

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**

**ESCUELA DE POSGRADO**



**“EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE LEPECHINIA MEYENII Y ÁCIDO  
ROSMARÍNICO COMO ANTIOXIDANTES NATURALES PARA EL ACEITE  
VIRGEN DE SACHA INCHI”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA**

**AUTOR  
MIJAIL CJUNO QUISPE**

**ASESOR  
DR. ERIC GABRIEL COSIO CARAVASI**

**LIMA – PERÚ**

**AGOSTO - 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi querida familia.*

*A Innóvate Perú y Olivos del Sur SAC por el apoyo con la tesis.*

*Agradecimiento especial al Dr. Eric Cosio por su valioso apoyo y enseñanzas, así mismo a todos los que laboran en los laboratorios de Bioanalítica y Ciencias Ecosistémicas de la sección Química PUCP.*

## RESUMEN

Los aceites polinsaturados como el aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) extra virgen, con alto contenido de ácidos grasos, omega 3 y 6, son altamente susceptibles a la oxidación y la consecuente pérdida de propiedades nutritivas y organolépticas. El presente trabajo, evaluó el extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* y el ácido rosmarínico (AR) purificado a partir de *L. Meyenii*, para un posible uso como antioxidantes naturales en el aceite de sacha inchi, con el objeto de preservar las grasas funcionales poliinsaturadas presentes en estos. En los ensayos, las sustancias a evaluar, extracto de *L. Meyenii* y AR, fueron comparadas con el antioxidante comercial butilhidroxitolueno (BTH), todas las sustancias fueron añadidas a muestras de aceite de sacha inchi extra virgen (extraído por prensado al frío), luego las muestras de aceites fueron sometidas a una cinética de oxidación a 50°C por catorce días. Durante el tratamiento, se tomaron muestras cada dos días, para evaluar el grado de oxidación, mediante ensayos estandarizados del valor de peróxidos, dienos y trienos conjugados. Así mismo se evaluó el proceso de oxidación de los aceites por espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), microextracción en fase sólida en el espacio superior seguida de cromatografía de gases - espectrometría de masas (HS-SPME/GC-MS) y resonancia magnética nuclear de protones (<sup>1</sup>H RMN).

Los resultados revelan que la adición del extracto de *L. Meyenii* al aceite de sacha inchi, reduce significativamente su oxidación, a partir de concentraciones de 1000 mg/kg; de este modo se muestra una marcada eficacia como antioxidante al extracto de *L. Meyenii* que contiene AR y otras sustancias antioxidantes con potencial efecto sinérgico. En virtud a los resultados se sugiere al extracto de *L. Meyenii* como posible agente de reemplazo de antioxidantes sintéticos usados actualmente para estos aceites de manera comercial.

## ABSTRACT

Oils such as extra virgin sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil, with a high content of polyunsaturated fatty acids, omega 3 and 6, are highly susceptible to oxidation and the consequent loss of nutritional and organoleptic properties. The present work evaluated ethanolic extract of *Lepechinia meyenii* and purified rosmarinic acid (AR) from this plant, for possible use as natural antioxidants in sacha inchi oil, in order to preserve functional polyunsaturated fats present in these. In the tests, the substances to be evaluated *L. Meyenii* extract and AR were compared with the commercial antioxidant butylhydroxytoluene (BTH). All substances were added to samples of extra virgin sacha inchi oil (extracted by cold pressing), then the samples of oils were subjected to oxidation kinetics at 50 ° C for fourteen days. During the treatment, samples were taken every other day, to evaluate the degree of oxidation, through standardized tests for peroxide value and conjugated dienes and trienes. Likewise, the oxidation process of the oils was evaluated by attenuated total reflectance infrared spectroscopy (FTIR-ATR), headspace solid phase microextraction, followed by gas chromatography - mass spectrometry (HS-SPME / GC-MS) and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR).

The results reveal that the addition of the *L. Meyenii* extract to the sacha inchi oil significantly reduces its oxidation, starting from concentrations of 1000 mg / kg; This shows a marked efficacy as an antioxidant to the *L. Meyenii* extract that contains AR and other antioxidant substances with potential synergistic effect. Based on the results, *L. Meyenii* extract is suggested as a possible replacement agent for synthetic antioxidants currently used for these oils on a commercial basis.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO I.....	12
GENERALIDADES .....	12
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	12
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	12
OBJETIVOS.....	12
Objetivo general:.....	12
Objetivos específicos: .....	13
CAPÍTULO II.....	14
2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	14
2.1 Sacha inchi .....	14
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	15
2.1.2 Aceite de sachá inchi .....	15
2.2 Degradación de aceites.....	17
2.3 Antioxidantes.....	19
2.3.1 Tipos de antioxidantes por su modo de acción.....	20
2.3.2 Mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT).....	20
2.3.3 Mecanismo de transferencia de un electrón (SET).....	21
2.3.4 Antioxidantes sintéticos.....	21
2.3.5 Antioxidantes naturales.....	22
2.4 Extractos naturales como antioxidantes para la estabilidad de aceites comestibles.....	24
2.5 <i>Lepechinia meyenii</i> .....	24
2.5.1 Clasificación taxonómica.....	25
2.6 Ácido rosmarínico .....	26
2.7 Métodos de evaluación y análisis de oxidación de aceites .....	27
2.7.1 Estabilidad acelerada.....	27
2.7.2 Métodos para determinar el grado de oxidación.....	28
2.7.2.1 El valor de peróxido (PV).....	28
2.7.2.2 Dienos conjugados (DC) y trienos conjugados (TC) .....	29
2.7.2.3 Análisis cromatográficos de productos de oxidación lipídica.....	30
2.7.2.4 Microextracción en fase sólida (SPME) .....	30
2.7.2.5 Espectroscopia Infrarroja – reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) ....	31

2.7.2.6	Resonancia magnética nuclear (RMN) y su uso en aceites .....	32
CAPÍTULO III	.....	33
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1	Materiales, reactivos y equipos .....	33
3.2	Metodología .....	35
3.2.1	Obtención de aceite de sachá inchi extra virgen .....	35
3.2.2	Obtención de extracto de <i>Lepechinia meyenii</i> .....	36
3.2.3	Aislamiento y purificación de ácido rosmarínico .....	36
3.2.4	Evaluación de los antioxidantes mediante una cinética de oxidación por 14 días. 37	
3.2.5	Evaluación de aceites oxidados. ....	38
3.2.6	Valor de peróxidos .....	38
3.2.7	Dienos conjugados.....	39
3.2.8	Evaluación por FTIR-ATR .....	40
3.2.9	Evaluación por HS-SPME-GC-MS .....	41
3.2.10	Evaluación por <sup>1</sup> H RMN.....	41
CAPÍTULO IV	.....	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1	Extracto de <i>Lepechinia meyenii</i> y ácido rosmarínico purificado.....	43
4.2	Resultados de la evaluación de antioxidantes mediante cinética de oxidación	44
4.3	Resultados de la evaluación HS-SPME-GC-MS.....	50
4.4	Resultados del análisis exploratorio por <sup>1</sup> H RMN. ....	53
CAPÍTULO V	.....	59
5.	CONCLUSIONES .....	59
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
	ANEXOS.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ACEITE DE SACHA INCHI. (23) .....	16
<b>TABLA 2:</b> COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN ACEITE DE SACHA INCHI CON OTROS ACEITES VEGETALES COMUNES. (23).....	16
<b>TABLA 3:</b> PRODUCTOS SECUNDARIOS DE OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR AUTO-OXIDACIÓN (8) .....	19
<b>TABLA 4:</b> MUESTRAS DE ASI CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ELM, AR, BHT, PARA LA PRUEBA DE OXIDACIÓN ACELERADA.....	38
<b>TABLA 5:</b> PORCENTAJE DE VARIACIÓN DE PESO EN LA MUESTRA DE ACEITES TRATADOS CON ELM, AR Y BHT. ....	44
<b>TABLA 6:</b> RESULTADO DEL PORCENTAJE DE GRASAS DE LAS MUESTRAS DE ASI TRATADAS CON ELM, AR, BHT Y MUESTRA CONTROL MEDIANTE <sup>1</sup> HRMN.....	53
<b>TABLA 7:</b> DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS Δ (PPM) SIGNIFICATIVOS OBSERVADOS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS, LOS PICOS FUERON COMPARADOS CON LOS REPORTADOS POR .....	58
<b>TABLA 8:</b> PORCENTAJE DE VARIACIÓN DE PESOS LAS MUESTRAS PROCESADAS EN LA CINÉTICA DE OXIDACIÓN.....	69
<b>TABLA 9:</b> VALOR DE PERÓXIDO DE TODAS LAS MUESTRAS EVALUADAS EN LA CINÉTICA DE OXIDACIÓN.....	69
<b>TABLA 10:</b> RESULTADOS DE LAS INTEGRALES DE LOS PICOS DE LAS BANDAS TRANS POR FT-IR-ATR.....	70
<b>TABLA 11:</b> RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DIENOS CONJUGADOS POR UV-VIS. ....	70
<b>TABLA 12:</b> RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE TRIENOS CONJUGADOS POR UV-VIS .....	71
<b>TABLA 13:</b> RESULTADOS DE LA INTEGRACIÓN DEL ÁREA CORRESPONDIENTE AL HEXANAL MEDIDO POR HS-SPME/GC-MS. ....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> SACHA INCHI (PLUKENETIA VOLUBILIS L.) EN SU ESTADO NATURAL	14
<b>FIGURA 2.</b> ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS COMUNES DE USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.	22
<b>FIGURA 3.</b> EJEMPLOS DE ALGUNOS ANTIOXIDANTES NATURALES COMUNES.	23
<b>FIGURA 4.</b> <i>LEPECHINIA MEYENII</i> , DENOMINADA COMÚNMENTE PUNA SALVIA.	25
<b>FIGURA 5.</b> EJEMPLO DE ESPECTRO <sup>1</sup> H RMN REPRESENTANDO A UNA HIPOTÉTICA GRASA. (FIGURA MODIFICADA DE LA REFERENCIA (63)	42
<b>FIGURA 6.</b> VARIACIÓN DE PESO EN % DE LAS MUESTRAS CON CÓDIGOS C, E, F H E I, LAS MUESTRAS TRATADAS CON ELM (E Y F) MUESTRAN UNA MENOR VARIACIÓN DE PESO EN EL TIEMPO A 50°C.	46
<b>FIGURA 7.</b> VALOR DE PERÓXIDOS DE LAS MUESTRAS CON CÓDIGOS C, E, F H E I, SE OBSERVA QUE LA MUESTRA F QUE CORRESPONDE AL ASI + ELM 1500 MG/KG ES LA QUE GENERA MENOS PERÓXIDOS EN UNA OXIDACIÓN DE 14 DÍAS A 50°C.	46
<b>FIGURA 8.</b> DIENOS CONJUGADOS DE LAS MUESTRAS CON CÓDIGOS C, E, F H E I, SE OBSERVA UNA CORRELACIÓN CON EL VALOR DE HIDROPERÓXIDOS.	47
<b>FIGURA 9.</b> TRIENOS CONJUGADOS DE LAS MUESTRAS CON CÓDIGOS C, E, F H E I, SE OBSERVA UNA CORRELACIÓN CON LOS RESULTADOS DEL VALOR DE HIDROPERÓXIDOS Y DIENOS CONJUGADOS.	47
<b>FIGURA 10.</b> IMÁGENES DE POIANA ET AL (52). DONDE MUESTRA ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN (EVOO) Y ACEITE DE SOYA (SBO) CALENTADA A 185°C POR 0,4 Y 8 HORAS SE PRODUCEN CAMBIOS EN LAS BANDAS TRANS.	48

<b>FIGURA 11.</b> ESPECTROS IR DE ASI CONTROL, OXIDACIÓN EN 14 DÍAS A 50°C, BANDAS TRANS SIMILARES A LOS DESCRITOS POR POIANA ET AL.	49
<b>FIGURA 12.</b> ESPECTROS IR DEL ASI CONTROL Y ASI CON ELM Y ASI CON BHT, EN OXIDACIÓN A 50°C POR 14 DÍAS.	49
<b>FIGURA 13.</b> ÁREA DE LAS BANDAS TRANS DE LOS ESPECTROS FT-IR-ATR DE LAS MUESTRAS CON CÓDIGOS C, E, F H E I, ESTA GRAFICA SIGUE LA TENDENCIA DE HIDROPERÓXIDOS, DIENOS, TRIENOS, LAS MUESTRAS TRATADAS CON ELM MUESTRAN UNA MAYOR PROTECCIÓN FRENTE AL BHT.	50
<b>FIGURA 14.</b> CROMATOGRAMAS DE LA MUESTRA ASI CONTROL (H), SIN ADITIVOS, DURANTE LOS 0 DÍAS (H14), 8 DÍAS (H8) Y 14 DÍAS (14) A 50°C. SE OBSERVA QUE EL TIEMPO 0 DÍAS LA PRESENCIA DE HEXANAL.	51
<b>FIGURA 15.</b> GRAFICAS DE LAS ÁREAS CROMATOGRÁFICAS DE LOS PICOS DEL HEXANAL, DE LAS MUESTRAS DE ASI CONTROL, ASI CON ELM A 1000 Y 1500 MG/KG, Y ASI CON BHT.	52
<b>FIGURA 16.</b> CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS CONTROL (F14), MUESTRA TRATADA CON BHT A 80 MG/KG (I14) Y MUESTRA TRATADA CON ELM A 1500 MG/KG (F14) AL FINALIZAR LA CINÉTICA DE OXIDACIÓN POR 14 DÍAS, SE OBSERVA QUE LA MUESTRA F14 CONTIENE MENOS HEXANAL.	52
<b>FIGURA 17.</b> ESPECTROS <sup>1</sup> H RMN DEL ASI CONTROL (H), SE OBSERVA LA VARIACIÓN DE PICOS A LO LARGO DEL TIEMPO DE OXIDACIÓN POR 14 DÍAS A 50°C; 0, 8 Y 14 CORRESPONDEN A LOS DÍAS DE OXIDACIÓN	54
<b>FIGURA 18.</b> COMPARACIÓN DE ESPECTROS <sup>1</sup> H RMN DE LOS ACEITES OXIDADOS POR 14 DÍAS, MUESTRA CONTROL (H), MUESTRA CON ELM (F 14) Y CON BHT (I 14).	55
<b>FIGURA 19.</b> COMPARACIÓN DE ESPECTROS <sup>1</sup> H RMN DE LOS ACEITES OXIDADOS POR 14 DÍAS, MUESTRA DE ASI CONTROL (H); 0, 8 Y 14 CORRESPONDE A LOS DÍAS DE OXIDACIÓN A 50°C. SE OBSERVA LA ZONA DE HIDROPERÓXIDOS.	56
<b>FIGURA 20.</b> COMPARACIÓN DE ESPECTROS <sup>1</sup> H RMN DE LOS ACEITES OXIDADOS POR 14 DÍAS, MUESTRA CONTROL (H), MUESTRA CON ELM (F 14) Y CON BHT (I 14), SE OBSERVA LA ZONA DE HIDROPERÓXIDOS.	57
<b>FIGURA 21.</b> CROMATOGRAMA HPLC DAD ACIDO ROSMARÍNICO PURO.	68
<b>FIGURA 22.</b> CROMATOGRAMA HPLC DAD DEL ELM	68

## INTRODUCCIÓN

El *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*) denominado comúnmente “maní de los incas” es una planta oleaginosa de la familia Euphorbiaceae que crece en climas cálidos en altitudes hasta 1500 m.s.n.m. en la Amazonía andina, existiendo reportes por cronistas de su cultivo desde tiempos prehispánicos (1). Las semillas de *sacha inchi* son una buena fuente de aceite (35 al 60%) y proteínas (27%). El aceite es rico en ácido grasos poliinsaturados (cerca del 93%), particularmente en ácidos grasos esenciales como el  $\alpha$ -linolénico (18:3  $\omega$ 3; IUPAC ácido [9Z,12Z,15Z]-octadeca-9,12,15-trienoico), y linoleico (18:2  $\omega$ 6; IUPAC ácido [9Z,12Z]-octadeca-9,12-dienoico) que representan el 47 y 37 % del contenido respectivamente (2). Se ha reportado que el aceite de *sacha inchi* contiene algo más de 2 g/kg de  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol (3) lo que le confiere cierta estabilidad oxidativa.

Los ácidos grasos esenciales son intermedios en la biosíntesis de compuestos importantes en el cuerpo humano, como la prostaglandina E1 y sus derivados (4). Otros estudios informaron que omega-3 y omega-6 ( $\omega$ -6 y  $\omega$ -3) son ácidos grasos insaturados que tienen efectos benéficos sobre la salud humana, al prevenir enfermedades como cáncer, cardiopatía coronaria e hipertensión; además se observó un efecto hipocolesterolémico cuando se utiliza como suplemento alimenticio (2).

La oxidación lipídica y en consecuencia la rancidez son factores principales que afectan la calidad de los aceites, grasas y los alimentos que contienen lípidos. La oxidación lipídica es responsable del desarrollo de sabor, color y olor desagradables además de alteraciones en la textura en los alimentos, haciéndolos indeseables e inadecuados para el consumo humano (5). Este fenómeno puede provocar alteraciones en el contenido nutricional de alimentos generando la degradación de las vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales y también puede tener un impacto negativo en la integridad y la inocuidad de los alimentos por la potencial formación de compuestos tóxicos (6). Los mecanismos de oxidación lipídica en un determinado alimento dependen de la naturaleza de las especies reactivas presentes y de su entorno físico-químico. Así, para evitar la descomposición de los grupos acilo de grasas insaturadas, es necesario mantener al mínimo los niveles de

energía (por ejemplo, temperatura y luz), que desencadenan la formación de radicales libres. Debe evitarse la presencia de trazas de metales y el contacto con oxígeno y el uso de antioxidantes ayudará a prevenir la formación de radicales libres (5). Los aceites comestibles ricos en omega-3 ( $\omega$ -3) son muy sensibles a autooxidación debido a la gran cantidad de dobles enlaces en su estructura molecular. Siguiendo un mecanismo radical de degradación con pasos de iniciación, propagación y terminación, los ácidos grasos se convierten en hidroperóxidos como productos de oxidación primaria (7).

El enfoque de la industria para prevenir la degradación de lípidos es usar antioxidantes sintéticos tales como butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y terbutil hidroquinona (TBHQ) (8); al respecto la seguridad de estos antioxidantes sintéticos ha sido cuestionada (9). Los antioxidantes naturales están siendo estudiados por sus propiedades beneficiosas para distintos usos en la industria, de alimentos, cosmética y otras, diversas publicaciones dan cuenta del uso de extractos de plantas que cuentan con actividad antioxidante, usados para prevenir la oxidación de los aceites. Lalas y colaboradores (10) mostraron que, al añadir 400 mg de un extracto comercial de romero a un kg de aceite de soya, hace que aumente el periodo de inducción en horas (PI) determinado por el método Rancimat, siendo de 65.3 horas, frente a una muestra control al que se añadió 200 mg de BHA (máximo permitido) que solo alcanzó 41.7 horas. Liang y colaboradores (11) compararon cuatro métodos de estabilidad acelerada para manteca de cerdo y grasa animal (sebo) con y sin antioxidantes, usando diversos métodos como el método del oxígeno activo (AOM), ensayo de la bomba de oxígeno, método Rancimat y el ensayo del horno de Schaal, concluyendo que la medida de la efectividad relativa de un antioxidante se da siempre y cuando se utilice un mismo método en la comparación. Al respecto indicaron también que, en base a los resultados obtenidos, el método Rancimat puede ser el método menos fiable para evaluar la efectividad de los antioxidantes en grasas (11). Frankel y colaboradores (6) reportaron que el instrumento automatizado Rancimat es cuestionable porque se basa en la conductividad de sustancias orgánicas volátiles producidas a temperaturas altas a consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos y, por ende,

la evaluación requiere niveles altos de oxidación que corresponden a niveles de rancidez que están muy por encima de lo normal. Ellos proponen un método de estabilidad oxidativa a 60°C, evaluando periódicamente dienos conjugados espectrofotométricamente (método estático) y hexanal (marcador de oxidación) por cromatografía de gases GC (método dinámico).

*Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling, conocida como “puna salvia” pertenece a la familia Lamiaceae y es una planta común en los Andes del sur del Perú entre los 3800-4200 m.s.n.m. Se le usa en la medicina tradicional para la cura de los ciclos menstruales irregulares, reumatismo, y como desinfectante para evitar contraer la tuberculosis (12). Un estudio hecho en la ciudad de Espinar (Región Cusco) muestra que es la tercera planta más usada por los pobladores (13) (14). Otros estudios demostraron que *L. meyenii*, presenta actividad antioxidante (15) (16), así mismo se logró identificar y cuantificar en *L. meyenii* los niveles de ácido rosmarínico (17), este antioxidante y el ácido cafeico están presentes en forma común en Lamiaceas (18). Todos estos estudios previos proporcionaron sustento para la posible aplicación industrial de los compuestos fenólicos presentes en extractos de *L. meyenii*, y del ácido rosmarínico extraído de *L. Meyenii*, para prevenir la oxidación de lípidos en alimentos. Por lo tanto, el principal objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia antioxidante del extracto de *L. meyenii*, y del ácido rosmarínico obtenido de ella, aplicado al aceite de sacha inchi, un aceite altamente poliinsaturado. El experimento simuló condiciones de almacenamiento acelerado (cinética de oxidación a 50°C) durante el cual se evaluó la eficacia antioxidante de los extractos en la prevención de la oxidación de lípidos.

# CAPÍTULO I

## GENERALIDADES

### JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El aceite de sacha inchi (ASI), un producto con un alto contenido de grasas poliinsaturadas omega 3 y 6 (48 y 36%), importantes desde el punto de vista nutricional, requiere el uso de antioxidantes para conferirle mayor vida útil. Actualmente antioxidantes sintéticos tales como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y la terc-butilhidroxiquinona (TBHQ) son los más usados por la industria alimentaria. Diversas publicaciones y algunos estudios clínicos dan cuenta de potenciales efectos nocivos para animales de experimentación (roedores) (9), lo cual genera cuestionamientos sobre su uso. Así mismo, el consumo a nivel mundial está mostrando una preferencia hacia productos y aditivos naturales lo cual motiva esta exploración sobre un extracto vegetal con alto potencial antioxidante y de ácido rosmarínico purificado a partir de hojas de *L. meyenii* como posibles agentes de reemplazo de antioxidantes sintéticos para uso en ASI extra virgen, un aceite que requiere de protección antioxidante.

### FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es viable el uso de extractos etanólicos de *L. meyenii* y ácido rosmarínico extraído de dicha planta como antioxidantes naturales alternativos para la preservación de un aceite polinsaturado como el aceite de sacha inchi?

### OBJETIVOS

#### Objetivo general:

Evaluar mediante ensayos de estabilidad oxidativa el uso de extracto etanólico de *L. meyenii*, y de ácido rosmarínico extraído a partir de hojas de *L. meyenii*, como

agentes antioxidantes naturales en aceite de sachá inchi extra virgen en reemplazo de antioxidantes sintéticos.

#### Objetivos específicos:

- Generar un proceso estandarizado para obtener un extracto etanólico de hojas de *L. meyenii* rico en antioxidantes fenólicos y libre de contaminantes lipídicos y de clorofila.
- Evaluar los componentes principales del extracto etanólico y del ácido rosmarínico proveniente de las hojas de *L. meyenii* por cromatografía líquida (HPLC).
- Aislar y purificar ácido rosmarínico a partir de hojas secas de *L. meyenii*.
- Evaluar la cinética de oxidación del aceite de sachá inchi por 14 días, usando aceite recién prensado sin aditivos (control), con etanol (control etanólico) y con extracto etanólico de *L. meyenii* o ácido rosmarínico purificado.
- Evaluar el deterioro oxidativo del aceite de sachá inchi, mediante la medición de valor de peróxidos, dienos conjugados, trienos conjugados y monitoreando productos volátiles terminales de oxidación usando resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  RMN), espectroscopia infrarroja (FT-IR-ATR) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

#### 2.1 Sacha inchi

El sachá inchi es una planta nativa de la Amazonía Peruana (19) descrita por primera vez, como especie, en el año 1753 por el naturalista Linneo; de ahí su nombre científico *Plukenetia volubilis* Linneo (20). En el Perú es denominado comúnmente desde siglos atrás bajo diferentes nombres, entre ellos “Mani del inca”, “Sacha inchi”, término quechua que significa “Maní del monte” y “Amui”, término utilizado por los pueblos de la Amazonía (20). La *Figura 1* muestra una planta de sachá inchi en su estado natural.



**Figura 1.** Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en su estado natural.

Es una planta oleaginosa que pertenece a la familia Euphorbiaceae y crece naturalmente en las tierras bajas de la Amazonía peruana, habiendo sido cultivada

durante siglos por la población nativa; se desarrolla bien en climas cálidos en altitudes hasta 1500 m.s.n.m. (1). Estudios realizados por Ocelák et al. (21) permitieron el registro de la diversidad genética de esta especie en la Amazonía peruana. Esta información detallada sobre la ecología y el cultivo de esta planta ha sido de extrema relevancia para la utilización de manera sustentable.

### 2.1.1 Clasificación taxonómica

Según el herbario virtual del Missouri Botanical Garden (22) la clasificación taxonómica del sachá inchi es la siguiente:

Clase	:	Equisetopsida C. Agardh
Sub clase	:	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	:	Rosanae Takht.
Orden	:	Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Familia	:	Euphorbiaceae Juss.
Género	:	<i>Plukenetia</i> L.
Especie	:	<i>Plukenetia volubilis</i> L.

### 2.1.2 Aceite de sachá inchi

El aceite de sachá inchi (ASI) extra virgen extraído por prensado en frío de sus semillas, es una buena fuente de aceite (35 al 60%) y proteínas (27%), En la Tabla 1 se muestra las características fisicoquímicas de una muestra representativa de aceite de sachá inchi (23) en el cual el valor ácido e índice de peróxidos se encuentra dentro de los límites establecidos por el Codex Alimentarius (24).

El ASI es rico en ácido grasos poliinsaturados (cerca del 93%), particularmente en ácidos grasos esenciales como el ácido linolénico (18:3  $\omega$ 3; IUPAC ácido [9Z,12Z,15Z]-octadeca-9,12,15-trienoico), y el ácido linoleico (18:2  $\omega$ 6; IUPAC ácido [9Z,12Z]-octadeca-9,12-dienoico), estos ácidos representan el 47 y 37 % respectivamente (2). En la *Tabla 2* se presenta los valores de ácidos grasos del ASI comparados con otros aceites. Se reportó que este aceite contiene entre 1 y 1.2 g/kg de  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol que le confiere cierta estabilidad oxidativa (3).

**Tabla 1:** Características fisicoquímicas del aceite de sachá inchi. (23)

Características fisicoquímicas	Valor
Valor ácido (mg KOH.g <sup>-1</sup> )	1.79
Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> .kg <sup>-1</sup> )	1.85
Valor de saponificación (mg KOH.g <sup>-1</sup> )	183.78
Materia insaponificable (g.kg <sup>-1</sup> )	5.03
Índice de yodo (g I <sub>2</sub> .100 g <sup>-1</sup> )	187.4
Contenido de humedad y volátiles (%)	0.014
Impurezas insolubles (%)	0.013
Índice de refracción (n <sup>40</sup> )	1.475
Coeficiente de extinción específica (E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> a 232 nm)	2.98
(E <sup>1%</sup> <sub>1cm</sub> a 270 nm)	0.3

Diversos estudios informaron que  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, tienen efectos benéficos sobre la salud humana, al contribuir a prevenir enfermedades como cáncer, cardiopatía coronaria e hipertensión; además se observó un efecto hipocolesterolémico cuando se le utiliza como suplemento alimenticio (2).

**Tabla 2.** Comparación del contenido de ácidos grasos en aceite de sachá inchi con otros aceites vegetales comunes. (23).

Muestra de aceite	% Ácido graso					%		
	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	AGMI (b)	AGPI (c)	AGI/AGS (d)
Sachá inchi	4	3	9	40	44	9	84	13
Sachá inchi (a)	4	3	9	36	47	9	83	13
Soya	11	4	23	54	8	23	62	5.7
Girasol	6	4	29	58	ND	29	58	8.7
Oliva	12	3	70	10	ND	70	10	5.3
Linaza	6	2	19	24	47	19	66	11
Maní	9	3	52	32	ND	52	32	7

(a) Muestra proveniente del Perú; (b) Ácidos grasos monoinsaturados; (c) Ácidos grasos poliinsaturados; (d) Ratio, Ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados; ND. No detectado.

Se observa que el ASI contiene aproximadamente el doble de ácido linoleico ( $\omega$ 6) que el aceite de linaza. En general, el consumo de una proporción de 1:1 de  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 se considera óptima para la salud humana. Esa proporción de omegas es muy

cercana a la que presenta el ASI (25) es por esta razón que se desprende la posibilidad de ser usado como un ingrediente alimenticio funcional. Así mismo el ácido alfa-linolénico presente en el ASI es un precursor de los ácidos docosahexaenoico (DHA) y araquidónico (ARA), dos componentes que contribuyen al adecuado desarrollo y mantenimiento de la función cognitiva en mamíferos, convirtiéndose así en una alternativa al aceite de pescado (25).

## 2.2 Degradación de aceites

Los aceites, y en general los lípidos, se degradan primariamente a través de dos procesos, lipólisis (rancidez hidrolítica), mediada por enzimas endógenas presentes en el aceite y auto-oxidación (rancidez oxidativa) promovida por el oxígeno. La degradación de aceites y grasas, y en general de alimentos que contengan lípidos, es responsable del desarrollo de sabor, color y olor desagradables y textura alterada en ellos, haciéndolos inadecuados para el consumo humano. (5) Estos procesos provocan alteraciones en su contenido nutricional y pueden resultar en la degradación de vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales, además de tener un potencial impacto negativo en la integridad e inocuidad de los alimentos a través de la acumulación de compuestos tóxicos (6).

La lipólisis (hidrolisis) es catalizada por enzimas (lipasas) presentes en productos alimenticios o producidas por ciertos microorganismos, consiste en la hidrólisis de los triglicéridos (triacilglicerolos) que integran una grasa o un aceite descomponiéndose en ácidos grasos y glicerina, ahora bien, una hidrólisis en aceites también se produce en presencia de agua y temperaturas generalmente altas; la hidrolisis puede producir de uno a tres ácido grasos libres y glicerol (mono, di o tri) (26).

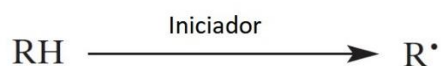
La auto-oxidación (rancidez oxidativa) es una reacción lipídica espontánea entre el oxígeno molecular y lípidos, se debe a la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados procedente de los aceites (26); es un proceso en cadena que ocurre a través de radicales libres intermedios con formación de peróxidos o hidroperóxidos, que posteriormente se polimerizan y descomponen dando origen a la formación de aldehídos, cetonas y ácidos de bajo peso molecular (8). Este

proceso es acelerado en presencia de la luz, calor, humedad, otros ácidos grasos libres y ciertos catalizadores inorgánicos como las sales de hierro y cobre.

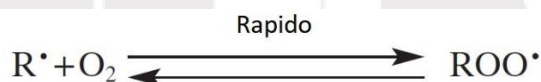
Los mecanismos de oxidación lipídica en un determinado alimento dependen de la naturaleza de las especies reactivas presentes y de su entorno físico-químico.

La auto-oxidación, se da a través de un mecanismo de reacciones en cadena, ocasionado por radicales libres, esta se divide en tres fases: iniciación, propagación y terminación (27).

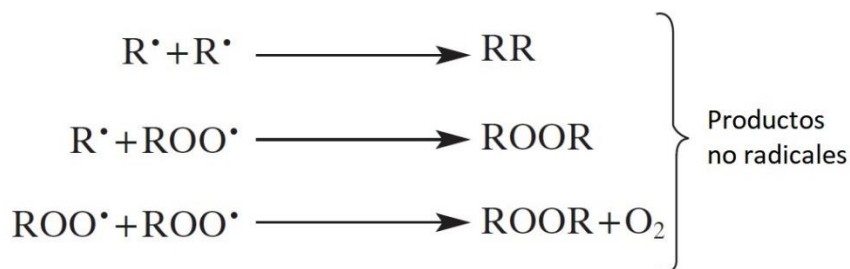
- 1) Iniciación: Extracción del átomo de hidrógeno homolítico de un grupo metileno que conduce a la formación del radical alquilo ( $R\cdot$ ) (26)



- 2) Propagación: Formación de radicales peroxi ( $ROO\cdot$ ) capaces de reaccionar con ácidos grasos insaturados y formar hidroperóxidos ( $ROOH$ ) (26)



- 3) Terminación: formación de productos no radicales por interacción de  $R\cdot$  y  $ROO\cdot$ .(26)



Dónde:  $R\cdot$  radical de ácido graso;  $ROOH$  hidroperóxido de ácido graso;  $ROO\cdot$  radical peroxi.

Los aceites comestibles ricos en omega-3 ( $\omega$ -3) son muy sensibles a la auto-oxidación debido a la gran cantidad de enlaces dobles en su estructura molecular.

Los lípidos involucrados en la oxidación en si son los restos de ácidos grasos insaturados, oleico, linoleico y linolénico y la tasa de oxidación de estos ácidos grasos aumenta con el grado de insaturación, como ejemplo si asignamos al ácido oleico un valor de 1, los ácidos linoleico y linolénico serán 10 y 100 veces, respectivamente, más propensos a la oxidación; así mismo precisar que las reacciones se producen simultáneamente y competitivamente.

Algunos aldehídos especialmente los aldehídos insaturados, son compuestos de olores muy pronunciados; estos aldehídos son productos finales de la oxidación de lípidos como por ejemplo el malondialdehído (MDA), 4- hidroxí-2-nonenal (HNE), 4- hidroxí-2-hexenal (4-HHE) y acroleína. En la *Tabla 3* se presentan algunos productos finales comunes en el proceso de auto-oxidación de los lípidos (8).

**Tabla 3.** *Productos secundarios de oxidación de ácidos grasos por auto-oxidación (8)*

CLASE	ÁCIDO OLEICO	ÁCIDO LINOLEICO	ÁCIDO LINOLÉNICO
Aldehídos	Octanal	Pentanal	Propanal
	Nonanal	Hexanal	Butanal
	2-Decenal	2-Octenal	2-Butenal
	Decanal	2-Nonenal	2-Pentenal
		2,4-Decadienal	Malonaldehído
		Malonaldehído	2-Hexenal
			3,6-Nonadienal Decatrienal
Ácidos Carboxílicos	Ácido Heptanoico	Ácido Hepatanoico	Ácido Heptanoico
	Ácido Octanoico	Ácido Octanoico	Ácido Octanoico
	Ácido 8-Oxooctanoico	Ácido 8-Oxooctanoico	Ácido Nonanoico
	Ácido 9-Oxononaico	Ácido 9-Oxononaico	Ácido 9-Oxononaico
	Ácido 10-Oxodecanoico	Ácido 10-Oxodecanoico	Ácido10-Oxodecanoico
Alcoholes	1-Heptanol	1-pentanol 1-Octen-3-ol	
Hidrocarburos	Heptano	Pentano	Etano
	Octano		Pentano

### 2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes en los alimentos pueden definirse como cualquier sustancia que sea capaz de retrasar, retardar o prevenir el desarrollo de rancidez en los alimentos

u otro deterioro del sabor debido a la oxidación. Los antioxidantes retrasan el desarrollo de sabores desagradables al extender el período de inducción. La adición de antioxidantes después del final de este período tiende a ser ineficaz para retardar el desarrollo de la rancidez (28).

### 2.3.1 Tipos de antioxidantes por su modo de acción

Los antioxidantes se dividen en dos categorías, primarios y secundarios:

**Primarios:** Conocidos como bloqueadores de cadena; actúan en la segunda etapa de la propagación atrapando radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) a través de tres mecanismos principales: transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), transferencia de un electrón (SET) o por medio de reacciones de adición. Como ejemplos están los compuestos fenólicos y tocoferoles (29).

**Secundarios:** Actúan en la etapa de iniciación evitando la formación de radicales libres a través de la quelación de iones metálicos y absorción de radiación UV, que actúan como catalizadores de las reacciones de oxidación y descomposición de hidroperóxidos, y sobre la primera etapa de la propagación a través de la captación de oxígeno y desactivación de oxígeno singlete (29). Los antioxidantes secundarios solo muestran actividad antioxidante cuando está presente un segundo componente menor. Esto puede verse en el caso de agentes secuestrantes como el ácido cítrico que son efectivos solo en presencia de iones metálicos, y agentes reductores como el ácido ascórbico que son efectivos en presencia de tocoferoles u otros antioxidantes primarios (28).

### 2.3.2 Mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT).

El antioxidante primario ( $\text{ArOH}$ ) captura un radical peroxilo por donación de átomos de hidrógeno, generando un hidroperóxido y un radical antioxidante más estable ( $\text{ArO}\cdot$ ).



La energía de activación de la reacción de transferencia de hidrógeno, aumenta con el aumento de la energía de disociación del enlace ArO-H, de esta manera, la eficiencia de un antioxidante que actúe a través de este mecanismo aumenta a medida que disminuye la energía de disociación de dicho enlace. Además, el radical del antioxidante formado, debe ser más estable que el radical inicial. En este sentido los compuestos fenólicos son excelentes antioxidantes primarios, debido a que los radicales ArO• formados son relativamente estables debido a la deslocalización de electrones desapareados por resonancia del anillo aromático (8) (30).

### 2.3.3 Mecanismo de transferencia de un electrón (SET).

En el mecanismo SET, el antioxidante (ArOH) puede donar un electrón al radical peroxilo, formando entre los productos un anión peroxilo y un catión radical del antioxidante (ArO•<sup>+</sup>).

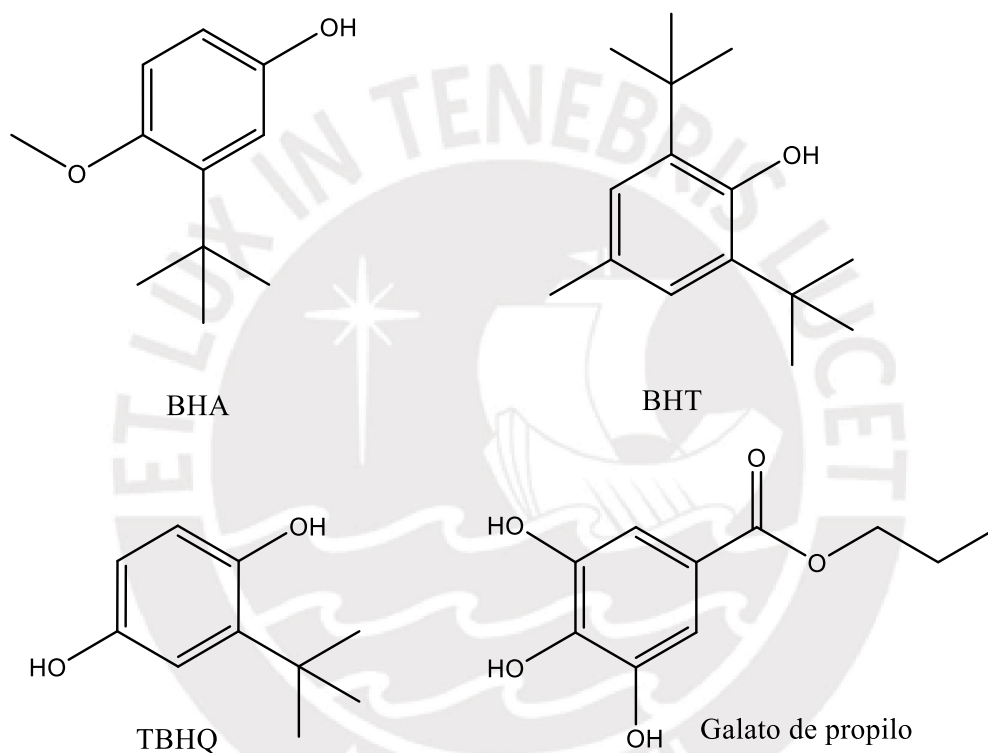


En este mecanismo, el factor energético más importante es el potencial de ionización (IP) que indica la facilidad con la cual el antioxidante puede donar un electrón; a menor potencial de ionización mejor actividad antioxidante. La estabilidad del catión ArOH•<sup>+</sup> está determinada por la naturaleza y tipo de sustituyentes del antioxidante. Los mecanismos HAT y SET pueden ocurrir de manera simultánea, sin embargo, las velocidades de reacción son diferentes; de esta manera, los factores de energía de disociación del enlace (BDE) y potencial de ionización (IP), permiten establecer cuál es el mecanismo de acción antioxidante más favorable. (8) (30).

### 2.3.4 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes más comunes de uso industrial en aceites comestibles son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), terbutil hidroquinona (TBHQ) y galato de propilo (PG) (8); (*Figura 2*) al respecto la seguridad de estos antioxidantes sintéticos ha sido cuestionada debido a sus posibles efectos negativos sobre la salud humana (9); las cantidades en que pueden ser empleadas

en alimentos están reguladas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) mediante el Codex Alimentarius y la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo el máximo de BHT permitido en aceites 75mg/kg (24). Estudios toxicológicos han revelado que BHA y BHT promueven carcinogénesis en roedores (9)(31). Este hecho acompañado de la tendencia actual de la reducción y eliminación del uso de aditivos sintéticos conlleva a la búsqueda y uso de antioxidantes de orígenes naturales.

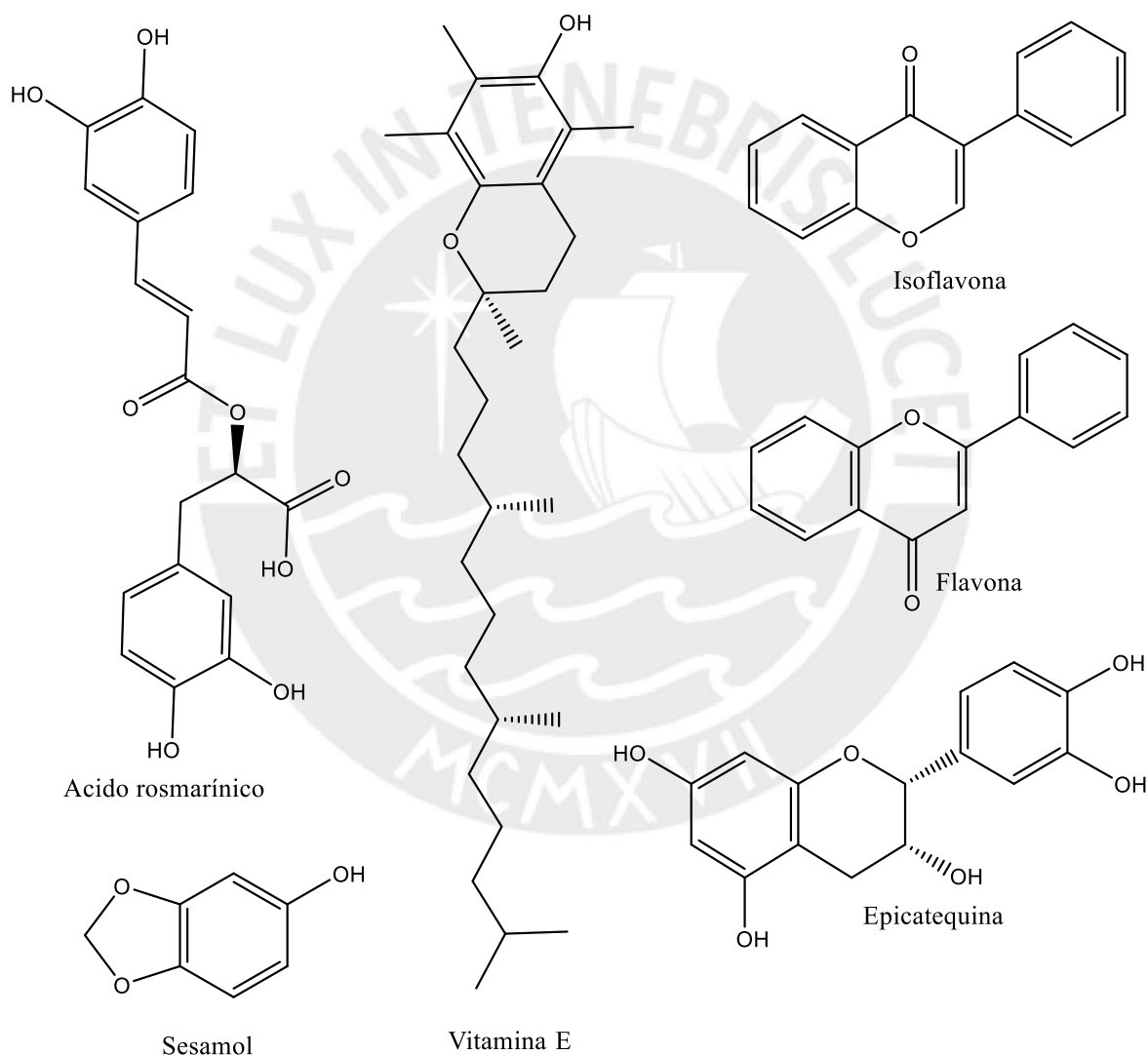


**Figura 2.** Antioxidantes sintéticos comunes de uso en la industria alimentaria.

### 2.3.5 Antioxidantes naturales

El uso empírico de compuestos naturales como antioxidantes es muy antiguo. El uso de condimentos en el hogar para la conservación de carne, pescado, queso y otros alimentos ricos en grasa puede deberse, al menos en parte, a un reconocimiento muy temprano en la historia humana del efecto retardador de la rancidez que ofrecen muchos de ellos.

La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos y los grupos más importantes de antioxidantes naturales son los tocoferoles como la vitamina E, flavonoides y ácidos fenólicos (28) (Figura 3). Éstos se caracterizan por presentar en su estructura un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (OH). Algunos de los flavonoides comunes son apigenina, crisina, luteolina, quercetina, miristisina, morina y kaempferol. Aproximadamente el 90% de los flavonoides en las plantas se producen como glucósidos. Ácido fenólicos como el ácido cafeico y el ácido rosmarínico también fueron reportados como antioxidantes naturales (32)



**Figura 3.** Ejemplos de algunos antioxidantes naturales comunes.

## 2.4 Extractos naturales como antioxidantes para la estabilidad de aceites comestibles

La concentración de compuestos fenólicos es relativamente baja en el aceite de sachá inchi extra virgen en comparación con otros aceites (33), sin embargo, se puede mencionar que los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios para inhibir la oxidación en los aceites vírgenes y contribuyen también a las propiedades organolépticas.

Los extractos naturales están siendo estudiados por sus propiedades beneficiosas para distintos usos en la industria de alimentos, cosmética y otras, diversas publicaciones dan cuenta del uso de extractos de plantas que cuentan con actividad antioxidante, usados para prevenir la oxidación de los aceites. Patil (34) en una revisión de diversos trabajos, da cuenta del uso de extractos de ajo para preservar y estabilizar aceite de jatrofa, (*Jatropha curcas*), informa de un estudio del extracto metanólico de semillas de “bajera” (*Terminalia bellirica*), que contiene ácido gálico; como antioxidante para lípidos; el uso del “ajowan” (*Trachyspermum ammi*) es un antioxidante para estabilizar el aceite de linaza y aceite bahera (*Terminalia bellirica*) se indica que el ajowan es comparable con el TBHQ, cuenta con una mayor estabilidad térmica. También se da cuenta del uso de aceites esenciales como antioxidantes para aceites comestibles el aceite esencial de tomillo y lavanda como antioxidante sobre el aceite de girasol donde se estudió a temperaturas de fritura (150, 180, 200 °C) y se observó una diferencia significativa en las muestras de aceite tratado y no tratado con aceites esenciales. Se encontró que los efectos antioxidantes del aceite esencial de “cassia” son más efectivos en el aceite de palma, durante el proceso de fritura.

## 2.5 *Lepechinia meyenii*

Las plantas de la familia Lamiaceae son ricas en polifenoles, fenoles simples, ácidos fenólicos y flavonoides (35) *L. meyenii* (Figura 4) es una Lamiaceae, muy difundida en los Andes del sur del Perú, que se usa en la medicina folclórica para la cura de los ciclos menstruales irregulares, reumatismo, malaria, afecciones hepáticas y tuberculosos; así mismo estudios biológicos reportaron actividad antimicrobiana

ante microorganismos gram+ y gram-, contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes* (12). Un estudio hecho en la ciudad de Espinar (Departamento del Cusco) muestra que *L. meyenii* es la tercera planta más usada de 26, por los pobladores del lugar (13) (14). Se reportó en la literatura que extractos de hojas de *L. meyenii* presentan actividad antioxidante (15) (16) y se logró identificar y cuantificar ácidos rosmarínico y cafeico (17), dos antioxidantes comunes en plantas de la familia *Lamiaceae* (18). Estos estudios también sugirieron posibles aplicaciones industriales de los fenoles presentes en los extractos etanólicos de *L. meyenii*, en especial del ácido rosmarínico, como agentes contra la oxidación de lípidos en aceites comestibles y otros alimentos.



**Figura 4.** *Lepechinia meyenii*, denominada comúnmente “Puna salvia”.

### 2.5.1 Clasificación taxonómica

Según el herbario virtual del Missouri Botanical Garden (22) la clasificación taxonómica la “puna salvia” es la siguiente:

Clase : Equisetopsida C. Agardh  
Sub clase : Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden	:	Asteranae Takht.
Orden	:	Lamiales Bromhead
Familia	:	Lamiaceae Martinov
Género	:	<i>Lepechinia Willd.</i>
Especie	:	<i>Lepechinia meyenii (Walp.) Epling</i>

## 2.6 Ácido rosmarínico

El ácido rosmarínico (AR) fue aislado y elucidado por primera vez como compuesto puro por los químicos italianos, Scarpati y Oriente (1958), y fue nombrado ácido rosmarínico por ser un compuesto aislado del *Rosmarinus officinalis* (romero).

El AR se encuentra comúnmente en las familias Boraginaceae y Lamiaceae (subfamilias Nepetoideae); sin embargo, también se encuentra en especies de otras familias de plantas superiores y en ciertas especies del helecho y milhojas de agua (36) (37).

La biosíntesis del AR tiene como precursores a la L-fenilalanina y L-tirosina (37).

El AR es un éster del ácido cafeico y del ácido 3,4-dihidroxifenil láctico, tiene como fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_8$ , un peso molecular 360.3 g/mol y punto de fusión entre 171 y 175 °C; en forma pura se presenta como un polvo color crema naranja (37).

El AR tiene un centro quiral y por lo tanto tiene dos formas enantioméricas (R) (+) y (S), la actividad óptica del (R) (+) es 106 ° (a 21 °C, c = 0,175 g/ml en etanol 96%) (38). El AR es relativamente polar por lo que es levemente soluble en agua, pero también soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, y es estable al calor.

Entre sus actividades biológicas descritas se destacan la neuroprotectora, antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral, astringente, antimutagénica y fotoprotectora (36) (39). Frankel *et al.* (6) evaluaron la actividad antioxidante de extractos de romero comercial, ácido rosmarínico, ácido carnósico y carnosol en aceites y emulsiones de aceite-agua monitoreando la inhibición de la formación de hidroperóxidos; ellos observaron que los ácidos rosmarínico y carnósico y el carnosol presentaban marcada actividad antioxidante en un aceite comercial de maíz mientras que el extracto de romero tuvo mayor actividad antioxidante en emulsiones de aceite- agua.

Otro estudio de la actividad antioxidante de extracto de romero, aceite esencial de *Nigella sativa* L., ácido carnósico, ácido rosmarínico y sesamol fue frente a un sistema de ácido linoleico (ácido graso); encontró que el extracto de romero tuvo mayor actividad antioxidante que los otros aditivos; los autores atribuyeron este efecto al mayor contenido fenólico del primer extracto de romero. El orden de la actividad antioxidante de los tres antioxidantes puros fue: ácido rosmarínico, ácido carnósico y el sesamol; por último no se pudo llegar a conclusiones acerca de las sinergias o contribuciones aditivas de parte de cada antioxidante frente a los componentes en general de los extractos (40).

## 2.7 Métodos de evaluación y análisis de oxidación de aceites

Los métodos para la evaluación de la calidad de los lípidos se pueden clasificar de forma aproximada en métodos estáticos, donde se determina el grado de oxidación en un momento determinado y métodos dinámicos en los que la grasa o el aceite se someten a un proceso de envejecimiento acelerado (26).

### 2.7.1 Estabilidad acelerada

Es un proceso en donde se somete al aceite a un proceso acelerado de oxidación por factores externos pudiendo ser temperatura elevada, luz, catalizadores metálicos, presión elevada y suministro de aire. Los métodos más populares son la prueba del horno Schaal, método del oxígeno activo (AOM), el consumo de oxígeno, la bomba de oxígeno (método ASTM), el uso de catalizadores ligeros o metálicos y el método Rancimat (26). Se cree que la prueba del horno Schaal, que consiste en calentar una muestra a 60–70 ° C a presión atmosférica, correlaciona mejor los cambios oxidativos con la evaluación de la vida útil (41). Liang *et al.* (11) evaluaron cuatro métodos de estabilidad acelerada para la manteca de cerdo y grasa animal (sebo) con y sin antioxidantes. Se compararon el método del oxígeno activo, ensayo de la bomba de oxígeno, Rancimat y el ensayo del horno de Schaal y concluyeron que una medida de la efectividad relativa de un antioxidante en la manteca de cerdo o el sebo se da siempre y cuando se utilice un mismo método para las evaluaciones paralelas. Por otro lado se indica que en base a los resultados obtenidos, el método

Rancimat puede ser el método menos fiable para evaluar la efectividad de los antioxidantes en grasas (11). Frankel *et al.* (6) indican que el instrumento automatizado Rancimat es cuestionable porque se basa en la conductividad de sustancias orgánicas volátiles producidas a temperaturas altas a consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos, por ende, la evaluación requiere niveles altos de oxidación que corresponden a niveles de rancidez que están muy por encima de lo normal. Ellos proponen un método de estabilidad oxidativa a 60°C, evaluando periódicamente dienos conjugados espectrofotométricamente método estático y mediante un marcador de oxidación volátil (hexanal) por evaluación de la emisión de volátiles por cromatografía de gases (HS-GC). La existencia de una variedad de métodos, basados en parámetros distintos, para monitorear la oxidación de lípidos refleja lo complejo de la tarea de evaluar los procesos de este tipo y refuerza la necesidad de aplicar múltiples métodos para poder llevar a cabo una caracterización adecuada.

## 2.7.2 Métodos para determinar el grado de oxidación

Existen diversos métodos para medir la oxidación de lípidos, métodos químicos y físicos.

### 2.7.2.1 *El valor de peróxido (PV)*

Este método es una de las mediciones más antiguas y más comúnmente utilizadas del grado de oxidación en los aceites los métodos de análisis pueden ser titulométricos, colorimétricos o electrométricos; este método está incluido en codex Alimentarius así como las normas ISO, AOAC, entre otras (42). El procedimiento estándar es yodométrico y mide el yodo elemental producido a partir del yoduro de potasio añadido como agente reductor a la muestra oxidada disuelta en una mezcla de cloroformo-ácido acético. El yodo liberado se titula con tiosulfato sódico estándar a un punto final de almidón. El valor de peróxido (PV) se expresa como miliequivalentes de yodo por kg de lípidos (meq/kg), o como milimol de hidroperóxido por kg de lípido (referido como peróxido). Los resultados de las determinaciones del valor del peróxido varían según los procedimientos usados. Se

pueden generar interferencias a causa del oxígeno en el aire, de la exposición a la luz, y de la absorción del yodo por el ácido graso insaturado en los aceites. Aunque al llevar a cabo el procedimiento en ausencia de aire y en la oscuridad puede reducir esta interferencia, estas precauciones no se toman generalmente para los análisis rutinarios. El método es empírico y depende de la destreza y técnica del operador (43). El valor máximo de peróxidos se produce en las etapas más tempranas de oxidación en los aceites más poliinsaturados, como los aceites de soja y de colza que contienen linolenato, y los aceites de pescado que contienen ácidos grasos poliinsaturados, porque sus hidroperóxidos se descomponen más fácilmente.

### 2.7.2.2 *Dienos conjugados (DC) y trienos conjugados (TC)*

Los dienos conjugados producidos a partir de lípidos poliinsaturados pueden determinarse cuantitativamente por su fuerte absorción máxima a 234 nm (extinción molecular de 25,000–29000 para una solución de 1 mol de hidroperóxidos / L de metanol). Una muestra pesada se diluye en metanol (para ésteres) o en isooctano (para triacilgliceroles) y la absorbancia a 234 nm se mide espectrofotométricamente y se expresa en  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxidos / g de muestra (43) (44). La medición de los dienos conjugados es un método sensible para seguir las etapas iniciales de la oxidación de lípidos en condiciones en las que los hidroperóxidos experimentan poca o ninguna descomposición. El método requiere de 50 a 100 mg de muestra, es simple y no depende de reacciones químicas o de color. Al igual que con las determinaciones del valor de peróxido, la determinación del dieno conjugado alcanzará un máximo durante el progreso de la oxidación y disminuirá cuando la velocidad de descomposición de los hidroperóxidos supere la velocidad de su formación (43).

En etapas más avanzadas de oxidación, los hidroperóxidos se descomponen en productos secundarios y poliméricos que también absorben a 234 nm, pero con una extinción más baja que los monohidroperóxidos, estos absorben a 270 nm debido a los trienos conjugados. Aunque los hidroperóxidos del linolenato de metilo oxidado tienen estructuras de dieno conjugado que absorben principalmente a 234 nm, producen productos secundarios que absorben a 270 nm para trienos conjugados y

compuestos carbonílicos. El método de dienos conjugados no es adecuado para aceites que contengan bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (43).

### 2.7.2.3 *Análisis cromatográficos de productos de oxidación lipídica*

La cromatografía de gases (GC) acoplada a un espectrómetro de masas (MS) permite evaluar compuestos que tienen influencia en las propiedades sensoriales de las grasas o alimentos que contienen grasa. Los principales compuestos volátiles generados en el proceso de oxidación de lípidos son los aldehídos, alcoholes, cetonas, furanonas, hidrocarburos y lactonas (26). Los aldehídos, insaturados como el hexanal, pentanal, hexenal, octanal, 1-octen-3-ol son los principales compuestos responsables del característico olor a rancio de las grasas oxidadas (45). Los métodos cromatográficos se utilizan también para el análisis de otros constituyentes volátiles menores en aceites.

Los métodos más comunes de análisis en GC- MS son los que se acoplan un accesorio usando un método espacio de cabeza estático, método espacio de cabeza dinámico y/o método de inyección directa, últimamente se están usando también métodos olfatométricos GC (43).

### 2.7.2.4 *Microextracción en fase sólida (SPME)*

Es técnica especial, de espacio de cabeza dinámico; acelera los análisis de volátiles y reduce los problemas de contaminación de la muestra en las líneas de transferencia y válvulas utilizadas en algunos cromatógrafos (46).

Esta técnica consiste en la extracción de los volátiles de una muestra por la adsorción en una unidad especial con la fibra de sílice fundida cubierta con un polímero o un adsorbente sólido. La fibra está unida a un émbolo de acero inoxidable rodeado por una aguja protectora. La aguja se inyecta en un frasco de muestra a través de un tabique. El émbolo se presiona en la muestra líquida o en el espacio de vacío sobre la muestra. Los volátiles pueden adsorberse a la fibra durante 2 – 30 min. La fibra se retrae en la aguja que se retira del vial de la muestra, y se inserta en el puerto del GC. El émbolo se presiona entonces se expone la fibra a la zona calentada del inyector para desorber y transferir los volátiles sobre la

columna del GC. La fibra se retrae y se retira la aguja del puerto GC. La técnica de SPME permite un alto rendimiento y no requiere de preparaciones de muestras extendidas y evita el uso de solventes (46) (43).

**Fibras SPME.** Existe una variedad de fibras comerciales con recubrimientos como por ejemplo poliacrilato (PA); poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB), divinilbenceno/carboxeno/poli(dimetilsiloxano) (DVB/CAR/PDMS), carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) entre otros (47).

Diversos trabajos se realizaron usando fibras SPME, Brunton *et al.* (48) cuantifica hexanal en muestras de pavo horneado usando una fibra PDMS/DVB.

Se detectó diversos aldehídos en hojuelas de avena por SPME, dentro del cual el hexanal fue el más abundante entre 67 y 137 µg/Kg en muestras frescas y 137 a 389 µg/kg en muestras envejecidas (47). El sistema HS-SPME-GC-MS se aplicó exitosamente para monitorear los cambios en la composición de compuestos volátiles en aceites comestibles en su proceso de oxidación durante el almacenamiento a temperatura ambiente (49). Siendo esta configuración la más versátil y útil para monitorear oxidación en aceites.

#### 2.7.2.5 *Espectroscopia Infrarroja – reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)*

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, (FTIR), acoplada a un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) es una técnica que tiene sus bases en las vibraciones moleculares, ofrece diversas ventajas en el análisis, como rapidez, el uso de pequeñas cantidades de muestras y solventes, y registra diversas longitudes de onda simultáneamente (50); esta técnica nos permite obtener información cualitativa sobre compuestos moleculares, y datos cuantificables de la relación entre la intensidad de las bandas y la concentración de componentes principales y secundarios en el aceite (51).

Un trabajo demostró que el estrés termo-oxidativo sufrido en respuesta al calentamiento a 185 ° C de un aceite de oliva o de soya, causó cambios significativos en todo el espectro infrarrojo de los aceites, pero los cambios más significativos fueron interpretados por conjugación concomitante e isomerización

*cis-trans* de los dobles enlaces que ensanchan la banda en la región C = O a 1743  $\text{cm}^{-1}$  reflejada por una disminución en la absorbancia de las bandas *cis* a 3006 y 722  $\text{cm}^{-1}$  y un aumento en la absorbancia de las bandas *trans* conjugadas y no conjugadas, a 987 y 967  $\text{cm}^{-1}$ , así mismo se dio la formación de epóxidos, revelada por una banda de vibración débil a 885  $\text{cm}^{-1}$  (52). Esto demuestra la utilidad de la FTIR-ATR como instrumento de medida para el seguimiento de procesos de oxidación en aceites.

#### 2.7.2.6 *Resonancia magnética nuclear (RMN) y su uso en aceites*

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las herramientas analíticas más poderosas para identificar sustancias orgánicas y bio-orgánicas y para dilucidar sus estructuras químicas. La RMN hace posible la observación directa de átomos; en función a la integral de una señal, esta es proporcional al número de átomos en el volumen de la sonda (sonda es la parte del RMN donde se excita los espines y se detecta la señal). La señal es una medida de las relaciones molares de las moléculas, independientemente del peso molecular. La espectroscopia de RMN ignora los factores de respuesta causados por variaciones en las tasas de extinción que dependen de la estructura molecular, como en la detección ultravioleta (UV), y las curvas de calibración no lineales, como se encuentran con los detectores de dispersión de luz (53).

Esta técnica es reconocida como uno de los métodos más confiables, conveniente, rápido y no destructivo; esta técnica ha sido usada extensamente para el análisis de alimentos como cerveza, vino, salsa de soya, vinagre, café, té, jugos de frutas, tomates, papas, zanahorias, maíz, trigo, leche, queso, mantequilla, carne entre muchos otros (54). La espectroscopia de RMN, especialmente la resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$  RMN), se ha aplicado para determinar las características de aceites y grasas; Guillen *et al.* (55), pudo determinar las cantidades de grupos linolenilo, linoleilo, oleilo y acilos saturados en el aceites utilizando el área de cinco señales de protones discretos del espectro de  $^1\text{H}$  NMR. Otros autores trabajaron para determinar la composición de ácidos grasos en aceites de girasol, linaza y oliva utilizando el  $^1\text{H}$  NMR.

En un nuevo trabajo Guillen *et al.* (56) analizaron el aceite de sacha inchi por RMN y reportaron que los espectros  $^1\text{H}$  RMN proveen una gran cantidad de información, respecto a las proporciones relativas de los diferentes grupos acilo y su naturaleza; así mismo descartaron la presencia de grupos acilo  $\gamma$ -linolénicos. Además, usaron las áreas de algunas señales de  $^1\text{H}$  RMN para determinar la proporción de grupos acilo saturados, mono, di y triinsaturados, que también estuvieron correlacionados con los valores obtenidos por los métodos clásicos. La  $^1\text{H}$  RMN se usó también para caracterizar mezclas de aceite de sacha inchi con aceite de soya y maíz. Asimismo se demostró que es posible cuantificar los omegas 3 y 6 con esta técnica (57).

Para el caso de monitoreos de degradación de aceites, existen reportes en los que se monitorea por  $^1\text{H}$  RMN aceites sometidos a oxidación acelerada y se observa acumulación de aldehídos, no así hidroperóxidos; en los reportes también se encontró que los aceites ricos en ácido oleico son más resistentes a la degradación que los aceites que contiene ácido linoleico y linolénico (58).

Esta técnica se vuelve muy útil para observar los cambios en el proceso de oxidación de lípidos, más aún si se complementa con la información de otras técnicas como el FT-IR-ATR, y HS-SPME/GC-MS.

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales, reactivos y equipos

##### Materias primas

- Aceite de Sacha inchi extra virgen obtenido de Olivos del Sur S.A.C. Corresponde a la primera prensada en frío.
- *Lepechinia meyenii*: La planta fue colectada en las pampas de Tambomachay, distrito, provincia, departamento del Cusco.

##### Reactivos.

- AAPH (2,2'-Azobis-(2-amidinopropano). 2HCl) (Sigma –Aldrich)
- Ácido acético (Merck)

- Ácido clorhídrico (J.T Baker, 37,5 %).
- Ácido fórmico (Merck)
- Ácido fosfórico (Merck)
- Acido gálico (Sigma –Aldrich)
- Ácido sulfúrico (Merck)
- Almidón soluble (Sigma –Aldrich)
- Bicarbonato de sodio (Merck)
- BHT (butilhidroxitolueno) (Sigma –Aldrich)
- $\text{CDCl}_3$  (Sigma –Aldrich)
- Reactivo Esterato M (solución de dimetil acetal, N, N- Dimetilformamida) (Supelco Bellefonte PA)
- Reactivo del fenol según Folin – Ciocalteau (Merck)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck)
- Hexanal (Sigma –Aldrich)
- PGR (rojo de pirogalol) (Sigma –Aldrich)
- Sulfato de magnesio (Merck)
- Tiosulfato de sodio (Merck)
- Trolox ((±) - 6- Hidroxi- 2,5,7,8- tetrametilcromano- 2-ácido carboxílico) (Sigma –Aldrich)
- Yoduro de potasio (Merck)

#### Solventes

- Acetato de etilo (J.T Baker)
- Agua desionizada (Millipore, MilliQ)
- Cloroformo (J.T Baker).
- Etanol (J.T Baker)
- Éter etílico (J.T. Baker)
- Isooctano (Duksan)
- Metanol (J.T Baker).

## Equipos

- Agitador Vortex (VWR, mini)
- Balanza analítica (OHAUS, Adventurer).
- Baño ultrasónico (Branson, 5800)
- Criostato (Neslab, RTE 101)
- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC, Hewlett Packard, 5890 series II; MS Hewlett Packard, 5972 series)
- Cromatógrafo líquido con detector DAD (HPLC) (Agilent Technologies, 1260 Infinity II)
- Espectrofotómetro UV-VIS (Thermo, Genesys 6)
- Espectrofotómetro lector de microplacas de absorbancia (Bio Tek - ELx800)
- Espectrómetro RMN. BRUKER Ascend 500 (Laboratorio de RMN de la sección Química PUCP).
- Estufa/Incubadora (Thermo, Precision)
- Liofilizador (Labconco, Lyph Lock 4.5)
- Rotavapor (Buchi, R3)

## Materiales

- Columna capilar GC DB-23 (Agilent J&W)
- Columna capilar GC DB-5 (Agilent J&W)
- Fibras SPME (Supelco)
- Micropipetas automáticas Gilson de 1, 0.5 y 0.2 ml

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Obtención de aceite de sachá inchi extra virgen

El aceite de sachá inchi fue obtenido de la empresa Olivos de Sur S.A.C, su proceso de obtención industrial fue por prensado en frío, luego de la obtención de 4 litros de

aceite este fue envasado en un frasco de vidrio al cual se le añadió nitrógeno gas, y fue almacenado a 4°C hasta el momento de su uso.

### 3.2.2 Obtención de extracto de *Lepechinia meyenii*

Se pesó 95 g de hojas secas de *L. meyenii* (LM), se añadió 1 L de etanol 70% y calentó a 75°C por 10 minutos. El extracto se filtró al vacío usando un filtro de celulosa. El residuo de la filtración fue re-extraído tres veces con 230 mL de etanol y siguiendo el mismo procedimiento. Los cuatro extractos filtrados fueron combinados y fueron concentrados en un rotavapor a 40°C hasta obtener la parte acuosa, donde se observa la separación de la clorofila (fase verde oscuro), esta se separa por filtración, obteniendo una fracción acuosa pura. La fracción acuosa se liofilizó hasta obtener un extracto seco color marrón claro denominado extracto de *L. meyenii* (ELM). Como parte del control de calidad se realizó una cromatografía HPLC-DAD del extracto obtenido siguiendo la metodología de Wang et al. (32). Así mismo se determinó sus polifenoles totales usando el reactivo Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología descrita por Rebelo *et. al* (59) y la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC) usando rojo de pirogalol (PGR) denominada prueba de ORAC-PGR según la metodología de Ortiz *et.al.*(60).

### 3.2.3 Aislamiento y purificación de ácido rosmarínico

Se pesó 80 g de hojas secas de LM, se añadió 1 litro de agua desionizada recién hervida, se deja por 24 horas, el líquido se separa por filtración, se repite la extracción con 500 ml, luego se colecta todos los extractos acuosos.

El extracto acuoso se llevó a pH 2.3 con HCl 0.5 N, luego se añadió 50 ml de acetato de etilo para separación de fases en una pera de decantación, la operación se repitió por 5 veces, se colectó la fase orgánica (acetato de etilo), y se le secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La fase orgánica se rotaevaporó hasta sequedad a 40°C. La fracción de acetato de etilo seco se disolvió con 50 ml de agua a 80°C, esta se deja enfriar lentamente a 4°C por 24 horas, se observó un precipitado resinoso el cual se desechó. El líquido claro se llevó pH 3 con HCl 0.2N, seguido se añadió 10 ml de

éter etílico para un reparto en una pera de decantación, la operación se realizó por 3 veces, se separó la fase orgánica y rotaevaporó hasta sequedad.

Esta fase orgánica seca se redisolvió en 5 ml de agua a 80°C y añadió 0.06g de carbón activado, se separó el líquido por filtración al vacío, el líquido claro final, se dejó en reposo por una noche a 4°C, luego se observó un precipitado color crema, este se filtró al vacío y lavó con agua helada, se secó en una estufa a 40°C por 8 horas, finalmente el producto final fue colocado en un desecador con gel de sílice por 24 horas para ser pesado. Luego se realizó un control de calidad por HPLC-DAD para observar su pureza, se siguió la metodología de Wang et al. (32), de forma similar al ELM se determinó en el AR sus polifenoles totales usando el reactivo Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología descrita por Rebelo *et. al* (59) y la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC) usando rojo de pirogalol (PGR) denominada prueba de ORAC-PGR según la metodología de Ortiz *et.al.*(60).

#### 3.2.4 Evaluación de los antioxidantes mediante una cinética de oxidación por 14 días.

Primero se preparó soluciones de antioxidantes a evaluar; para ELM se preparó una solución stock de 300 g/kg y para el AR una solución de 60 g/kg en etanol 70%.

Seguido se preparó las muestras de aceites con antioxidantes para los ensayos de oxidación acelerada, se tomó en promedio 193 ml de ASI al cual se añadió el respectivo antioxidante antes preparado, se calentó con agitación por 5 minutos a 50 °C y sónico a temperatura ambiente por 15 minutos, así las muestras quedaron listas. Las muestras fueron ASI con AR, ASI con ELM, ASI con BHT, ASI puro (muestra control) y ASI con EtOH 70% (solventes de las soluciones madres de AR y ELM); la *Tabla 4* describe las mezclas con su respectiva codificación y concentración de antioxidante de prueba.

Todas las muestras de aceite (desde la A hasta la J) fueron colocadas en placas petri de vidrio de 6 cm de diámetro con un promedio de 8 mL de muestra de aceite. Cada muestra fue preparada por triplicado y evaluada cada 2 días por un total de 14 días. A cada muestra le correspondió 24 placas (3 x 8 cm), haciendo un total de 240 placas con muestras de aceites.

Las muestras fueron llevadas a una estufa programada a 50 ° y se retiraron muestras de la estufa cada dos días, hasta llegar al día 14. El contenido de cada placa fue transferido a tubos Falcon de 15 mL y fueron almacenados a -18°C hasta el momento de su análisis.

**Tabla 4.** Muestras de ASI con diferentes concentraciones de ELM, AR, BHT, para la prueba de oxidación acelerada.

Muestras			
N°	Código	Descripción	Resumen
1	A	AR 53 mg/Kg de ASI	ASI+AR-50
2	B	AR 98 mg/Kg de ASI	ASI+AR-100
3	C	AR 198 mg/Kg de ASI	ASI+AR-200
4	D	ELM 499 mg/kg de ASI	ASI+ELM-500
5	E	ELM 1000 mg/kg de ASI	ASI+ELM-1000
6	F	ELM 1508 mg/kg de ASI	ASI+ELM-1500
7	G	EtOH70% 4968 mg/kg de ASI	ASI+EtOH
8	H	Muestra control (sin aditivos)	ASI
9	I	BHT 81 mg/kg de ASI	ASI+BHT-80
10	J	BHT 38 mg/kg de ASI	ASI+BHT-40

**Nota:** Para fines de redacción se aproximarán los valores de concentración y se usara los valores del resumen por ejm, 53 por 50, 499 por 500.

### 3.2.5 Evaluación de aceites oxidados.

Luego de la cinética de oxidación por 14 días, las muestras de aceites colectadas cada dos días fueron evaluadas mediante diversas técnicas que se describen a continuación:

### 3.2.6 Valor de peróxidos

Se determinó según el método oficial de la AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists, 1995) (61), con ciertas modificaciones en el peso de la muestra, los ensayos se realizaron por triplicado.

Se pesaron  $2.5 \pm 0.05$  g de aceite en un matraz y fueron disueltos con 15 ml de una solución de ácido acético:cloroformo (3:2; v/v), seguido se añadió 0.25 ml de solución saturada de KI, se agito por un minuto; transcurrido el tiempo se añadió 15 ml de agua desionizada y se procedió a titular con tiosulfato de sodio 0.01N,

utilizando como indicador almidón al 1%. Se trabajó con un blanco, reemplazando a la muestra por agua destilada y se siguió el mismo procedimiento de análisis, descrito para la muestra.

El valor de peróxidos fue reportado como meq O<sub>2</sub>/kg de aceite y se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Valor de peroxidos} = \frac{(V_{gm} - V_{gb}) \times N}{W} \times 1000 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

V<sub>gm</sub>: Volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra (ml)

V<sub>gb</sub>: Volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación del blanco (ml)

N: Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

W: Peso del aceite en g

### 3.2.7 Dienes conjugados

Se siguió el protocolo descrito en Current Protocols in Food Analytical Chemistry, (62). Se pesó y anoto con precisión entre 0.01 to 0.03 g de aceite, este se disolvió en 25 ml de isooctano y se sónico por 2 minutos. Para los dienos conjugados (DC) se colocó la solución preparada en una cubeta de cuarzo y se leyó a 233 nm en un espectrofotómetro UV-VIS, la muestra se comparó con un blanco y se anotó la absorbancia. Para el caso de trienos conjugados (TC) se repite la operación similar al de DC, pero se midió a λ 268 nm.

Para los cálculos se usó las siguientes ecuaciones:

$$C_{DC} = \frac{A_{233}}{\epsilon \times l} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$DC_{valor} = \frac{C_{DC} \times (2.5 \times 10^4)}{W} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$E_{cm}^{1\%} = \frac{A_{\lambda}}{C_L \times l} \quad (\text{Ecuación 4})$$

C<sub>DC</sub> = Concentración de dienos conjugados en mmol /ml

$A_{233}$  = Absorbancia de la solución

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción del hidroperóxido del ácido linoleico ( $2.525 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$l$  = longitud de la cubeta.

$DC_{\text{Valor}}$  = Valor de dienos conjugados

$W$  = Peso de la muestra en gramos

$E$  = Coeficiente de extinción

$A_{\lambda}$  = La absorbancia medida a 233 nm para dienos y 268 para trienos

$C_L$  = Concentración de la solución de lípidos en g/100 ml

### 3.2.8 Evaluación por FTIR-ATR

El análisis FTIR-ATR siguió algunos lineamientos según Poiana *et al.* (52) no requirió ningún tratamiento, se colocó una gota de muestra en el equipo para su lectura en un espectrómetro infrarrojo marca Perkin Elmer modelo Spectrum 100 FT-IR, se corrió el espectro desde 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  con 4 repeticiones.

Los archivos de los espectros IR fueron procesados con el software libre SPECTROGRYPH 1.2.8. Se evaluó las bandas *trans* de los conjugados y no conjugados entre 930 y 1007  $\text{cm}^{-1}$ ,

Se siguió el siguiente procedimiento.

- Se cargó los espectros IR seleccionados luego ponerlos en modo absorbancia
- Con el menú en PROCESS se ejecutó NORMALIZE PEAK, lo que permite normalizar al espectro de 0 a 1 de absorbancia.
- Se ejecutó SIMPLE BASE LINE, permite estandariza al grupo de espectros con una misma línea base.
- Luego se cambió en el menú a ANALYZE y se ejecutó INTEGRATION WITH BASELINE para integrar las áreas bajo los picos desde 978 a 952  $\text{cm}^{-1}$
- Los datos generados fueron promediados y graficados en Excel usando días en el eje x y los promedios obtenidos de Spectrogyph en el eje y.

### 3.2.9 Evaluación por HS-SPME-GC-MS

Se siguió recomendaciones de Brunton (48), Ma (63) y Xu (49) para lo cual se continuo un procedimiento como sigue:

Se pesó en promedio 4.5 gamos de muestra de aceite, se colocó en un vial para SPME ámbar de 50 ml, se expuso la fibra SPME (65um PDMS-DVB, Supelco) dentro del vial en la zona del espacio de cabeza por 20 minutos a 80°C con agitación magnética.

Luego se desorbió los volátiles atrapados en la fibra SPME, en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Hewlett-Packard 5890 A Series II, 5972 MSD), usando una columna capilar DB-5 ms (30 m x 0.25 mm I.D. y 0.25 µm, J&W Scientific, CA, USA), los parámetros para el análisis fueron: flujo de He, programa de temperatura: inicio 40°C por 3 minutos, de 40 a 160°C incremento a 4°C/min, de 160 a 280°C con incremento 10°C/min. Los cromatogramas y espectros de masas fueron procesados mediante software Mass Hunter (Agilent) y base de datos del "National Institute of Standards and Technology" NIST 2011.

### 3.2.10 Evaluación por <sup>1</sup>H RMN

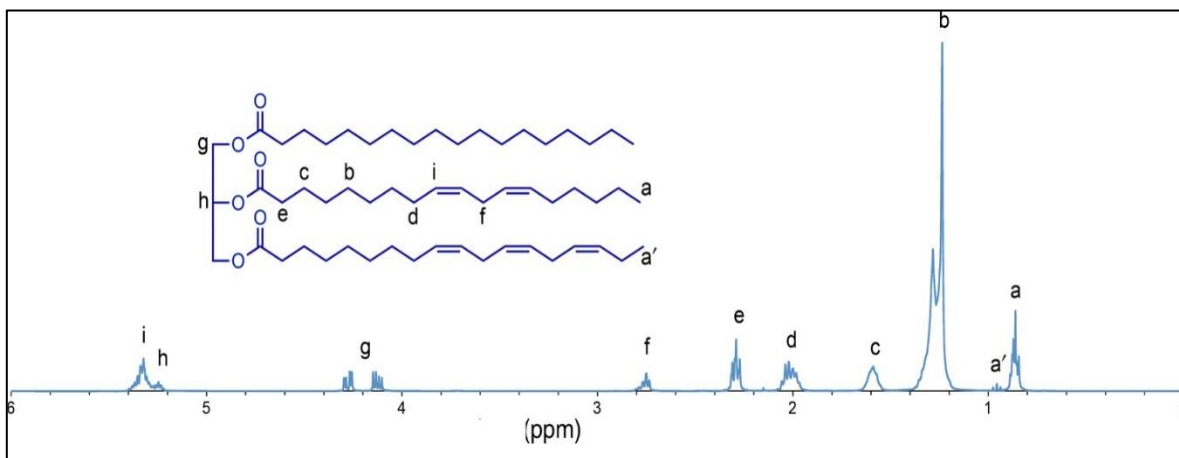
La evaluación se realizó con las muestras C, F, H e I, se tomó como referencia los trabajos preliminares descritos por Melliou publicado por Capozzi *et al.* (64), referidos a la evaluación rápida por RMN de aceites de oliva.

Para el análisis se pesó 225 mg de aceite y se disolvió con 0.5 ml de CDCl<sub>3</sub>, y fue transferido a un tubo de RMN.

Los espectros fueron llevados al laboratorio del Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN-PUCP), se corrió en un equipo Bruker Avance III HD 500 MHz, se usó una secuencia DPFGE fue ejecutada usando un pulso "reburb" de reenfoque selectivo a 2.6 ms 180 grados, con una ventana de excitacion de 2400Hz desde 11 a 7 ppm a 16 scan. Los espectros fueron procesados mediante el software TopSpin (Bruker).

A partir de los espectros se calculó el porcentaje de ácidos grasos insaturados, saturados y polinsaturados siguiendo la metodología propuesta por Hartel *et al.* (65) y Barison *et al.* (66), en base a las integraciones de los picos de hidrógenos descritos

en la *Figura 5* y usando las ecuaciones 5, 6, 7 y 8 se calculó los porcentajes de grasas saturadas insaturadas, poliinsaturadas y monoinsaturadas.



**Figura 5.** Ejemplo de espectro  $^1\text{H}$  RMN representando a una hipotética grasa, donde las letras representan las integrales de los hidrógenos en una grasa. (Figura modificada de la referencia (65))

$$\% \text{ de grasa insaturada} = \frac{Hd}{2He} \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\% \text{ de grasa saturada} = 100\% - \text{Porcentaje de grasa insaturada} \quad (\text{Ecuación. 6})$$

$$\% \text{ de grasa poliinsaturada} = \frac{(Hf - \frac{2Ha}{3})}{He} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\% \text{ de grasa Monoinsaturada} = \% \text{ de grasa Insaturada} - \% \text{ de grasa Poliinsaturada} \quad (\text{Ecuación. 8})$$

Ha, Hd, He, Hf = integrales de los hidrógenos, según posiciones indicadas en la figura 5

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Extracto de *Lepechinia meyenii* y ácido rosmarínico purificado.

El proceso de producción del extracto de *Lepechinia meyenii* (ELM) a partir de hojas secas de *L. Meyenni*, usando como solvente etanol 70% dicho solvente cumple la expectativa de ser un solvente “verde”, no tóxico; dio como resultado un polvo color marrón, con un rendimiento del 12.56 %. Como parte de su control de calidad se realizó una evaluación del ELM por HPLC-DAD, observándose en el cromatograma (ver figura 21 del anexo 1) la presencia de ácido rosmarínico en un 30.10% y ácido cafeico un 0.83%, el rango UV usado en el DAD fue de 330 nm a dicha longitud de onda se detectó otros 18 picos pertenecientes a otras sustancias desconocidas, el porcentaje de áreas de esos picos desconocidos estuvo entre el 0.0738 a 1.5878 %. Este trabajo no profundizó en la identificación de los otros picos, será preciso en un futuro identificar las otras sustancias presentes en el ELM. Así mismo se determinó los polifenoles totales por Folin-Ciocalteu dando un resultado de 5.86 mg ácido gálico. g<sup>-1</sup>, respecto al resultado de ORAC-PGR se obtuvo un valor ORAC de 26.5 equivalentes de Trolox mM para un ELM de 100 ppm; se puede comparar con el estándar de ácido gálico que resulta con un valor ORAC = 224.5 para una un ácido gálico de 100 ppm.

Respecto al aislamiento y purificación de ácido rosmarínico (AR) a partir de hojas secas de *L. meyenii*, donde se usó el método propuesto por la referencia (13). Dio como resultado un polvo color crema de AR purificado con un rendimiento del 1.46%. Al AR purificado se le realizó un control de calidad por HPLC-DAD (ver el cromatograma en la figura 22 del anexo 1) el resultado mostró una pureza cromatográfica del 99.4%. El cromatograma muestra solo tres picos a tiempos de retención de 4.415, 9.748 (AR) y 12.879 (Ácido cafeico) minutos, se corrobora

mediante el uso de un estándar de ácido cafeico la presencia de este en el AR purificado en una concentración cromatográfica de un 0.2590%. otros resultados fueron los polifenoles totales por Folin-Ciocalteu dando un resultado de 5.94 mg ácido gálico. g<sup>-1</sup>, respecto al resultado de ORAC-PGR se obtuvo un valor ORAC de 42.4 equivalentes de Trolox mM, para un AR de 100 ppm.

Para el caso del proceso de extracción y purificación del AR se usaron dos solventes orgánicos (acetato de etilo/ éter etílico) los cuales podrían eliminarse por completo en el proceso de secado.

Los productos obtenidos ELM y AR pueden ser sugeridos para uso alimentario, previamente deberán pasar pruebas exhaustivas de calidad, como solventes residuales y otros que exijan las normativas vigentes.

#### 4.2 Resultados de la evaluación de antioxidantes mediante cinética de oxidación

Las muestras de aceite según la *Tabla 4*; fueron sometidas a oxidación acelerada a 50°C por 14 días, para evaluar las muestras fueron colectadas cada dos días.

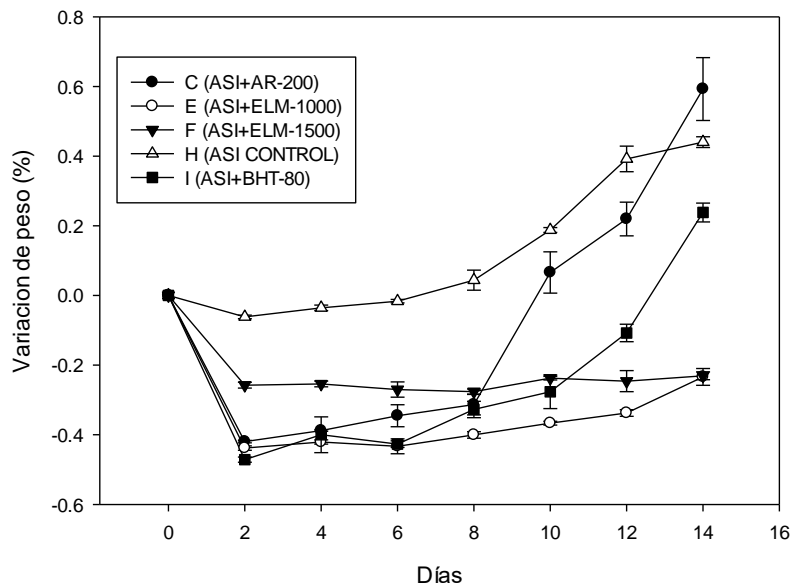
La primera evaluación que se realizó, fue la variación de peso, que presentaron las muestras a lo largo de la cinética, la *Tabla 5* presenta estos resultados.

**Tabla 5.** Porcentaje de variación de peso en la muestra de aceites tratados con ELM, AR y BHT.

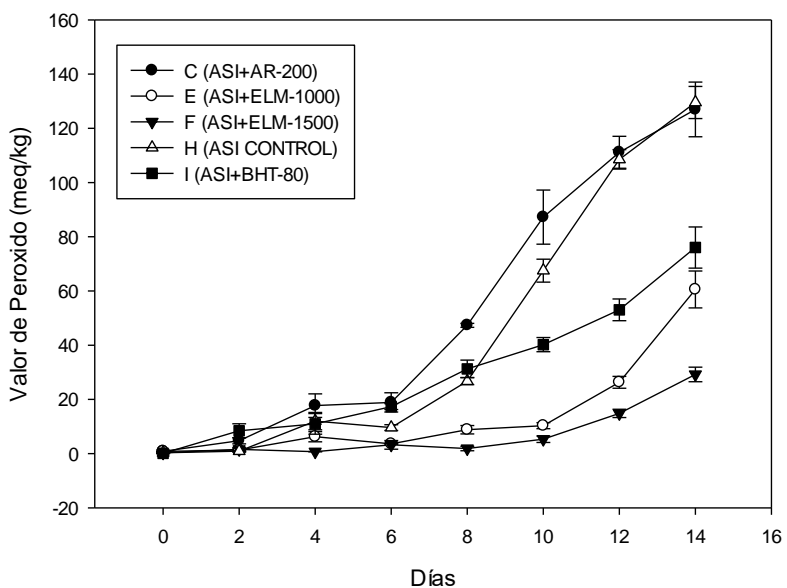
Muestras de aceites	Código	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10	Día 12	Día 14
		% de variación del peso							
ASI+AR-50	A	0.000	-0.449	-0.213	-0.024	0.029	0.111	0.235	0.269
ASI+AR-100	B	0.000	-0.340	-0.191	-0.070	0.505	1.058	1.290	2.491
ASI+AR-200	C	0.000	-0.420	-0.388	-0.345	-0.313	0.066	0.220	0.593
ASI+ELM-500	D	0.000	-0.556	-0.426	-0.414	-0.301	-0.169	0.224	0.454
ASI+ELM-1000	E	0.000	-0.438	-0.421	-0.433	-0.400	-0.367	-0.337	-0.234
ASI+ELM-1500	F	0.000	-0.258	-0.254	-0.270	-0.276	-0.237	-0.246	-0.231
ASI+EtOH	G	0.000	-0.424	-0.327	-0.368	-0.238	-0.172	0.050	0.234
ASI	H	0.000	-0.062	-0.035	-0.016	0.044	0.188	0.392	0.440
ASI+BHT-80	I	0.000	-0.471	-0.400	-0.427	-0.327	-0.277	-0.108	0.238
ASI+BHT-40	J	0.000	-0.021	0.032	0.100	0.095	0.170	0.278	0.558

En la *Figura 6* se muestran las tendencias de los aceites tratados con AR, ELM, BHT y la muestra control. Se observa una caída en el peso en los primeros dos días para todas las muestras, para el caso de las muestras tratadas se debe al solvente que se usó para disolver el AR, ELM (EtOH 70%). En el caso de la muestra control (ASI) no se observa una caída pronunciada. Se observa que todas las muestras empiezan a aumentar de peso con el paso del tiempo a 50°C, esto se debe a que el aceite sufre oxidación y al final de la cadena de reacciones resulta en una polimerización y un aumento de masa por incorporación de oxígeno. Se observa también que la muestra tratada con 1000 y 1500 mg/kg de ELM sufre menos variación en peso.

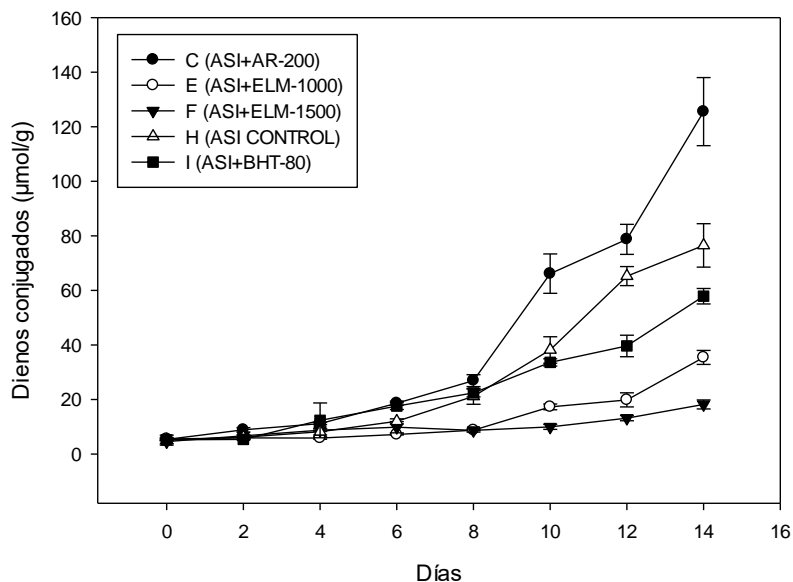
Los resultados de los análisis de **valor de peróxidos, dienos conjugados y trienos conjugados** dieron como resultado que las muestras tratadas con las cantidades propuestas de AR no cumplen un papel protector de oxidación del ASI; pero el ELM a 1000 y 1500 mg/kg sí muestra un efecto protector claro en comparación con la muestra tratada con BHT. La *Figura 7* muestra el valor de peróxidos expresado en  $\mu\text{mol/g}$ , comparando las muestras representativas de ASI tratado con AR, ELM, BHT y muestra control. Similar condición se observa en las *Figuras 8 y 9* que corresponde a dienos y trienos conjugados, se observa claramente una tendencia similar a la descrita en la *Figura 7*, donde las muestras que contienen ELM, generan menores concentraciones de dienos y trienos conjugados. La formación de trienos es menor frente a los dienos, entendiendo que los trienos se generan en una segunda etapa de oxidación más avanzada.



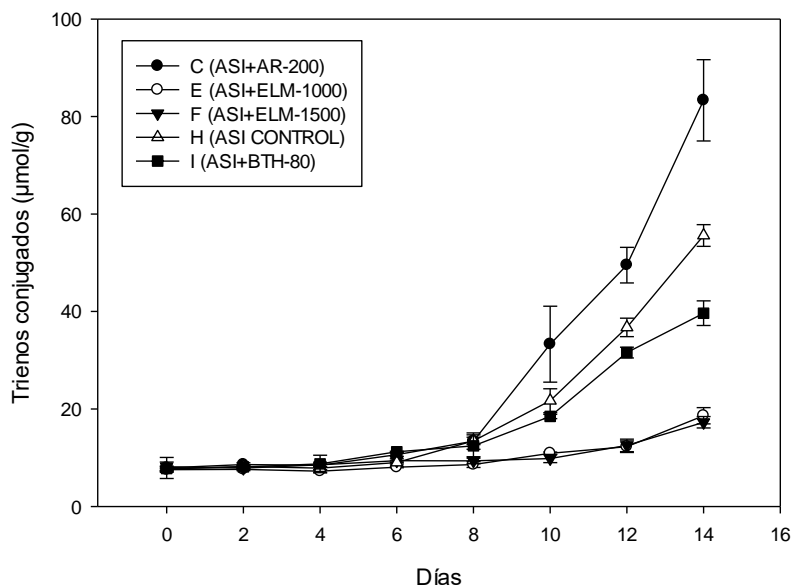
**Figura 6.** Variación de peso en porcentaje de las muestras con códigos C, E, F H e I, las muestras tratadas con ELM (E y F) muestran una menor variación de peso en el tiempo a 50°C.



**Figura 7.** Valor de peróxidos de las muestras con códigos C, E, F H e I, se observa que la muestra F que corresponde al ASI + ELM 1500 mg/kg es la que genera menos peróxidos en una oxidación de 14 días a 50°C.



**Figura 8.** Dienos conjugados en las muestras con códigos C, E, F H e I; se observa una correlación con el valor de hidroperóxidos.

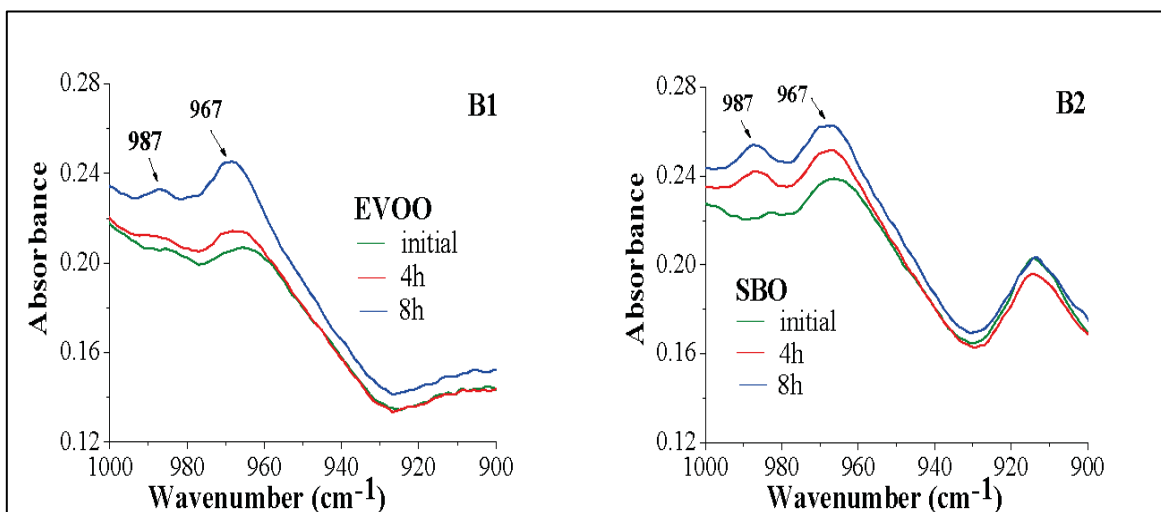


**Figura 9.** Trienos conjugados en las muestras con códigos C, E, F H e I; se observa una correlación con los resultados del valor de hidroperóxidos y dienos conjugados.

Respecto a la evaluación por **FTIR -ATR** primero recordar lo descrito por Poiana *et al.* (52) que indica que cuando se calienta el aceite de oliva o de soja a 185°C, se producen cambios cis-trans en los dobles enlaces observados por un aumento de la absorbancia en las bandas trans conjugados y no conjugados, en 987 y 967 cm-

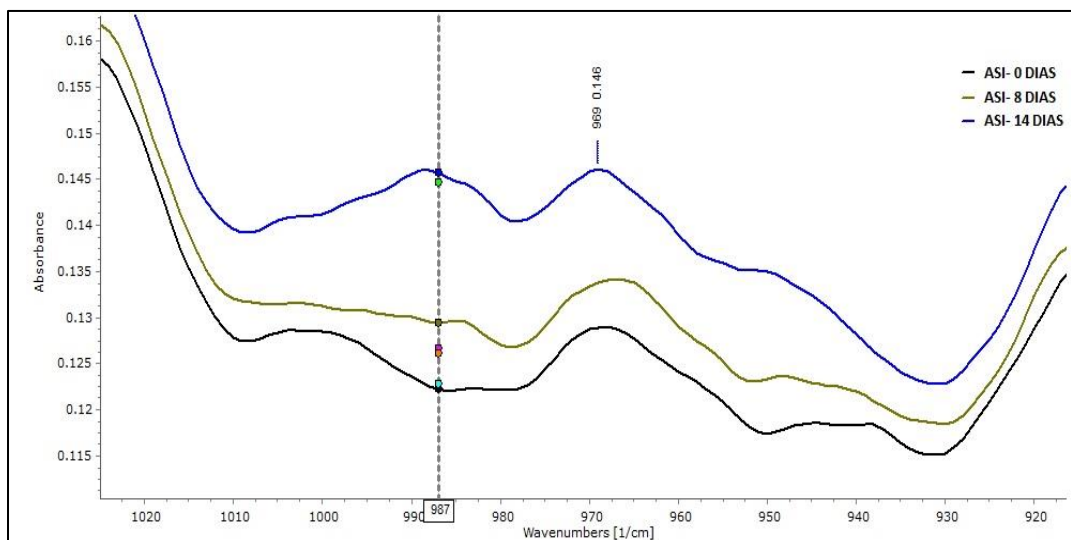
1; esto debido a la formación de productos secundarios de oxidación (52). La *Figura 10* muestra un ejemplo del aumento de la absorbancia de las bandas *trans*.

Al respecto los resultados de la evaluación FTIR-ATR de la cinética de oxidación realizada a 50°C por 14 días del ASI control (H), dio como resultado los espectros IR que se muestran en la *Figura 11*. Se observa un patrón similar al descrito por Poiana *et al.* (52), las bandas *trans* entre los picos 987 y 967  $\text{cm}^{-1}$  aumentan con el tiempo de oxidación.



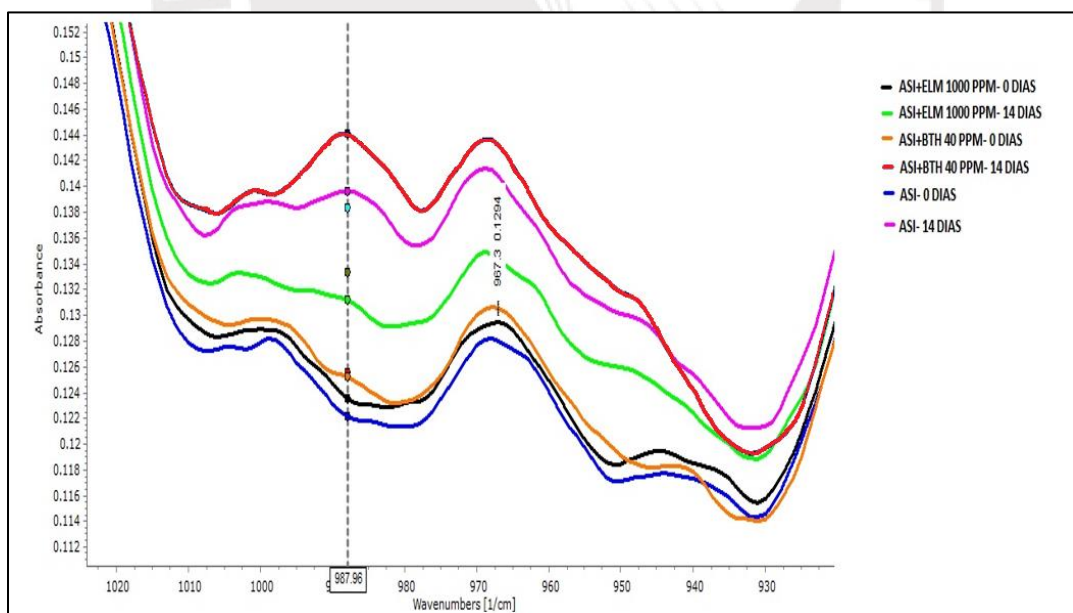
**Figura 10.** Imágenes extraídas de la referencia (52). Se observan espectros IR de muestras de aceites, a la izquierda aceite de oliva extra virgen (EVOO) y a la derecha aceite de soya (SBO), los aceites fueron calentados a 185°C durante 4 y 8 horas como resultado se producen cambios en las bandas *trans* a 987 y 967  $\text{cm}^{-1}$ .

En la cinética de oxidación de todas las muestras de aceite que se encuentran descritas en la *Tabla 4*, los que resultaron con un mayor efecto protector fueron las muestras E y F que corresponden a ASI tratados con ELM entre 1000 y 1500  $\text{mg/kg}$  respectivamente.



**Figura 11.** Espectros IR de ASI control, oxidación en 14 días a 50°C, aumento de la absorbancia de las bandas *trans* similares a los descritos por Poiana et al. (52)

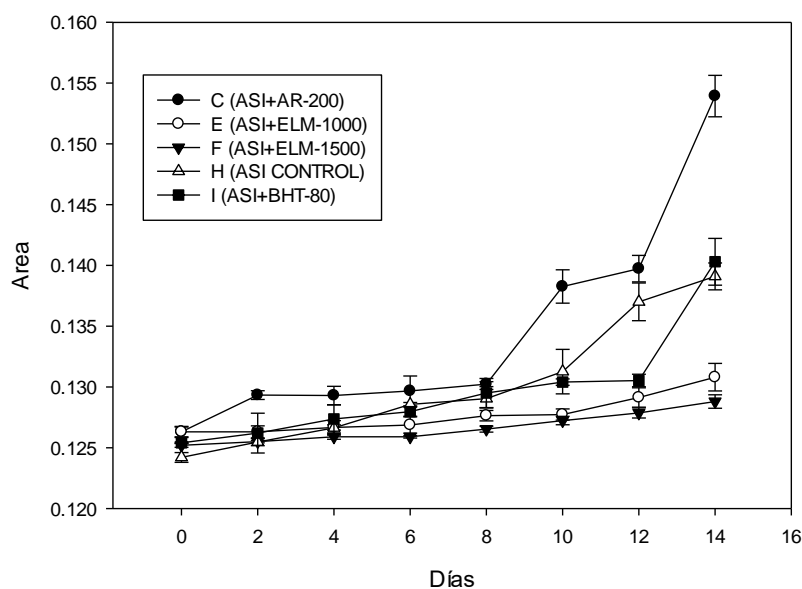
La Figura 12 muestra bandas *trans* con los picos 987 y 967  $\text{cm}^{-1}$ , se observa cambios (en el calentamiento a 50°C por 14 días) y un aumento significativo de las absorbancias en el caso del ASI puro y el ASI con el BHT, para el caso del ASI con el ELM las absorbancias cambian en menor medida que los antes mencionados.



**Figura 12.** Espectros IR del ASI control y ASI con ELM y ASI con BHT, en oxidación a 50°C por 14 días.

En los espectros IR del ASI con ELM 1000 y 1500 ppm, ASI con BHT 40 ppm y ASI puro, fueron analizados en función al área del espectro que representa el cambio a *trans*, se midió el área del segmento de espectro entre 978 - 952 considerando la integración con la línea base. La *Figura 13* contiene la gráfica de los valores promedios de integración de las áreas seleccionadas entre 978 y 952  $\text{cm}^{-1}$ , que representarían los cambios de *cis* a *trans*.

Los análisis reportados dan cuenta que ASI tratado con ELM en concentraciones de 1000 y 1500 mg/kg evitan la formación de hidroperóxidos, dienos y trienos conjugados, así mismo evita la generación de sustancias *trans* según el resultado obtenido por FTIR-ATR. Estos resultados son comparados frente al ASI tratado con BHT a concentraciones del 40 y 80 mg/kg.



**Figura 13.** Área de las bandas *trans* de los espectros FTIR-ATR de las muestras con códigos C, E, F H e I, esta grafica sigue la tendencia de hidroperóxidos, dienos, trienos, las muestras tratadas con ELM muestran una mayor protección frente al BHT.

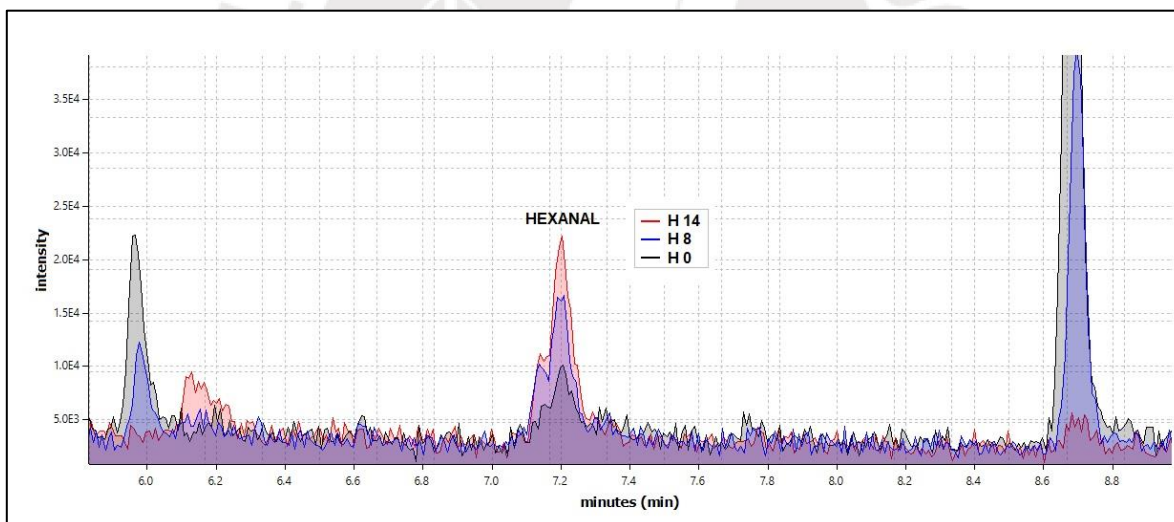
#### 4.3 Resultados de la evaluación HS-SPME-GC-MS

Las muestras sometidas a HS-SPME/GC-MS fueron las de 0 días, 8 días y 14 días, las concentraciones relativas de hexanal; principal componente que indica degradación de aceites estuvo presente en la muestra control, esto podría indicar

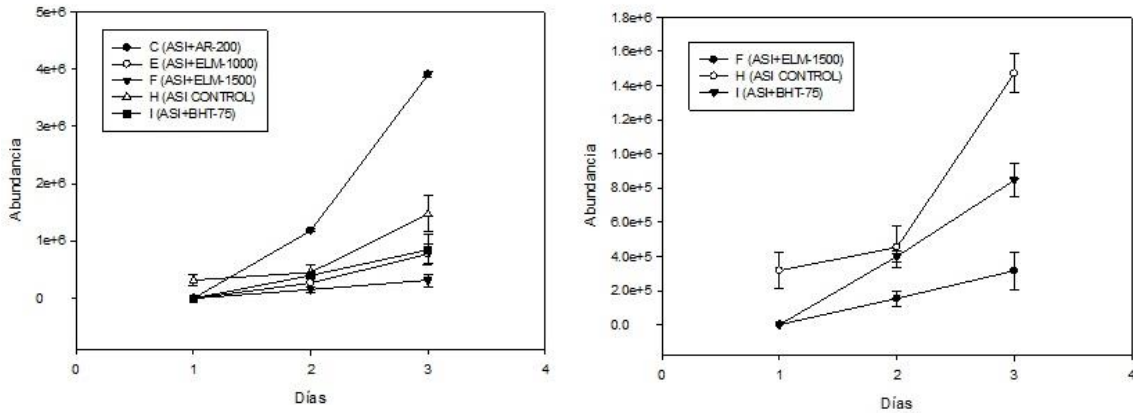
que los aceites estuvieron sufriendo oxidación cuando aún se encontraban como materia prima (semillas de sachá inchi). La *Figura 14* muestra los cromatogramas de la muestra ASI control durante la cinética por 14 días. Los resultados generales de las muestras de ASI tratadas con AR, resultaron con altas concentraciones de hexanal respecto a la muestra control, para las gráficas se consideró solo la muestra con 200 mg/Kg de AR (C).

La *Figura 15* muestra una gráfica las áreas de los picos de hexanal a lo largo de los días, (0,8 y 14), se observa que las muestras tratadas con AR (C - ASI+AR-200) es la que más hexanal produce, por ende, no funciona como antioxidante para aceite de sachá inchi; de otro lado las muestras de aceites tratadas con ELM y BHT generan menos hexanal, concordando con los resultados obtenidos del valor de hidroperóxidos, dienos y trienos conjugados.

Las muestras tratadas con antioxidantes AR, ELM y BHT no presentaban hexanal en el tiempo cero (cero días).

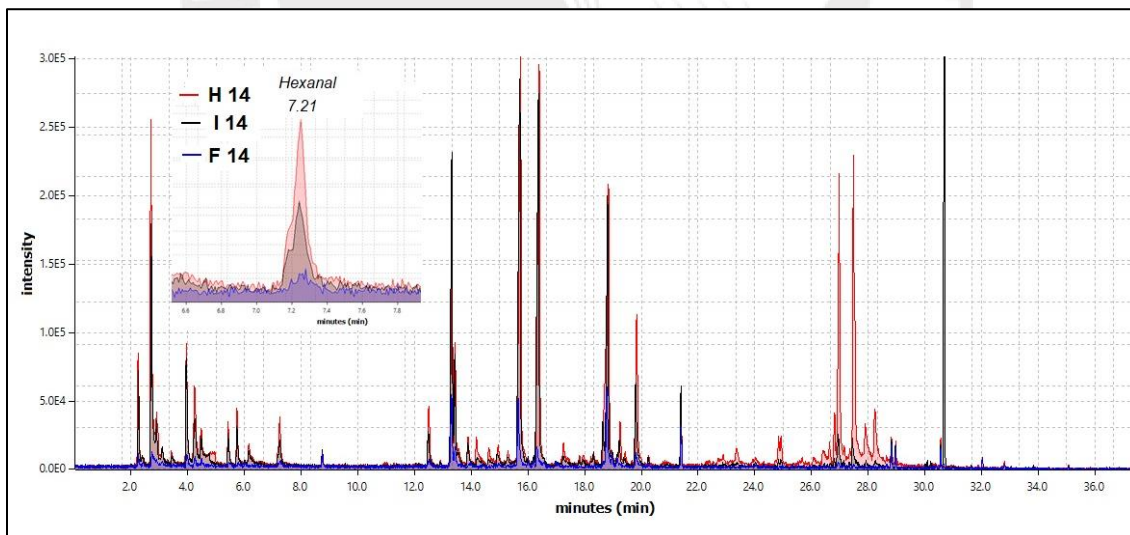


**Figura 14.** Cromatogramas de la muestra ASI control (H), sin aditivos, durante los 0 días (H0), 8 días (H8) y 14 días (H14) a 50°C. se observa que el tiempo 0 días la presencia de hexanal.



**Figura 15.** Graficas de las áreas cromatográficas de los picos del hexanal, de las muestras de ASI control, ASI con ELM a 1000 y 1500 mg/kg, y ASI con BHT.

Este método del HS-SPME/GC-MS permite monitorear de forma sencilla los volátiles que se forman en el transcurso de una oxidación de aceites; Ramos (33) recopila y describe la presencia de 60 compuestos volátiles en el aceite de sacha inchi, entre ellos alcoholes, aldehídos, cetonas, terpenos, furanonas y ácidos carboxílicos; en la revisión de los cromatogramas obtenidos, se presentan además de los nombrados, hidrocarburos y ácidos grasos.



**Figura 16.** Cromatogramas de las muestras control (H14), muestra tratada con BHT a 80 mg/kg (I14) y muestra tratada con ELM a 1500 mg/kg (F14) al finalizar la cinética de oxidación por 14 días, se observa que la muestra F14 contiene menos hexanal.

La presencia de hexanal es común en todas las muestras a medida que se va oxidando, la *Figura 16* muestra los cromatogramas de las muestras más

representabas a los 14 días de sometidas a 50 °C, ahí se observa que la muestra control (H14) contiene 4.7 veces más hexanal que la muestra tratada con 1500 mg/kg de ELM (F14), así mismo la muestra tratada con BHT a 80 mg/kg (I14) contiene 2.7 veces más hexanal que la muestra con ELM (F14).

#### 4.4 Resultados del análisis exploratorio por <sup>1</sup>H RMN.

El análisis por RMN ha evolucionado bastante y al igual que el FT-IR es un método no destructivo. Las muestras de ASI analizadas por este método fueron las tratadas con AR 200 mg/kg, con ELM 1500 mg/kg, la muestra tratada con BHT 80 mg/kg y una muestra sin aditivos como control. Se analizó las muestras tratadas en la cinética de oxidación a 50 °C a 0, 8 y 14 días.

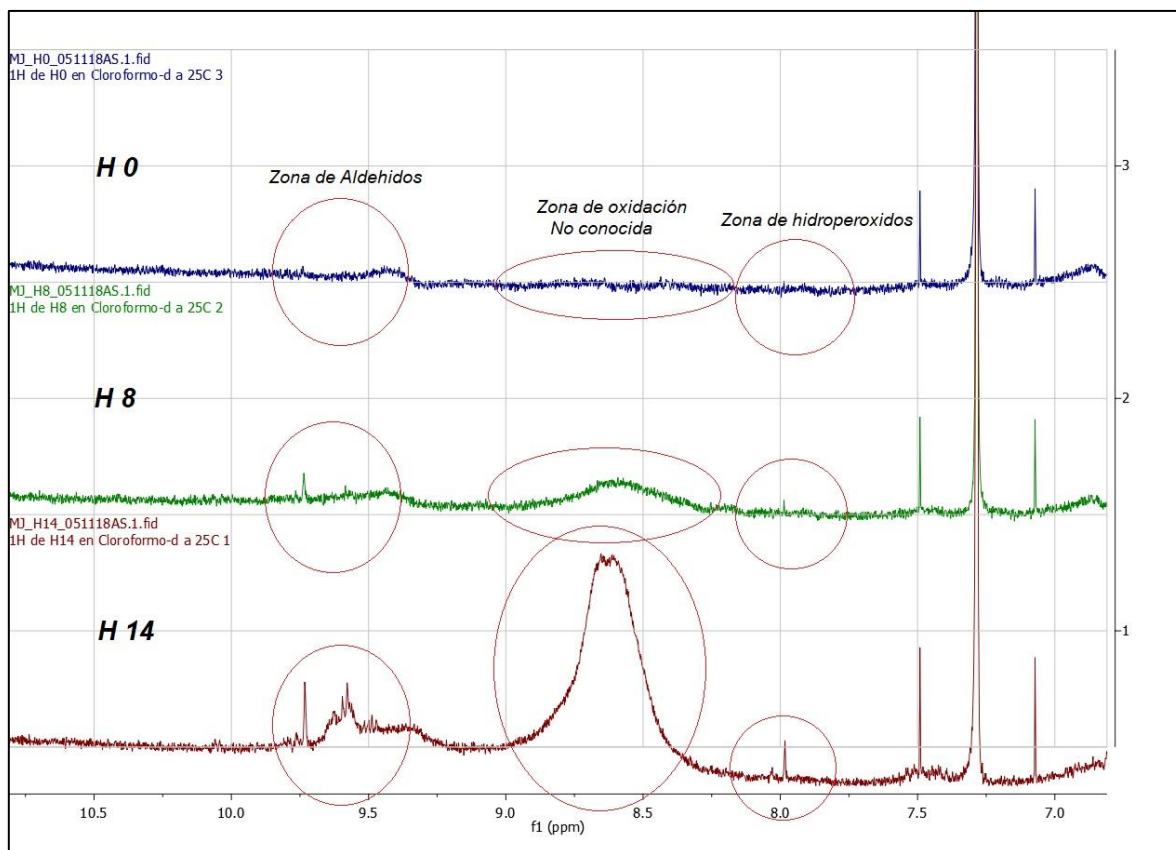
**Tabla 6.** Resultado del porcentaje de grasas de las muestras de ASI tratadas con ELM, AR, BHT y muestra control mediante <sup>1</sup>HRMN.

Código de muestra	% grasas Insaturadas	% grasas saturadas	% grasas poliinsaturadas	% de grasas monoinsaturados
C0	92.1	7.9	82.2	9.9
H0	91.7	8.3	80.5	11.2
F0	92.4	7.6	85	7.4
I0	90.9	9.1	79.7	11.2
C8	90.4	9.6	79.7	10.7
H8	90.9	9.1	80.5	10.4
F8	93.6	6.4	83.6	10
I8	92.1	7.9	80.4	11.7
C14	84.2	15.8	71.1	13.1
H14	87.2	12.8	78.7	8.5
F14	89.9	10.1	82.6	7.3
I14	90.6	9.4	78.6	12

Nota: En los códigos los números 0, 8 y 14 corresponden a los días y las letras C (ASI+AR-200), F (ASI+ELM-1500), H (ASI CONTROL), H (ASI CONTROL) e I (ASI+BHT-80).

Primeramente, se analizó el porcentaje de grasa saturada, insaturada y poliinsaturada, siguiendo la metodología descrita por Aaron *et al.* (65), la *Tabla 6* muestra los resultados obtenidos; la muestra control en su cinética por 14 días (H0,

H8 y H14) presenta una baja en el % de grasas insaturadas (de 91.7 a 87.2%) y poliinsaturadas (de 80.5 a 78.7%) y una subida en el % de grasas saturadas (de 8.3 a 12.8%). Para los otros casos ocurre de forma similar. Las muestras tratadas con ELM y BHT (H e I) bajan menos que la muestra control en sus porcentajes de grasas insaturadas.

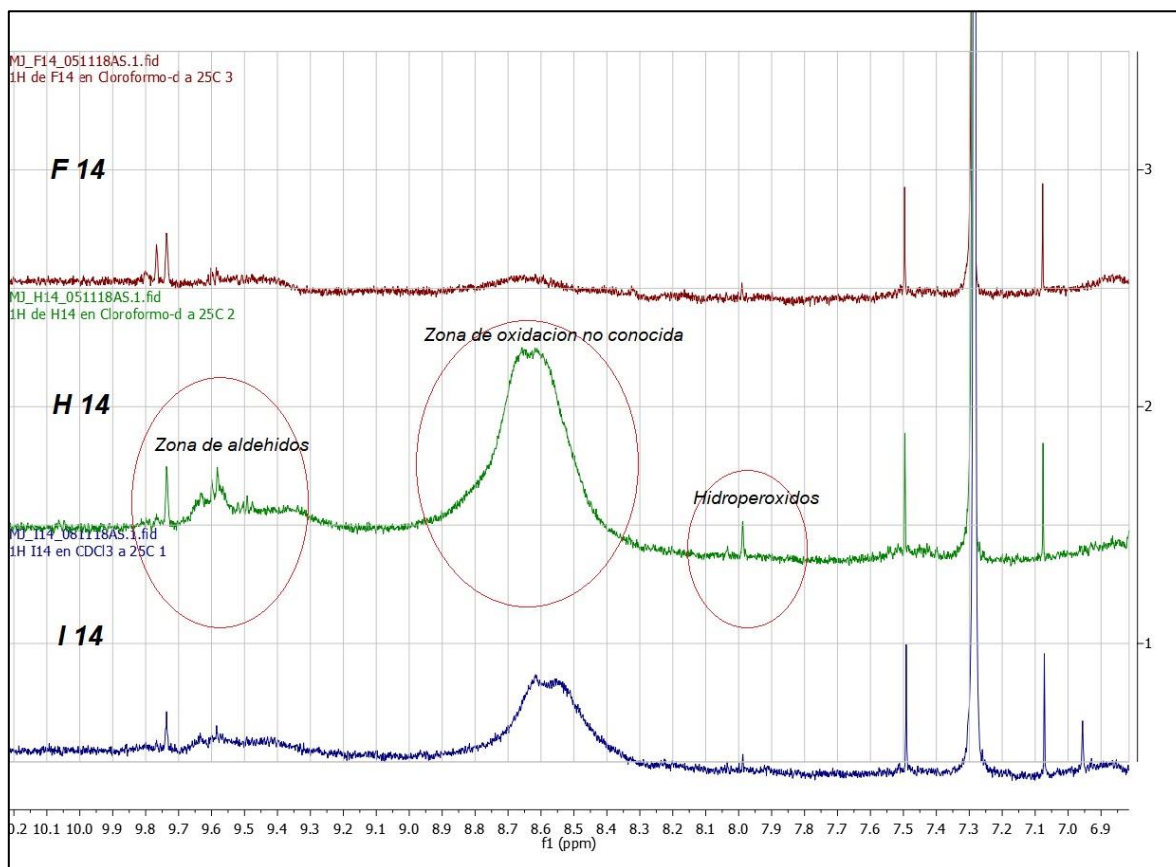


**Figura 17.** Espectros <sup>1</sup>H RMN del ASI control (H), se observa la variación de picos a lo largo del tiempo de oxidación por 14 días a 50°C; 0, 8 y 14 corresponden a los días de oxidación

El análisis de los espectros <sup>1</sup>H RMN mostró que en la cinética de oxidación de la muestra control a lo largo de 14 días a 50°C se pudo distinguir una zona muy tenue cercana a 8 ppm que puede corresponder a formaldehído o a hidroperóxidos, una zona entre 8.4 y 9 ppm en la que empieza a generarse un pico no identificado a medida que se oxida. Debido a que está en una zona cercana a hidroperóxidos y aldehídos probablemente debe tratarse de alguno de ellos. La zona de 9.4 a 9.78 ppm corresponde a la zona de aldehídos, dentro del cual se encuentran hexanal,

heptenal, nonanal, (E)-2-hexenal, entre otros (67). La *Figura 17* muestra los espectros  $^1\text{H}$  RMN de la muestra de ASI control oxidada (14 días a  $50^\circ\text{C}$ ).

También se comparó los espectros a los 14 días de oxidación de la muestra de ASI con 1500 mg/kg de ELM (F 14) y ASI con BHT 80 mg/kg (I 14) con la muestra control (H 14), la *Figura 18* muestra los cambios en los espectros. Como puede observarse, la zona de oxidación y la de hidroperóxidos es menor en la muestra de ASI con ELM (F 14).



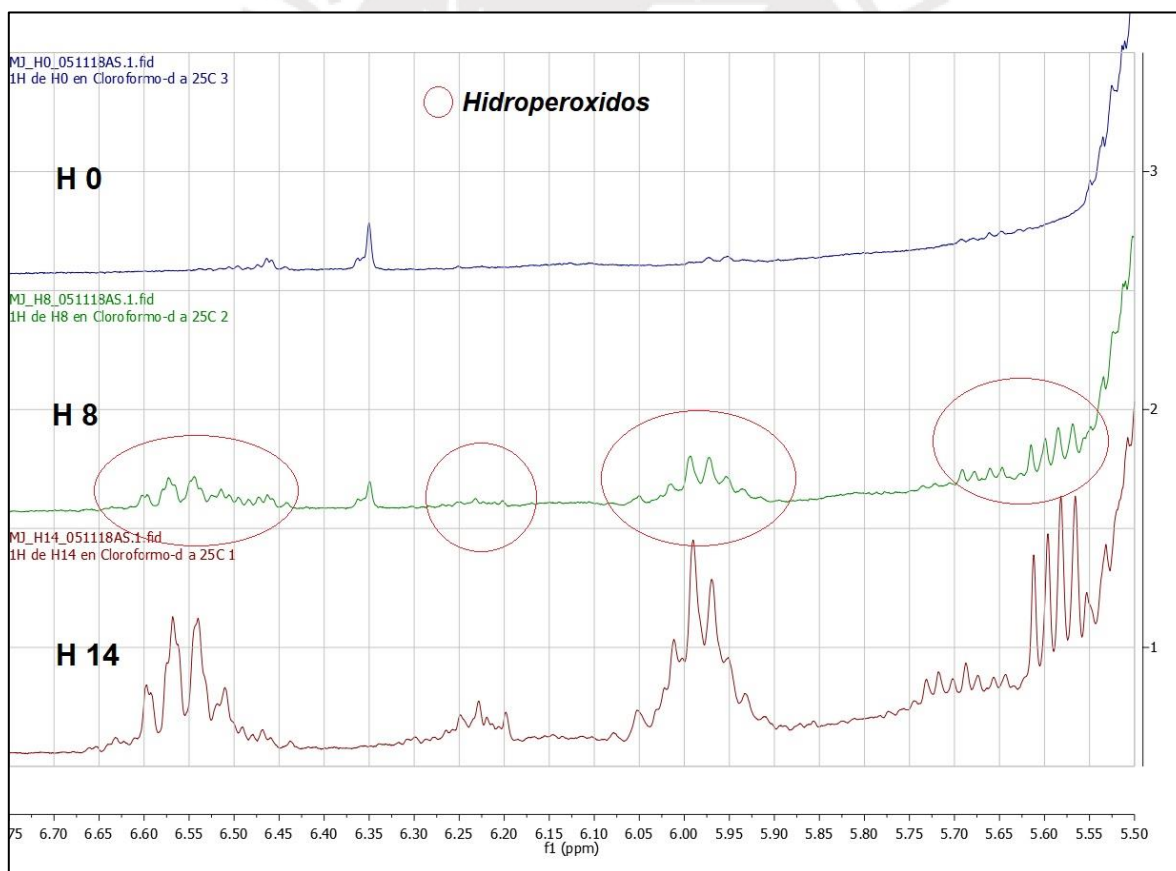
**Figura 18.** Comparación de espectros  $^1\text{H}$  RMN de los aceites oxidados por 14 días, muestra control (H), muestra con ELM (F 14) y con BHT (I 14).

Los hidroperóxidos son sustancias que se generan en el proceso de oxidación y lograron detectarse en la zona cercana a 8 ppm. Para corroborar su presencia se observó los picos complementarios a 5.40 a 6.50 ppm que corresponden a  $\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}$ . En la *Figura 19* se observa hidroperóxidos presentes en la muestra ASI control (H) y cómo varían en el tiempo (0, 8 y 14 días). La muestra ASI

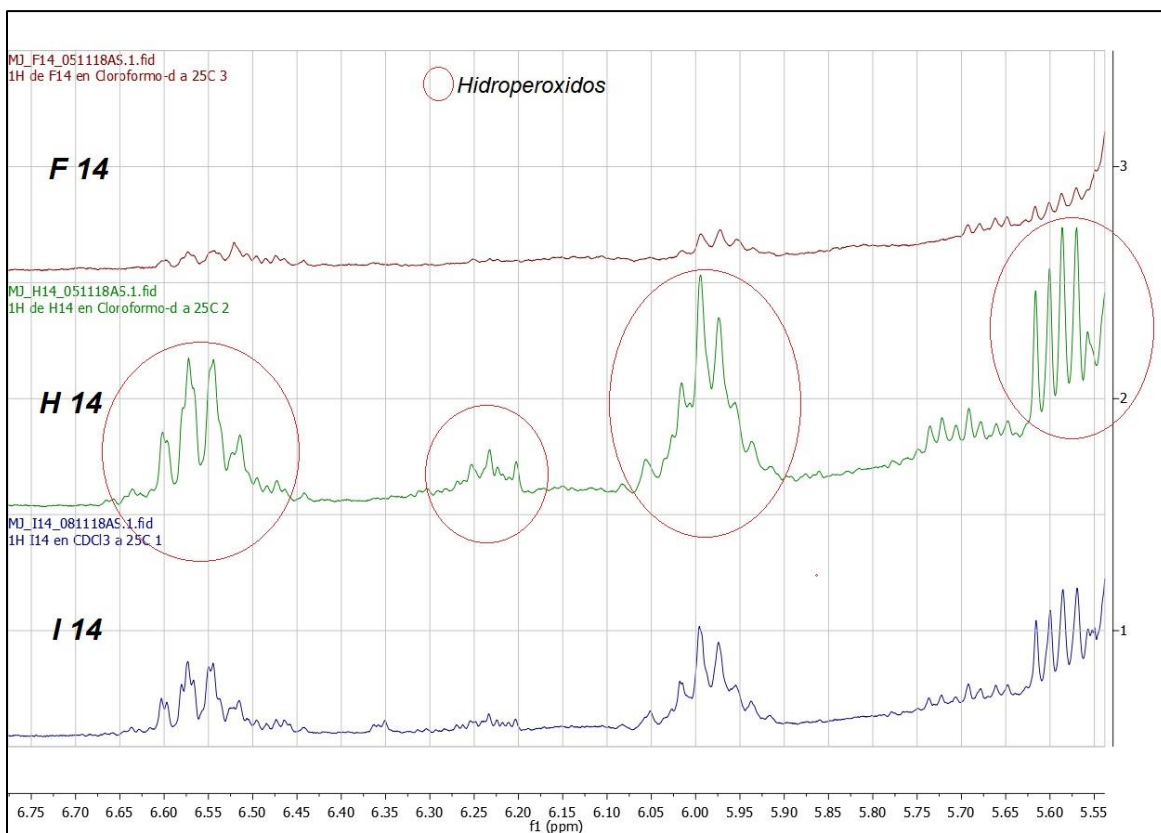
con ELM (F) presentó menores cantidad de hidroperóxidos, (*Figura 20*) que la muestra control y la tratada con BHT.

La muestra de ASI con AR superó en hidroperóxidos a la muestra control en los 14 días; es posible que el ácido rosmarínico no pudo desenvolverse adecuadamente por el medio graso en que se encontraba, también es probable que hayan existido reacciones no conocidas que consumieron todo el AR durante la cinética de oxidación.

Faltaría analizar el efecto con mayores concentraciones de AR, así mismo se deberá buscar tensoactivos de grado alimentario que pueda ayudar a una óptima dispersión y solubilización del AR en el aceite. Otro punto importante será estudiar la sinergia del AR con otros fenoles que pudiesen estar presentes en el ELM; del mismo modo se deberá estudiar la presencia de glucósidos en el ELM y su interacción frente a aceites poliinsaturados.



**Figura 19.** Comparación de espectros  $^1\text{H}$  RMN de los aceites oxidados por 14 días, muestra de ASI control (H); 0, 8 y 14 corresponde a los días de oxidación a  $50^\circ\text{C}$ . se observa la zona de hidroperóxidos.



**Figura 20.** Comparación de espectros  $^1\text{H}$  RMN de los aceites oxidados por 14 días, muestra control (H), muestra con ELM (F 14) y con BHT (I 14), se observa la zona de hidroperóxidos.

Los datos obtenidos de los espectros  $^1\text{H}$  RMN, nos indica que se puede monitorear la formación y acentuación de nuevas sustancias como hidroperóxidos, aldehídos, entre otros, en general se puede monitorear la oxidación de aceites por esta metodología.

La *Tabla 7* muestra los desplazamientos químicos más significativos, observados en los espectros  $^1\text{H}$  RMN; destaca un pico a 6.95 ppm, en la muestra con BHT, luego en la muestra con ELM y AR se observa un pico común a 3.68 ppm, ambos picos posiblemente supongan un CH provenientes del fenol del ácido rosmarínico. Los hidroperóxidos se observan claramente en los desplazamientos a 5.6, 6.0, 6.56, (67), y aumentan con el tiempo de oxidación a  $50^\circ\text{C}$ . El ASI a 1500 mg/kg de ELM genera menos hidroperóxidos que la muestra control y el ASI tratado con BHT.

**Tabla 7.** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) significativos observados en las muestras analizadas, los picos fueron comparados con los reportados por Castejón et.al (65).

Desplazamiento (ppm)	Asignación	Protón	Información adicional
0.92	Ácido graso	CH <sub>3</sub> (t)	Aumenta con la oxidación
1.18	<sup>13</sup> C satélite (C)	(m)	Aumenta con la oxidación
2.14	<sup>13</sup> C satélite (C)	(m)	Aumenta con la oxidación
2.92	<sup>13</sup> Csatellite (G)	(t/1JCH=125.98 Hz)	Aumenta con la oxidación
3.68	Desconocido	CH	Se presenta solo en las muestras con ELM y AR, / fenoles o alcoholes
3.70	sn-1,2 en diglicerido	CH <sub>2</sub> (d)	Acidez libre/ Disminuye con la oxidación
4.45	<sup>13</sup> C satélite (H) /	(dd/1JCH=148.60 Hz)	Triglicéridos /Se mantiene
4.49	Desconocido		Aparece en la oxidación a 14 días
4.57	Terpeno	CH (d)	Terpeno desconocido /Aparece en la oxidación a 14 días
4.61	Terpeno	CH (d)	Terpeno desconocido / Aparece en la oxidación a 14 días
4.75	Terpeno	CH (d)	Terpeno desconocido / Aumenta con la oxidación
5.10	sn-1,2 diglicérido	CHOCOR (m)	Disminuye con la oxidación
5.60	Hidroperóxidos	CH=CH-CH=CH (m)	Aumenta con la oxidación
6.00	Hidroperóxidos	CH=CH-CH=CH (m)	Aumenta con la oxidación
6.35	Desconocido		Disminuye con la oxidación
6.56	Hidroperóxidos	CH=CH-CH=CH (m)	Aumenta con la oxidación
6.95	Compuesto fenólico	CH	Antioxidantes / se observa en la muestra de BHT
8.00	Formaldehido y/o hidroperóxidos	CH <sub>2</sub> O	Aumenta con la oxidación
8.60	Desconocido		Se extiende de 8.4 hasta 8.8/ Aumenta con la oxidación
9.58	4-Hidroxi-(E)-2-alcadienal	COH (d)	Aumenta con la oxidación
9.60	(Z,E)-2,4-alcadienal	COH (d)	Aumenta con la oxidación
9.74	Hexanal	COH (m)	Aumenta con la oxidación
9.76	n-Alcanales	COH (t)	Aumenta con la oxidación

En este trabajo la metodología <sup>1</sup>H RMN, fue a nivel exploratorio, pero debe destacarse su mayor alcance, con el cual podría cuantificarse los hidroperóxidos y aldehídos totales. El BHT y el ELM fue distinguido en los espectros <sup>1</sup>H RMN a 3.68 y 6.95 ppm, queda por estudiar la descomposición de los antioxidantes, en el proceso de oxidación.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES

1. Se evaluó un método de extracción etanólica al 70% de hojas secas de *L. meyenii*, obteniéndose un extracto de *Lepechinia meyenii* (ELM) con un rendimiento del 12.56 %. El extracto (ELM) obtenido contiene un 30.1 % de ácido rosmarínico y 0.83 % de ácido cafeico, el método evaluado tiene la ventaja de ser un método eficaz para concentrar ácido rosmarínico (por encima del 30%) y evita la contaminación por de clorofila, así mismo se destaca el uso de solventes no tóxicos, esto permitiría el uso del extracto con fines alimentarios.
2. Se logró aislar y purificar el ácido rosmarínico a partir de hojas secas de *L. meyenii* obteniéndose un rendimiento del 1.46 %, el ácido rosmarínico purificado resulto con una pureza cromatográfica (HPLC-DAD) del 99.4%. El método usado tiene la particularidad de ser un método no cromatográfico, así mismo el proceso de purificación llevo a valores altos de pureza lo cual indica que el método es eficaz, si bien se realizó un secado exhaustivo para evitar restos de solventes orgánicos en el ácido rosmarínico, se sugiere una evaluación de trazas de solventes para un posible uso alimentario.
3. La cinética oxidativa del aceite de sachá inchi extra virgen, durante 14 días a 50°C, el cual evaluó la actividad antioxidante del ácido rosmarínico, extracto de *L. meyenii* y BHT indicó que el ácido rosmarínico usado en concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg de aceite, no fue eficaz y no detuvo la oxidación del aceite.
4. La evaluación frente a la cinética oxidativa evidencio que el extracto de *L. meyenii* (ELM) es efectivo como antioxidante en aceite de sachá inchi, usando concentraciones de 1000 y 1500 mg/kg. Se observó al día 14 de oxidación acelerada a 50°C, que el ELM usado a 1500 mg/kg es 36.2%,

51.8% y 40.3% más efectivo que el BHT usado a 80mg/kg, frente a la formación de hidroperóxidos, dienos y trienos conjugados respectivamente. Estos datos confirman la protección antioxidante del ELM frente al aceite de sachá inchi.

5. El monitoreo de la oxidación de mediante la técnica de FTIR-ATR, fue importante, porque la metodología usada al evaluar las bandas *trans* a 987 y 967  $\text{cm}^{-1}$  dieron correlaciones similares a las dadas por los resultados de hidroperóxidos, este método puede sugerirse para evaluar y monitorear de manera rápida y sin uso de reactivos la oxidación de grasas.
6. El monitoreo de la cinética de oxidación a los 14 días mediante la técnica del HS-SPME/GC-MS, indico que las muestras tratadas con ELM a 1500 mg/kg producen un 36% menos hexanal (medida relativa de abundancia) que las muestra tratadas con BHT a 80 mg/kg.
7. Para el caso del monitoreo por RMN, los espectros de  $^1\text{H}$  RMN mostraron la posibilidad de informar sobre los porcentajes de grasas insaturadas, saturadas, polinsaturadas y moniinsaturadas, observándose variaciones de estas en el transcurso de la oxidación, así mismo se pudo observar la variación de hidroperóxidos y distinguir los aldehídos formados, del mismo modo estos espectros corroboraron la protección antioxidante que ejerció el ELM frente al aceite de sachá inchi; esta metodología de monitoreo puede ser una alternativa novedosa de monitoreo de antioxidantes en grasas y aceites.

Finalmente se concluye que el extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* puede ser una alternativa como antioxidante para el aceite de sachá inchi, rico en ácidos grasos polinsaturados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chirinos R, Zuloeta G, Pedreschi R, Mignolet E, Larondelle Y, Campos D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chem.* 2013;141(3):1732–9.
2. Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dachà M, et al. Chemical characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *J Agric Food Chem.* 2011;59(24):13043–9.
3. Follegatti-Romero LA, Piantino CR, Grimaldi R, Cabral FA. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *J Supercrit Fluids.* 2009;49(3):323–9.
4. Graham C, Burdge PCC. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev* 45 581–597. 2005;581–97.
5. Naz S, Sheikh H, Siddiqi R, Sayeed SA. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. *Food Chem.* 2004;88(2):253–9.
6. Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J Agric Food Chem.* 1996;44(1):131–5.
7. Guitard R, Paul JF, Nardello-Rataj V, Aubry JM. Myricetin, rosmarinic and carnosic acids as superior natural antioxidant alternatives to  $\alpha$ -tocopherol for the preservation of omega-3 oils. *Food Chem.* 2016;213:284–95.
8. Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2006;5(4):169–86.
9. Ito N, Fukushima S, Tsuda H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by bha, bht, and other antioxidants. *Crit Rev Toxicol.* 1985;15(2):109–50.
10. L alas S, Dourtoglou V. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *J Am Oil Chem Soc.* 2003;80(6):579–

83.

11. Liang C, Schwarzer K. Comparison of four accelerated stability methods for lard and tallow with and without antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 1998;75(10):1441–3.
12. Mamani M., Chavez J, Lock O, Holstein U, Duesler E. Sesquiterpene Guaiol from *Lepechinia meyenii*. *Rev Latinoam Química.* 1990;21/2:63–6.
13. Cjuno M, Serrano C, Choquenayra J. Separacion de acido rosmarinico a partir de *Lepechinia meyenii* Walp. *Epling (Lamiaceae).* *Cienc - Rev la Fac ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas - UNSAAC.* 2008;1:32–43.
14. Oficina Nacional de Evaluacion de los Recursos Naturales (ONERN). *Inventario y evaluacion de los recursos naturales de la zona alto andina del Perú reconcimientto departamento del Cusco [Internet].* 1986. Available from: <http://repositorio.ana.gob.pe/handle/ANA/994>
15. Castillo P, Lock O. Compuestos con actividad antioxidante en la especie *Lepechinia meyenii* Walp. *Rev la Soc Química del Perú.* 2005;71–4:227–36.
16. Castillo Romero PC. Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia mayenii* Walp. [Internet]. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2004. Available from: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/92>
17. Cjuno M, Ligarda K. Cuantificación de ácido rosmarínico en seis plantas cusqueñas de la tribu mentheae (Lamiaceae) por HPLC-DAD. Universidad Nacional de San Antonio Abab del Cusco; 2013.
18. Janicsák G, Máthé I, Miklóssy-Vári V, Blunden G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem Syst Ecol.* 1999;27(7):733–8.
19. Maurer NE, Hatta-Sakoda B, Pascual-Chagman G, Rodriguez-Saona LE. Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chem.* 2012;134(2):1173–80.
20. Ramos F. Caracterización y Trazabilidad del Aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo). Universidad de Sevilla. 2014.

21. Ocelák M, Čepková PH, Viehmannová I, Dvořáková Z, Huansi DC, Lojka B. Genetic diversity of *Plukenetia volubilis* L. assessed by ISSR markers. *Sci Agric Bohem.* 2015;46(4):145–53.
22. World Flora Online [Internet]. [cited 2018 Nov 14]. Available from: <http://www.missouribotanicalgarden.org/plant-science/plant-science/world-flora-online.aspx>
23. Liu Q, Xu Y, Zhang P, Na Z, Tang T, Shi Y, et al. Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil from Xishuangbanna (China). *Grasas Aceites.* 2014;65(651):17–3495.
24. FAO (Food and Agriculture Organization), OMS (Organización Mundial de la Salud). Codex Standard for Named Vegetable Oils (CODEX-STAN 210 - 1999). 1999;8:11–25.
25. Wang S, Zhu F, Kakuda Y. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food Chem.* 2018;265:316–28.
26. Wasowicz E, Gramza A, Hes M, Jelen HH, Korczak J, Malecka M, et al. Oxidation of lipids in food. *J Food Nutr Sci.* 2004;13(48 61):87–100.
27. Frankel EN. Review. Recent advances in lipid oxidation. *J Sci Food Agric.* 1991;54(4):495–511.
28. Gordon MH, Jan P, Yanishlieva N. Antioxidants in food, Practical applications. *Antioxidants in Food.* 2001. 7–21 p.
29. Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chem.* 2006;101(3):1151–7.
30. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.* 2003;51(11):3273–9.
31. Sakai A, Miyata N, Takahashi A. Promoting activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Lett.* 1997;115:213–20.
32. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic

- acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* 2004;87(2):307–11.
33. Ramos F. Caracterización y Trazabilidad del Aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) [Internet]. Universidad de Sevilla. 2014. Available from: <http://fondosdigitales.us.es/tesis/tesis/2284/caracterizacion-y-trazabilidad-del-aceite-de-sacha-inchi-plukenetia-volubilis-linneo/#description>
  34. Patil D. Role of antioxidants in stability of edible oil. *Trends Post Harvest Technol.* 2014;1(1):68–73.
  35. Nurmi A, Nurmi T, Mursu J, Hiltunen R, Voutilainen S. Ingestion of oregano extract increases excretion of urinary phenolic metabolites in humans. *J Agric Food Chem.* 2006;54(18):6916–23.
  36. Petersen M, Simmonds MSJ. Molecules of Interest Rosmarinic acid. *Phytochemistry.* 2003;62:121–5.
  37. Petersen M, Häusler E, Meinhard J, Karwatzki B, Gertlowski C. The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1994;38(2–3):171–9.
  38. Trute A, Nahrstedt A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. *Phytochem Anal.* 1996;7(4):204–8.
  39. Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(2):386–92.
  40. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 2008;110(1):76–82.
  41. Frankel EN. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends food Sci Technol.* 1993;4(July):220–5.
  42. Fiebig HJ. Peroxide value determination. *Inf - Int News Fats, Oils Relat Mater.* 2003;14(10):651–2.
  43. Frankel EN. Lipid oxidation [Internet]. Second edi. Woodhead Publishing Limited; 2012. Available from: <https://www.elsevier.com/books/lipid->

oxidation/frankel/978-0-9531949-8-8

44. Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *J Agric Food Chem.* 1994;42(5):1054–9.
45. Snyder JM, Frankel EN, Selke E. capillary gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1985;62:1675–9.
46. García-Llatas G, Lagarda MJ, Romero F, Abellán P, Farré R. A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage: Application to liquid infant foods and powdered infant formulas. *Food Chem.* 2006;101(3):1078–86.
47. Klensporf D, Jelen´ HH. Analysis of volatile aldehydes in oat flakes by SPME-GC/MS. *Polish J Food Nutr Sci.* 2005;14(4):389–95.
48. Brunton NP, Cronin DA, Monahan FJ, Durcan R. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem.* 2000;68(3):339–45.
49. Xu L, Yu X, Li M, Chen J, Wang X. Monitoring oxidative stability and changes in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME/GC–MS. *Int J Food Prop.* 2018;20(00):S2926–38.
50. Zahir E, Saeed R, Hameed MA, Yousuf A. Study of physicochemical properties of edible oil and evaluation of frying oil quality by Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Arab J Chem.* 2017;10:S3870–6.
51. Moros J, Roth M, Garrigues S, Guardia M de la. Preliminary studies about thermal degradation of edible oils through attenuated total reflectance mid-infrared spectrometry. *Food Chem.* 2009;114(4):1529–36.
52. Poiana M-A, Alexa E, Munteanu M-F, Gligor R, Moigradean D, Mateescu C. Use of ATR-FTIR spectroscopy to detect the changes in extra virgin olive oil by adulteration with soybean oil and high temperature heat treatment. *Open Chem.* 2015;13(1):689–98.
53. Hamilton RJ (Richard J. Lipid analysis in oils and fats. Hamilton RJ, editor. Blackie academic & professional; 1998. 385 p.

54. Hwang H-S. Advances in NMR Spectroscopy for Lipid Oxidation Assessment [Internet]. 2017. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54196-9>
55. Guillén MD, Ruiz A. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2003;105(9):502–7.
56. Guillén MD, Ruiz A, Cabo N, Chirinos R, Pascual G. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR. Comparison with Linseed Oil. 2003;80(8):655–762.
57. Vicente J, De Carvalho MG, Garcia-Rojas EE. Fatty acids profile of Sacha Inchi oil and blends by <sup>1</sup>H NMR and GC-FID. *Food Chem*. 2015;181:215–21.
58. Gullén MD, Ruiz A. Monitoring of heat-induced degradation of edible oils by proton NMR. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2008;110(1):52–60.
59. Rebelo MM, Da Silva JKR, Andrade EHA, Maia JGS. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Brazilian J Pharmacogn*. 2009;19(1 B):230–5.
60. Ortiz R, Anttilén M, Speisky H, Aliaga ME, Lopez-Alarcon C, Baugh S. Application of a Microplate-Based ORAC-Pyrogallol Red Assay for the Estimation of Antioxidant Capacity: First Action 2012.03. *J AOAC Int*. 2012;95:1558–61.
61. AOAC Official Methods of Analysis. AOAC Official Method 965.33, Peroxide value of oils and fats. 1995.
62. Pegg RB. Measurement Of Primary Lipid Oxidation Products. *Handb Food Anal Chem*. 2005;1–2:515–29.
63. Ma C, Ji J, Tan C, Chen D, Luo F, Wang Y, et al. Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for the analysis of aldehydes in edible oils. *Talanta*. 2014;120:94–9.
64. Capozzi F, Laghi L, Belton PS. Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. 2015. P001-224 p.
65. Hartel AM, Moore AC. Extraction and <sup>1</sup>H NMR Analysis of Fats from Convenience Foods: A Laboratory Experiment for Organic Chemistry. *J*

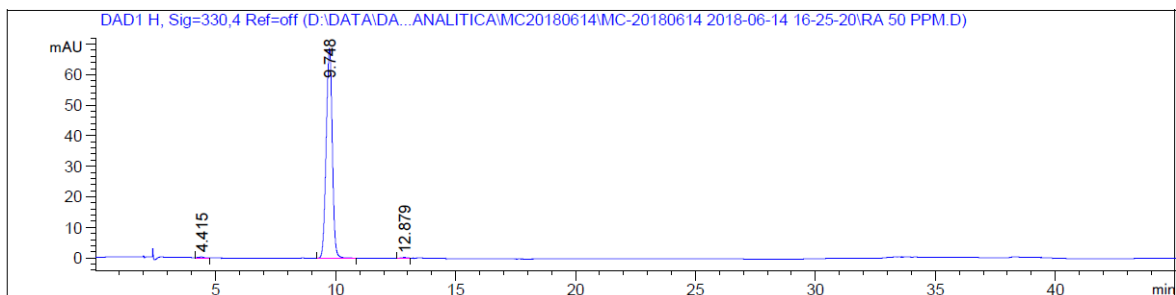
Chem Educ. 2014;91(10):1702–5.

66. Barison A, Da Silva CWP, Campos FR, Simonelli F, Lenz CA, Ferreira AG. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem.* 2010;48(8):642–50.
67. Castejón D, Mateos-Aparicio I, Molero MD, Cambero MI, Herrera A. Evaluation and Optimization of the Analysis of Fatty Acid Types in Edible Oils by  $^1\text{H}$ -NMR. *Food Anal Methods.* 2014;7(6):1285–97.



# ANEXOS

## Anexo 1. Cromatogramas HPLC.

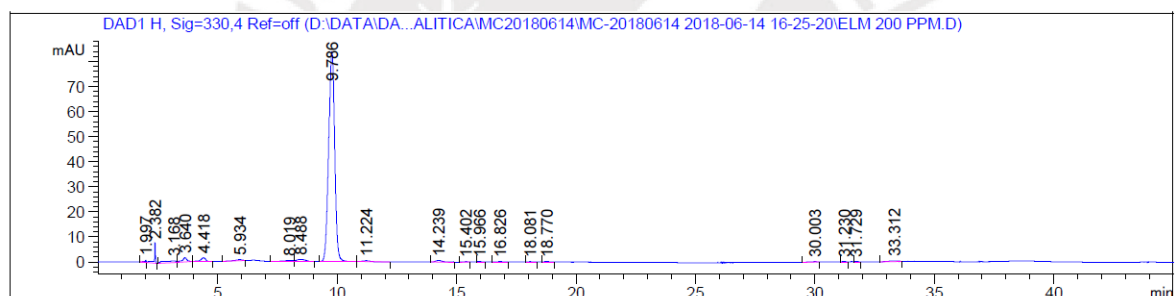


Signal 3: DAD1 H, Sig=330,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.415	BB	0.1606	3.16983	2.40704e-1	0.2622
2	9.748	BB	0.2723	1202.75134	68.69292	99.4788
3	12.879	BB	0.1859	3.13119	2.07729e-1	0.2590

Totals : 1209.05236 69.14135

Figura 21. Cromatograma HPLC DAD Acido rosmarínico puro.



Signal 3: DAD1 H, Sig=330,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.997	BV E	0.0589	3.87743	8.71903e-1	0.2343
2	2.382	VB R	0.0433	24.50467	7.88516	1.4808
3	3.168	BV	0.5019	26.27554	6.36120e-1	1.5878
4	3.640	VB	0.1934	21.75999	1.61318	1.3150
5	4.418	BB	0.2221	21.53723	1.50373	1.3015
6	5.934	BB	0.2773	8.97734	3.97786e-1	0.5425
7	8.019	BV	0.3117	13.33483	5.08944e-1	0.8058
8	8.488	VB	0.3123	23.34198	8.94956e-1	1.4106
9	9.786	BB	0.2744	1465.36951	83.62925	88.5528
10	11.224	BB	0.2782	9.94563	4.23144e-1	0.6010
11	14.239	BB	0.2658	13.96831	6.74056e-1	0.8441
12	15.402	BB	0.1697	2.10988	1.64415e-1	0.1275
13	15.966	BB	0.1357	1.50583	1.44403e-1	0.0910
14	16.826	BB	0.1774	2.22057	1.58551e-1	0.1342
15	18.081	BB	0.1443	1.58748	1.35845e-1	0.0959
16	18.770	BB	0.1600	3.29547	2.59753e-1	0.1991
17	30.003	BB	0.1939	2.78882	1.87144e-1	0.1685
18	31.230	BB	0.1021	7.80678e-1	1.05807e-1	0.0472
19	31.729	BB	0.0998	1.22057	1.92975e-1	0.0738
20	33.312	BB	0.3307	6.39502	2.35545e-1	0.3865

Totals : 1654.79677 100.62266

Figura 22. Cromatograma HPLC DAD del ELM

## Anexo 2. Resultados de análisis

**Tabla 8.** Porcentaje de variación de pesos las muestras procesadas en la cinética de oxidación.

DÍAS	A (% masa)	SD	B (% masa)	SD	C (% masa)	SD	D (% masa)	SD	E (% masa)	SD	F (% masa)	SD	G (% masa)	SD	H (% masa)	SD	I (% masa)	SD	J (% masa)	SD	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	-0.449	0.009	-0.340	0.005	-0.420	0.003	-0.556	0.094	-0.438	0.006	-0.258	0.008	-0.424	0.007	-0.062	0.005	-0.471	0.007	-0.021	0.012	0.012
4	-0.213	0.025	-0.191	0.034	-0.388	0.002	-0.426	0.009	-0.421	0.006	-0.254	0.008	-0.327	0.015	-0.035	0.008	-0.400	0.051	0.032	0.015	0.015
6	-0.024	0.072	-0.070	0.016	-0.345	0.032	-0.414	0.004	-0.433	0.021	-0.270	0.022	-0.368	0.008	-0.016	0.005	-0.427	0.009	0.100	0.008	0.008
8	0.029	0.034	0.505	0.047	-0.313	0.029	-0.301	0.017	-0.400	0.009	-0.276	0.007	-0.238	0.003	0.044	0.029	-0.327	0.023	0.095	0.022	0.022
10	0.111	0.049	1.058	0.045	0.066	0.059	-0.169	0.050	-0.367	0.006	-0.237	0.005	-0.172	0.003	0.188	0.007	-0.277	0.048	0.170	0.026	0.026
12	0.235	0.022	1.290	0.016	0.220	0.048	0.224	0.029	-0.337	0.009	-0.246	0.030	0.050	0.049	0.392	0.037	-0.108	0.025	0.278	0.013	0.013
14	0.269	0.003	2.491	0.162	0.593	0.090	0.454	0.098	-0.234	0.024	-0.231	0.011	0.234	0.016	0.440	0.015	0.238	0.027	0.558	0.058	0.058

Nota: Considerar la codificación de la Tabla 4.

**Tabla 9.** Valor de peróxido de todas las muestras evaluadas en la cinética de oxidación

DÍAS	Muestras																			
	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD	E	SD	F	SD	G	SD	H	SD	I	SD	J	SD
0.0	0.9	0.1	1.1	0.1	0.8	0.0	0.7	0.1	0.8	0.0	0.3	0.1	2.4	1.2	0.3	0.4	0.1	0.0	0.9	0.2
2.0	4.9	0.7	6.6	1.3	4.8	1.1	1.5	1.3	1.3	0.8	1.5	0.6	9.0	0.3	0.9	0.2	8.4	2.6	1.9	0.2
4.0	45.7	6.2	44.2	12.4	17.7	4.4	7.6	7.0	6.2	1.9	0.7	0.0	24.6	2.1	12.0	3.2	11.0	3.8	18.3	2.7
6.0	66.3	10.2	73.7	11.0	18.9	3.6	10.0	1.6	3.6	0.1	3.2	1.6	30.6	1.2	9.6	1.1	17.3	1.1	37.2	4.9
8.0	70.4	6.7	127.5	10.7	47.3	0.7	32.9	7.8	8.8	1.6	1.9	0.8	70.6	3.7	26.7	1.3	31.3	3.2	42.0	4.7
10.0	88.4	7.0	137.5	13.0	87.2	10.0	55.6	8.3	10.3	1.1	5.3	1.2	88.6	3.8	67.5	4.2	40.2	2.6	54.9	2.8
12.0	93.5	9.2	155.2	11.2	111.2	5.9	118.3	7.5	26.3	2.2	14.8	1.5	120.4	7.7	108.5	3.6	53.0	4.0	80.5	5.0
14.0	113.3	8.2	175.2	14.1	127.0	10.1	130.3	9.2	60.6	6.8	29.2	2.7	124.7	9.3	129.5	5.9	76.0	7.6	99.3	7.0

Nota: Considerar la codificación de la Tabla 4.

**Tabla 10. Resultados de las integrales de los picos de las bandas trans por FT-IR-ATR**

Días	Muestras																			
	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD	E	SD	F	SD	G	SD	H	SD	I	SD	J	SD
0	0.1251	0.0009	0.1287	0.0005	0.1263	0.0005	0.1261	0.0007	0.1263	0.0004	0.1252	0.0002	0.1271	0.0003	0.1242	0.0004	0.1254	0.0001	0.1242	0.0005
2	0.1279	0.0001	0.1261	0.0008	0.1293	0.0004	0.1258	0.0002	0.1263	0.0005	0.1255	0.0001	0.1275	0.0001	0.1255	0.0003	0.1262	0.0016	0.1255	0.0006
4	0.1293	0.0006	0.1316	0.0003	0.1293	0.0008	0.1267	0.0003	0.1267	0.0002	0.1259	0.0002	0.1281	0.0005	0.1266	0.0006	0.1274	0.0012	0.1264	0.0006
6	0.1310	0.0002	0.1348	0.0014	0.1297	0.0012	0.1288	0.0006	0.1269	0.0007	0.1259	0.0001	0.1283	0.0002	0.1286	0.0002	0.1280	0.0004	0.1280	0.0023
8	0.1343	0.0009	0.1551	0.0061	0.1302	0.0002	0.1298	0.0006	0.1276	0.0004	0.1265	0.0003	0.1292	0.0022	0.1290	0.0008	0.1295	0.0012	0.1298	0.0005
10	0.1364	0.0006	0.1890	0.0040	0.1383	0.0014	0.1329	0.0017	0.1277	0.0005	0.1272	0.0003	0.1342	0.0004	0.1313	0.0018	0.1304	0.0003	0.1302	0.0011
12	0.1406	0.0015	0.2141	0.0071	0.1397	0.0011	0.1447	0.0010	0.1291	0.0008	0.1279	0.0004	0.1393	0.0010	0.1370	0.0016	0.1305	0.0005	0.1327	0.0029
14	0.1465	0.0005	0.2533	0.0097	0.1539	0.0017	0.1453	0.0021	0.1308	0.0011	0.1288	0.0006	0.1415	0.0017	0.1391	0.0011	0.1403	0.0019	0.1399	0.0021

Nota: Considerar la codificación de la Tabla 4.

**Tabla 11. Resultados del análisis de dienos conjugados por UV-VIS.**

DIAS	Muestras																			
	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD	E	SD	F	SD	G	SD	H	SD	I	SD	J	SD
0	5.340	0.379	6.637	0.465	5.394	1.544	5.197	0.392	5.527	0.522	4.566	1.268	4.899	0.338	5.182	0.229	5.214	0.271	7.051	0.094
2	9.054	0.780	10.482	0.655	8.883	0.804	6.241	0.261	5.921	0.600	6.697	0.386	6.491	0.359	6.181	0.183	5.398	0.106	9.229	0.271
4	35.767	2.678	28.063	1.948	11.158	0.394	8.605	0.392	5.884	0.448	8.767	0.446	12.613	3.100	8.207	1.206	12.356	6.387	14.658	2.669
6	42.223	2.020	36.152	4.178	18.646	0.773	10.941	1.460	7.211	0.196	9.866	2.060	17.747	0.969	12.004	0.935	17.603	1.272	23.262	1.382
8	55.764	2.730	112.662	10.285	26.917	2.189	28.792	1.097	8.763	0.193	8.722	0.679	35.512	0.670	21.142	2.869	22.406	1.420	28.757	1.677
10	75.912	7.510	138.562	7.586	66.144	7.221	43.845	3.557	17.312	1.058	9.960	0.912	42.699	1.458	38.189	4.850	33.610	1.321	39.727	2.153
12	80.783	3.086	172.370	13.132	78.723	5.505	85.312	11.974	19.870	2.600	13.166	0.961	73.903	7.636	65.237	3.480	39.634	3.954	59.040	1.479
14	91.979	8.923	181.983	12.767	125.533	12.479	94.757	2.911	35.430	2.572	18.215	1.654	82.435	4.135	76.499	7.985	57.866	2.853	71.087	3.270

Nota: Considerar la codificación de la Tabla 4.

**Tabla 12.** Resultados del análisis de trienos conjugados por UV-VIS

DIAS	Muestras																			
	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD	E	SD	F	SD	G	SD	H	SD	I	SD	J	SD
0	6.006	0.654	6.695	0.157	7.912	2.157	8.304	0.205	7.554	0.263	8.152	0.945	7.777	0.082	7.657	0.641	7.776	0.343	7.786	0.687
2	7.998	0.262	8.247	0.719	8.586	0.361	7.897	0.204	7.598	0.245	7.871	0.255	7.651	0.615	8.202	0.196	8.109	0.210	9.039	0.623
4	12.392	1.391	13.470	1.844	8.446	0.430	8.298	0.811	7.232	0.291	8.532	0.426	10.043	1.139	7.862	0.368	8.724	1.799	9.837	0.995
6	22.392	2.178	19.397	3.606	10.636	0.349	8.849	0.966	8.072	0.118	9.397	0.386	10.494	0.164	9.031	0.317	11.224	0.100	12.879	2.904
8	27.488	3.013	103.754	9.705	13.404	1.678	16.548	0.682	8.603	0.588	9.352	0.581	12.982	2.961	13.453	0.764	12.442	2.238	17.124	1.860
10	39.536	2.797	175.017	9.805	33.286	7.787	25.677	3.446	10.911	0.256	9.845	0.849	21.842	0.454	21.697	2.461	18.461	0.449	17.248	2.701
12	43.152	4.787	197.140	7.230	49.512	3.661	44.516	5.892	12.265	1.186	12.523	1.286	44.334	1.231	36.730	1.890	31.572	1.089	28.078	1.458
14	47.355	3.570	228.590	7.217	83.321	8.340	55.588	3.159	18.606	1.669	17.265	1.174	52.687	2.963	55.585	2.220	39.652	2.532	57.727	3.557

**Tabla 13.** Resultados de la integración del área correspondiente al hexanal medido por HS-SPME/GC-MS.

Días	Muestras									
	A	SD	B	SD	C	SD	D	SD	E	SD
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8.0	1175034.3	341355.7	3147488.5	362735.2	1178955.0	25615.4	631948.0	66543.1	267916.7	75632.7
14.0	2888817.3	503370.0	36621454.0	321732.1	3903702.0	42481.5	2204541.7	156409.1	770281.3	168991.0
Días	Muestras									
	F	SD	G	SD	H	SD	I	SD	J	SD
0.0	0.0	0.0	300525.3	150582.6	316873.3	106754.0	0.0	0.0	16271.3	5000.9
8.0	153738.3	46173.2	523135.3	202094.0	453614.0	121743.0	400450.7	29806.5	294648.3	235225.3
14.0	316226.0	109219.0	1541923.0	697732.1	1471538.3	314783.4	846507.3	264128.7	1793281.7	112722.1