perú); CENAN (Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, Perú). 2017. Tablas peruanas de composición de alimentos. 10 ed. Reyes, M; Gómez-Sánchez, I; Espinoza, C. Lima, Perú. 142 p.
- Moharram, HA; Youssef, MM. 2014. Methods for determining the antioxidant activity: A review. Alexandria Journal of Food Science and Technology 11(1):31-42.
- Montesano, D; Cossignani, L; D'Arco, G; Simonetti, MS; Damiani, P. 2006. Pure Lycopene from Tomato Preserves Extra Virgin Olive Oil from Natural Oxidative Events During Storage. Journal of the American Oil Chemists' Society 83(11):933-941.
- Morris, DH. 2007. Description and Composition of Flax. *In* Flax: a health and nutrition primer. 4 ed. Canadá, Flax Council of Canada. p. 9-21.
- Mridula, D; Barnwal, P; Singh, KK. 2015. Screw pressing performance of whole and dehulled flaxseed and some physico-chemical characteristics of flaxseed oil. Journal of Food Science and Technology 52(3):1498-1506.
- Mueller, K; Eisner, P; Yoshie-Stark, Y; Nakada, R; Kirchhoff, E. 2010. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Food Engineering 98:453-460.
- Nag, A. 2000. Stabilization of Flaxseed Oil with Capsicum Antioxidant. Journal of the American Oil Chemists' Society 77(7):799-800.
- Nicoli, MC. 2012. An introduction to food shelf life: Definitions, basic concepts, and regulatory aspects. *In* Shelf life assessment of food. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 1-15.

- Nykter, M; Kymäläinen, HR. 2006. Quality characteristics of edible linseed oil. *Agricultural and food science* 15(4):402-413.
- O'Brien, RD. 2009. Fats and oils analysis. *In Fats and oils: Formulating and processing for applications*. 3 ed. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 197-261.
- Obranović, M; Škevin, D; Kraljić, K; Pospišil, M; Nederal, S; Blekić, M; Putnik, P. 2015. Influence of Climate, Variety and Production Process on Tocopherols, Plastochromanol-8 and Pigments in Flaxseed Oil. *Food Technology and Biotechnology* 53(4):496-504.
- Omar, KA; Shan, L; Wang, YL; Wang, X. 2010. Stabilizing flaxseed oil with individual antioxidants and their mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(9):1003-1011.
- Omer, E; Thapa, M; Hong, L; Lianfu, Z. 2014. The Influence of Lycopene and Other Natural Antioxidants on Refined Sunflower Oil Stability. *International Journal of Engineering Research & Technology* 3(3):86-91.
- Oomah, BD. 2003. Processing of flaxseed fiber, oil, protein, and lignan. *In Thompson, LU; Cunnane, SC. Flaxseed in human nutrition*. 2 ed. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. s.p.
- Oomah, BD; Mazza, G. 1998. Compositional changes during commercial processing of flaxseed. *Industrial Crops and Products* 9(1):29-37.
- Osawa, CC; Gonçalves, LAG; Ragazzi, S. 2008. Evaluation of the quality of pet foods using fast techniques and official methods. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28:223-230.
- Ozgen, M; Reese, RN; Tulio, AZ; Scheerens JC; Miller AR. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(4):1151-1157.
- Padmanabhan, P; Cheema, A; Paliyath, G. 2016. Solanaceous fruits including tomato, eggplant, and peppers. *In Caballero, B; Finglas, P; Toldrá, F. Encyclopedia of food and health*. Oxford, Reino Unido, Elsevier. v. 5, p. 24-32.

- Panfili, G; Fratianni, A; Irano, M. 2003. Normal-phase High-Performance Liquid Chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14): 3940-3944.
- Papaioannou, EH; Liakopoulou-Kyriakides, M; Karabelas, AJ. 2016. Natural Origin Lycopene and Its 'Green' Downstream Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(4):686-709.
- Pérez-Jiménez, J; Arranz, S; Taberner, M; Díaz-Rubio, E; Serrano, J; Goñi, I; Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41(3):274-285.
- Piergiovanni, L; Limbo, S. 2010. Packaging and the Shelf Life of Vegetable Oils. *In* Robertson, GL. *Food packaging and shelf life. A practical guide.* Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 317-338.
- Prior, RL; 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(10):4290-4302.
- Przybylski, R. 2005. Flax oil and high linolenic oils. *In* Shahidi, F. 2005. *Edible oil and fat products: Edible oils.* 6 ed. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. v. 2, p. 281-301.
- Pu, J; Sathivel, S. 2011. Kinetics of Lipid Oxidation and Degradation of Flaxseed Oil Containing Crawfish (*Procambarus clarkii*) Astaxanthin. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88(5):595-601.
- Raczyk, M; Popis, E; Kruszewski, B; Ratusz, K; Rudzińska, M. 2016. Physicochemical quality and oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum*) and camelina (*Camelina sativa*) cold-pressed oils from retail outlets. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118(5):834-839.

- Ramis-Ramos, G. 2003. Antioxidants: Synthetic antioxidants. *In* Caballero, B; Trugo, LC; Finglas, PM. Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2 ed. s. 1, Academic Press. p. 265-275.
- Rao, AV; Ray, MR; Rao, LG. 2006. Lycopene. *In* Taylor, SL. Advances in food and nutrition research. California, Estados Unidos de América, Elsevier Inc. v. 51, p. 99-164.
- Ricciutellia, M; Marconi, S; Boarelli, MC; Caprioli, G; Sagratini, G; Ballini, R; Fiorini, D. 2017. Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *Journal of Chromatography A* 1481:53-63.
- Robertson, GL. 2010. Food quality and indices of failure. *In* Food packaging and shelf life. A practical guide. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 17-30.
- Rocha, CE; Roehrs, R; Roehrs, M. 2015. Chemistry, sources and benefits of lycopene. *In* Bailey, JR. 2015. Lycopene. Food sources, potential role in human health and antioxidant effects. Nueva York, Estados Unidos de América, Nova Science Publishers. p. 105-113.
- Rodriguez-Amaya, DB. 2015. Carotenes and xanthophylls as antioxidants. *In* Shahidi, F. Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge, Reino Unido, Elsevier. p. 17-50.
- Rozzi, NL; Singh, RK; Vierling, RA; Watkins, BA. 2002. Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(9):2638-2643.
- Saini, RK; Keum, YS. 2016. Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International* 82:59-70.
- Schaich, KM. 2005. Lipid oxidation: Theoretical aspects. *In* Shahidi, F. Bailey's industrial oil and fat products. Edible oil and fat products: Chemistry, properties, and health effects. 6 ed. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. v. 1, p. 269-355.

- Schaich, KM. 2016. Analysis of lipid and protein oxidation in fats, oils, and foods. *In* Hu, M; Jacobsen, C. Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats. London, Reino Unido, Elsevier Inc. p. 1-131.
- Schaich, KM; Tian, X; Xie, J. 2015. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods* 18 pt. B:782-796.
- Schlesier, K; Harwat, M; Böhm, V; Bitsch, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 36(2):177-187.
- Schuyvens, C. 2014. Food additives: Antioxidants. *In* Motarjemi, Y; Moy, GG; Todd, ECD. Encyclopedia of food safety. San Diego, Estados Unidos de América, Elsevier Inc. v. 2, p. 455-458.
- Scrimgeour, C. 2005. Chemistry of fatty acids. *In* Shahidi, F. Bailey’s industrial oil and fat products. Edible oil and fat products: Chemistry, properties, and health effects. 6 ed. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. v. 1, p. 1-43.
- Sgherri, C; Pérez-López, U; Pinzino, C. 2015. Antioxidant properties of food products containing lycopene are increased by the presence of chlorophyll. *In* Bailey, JR. 2015. Lycopene. Food sources, potential role in human health and antioxidant effects. Nueva York, Estados Unidos de América, Nova Science Publishers. p. 39-89.
- Shadyro, OI; Sosnovskaya, AA; Edimecheva, IP. 2017. Flaxseed oil stabilization using natural and synthetic antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119(10):1-11.
- Shahidi, F; Ambigaipalan, P; Wanasundara, PKJPD. 2017a. Extraction and Analysis of Lipids. *In* Akoh, CC. Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 4 ed. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 131-166.
- Shahidi, F; Wanasundara, PKJPD. 2005. Antioxidants: Science, technology, and applications. *In* Shahidi, F. Bailey’s industrial oil and fat products. Edible oil and fat products: Chemistry, properties, and health effects. 6 ed. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. v. 1, p. 431-489.

- Shahidi, F; Wang, J; Wanasundara, UN. 2017b. Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils. *In* Akoh, CC. Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 4 ed. Florida, Estados Unidos de América, Taylor & Francis. p. 519-542.
- Shahidi, F; Zhong, Y. 2005a. Lipid oxidation: Measurement methods. *In* Shahidi, F. Bailey's industrial oil and fat products. Edible oil and fat products: Chemistry, properties, and health effects. 6 ed. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. v. 1, p. 357-385.
- Shahidi, F; Zhong, Y. 2005b. Antioxidants: Regulatory Status. *In* Shahidi, F. Bailey's industrial oil and fat products. Edible oil and fat products: Chemistry, properties, and health effects. 6 ed. Nueva Jersey, Estados Unidos de América, John Wiley. v. 1, p. 491-512.
- Shi, J; Le Maguer, M. 2000. Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. *Critical Reviews in Biotechnology* 20(4):293-334.
- Shi, J; Xue, SJ. 2008. Stability of lycopene during food processing and storage. *In* Preedy, VR; Watson, RR. Lycopene. Nutritional, medicinal and therapeutic properties. Nuevo Hampshire, Estados Unidos de América, Science Publishers. p. 17-36.
- Shi, J; Xue, SJ; Jiang, Y; Ye, X. 2010. Supercritical-fluid extraction of lycopene from tomatoes. *In* Rizvi, SSH. Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 619-645.
- Shim, YY; Gui, B; Arnison, PG; Wang, Y; Reaney, MJT. 2014. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science & Technology* 38:5-20.
- Shim, YY; Gui, B; Wang, Y; Reaney, MJT. 2015. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil processing and selected products. *Trends in Food Science & Technology* 43:162-177.
- Siger, A; Nogala-Kalucka, M; Lampart-Szczapa, E. 2008. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids* 15(2):137-149.

- Singh, J; Bargale, PC. 2000. Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering* 43(2):75-82.
- Singh, KK; Jhamb, SA; Kumar, R. 2011. Effect of pretreatments on performance of screw pressing for flaxseed. *Journal of Food Process Engineering* 35(4):543-556.
- Singh, KK; Wiesenborn, DP; Tostenson, K; Kangas, N. 2002. Influence of Moisture Content and Cooking on Screw Pressing of Crambe Seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(2):165-170.
- Singh, TK; Cadwallader, KR. 2002. The shelf life of foods: An overview. *In* Cadwallader, KR; Weenen, H. *Freshness and shelf life of foods*. Washington D. C., Estados Unidos de América, American Chemical Society. p. 2-21.
- Siwach, R; Tokas, J; Seth, R. 2016. Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. *Food Chemistry* 199:541-546.
- Stenson, DF; Min, DB. 2000. Effects of β -Carotene and Lycopene Thermal Degradation Products on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(11):1153-1160.
- Surendar, J; Shere, DM; Shere, PD. 2018. Effect of drying on quality characteristics of dried tomato powder. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(2):2690-2694.
- Symoniuk, E; Ratusz, K; Krygier, K. 2016a. Comparison of the oxidative stability of cold-pressed rapeseed oil using Pressure Differential Scanning Calorimetry and Rancimat methods. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119(5):1-9.
- Symoniuk, E; Ratusz, K; Krygier, K. 2016b. Comparison of the oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil by pressure differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. *Journal of Food Science and Technology* 53(11):3986-3995.
- Symoniuk, E; Ratusz, K; Krygier, K. 2017. Oxidative stability and the chemical composition of market cold-pressed linseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119(11):170055.
- Taghvaei, M; Jafari, SM; Sadeghi Mahoonak, A; Mehregan Nikoo, A; Rahmanian, N;

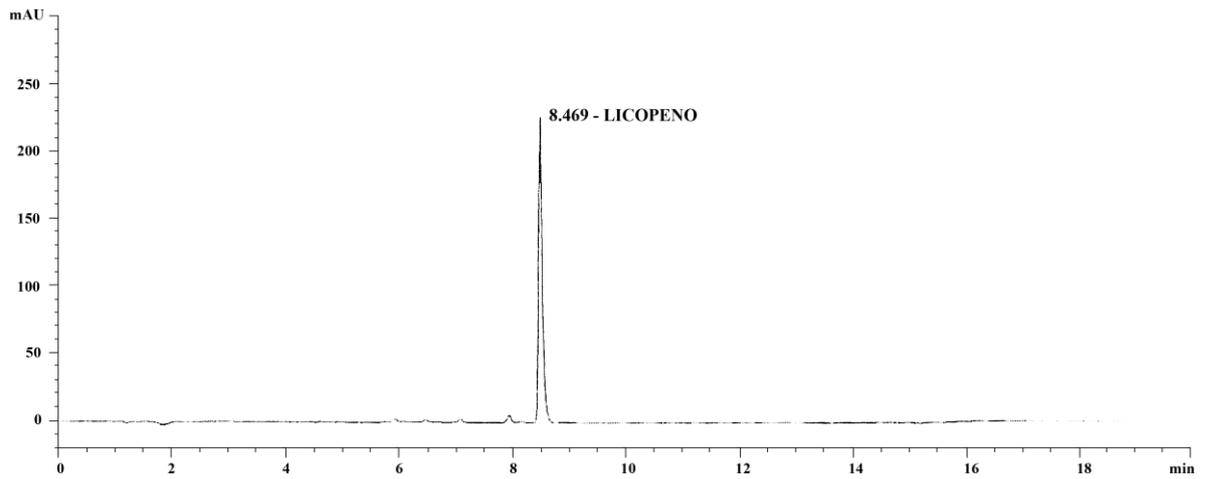
- Hajitabar, J; Meshginfar, N. 2014. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. *LWT - Food Science and Technology* 56(1):124-130.
- Talbot, G. 2011. The stability and shelf life of fats and oils. *In* Kilcast, D; Subramaniam, P. Food and beverage stability and shelf life. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 683-715.
- Talbot, G. 2016. The stability and shelf life of fats and oils. *In* Subramaniam, P. The stability and shelf life of food. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. p. 461-503.
- Tan, CP; Nehdi, IA. 2012. The physicochemical properties of palm oil and its components. *In* Lai, OM; Tan, CP; Akoh, CC. Palm oil. Production, processing, characterization, and uses. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. p. 377-391.
- Tańska, M; Roszkowska, B; Skrajda, M; Dąbrowski, G. 2016. Commercial Cold Pressed Flaxseed Oils Quality and Oxidative Stability at the Beginning and the End of Their Shelf Life. *Journal of Oleo Science* 65(2):111-121.
- Tinello, F; Lante, A; Bernardi, M; Cappiello, F; Galgano, F; Caruso, MC; Favati, F. 2017. Comparison of OXITEST and RANCIMAT methods to evaluate the oxidative stability in frying oils. *European Food Research and Technology* 244(4):747-755.
- Tostenson, K; Wiesenborn, D; Zheng, Y; Lipp, D; Kangas, N. 2004. Start-up approaches and performance monitoring for screw-pressing flaxseed oil. ASAE/CSAE annual international meeting. p. 1-10.
- Tsao, R. 2015. Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. *In* Shahidi, F. Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge, Reino Unido, Elsevier. p. 335-347.
- Tuberoso, CIG; Kowalczyk, A; Sarritzu, E; Cabrera, P. 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry* 103(4):1494-1501.
- Van De Mark, MR; Sandefur, K. 2005. Vegetable oils in paint and coatings. *In* Erhan, SZ. Industrial uses of vegetable oils. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. s. p.

- van Doosselaere, P. 2013. Production of oils. *In* Hamm, W; Hamilton, RJ; Calliauw, G. Edible oil processing. 2 ed. Oxford, Reino Unido, John Wiley. p. 55-96.
- van Ruth, SM; Shaker, ES; Morrissey, PA. 2001. Influence of methanolic extracts of soybean seeds and soybean oil on lipid oxidation in linseed oil. *Food Chemistry* 75(2):177-184.
- Vasapollo, G; Longo, L; Rescio, L; Ciurlia, L. 2004. Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 29(1-2):87-96.
- Vasconcelos dos Santos, O; da Silva Lannes, SC. 2015. Application of supercritical fluid extraction technology to obtain Brazil nut oil. *In* Lindy, J. Supercritical fluid extraction. Technology, applications and limitations. Nueva York, Estados Unidos de América, Nova Science Publishers. p. 25-46.
- Verhoeff, M; van Duijn, G. 2013. Quality and food safety assurance and control. *In* Hamm, W; Hamilton, RJ; Calliauw, G. Edible oil processing. 2 ed. Oxford, Reino Unido, John Wiley. p. 251-266.
- Verleyen, T; Van Dyck, S; Adams, CA. 2005. Accelerated stability tests. *In* Kamal-Eldin, A; Pokorný, J. Analysis of lipid oxidation. Illinois, Estados Unidos de América, AOCS Press. s. p.
- Wagner, KH; Elmadfa, I. 2000. Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102(10):624-629.
- Weber, RW. 2014. Adverse reactions to the antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *In* Metcalfe, DD; Sampson, HA; Simon, RA; Lack, G. Food Allergy. Adverse reaction to foods and food additives. Oxford, Reino Unido, John Wiley. p. 393-401.
- Wiesenborn, D; Kangas, N; Tostenson, K; Hall III, C; Chang, K. 2005. Sensory and Oxidative Quality of Screw-Pressed Flaxseed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82(12):887-892.

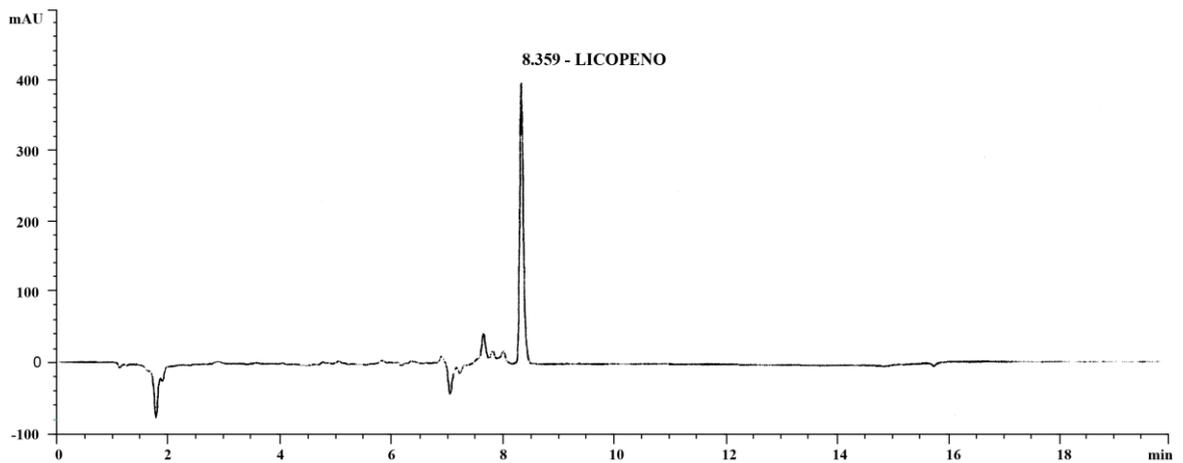
- Wong, DWS. 2018. Lipids. *In* Mechanism and theory in food chemistry. 2 ed. California, Estados Unidos de América, Springer. p. 1-53.
- Yahia, EM; Maldonado Celis, ME; Svendsen, M. 2018. The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. *In* Yahia, EM. Fruit and vegetable phytochemicals. Chemistry and human health. 2 ed. Oxford, Reino Unido, John Wiley. v. 1, p. 3-52.
- Yanishlieva-Maslarova, NV. 2001. Inhibiting oxidation. *In* Pokorny, J; Yanishlieva, N; Gordon, M. Antioxidants in Food: Practical Applications. Cambridge, Reino Unido, Woodhead Publishing. s. p.
- Yi, C; Shi, J; Xue, SJ; Jiang, Y; Li, D. 2009. Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity. *Food Chemistry* 113(4):1088-1094.
- Zhang, K; Jiang, H; Ren, Y. 2011a. The Effect of Technical Parameters on Lycopene Extraction in Supercritical Fluid Extraction from Freeze-Dried Tomato Pomace (Peels and Seeds). *Advanced Materials Research* 236-238:2868-2871.
- Zhang, ZS; Li, D; Zhang, LX. 2013. Effect of Heating on the Fatty Acid Composition and Oxidation Products of Flaxseed Oil. *Asian journal of chemistry* 25(18):10082-10086.
- Zhang, ZS; Wang, LJ; Li, D; Li, SJ; Özkan, N. 2011b. Characteristics of flaxseed oil from two different flax plants. *International Journal of Food Properties* 14(6):1286-1296.
- Zheng, YL; Wiesenborn, DP; Tostenson, K; Kangas, N. 2003. Screw Pressing of Whole and Dehulled Flaxseed for Organic Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(10):1039-1045.
- Zuk, M; Richter, D; Matuła, J; Szopa, J. 2015. Linseed, the multipurpose plant. *Industrial Crops and Products* 75 pt. B:165-177.
- Zuknik, MH; Nik Norulaini, NA; Mohd Omar, AK. 2012. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene: A review. *Journal of Food Engineering* 112(4):253-262.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE LICOPENO



ANEXO 2: CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DE LICOPENO DE TOMATE



ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR OSI A 110 °C

ANOVA para el valor OSI a 110 °C

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.4748300	4	0.36870700	157.12	0.0000
Intra grupos	0.0234667	10	0.00234667		
Total (Corr.)	1.4982900	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para el valor OSI a 110 °C

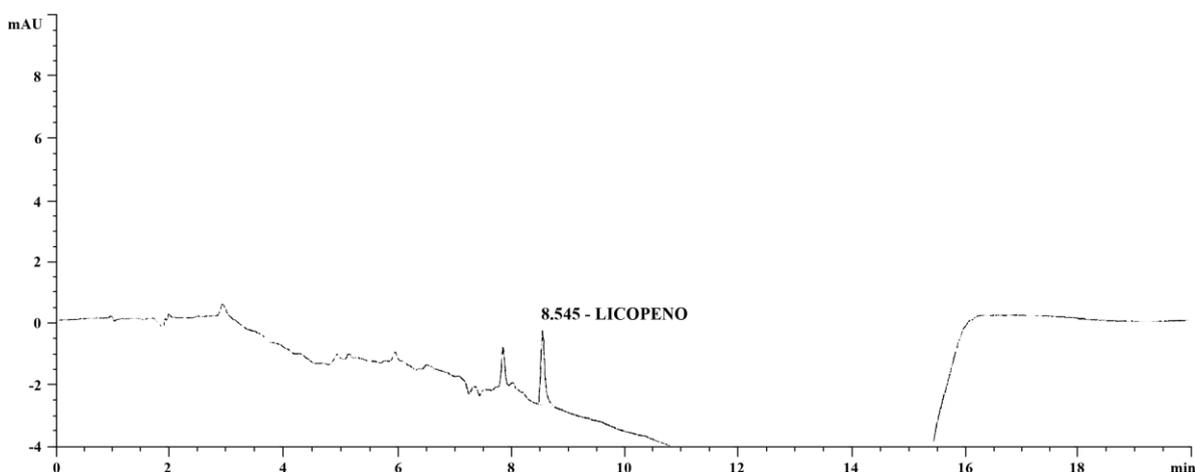
Método: 95.0 porcentaje Duncan

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	2.18000	X
Linaza + Licopeno 40 ppm	3	2.65000	X
Linaza + Licopeno 80 ppm	3	2.90667	X
Linaza BHT 200 ppm	3	2.94000	X
Linaza + Licopeno 120 ppm	3	3.06000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno 120 ppm - Linaza + Licopeno 40 ppm	*	0.41
Linaza + Licopeno 120 ppm - Linaza + Licopeno 80 ppm	*	0.153333
Linaza + Licopeno 120 ppm - Linaza	*	0.88
Linaza + Licopeno 120 ppm - Linaza BHT 200 ppm	*	0.12
Linaza + Licopeno 40 ppm - Linaza + Licopeno 80 ppm	*	-0.256667
Linaza + Licopeno 40 ppm - Linaza	*	0.47
Linaza + Licopeno 40 ppm - Linaza BHT 200 ppm	*	-0.29
Linaza + Licopeno 80 ppm - Linaza	*	0.726667
Linaza + Licopeno 80 ppm - Linaza BHT 200 ppm		-0.0333333
Linaza - Linaza BHT 200 ppm	*	-0.76

* indica una diferencia significativa

ANEXO 4: CROMATOGRAMA DEL ACEITE DE LINAZA CON 80 PPM DE LICOPENO



ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA HUMEDAD

ANOVA para la Humedad

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.011266700	1	0.011266700	52.00	0.0020
Intra grupos	0.000866667	4	0.000216667		
Total (Corr.)	0.012133300	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para la Humedad

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	3	0.520000	X
Linaza	3	0.606667	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.086667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

ANOVA para el Índice de Refracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	26.0417	1	0.000001815		
Intra grupos	1.53333	4	0		
Total (Corr.)	27.5750	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Índice de Refracción

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	3	1.4802	X
Linaza	3	1.4813	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.0011

* indica una diferencia significativa

ANEXO 7: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PARÁMETRO L* DE COLOR

ANOVA para el parámetro L* de color

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	349.3010	1	349.30100	5662.82	0.0000
Intra grupos	0.246733	4	0.0616833		
Total (Corr.)	349.5480	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el parámetro L* de color

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	3	20.9733	X
Linaza	3	36.2333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-15.26

* indica una diferencia significativa

ANEXO 8: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PARÁMETRO a* DE COLOR

ANOVA para el parámetro a* de color

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	65.5381	1	65.5381	1800.50	0.0000
Intra grupos	0.14560	4	0.03640		
Total (Corr.)	65.6837	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el parámetro a* de color

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	-1.40	X
Linaza + Licopeno	3	5.21	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	6.61

* indica una diferencia significativa

ANEXO 9: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PARÁMETRO b* DE COLOR

ANOVA para el parámetro b* de color

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	584.304	1	584.3040	1935.21	0.0000
Intra grupos	1.20773	4	0.301933		
Total (Corr.)	585.512	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el parámetro b* de color

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	3	4.69667	X
Linaza	3	24.4333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-19.7367

* indica una diferencia significativa

ANEXO 10: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES

ANOVA para los Ácidos grasos libres

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000777482	1	0.000777482	1.71	0.2605
Intra grupos	0.001813510	4	0.000453377		
Total (Corr.)	0.002590990	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para los Ácidos grasos libres

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	0.478333	X
Linaza + Licopeno	3	0.501100	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.0227667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 11: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÍNDICE DE PERÓXIDO

ANOVA para el Índice de peróxido

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000117042	1	0.000117042	0.15	0.7181
Intra grupos	0.003116570	4	0.000779143		
Total (Corr.)	0.003233620	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Índice de peróxido

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	0.288533	X
Linaza + Licopeno	3	0.297367	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.00883333

* indica una diferencia significativa

ANEXO 12: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR P-ANISIDINA

ANOVA para el Valor p-Anisidina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00273493	1	0.002734930	8.04	0.0470
Intra grupos	0.00135997	4	0.000339993		
Total (Corr.)	0.00409491	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Valor p-Anisidina

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	0.171867	X
Linaza + Licopeno	3	0.214567	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.0427

* indica una diferencia significativa

ANEXO 13: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR k₂₃₂

ANOVA para el Valor k₂₃₂

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.01473120	1	0.01473120	7.74	0.0497
Intra grupos	0.00761534	4	0.00190384		
Total (Corr.)	0.02234660	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Valor k₂₃₂

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	1.2082	X
Linaza + Licopeno	3	1.3073	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.0991

* indica una diferencia significativa

ANEXO 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR k₂₆₈

ANOVA para el Valor k₂₆₈

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00016854	1	0.00016854	4.98	0.0895
Intra grupos	0.00013544	4	0.00003386		
Total (Corr.)	0.00030398	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Valor k₂₆₈

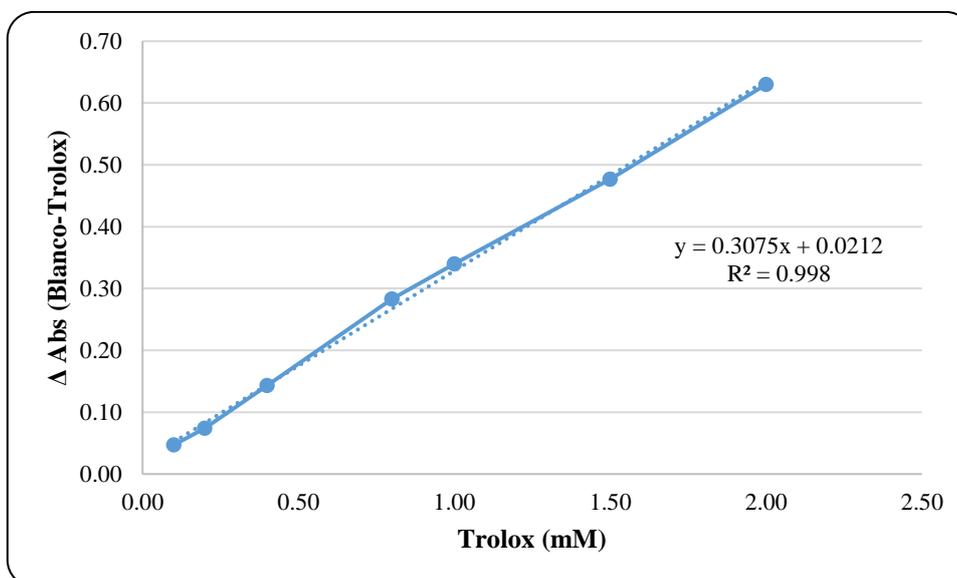
Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	0.0943	X
Linaza + Licopeno	3	0.1049	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.0106

* indica una diferencia significativa

ANEXO 15: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS



ANEXO 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE HIDROFÍLICA

ANOVA para la capacidad antioxidante hidrofílica

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.01126670	1	0.011266700	13.00	0.0226
Intra grupos	0.00346667	4	0.000866667		
Total (Corr.)	0.01473330	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para la capacidad antioxidante hidrofílica

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	0.570000	X
Linaza + Licopeno	3	0.656667	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.086667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 17: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICA

ANOVA para la Capacidad antioxidante lipofílica

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.02801670	1	1.00042000	682.10	0.0000
Intra grupos	0.00586667	4	0.00146667		
Total (Corr.)	0.03388330	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para la Capacidad antioxidante lipofílica

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	1.85333	X
Linaza + Licopeno	3	2.67000	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.816667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

ANOVA para la Capacidad antioxidante total

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.2604200	1	1.26042000	337.61	0.0001
Intra grupos	0.0149333	4	0.00373333		
Total (Corr.)	1.2753500	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para la Capacidad antioxidante total

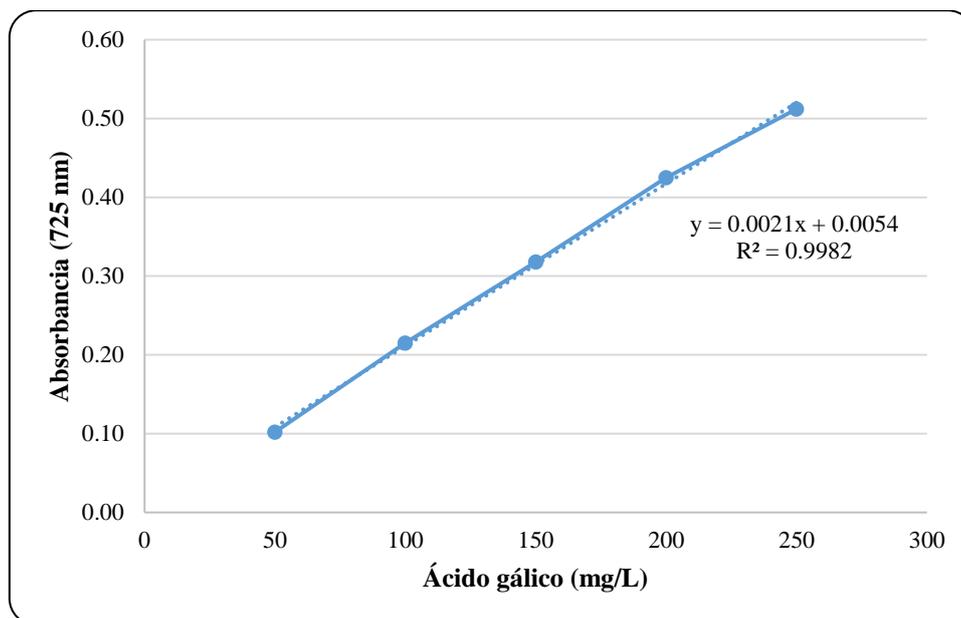
Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	2.47667	X
Linaza + Licopeno	3	3.39333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.916667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 19: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LOS POLIFENOLES TOTALES



ANEXO 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS POLIFENOLES TOTALES

ANOVA para los Polifenoles totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.29402	1	2.29402	0.44	0.5454
Intra grupos	21.0740	4	5.26850		
Total (Corr.)	23.3680	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para los Polifenoles totales

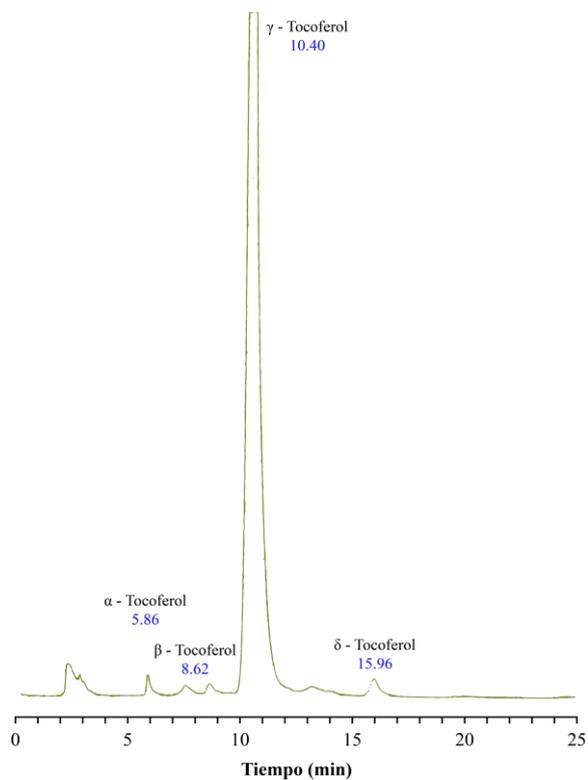
Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	3	55.1563	X
Linaza	3	56.3930	X

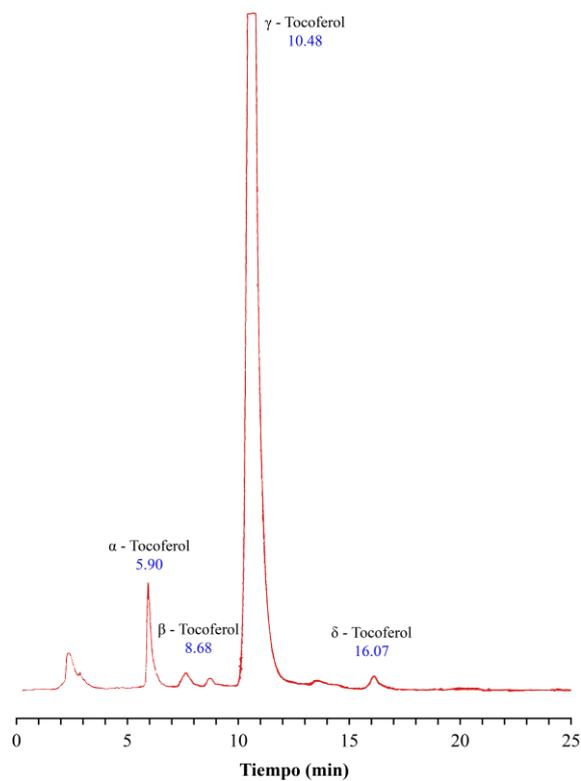
Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		-1.23667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 21: CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE LINAZA



ANEXO 22: CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS DE TOCOFEROLES DEL ACEITE DE LINAZA CON 80 PPM DE LICOPENO



ANEXO 23: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL α -TOCOFEROL

ANOVA para el α -tocoferol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.45203	1	1.452030	6453.44	0.0002
Intra grupos	0.00045	2	0.000225		
Total (Corr.)	1.45248	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el α -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	0.350	X
Linaza + Licopeno	2	1.555	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	1.205

* indica una diferencia significativa

ANEXO 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL γ -TOCOFEROL

ANOVA para el γ -tocoferol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.15563	1	1.15563	0.22	0.6829
Intra grupos	10.3341	2	5.16703		
Total (Corr.)	11.4897	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el γ -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	2	56.080	X
Linaza	2	57.155	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		-1.075

* indica una diferencia significativa

ANEXO 25: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL δ -TOCOFEROL

ANOVA para el δ -tocoferol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.009025	1	0.009025	1.50	0.3456
Intra grupos	0.012050	2	0.006025		
Total (Corr.)	0.021075	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el δ -tocoferol

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	2	0.680	X
Linaza	2	0.775	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Licopeno - Linaza		-0.095

* indica una diferencia significativa

ANEXO 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL β -TOCOFEROL

ANOVA para el β -tocoferol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000025	1	0.000025	0.06	0.8310
Intra grupos	0.000850	2	0.000425		
Total (Corr.)	0.000875	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el β -tocoferol

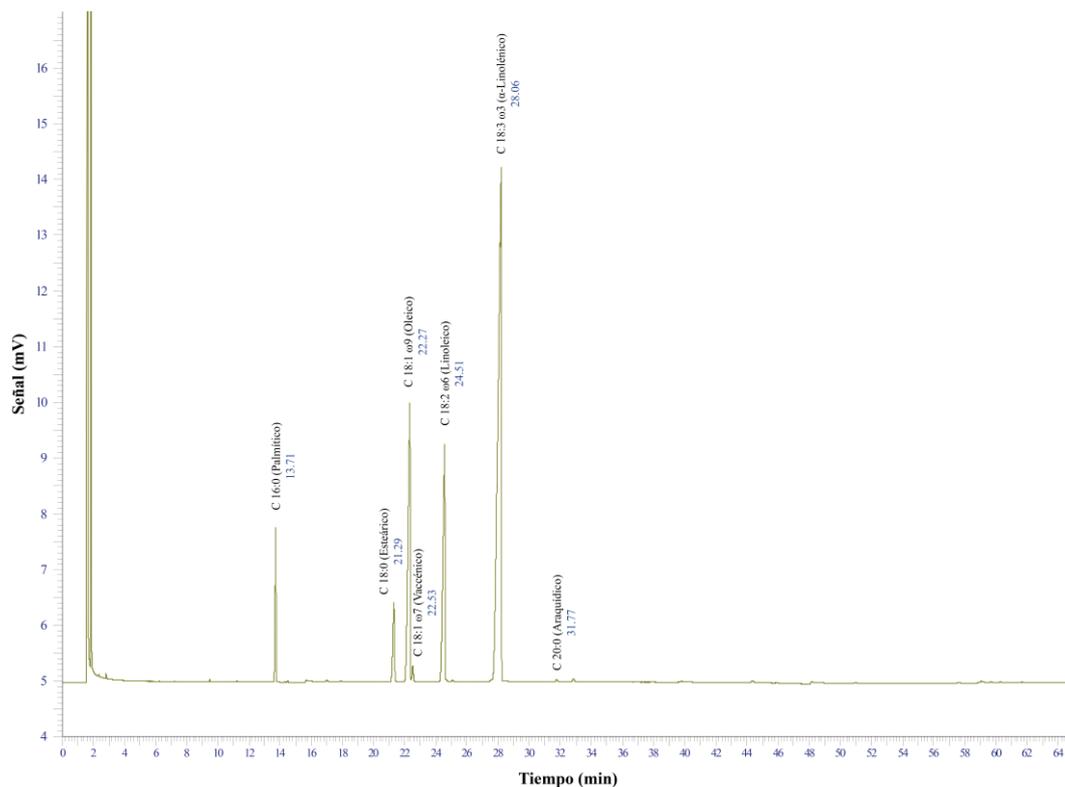
Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	0.595	X
Linaza + Licopeno	2	0.600	X

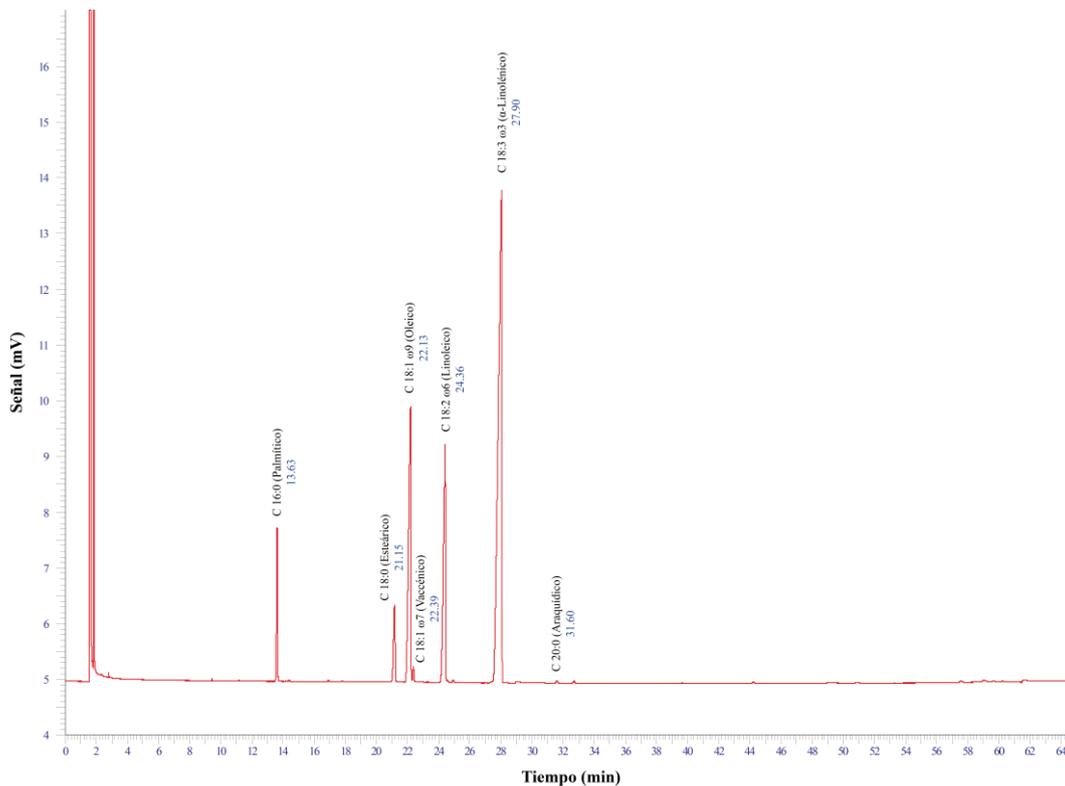
Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.005

* indica una diferencia significativa

ANEXO 27: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LINAZA



ANEXO 28: CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LINAZA CON 80 PPM DE LICOPENO



ANEXO 29: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO α -LINOLÉNICO

ANOVA para el Ácido α -Linolénico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.366025	1	0.366025	11.91	0.0747
Intra grupos	0.061450	2	0.030725		
Total (Corr.)	0.427475	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido α -Linolénico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	2	55.29	X
Linaza	2	55.895	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		-0.605

* indica una diferencia significativa

ANEXO 30: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO LINOLEICO

ANOVA para el Ácido Linoleico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.1156	1	0.1156	289.00	0.0034
Intra grupos	0.0008	2	0.0004		
Total (Corr.)	0.1164	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido Linoleico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	15.4	X
Linaza + Licopeno	2	15.74	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	0.34

* indica una diferencia significativa

ANEXO 31: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO PALMÍTICO

ANOVA para el Ácido Palmítico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0121	1	0.0121	4.84	0.1588
Intra grupos	0.0050	2	0.0025		
Total (Corr.)	0.0171	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido Palmítico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	4.70	X
Linaza + Licopeno	2	4.81	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.11

* indica una diferencia significativa

ANEXO 32: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO ESTEÁRICO

ANOVA para el Ácido Esteárico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0016	1	0.0016	3.20	0.2155
Intra grupos	0.0010	2	0.0005		
Total (Corr.)	0.0026	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido Esteárico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	2	4.10	X
Linaza	2	4.14	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		-0.04

* indica una diferencia significativa

ANEXO 33: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO OLEICO

ANOVA para el Ácido Oleico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0196	1	0.0196	1.94	0.2982
Intra grupos	0.0202	2	0.0101		
Total (Corr.)	0.0398	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido Oleico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	19.12	X
Linaza + Licopeno	2	19.26	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.14

* indica una diferencia significativa

ANEXO 34: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO VACCÉNICO

ANOVA para el Ácido Vaccénico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0049	1	0.0049	1.00	0.4226
Intra grupos	0.0098	2	0.0049		
Total (Corr.)	0.0147	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido Vaccénico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	0.59	X
Linaza + Licopeno	2	0.66	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.07

* indica una diferencia significativa

ANEXO 35: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁCIDO ARAQUÍDICO

ANOVA para el Ácido Araquídico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000025	1	0.000025	1.00	0.4226
Intra grupos	0.000050	2	0.000025		
Total (Corr.)	0.000075	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para el Ácido Araquídico

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	2	0.14	X
Linaza	2	0.145	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		-0.005

* indica una diferencia significativa

ANEXO 36: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

ANOVA para los Ácidos grasos poliinsaturados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.070225	1	0.070225	1.84	0.3076
Intra grupos	0.076250	2	0.038125		
Total (Corr.)	0.146475	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para los Ácidos grasos poliinsaturados

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	2	71.030	X
Linaza	2	71.295	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		-0.265

* indica una diferencia significativa

ANEXO 37: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS

ANOVA para los Ácidos grasos monoinsaturados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0441	1	0.0441	1.52	0.3428
Intra grupos	0.0580	2	0.0290		
Total (Corr.)	0.1021	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para los Ácidos grasos monoinsaturados

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	19.71	X
Linaza + Licopeno	2	19.92	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.21

* indica una diferencia significativa

ANEXO 38: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

ANOVA para los Ácidos grasos saturados

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.004225	1	0.004225	3.19	0.2161
Intra grupos	0.002650	2	0.001325		
Total (Corr.)	0.006875	3			

Pruebas de Múltiple Rangos para los Ácidos grasos saturados

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	2	8.985	X
Linaza + Licopeno	2	9.05	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza		0.065

* indica una diferencia significativa

ANEXO 39: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS VALORES DE OSI A 90 °C

ANOVA para los valores de OSI a 90 °C

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	18.2004000	1	18.2004000	10602.18	0.0000
Intra grupos	0.00686667	4	0.00171667		
Total (Corr.)	18.2073000	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para los valores de OSI a 90 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	11.2400	X
Linaza + Licopeno	3	14.7233	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	3.48333

* indica una diferencia significativa

ANEXO 40: ANÁLISIS ESTADÍSTICO LOS VALORES DE OSI A 100 °C

ANOVA para los valores de OSI a 100 °C

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.19002000	1	8.19002000	7925.82	0.0000
Intra grupos	0.00413333	4	0.00103333		
Total (Corr.)	8.19415000	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para los valores de OSI a 100 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	4.06667	X
Linaza + Licopeno	3	6.40333	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	2.33667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 41: ANÁLISIS ESTADÍSTICO LOS VALORES DE OSI A 110 °C

ANOVA para los valores de OSI a 110 °C

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.7920670	1	0.79206700	235.27	0.0001
Intra grupos	0.0134667	4	0.00336667		
Total (Corr.)	0.8055330	5			

Pruebas de Múltiple Rangos para los valores de OSI a 110 °C

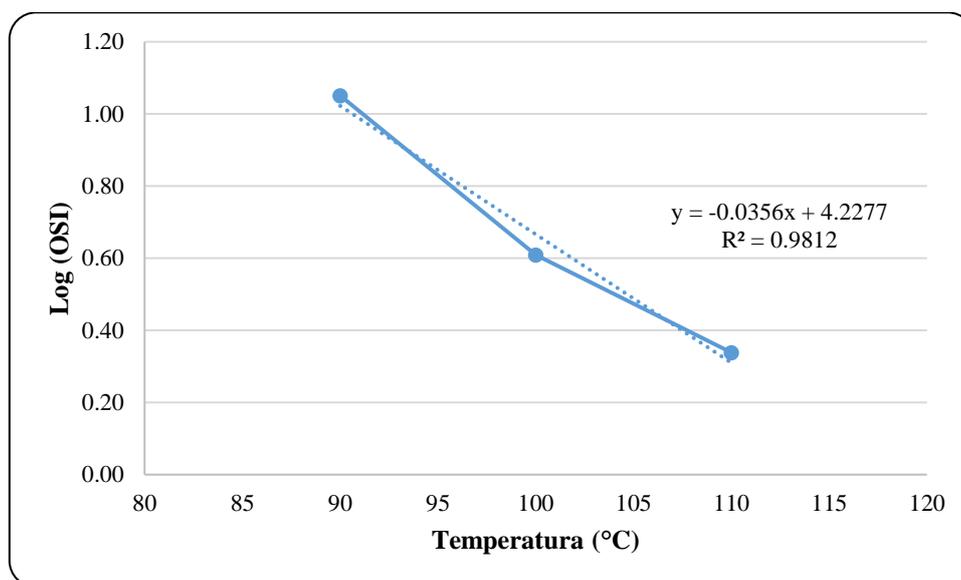
Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Linaza	3	4.06667	X
Linaza + Licopeno	3	6.40333	X

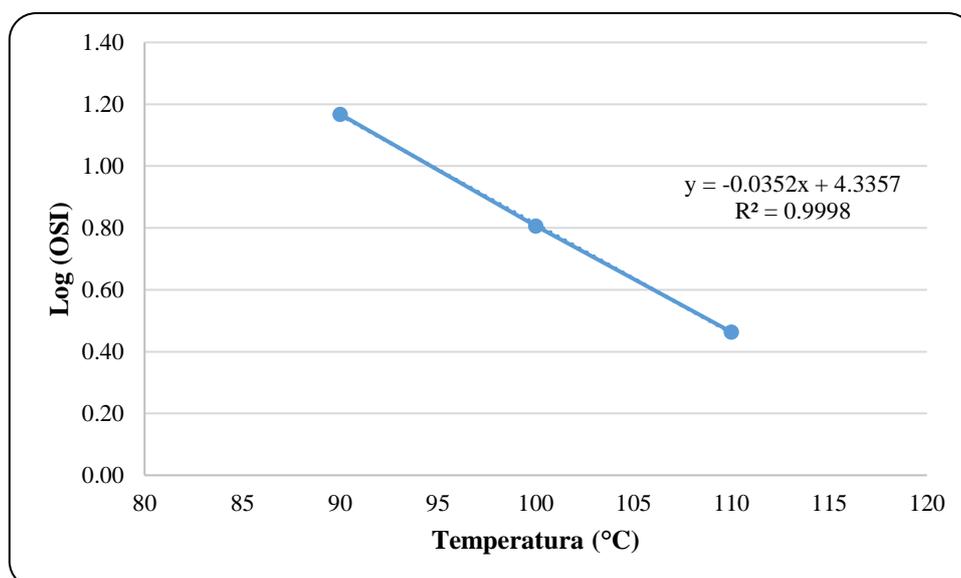
Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	2.33667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 42: GRÁFICA PARA EXTRAPOLAR LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE LINAZA POR RANCIMAT



ANEXO 43: GRÁFICA PARA EXTRAPOLAR LA VIDA ÚTIL DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO POR RANCIMAT



ANEXO 44: VARIACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Tiempo (días)	Ácidos grasos libres (% ácido oleico)					
	Aceite de linaza			Aceite de linaza con licopeno		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.63 ± 0.01
4			0.65 ± 0.01			0.61 ± 0.02
6		0.64 ± 0.01			0.64 ± 0.01	
8			0.68 ± 0.01			0.64 ± 0.01
9	0.64 ± 0.01			0.65 ± 0.01		
12		0.65 ± 0.02	0.70 ± 0.01		0.65 ± 0.01	0.66 ± 0.02
16			0.77 ± 0.01			0.70 ± 0.01
18	0.66 ± 0.01	0.69 ± 0.01		0.64 ± 0.01	0.64 ± 0.01	
20			0.82 ± 0.02			0.76 ± 0.01
24		0.72 ± 0.01	0.87 ± 0.01		0.68 ± 0.01	0.78 ± 0.01
27	0.69 ± 0.01			0.68 ± 0.01		
28			0.95 ± 0.01			0.83 ± 0.01
30		0.77 ± 0.03			0.73 ± 0.01	
32			0.99 ± 0.01			0.89 ± 0.02
36	0.74 ± 0.01	0.82 ± 0.01	1.13 ± 0.02	0.72 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.94 ± 0.01
40			1.19 ± 0.01			1.00 ± 0.01
42		0.86 ± 0.01			0.80 ± 0.01	
45	0.78 ± 0.01			0.74 ± 0.02		
48		0.93 ± 0.01			0.82 ± 0.01	
54	0.89 ± 0.01	1.04 ± 0.01		0.78 ± 0.01	0.86 ± 0.02	
60		1.11 ± 0.01			0.93 ± 0.01	
63	0.94 ± 0.01			0.83 ± 0.01		
72	1.02 ± 0.02			0.88 ± 0.01		
81	1.08 ± 0.01			0.91 ± 0.01		
90	1.13 ± 0.01			0.96 ± 0.01		

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

ANEXO 45: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A 40 °C

ANOVA para los análisis de Ácidos grasos libres a 40 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.0525091	1	0.05250910	29.98	0.0000
B:BLOQUE	0.9084410	10	0.09084410	51.87	0.0000
RESIDUOS	0.0560409	32	0.00175128		
TOTAL (CORREGIDO)	1.0169900	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Ácidos grasos libres a 40 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.765000	0.00892208	X
Linaza	22	0.834091	0.00892208	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.0690909

* indica una diferencia significativa

ANEXO 46: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A 50 °C

ANOVA para los análisis de Ácidos grasos libres a 50 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.0445455	1	0.04454550	27.46	0.0000
B:BLOQUE	0.7149230	10	0.07149230	44.08	0.0000
RESIDUOS	0.0519045	32	0.00162202		
TOTAL (CORREGIDO)	0.8113730	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Ácidos grasos libres a 50 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.740455	0.0085865	X
Linaza	22	0.804091	0.0085865	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Linaza - Licopeno	*	-0.0636364

* indica una diferencia significativa

ANEXO 47: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A 60 °C

ANOVA para los análisis de Ácidos grasos libres a 60 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.0761114	1	0.07611140	52.31	0.0000
B:BLOQUE	1.0695100	10	0.10695100	73.50	0.0000
RESIDUOS	0.0465636	32	0.00145511		
TOTAL (CORREGIDO)	1.1921900	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Ácidos grasos libres a 60 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.766818	0.00813274	X
Linaza	22	0.850000	0.00813274	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.0831818

* indica una diferencia significativa

ANEXO 48: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL ACEITE DE LINAZA

ANOVA para los análisis de Ácidos grasos libres del aceite de linaza - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0.113336	2	0.05666790	20.48	0.0000
B:BLOQUE	1.900770	24	0.07919890	28.63	0.0000
RESIDUOS	0.107889	39	0.00276639		
TOTAL (CORREGIDO)	2.032580	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Ácidos grasos libres del aceite de linaza

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	0.762073	0.0178187	X
50	22	0.832740	0.0157298	X
60	22	0.952907	0.0178187	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.0706667
40 - 60	*	-0.1908330
50 - 60	*	-0.1201670

* indica una diferencia significativa

ANEXO 49: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO

ANOVA para los análisis de Ácidos grasos libres del aceite de linaza con licopeno - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura	0.0338483	2	0.01692420	15.40	0.0000
B: BLOQUE	0.7958710	24	0.03316130	30.18	0.0000
RESIDUOS	0.0428517	39	0.00109876		
TOTAL (CORREGIDO)	0.8482620	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Ácidos grasos libres del aceite de linaza con licopeno

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	0.724393	0.01122980	X
50	22	0.759560	0.00991328	X
60	22	0.827727	0.01122980	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.0351667
40 - 60	*	-0.1033330
50 - 60	*	-0.0681667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 50: VARIACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Tiempo (días)	Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg)					
	Aceite de linaza			Aceite de linaza con licopeno		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.06	0.31 ± 0.06	0.31 ± 0.06
4			0.36 ± 0.20			0.48 ± 0.22
6		0.38 ± 0.08			0.44 ± 0.10	
8			1.04 ± 0.30			0.52 ± 0.05
9	0.38 ± 0.15			0.37 ± 0.15		
12		0.45 ± 0.13	0.96 ± 0.31		0.52 ± 0.09	0.75 ± 0.29
16			1.43 ± 0.12			0.82 ± 0.28
18	0.49 ± 0.07	0.82 ± 0.12		0.59 ± 0.05	0.85 ± 0.05	
20			1.97 ± 0.22			1.02 ± 0.38
24		1.01 ± 0.23	3.22 ± 0.27		0.99 ± 0.02	1.36 ± 0.35
27	0.95 ± 0.15			0.84 ± 0.14		
28			4.73 ± 0.17			1.77 ± 0.12
30		1.92 ± 0.09			1.43 ± 0.08	
32			5.77 ± 0.25			3.00 ± 0.08
36	1.62 ± 0.12	2.76 ± 0.27	7.43 ± 0.06	1.38 ± 0.14	1.96 ± 0.15	4.73 ± 0.02
40			8.94 ± 0.11			5.32 ± 0.02
42		4.05 ± 0.02			3.39 ± 0.15	
45	2.99 ± 0.08			2.01 ± 0.04		
48		4.91 ± 0.10			3.26 ± 0.13	
54	3.64 ± 0.13	6.80 ± 0.05		2.83 ± 0.17	3.97 ± 0.11	
60		7.83 ± 0.01			4.91 ± 0.12	
63	5.12 ± 0.06			3.47 ± 0.03		
72	6.89 ± 0.09			4.39 ± 0.14		
81	7.61 ± 0.11			4.91 ± 0.09		
90	8.94 ± 0.02			5.12 ± 0.04		

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

ANEXO 51: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS A 40 °C

ANOVA para los análisis de Índice de peróxidos a 40 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	14.6627	1	14.66270	25.84	0.0000
B:BLOQUE	250.829	10	25.08290	44.21	0.0000
RESIDUOS	18.1548	32	0.567338		
TOTAL (CORREGIDO)	283.647	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de peróxidos a 40 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	2.38409	0.160587	X
Linaza	22	3.53864	0.160587	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-1.15455

* indica una diferencia significativa

ANEXO 52: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS A 50 °C

ANOVA para los análisis de Índice de peróxidos a 50 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	7.66113	1	7.66113	18.58	0.0001
B:BLOQUE	184.828	10	18.4828	44.82	0.0000
RESIDUOS	13.1950	32	0.412344		
TOTAL (CORREGIDO)	205.685	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de peróxidos a 50 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	2.00273	0.136905	X
Linaza	22	2.83727	0.136905	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.834545

* indica una diferencia significativa

ANEXO 53: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS A 60 °C

ANOVA para los análisis de Índice de peróxidos a 60 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	23.4476	1	23.44760	38.61	0.0000
B:BLOQUE	224.507	10	22.45070	36.97	0.0000
RESIDUOS	19.4315	32	0.607233		
TOTAL (CORREGIDO)	267.386	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de peróxidos a 60 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	1.825	0.166137	X
Linaza	22	3.285	0.166137	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-1.46

* indica una diferencia significativa

ANEXO 54: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS DEL ACEITE DE LINAZA

ANOVA para los análisis de Índice de peróxidos del aceite de linaza - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	26.8684	2	13.43420	19.37	0.0000
B:BLOQUE	500.630	24	20.85960	30.07	0.0000
RESIDUOS	27.0530	39	0.693666		
TOTAL (CORREGIDO)	533.232	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de peróxidos del aceite de linaza

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	2.15187	0.282160	X
50	22	3.40020	0.249081	X
60	22	5.12353	0.282160	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-1.24833
40 - 60	*	-2.97167
50 - 60	*	-1.72333

* indica una diferencia significativa

ANEXO 55: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO

ANOVA para los análisis de Índice de peróxidos del aceite de linaza con licopeno - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura	6.36526	2	3.182630	14.20	0.0000
B: BLOQUE	174.522	24	7.271740	32.44	0.0000
RESIDUOS	8.74170	39	0.224146		
TOTAL (CORREGIDO)	186.854	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de peróxidos del aceite de linaza con licopeno

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	1.56167	0.160393	X
50	22	2.18750	0.141590	X
60	22	3.01083	0.160393	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.625833
40 - 60	*	-1.449170
50 - 60	*	-0.823333

* indica una diferencia significativa

ANEXO 56: VARIACIÓN DEL ÍNDICE DE P-ANISIDINA EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Tiempo (días)	Índice de p-Anisidina					
	Aceite de linaza			Aceite de linaza con licopeno		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0.04	0.23 ± 0.08	0.23 ± 0.08	0.23 ± 0.08
4			0.19 ± 0.07			0.21 ± 0.09
6		0.15 ± 0.16			0.25 ± 0.06	
8			0.24 ± 0.08			0.25 ± 0.09
9	0.20 ± 0.10			0.24 ± 0.06		
12		0.19 ± 0.06	0.29 ± 0.07		0.27 ± 0.10	0.31 ± 0.06
16			0.38 ± 0.09			0.36 ± 0.06
18	0.29 ± 0.10	0.25 ± 0.08		0.27 ± 0.11	0.24 ± 0.08	
20			0.62 ± 0.07			0.49 ± 0.08
24		0.35 ± 0.09	0.90 ± 0.04		0.28 ± 0.05	0.55 ± 0.05
27	0.25 ± 0.08			0.23 ± 0.06		
28			1.11 ± 0.04			0.71 ± 0.08
30		0.54 ± 0.05			0.32 ± 0.08	
32			1.28 ± 0.09			0.91 ± 0.10
36	0.39 ± 0.08	0.81 ± 0.08	1.63 ± 0.09	0.31 ± 0.03	0.41 ± 0.07	1.01 ± 0.08
40			2.04 ± 0.08			1.24 ± 0.07
42		0.93 ± 0.07			0.57 ± 0.06	
45	0.58 ± 0.09			0.30 ± 0.04		
48		1.15 ± 0.10			0.71 ± 0.08	
54	0.93 ± 0.10	1.71 ± 0.08		0.45 ± 0.06	1.08 ± 0.08	
60		1.98 ± 0.06			1.31 ± 0.10	
63	1.19 ± 0.09			0.61 ± 0.06		
72	1.34 ± 0.08			0.67 ± 0.05		
81	1.69 ± 0.07			0.84 ± 0.09		
90	1.97 ± 0.09			1.16 ± 0.10		

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

ANEXO 57: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA A 40 °C

ANOVA para los análisis de Índice de p-Anisidina a 40 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	1.21778	1	1.2177800	27.93	0.0000
B:BLOQUE	8.95375	10	0.8953750	20.54	0.0000
RESIDUOS	1.39527	32	0.0436021		
TOTAL (CORREGIDO)	11.5668	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de p-Anisidina a 40 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.483636	0.0445187	X
Linaza	22	0.816364	0.0445187	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.332727

* indica una diferencia significativa

ANEXO 58: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA A 50 °C

ANOVA para los análisis de Índice de p-Anisidina a 50 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.598111	1	0.5981110	20.00	0.0001
B:BLOQUE	10.15560	10	1.0155600	33.96	0.0000
RESIDUOS	0.956814	32	0.0299004		
TOTAL (CORREGIDO)	11.71050	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de p-Anisidina a 50 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.512727	0.0368661	X
Linaza	22	0.745909	0.0368661	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.233182

* indica una diferencia significativa

ANEXO 59: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA A 60 °C

ANOVA para los análisis de Índice de p-Anisidina a 60 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.593457	1	0.593457	19.04	0.0001
B:BLOQUE	9.832200	10	0.983220	31.55	0.0000
RESIDUOS	0.997218	32	0.0311631		
TOTAL (CORREGIDO)	11.42290	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de p-Anisidina a 60 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.569545	0.0376365	X
Linaza	22	0.801818	0.0376365	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.232273

* indica una diferencia significativa

ANEXO 60: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA DEL ACEITE DE LINAZA

ANOVA para los análisis de Índice de p-Anisidina del aceite de linaza - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	1.24686	2	0.6234300	16.57	0.0000
B:BLOQUE	23.5230	24	0.9801270	26.05	0.0000
RESIDUOS	1.46732	39	0.0376237		
TOTAL (CORREGIDO)	25.0512	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de p-Anisidina del aceite de linaza

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	0.540853	0.0657130	X
50	22	0.834520	0.0580092	X
60	22	1.184190	0.0657130	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.293667
40 - 60	*	-0.643333
50 - 60	*	-0.349667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 61: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE ÍNDICE DE P-ANISIDINA DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO

ANOVA para los análisis de Índice de p-Anisidina del aceite de linaza con licopeno - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura	0.441315	2	0.2206570	10.85	0.0002
B: BLOQUE	6.507320	24	0.2711380	13.33	0.0000
RESIDUOS	0.793118	39	0.0203364		
TOTAL (CORREGIDO)	7.384440	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de Índice de p-Anisidina del aceite de linaza con licopeno

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	0.366873	0.0483122	X
50	22	0.550040	0.0426484	X
60	22	0.750207	0.0483122	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.183167
40 - 60	*	-0.383333
50 - 60	*	-0.200167

* indica una diferencia significativa

ANEXO 62: VARIACIÓN DEL VALOR k_{232} EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Tiempo (días)	k_{232}					
	Aceite de linaza			Aceite de linaza con licopeno		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	1.39 ± 0.03	1.39 ± 0.03	1.39 ± 0.03	1.42 ± 0.03	1.42 ± 0.03	1.42 ± 0.03
4			1.42 ± 0.03			1.45 ± 0.04
6		1.43 ± 0.00			1.43 ± 0.00	
8			1.49 ± 0.03			1.48 ± 0.03
9	1.36 ± 0.00			1.43 ± 0.00		
12		1.53 ± 0.04	1.57 ± 0.04		1.46 ± 0.01	1.52 ± 0.02
16			1.81 ± 0.02			1.59 ± 0.02
18	1.45 ± 0.02	1.68 ± 0.02		1.46 ± 0.00	1.60 ± 0.03	
20			1.98 ± 0.03			1.67 ± 0.01
24		1.84 ± 0.04	2.21 ± 0.04		1.68 ± 0.02	1.84 ± 0.02
27	1.59 ± 0.00			1.53 ± 0.03		
28			2.39 ± 0.02			1.96 ± 0.02
30		2.07 ± 0.01			1.73 ± 0.00	
32			2.51 ± 0.02			2.11 ± 0.03
36	1.77 ± 0.04	2.14 ± 0.01	2.72 ± 0.01	1.63 ± 0.02	1.92 ± 0.02	2.24 ± 0.02
40			2.88 ± 0.02			2.37 ± 0.02
42		2.30 ± 0.02			1.96 ± 0.03	
45	1.93 ± 0.03			1.79 ± 0.01		
48		2.60 ± 0.02			2.09 ± 0.01	
54	2.09 ± 0.03	2.65 ± 0.02		1.85 ± 0.00	2.17 ± 0.03	
60		2.76 ± 0.03			2.31 ± 0.04	
63	2.24 ± 0.02			1.92 ± 0.02		
72	2.30 ± 0.02			2.03 ± 0.04		
81	2.56 ± 0.02			2.18 ± 0.02		
90	2.82 ± 0.02			2.27 ± 0.03		

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

ANEXO 63: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₃₂ A 40 °C

ANOVA para los análisis de k₂₃₂ a 40 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.358202	1	0.3582020	30.11	0.0000
B:BLOQUE	6.348120	10	0.6348120	53.36	0.0000
RESIDUOS	0.380723	32	0.0118976		
TOTAL (CORREGIDO)	7.087040	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₃₂ a 40 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	1.77364	0.0232551	X
Linaza	22	1.95409	0.0232551	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.180455

* indica una diferencia significativa

ANEXO 64: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₃₂ A 50 °C

ANOVA para los análisis de k₂₃₂ a 50 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.614545	1	0.6145450	48.92	0.0000
B:BLOQUE	6.584510	10	0.6584510	52.41	0.0000
RESIDUOS	0.402005	32	0.0125626		
TOTAL (CORREGIDO)	7.601060	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₃₂ a 50 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	1.79773	0.0238962	X
Linaza	22	2.03409	0.0238962	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.236364

* indica una diferencia significativa

ANEXO 65: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₃₂ A 60 °C

ANOVA para los análisis de k₂₃₂ a 60 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.675057	1	0.6750570	46.34	0.0000
B:BLOQUE	7.687320	10	0.7687320	52.78	0.0000
RESIDUOS	0.466118	32	0.0145662		
TOTAL (CORREGIDO)	8.828500	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₃₂ a 60 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	1.78591	0.0257313	X
Linaza	22	2.03364	0.0257313	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.247727

* indica una diferencia significativa

ANEXO 66: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₃₂ DEL ACEITE DE LINAZA

ANOVA para los análisis de k₂₃₂ del aceite de linaza - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0.809000	2	0.404500	24.81	0.0000
B:BLOQUE	15.12180	24	0.630077	38.64	0.0000
RESIDUOS	0.635933	39	0.016306		
TOTAL (CORREGIDO)	15.85110	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de K₂₃₂ del aceite de linaza

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	1.79227	0.0432607	X
50	22	2.08560	0.0381891	X
60	22	2.30893	0.0432607	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.293333
40 - 60	*	-0.516667
50 - 60	*	-0.223333

* indica una diferencia significativa

ANEXO 67: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k_{232} DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO

ANOVA para los análisis de k_{232} del aceite de linaza con licopeno - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Temperatura	0.310012	2	0.15500600	26.03	0.0000
B: BLOQUE	5.878760	24	0.24494900	41.13	0.0000
RESIDUOS	0.232263	39	0.00595545		
TOTAL (CORREGIDO)	6.117410	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k_{232} del aceite de linaza con licopeno

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	1.6484	0.0261443	X
50	22	1.8409	0.0230793	X
60	22	1.9659	0.0261443	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.1925
40 - 60	*	-0.3175
50 - 60	*	-0.1250

* indica una diferencia significativa

ANEXO 68: VARIACIÓN DEL VALOR k_{268} EN EL TIEMPO A LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

Tiempo (días)	k_{268}					
	Aceite de linaza			Aceite de linaza con licopeno		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
4			0.10 ± 0.02			0.11 ± 0.00
6		0.11 ± 0.01			0.11 ± 0.01	
8			0.14 ± 0.01			0.11 ± 0.02
9	0.12 ± 0.01			0.11 ± 0.01		
12		0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.00		0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.00
16			0.16 ± 0.02			0.13 ± 0.01
18	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.00		0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	
20			0.18 ± 0.01			0.14 ± 0.01
24		0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.02		0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02
27	0.14 ± 0.01			0.12 ± 0.00		
28			0.21 ± 0.00			0.16 ± 0.01
30		0.15 ± 0.02			0.13 ± 0.02	
32			0.24 ± 0.01			0.19 ± 0.00
36	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.00	0.25 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.21 ± 0.00
40			0.29 ± 0.01			0.22 ± 0.01
42		0.20 ± 0.01			0.16 ± 0.02	
45	0.16 ± 0.02			0.14 ± 0.00		
48		0.22 ± 0.01			0.17 ± 0.00	
54	0.17 ± 0.02	0.26 ± 0.02		0.14 ± 0.00	0.20 ± 0.00	
60		0.28 ± 0.00			0.24 ± 0.01	
63	0.19 ± 0.01			0.16 ± 0.02		
72	0.20 ± 0.02			0.16 ± 0.02		
81	0.22 ± 0.02			0.19 ± 0.02		
90	0.27 ± 0.01			0.22 ± 0.00		

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n = 2)

ANEXO 69: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₆₈ A 40 °C

ANOVA para los análisis de k₂₆₈ a 40 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.0068750	1	0.006875000	33.08	0.0000
B:BLOQUE	0.0757727	10	0.007577270	36.46	0.0000
RESIDUOS	0.0066500	32	0.000207813		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0892977	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₆₈ a 40 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.142727	0.00307344	X
Linaza	22	0.167727	0.00307344	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.025

* indica una diferencia significativa

ANEXO 70: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₆₈ A 50 °C

ANOVA para los análisis de k₂₆₈ a 50 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.01020230	1	0.010202300	41.47	0.0000
B:BLOQUE	0.10196800	10	0.010196800	41.45	0.0000
RESIDUOS	0.00787273	32	0.000246023		
TOTAL (CORREGIDO)	0.12004300	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₆₈ a 50 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.145909	0.00334408	X
Linaza	22	0.176364	0.00334408	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.0304545

* indica una diferencia significativa

ANEXO 71: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₆₈ A 60 °C

ANOVA para los análisis de k₂₆₈ a 60 °C - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra	0.01312730	1	0.013127300	46.30	0.0000
B:BLOQUE	0.10557300	10	0.010557300	37.24	0.0000
RESIDUOS	0.00907273	32	0.000283523		
TOTAL (CORREGIDO)	0.12777300	43			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₆₈ a 60 °C

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Aceite	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Linaza + Licopeno	22	0.150455	0.0035899	X
Linaza	22	0.185000	0.0035899	X

Contraste	Sig.	Diferencia
Linaza + Licopeno - Linaza	*	-0.0345455

* indica una diferencia significativa

ANEXO 72: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE k₂₆₈ DEL ACEITE DE LINAZA

ANOVA para los análisis de k₂₆₈ del aceite de linaza - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0.0121400	2	0.006070000	13.81	0.0000
B:BLOQUE	0.1883020	24	0.007845920	17.85	0.0000
RESIDUOS	0.0171433	39	0.000439573		
TOTAL (CORREGIDO)	0.2087270	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de K₂₆₈ del aceite de linaza

Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	0.149573	0.0071029	X
50	22	0.185240	0.0062702	X
60	22	0.212907	0.0071029	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.0356667
40 - 60	*	-0.0633333
50 - 60	*	-0.0276667

* indica una diferencia significativa

ANEXO 73: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LOS ANÁLISIS DE K₂₆₈ DEL ACEITE DE LINAZA CON LICOPENO

ANOVA para los análisis de k₂₆₈ del aceite de linaza con licopeno - Suma cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	0.0065350	2	0.003267500	11.75	0.0001
B:BLOQUE	0.0906153	24	0.003775640	13.57	0.0000
RESIDUOS	0.0108483	39	0.000278162		
TOTAL (CORREGIDO)	0.1021270	65			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para los análisis de k₂₆₈ del aceite de linaza con licopeno
Método: 95.0 porcentaje Student-Newman-Keuls

Temperatura (°C)	Casos	Media	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	22	0.127287	0.00565028	X
50	22	0.150120	0.00498787	X
60	22	0.173953	0.00565028	X

Contraste	Sig.	Diferencia
40 - 50	*	-0.0228333
40 - 60	*	-0.0466667
50 - 60	*	-0.0238333

* indica una diferencia significativa