UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

"DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DEL ACEITE CRUDO DE PESCADO USANDO ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y NATURALES MEDIANTE USO DEL RANCIMAT"

AUTORES:

BACH. ARDILES FALCÓN NATALIA ELENA.
BACH. MOZO MALCA VANESSA JANEEL.

ASESOR:

MS. CESAR MORENO ROJO.

NUEVO CHIMBOTE- PERU
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

HOJA DE CONFORMIDAD DE ASESOR

El presente trabajo de tesis titulado: **"DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DEL ACEITE CRUDO DE PESCADO USANDO ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y NATURALES MEDIANTE USO DEL RANCIMAT"** Ha contado con el asesoramiento de quien deja constancia de su aprobación. Por tal motivo, firmo el presente trabajo en calidad de Asesor. Designado por RESOLUCION DECANATURAL N° 081 – 2016 – UNS – FI.

MS. CESAR MORENO ROJO
ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERIO AGROINDUSTRIAL

"Determinación Del Tiempo De Vida Útil Del Aceite Crudo De Pescado Usando Antioxidantes Sintéticos Y Naturales Mediante Uso Del Rancimat"

TESISTAS

Bach. Natalia Elena Ardiles Falcon.
Bach. Vanessa Janeel Mozo Malca.

Revisado y Aprobado el día 25 de Mayo de 2017 por el siguiente Jurado Evaluador, designado mediante Resolución Decanatural N° 035-2017-UNS-CCFI

Dr. Augusto Castillo Calderón
Presidente

Ms. Cesar Moreno Rojo
Secretario

Dra. Luz Paucar Menacho
Integrante

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicarle a

Dios por siempre estar conmigo,

Él siempre me da fuerzas

e ilumina mi camino

A mis padres y mis hermanos

Porque sin su ayuda incondicional

y apoyo constante no hubiera

sido posible ser lo que ahora soy;

así como el esfuerzo transmitido,

amor y compresión.

Natalia. A

Ante todo quiero dedicarle este trabajo a Dios por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida, porque me ha dado la vida, fortaleza y me ilumino en todo el trayecto de mi carrera, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a levantarme y seguir adelante.

A mis padres Luz y Florencio a quien les debo todo en la vida, por su apoyo incondicional en todo momento , por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanas Diana y Wendy porque siempre me brindaron todo su apoyo, motivación y las fuerzas que necesitaba en esos difíciles momentos, así como también a esa persona especial que a pesar de todo siempre está conmigo apoyándome. Gracias
E.T.L.R.

Vanessa. M

AGRADECIMIENTO

A nuestras familias, este camino hubiese sido más difícil de recorrer si no existiesen, más aún si es por ellos que lo tengo todo en la vida, motivación de seguir trabajando duro poder lograr cumplir mis metas y salir delante por ellos.

A nuestro asesor el Ing. Cesar Moreno Rojo porque nos motivó y apoyó constantemente, por su tiempo, por su apoyo y su guía brindada en el desarrollo de esta investigación.

A nuestros grandes amigos, que demostraron serlos por estar siempre ahí, por sus consejos y apoyo; y por motivarnos a culminar este trabajo.

A la Universidad Nacional del santa y en especial a la escuela de ingeniería agroindustrial por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar el tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado anchoveta utilizando antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHA y BHT) y antioxidantes naturales (Extracto de té verde y extracto de romero) a fin de establecer cuál es la mejor mezcla para obtener el mayor tiempo de vida útil.

El tiempo de vida útil se realizó por el método Rancimat, a tres temperaturas (80 °C; 100 °C y 120 °C), a un flujo de aire constante de 15L/h, los resultados obtenidos en la determinación del tiempo de vida útil extrapolando los resultados a 25 °C indican que el aceite crudo de pescado sin adición de antioxidantes dio (0.6meses) y el mejor tratamiento T1 (8 meses) usando antioxidantes sintéticos y naturales mediante uso del Rancimat. Los tiempos de inducción para el ACP(Aceite Crudo Pescado) a las temperaturas de 80 ° C, 100 ° C y 120 ° C con un flujo constante de 15 L/h fueron 5.10 ± 0.02a, 1.04 ± 0.02a, 0.19 ± 0.03a respectivamente.

Asimismo se realizó la evaluación de las características físico-químicas del aceite crudo de pescado anchoveta sin antioxidante tales como: % acidez titulable (2.52 ± 0.01), %humedad e impurezas (0.05 ± 0.01), densidad (0.92 ± 0.00), índice de refracción (1.39 ± 0.00), índice de yodo (184.52 ± 0.25), índice de peróxido (1.15 ± 0.01), índice de anisidina (6.87 ± 0.01), valor Totox (6.87 ± 0.02)y composición de ácidos grasos (EPA+DHA :30.41%).

El orden de eficiencia de los tratamientos con antioxidantes de origen sintético y natural fue el siguiente: T1 (TBHQ, BHT y BHA) > T4 (TBHQ, BHT, BHA + Tocoferoles Naturales)> T5 (TBHQ, BHT, BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero) > T3 (Extracto de té verde + Extracto de Romero) > T2 (Tocoferoles Naturales) > T6 (Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the shelf life of crude anchovy fish oil using synthetic antioxidants (TBHQ, BHA and BHT) and natural antioxidants (Green tea extract and rosemary extract) in order to establish the best mixture to obtain the longest useful life.

The useful life was performed by the Rancimat method, at three temperatures (80 ° C, 100 ° C and 120 ° C), at a constant air flow of 15L / h, the results obtained in the determination of the life time Useful extrapolating the results to 25 ° C indicate that crude fish oil without antioxidant addition gave (0.05 years) and the best T1 treatment (0.66 years) using synthetic and natural antioxidants through the use of Rancimat. Induction times for the ACP(Crude Oil Fish) at temperatures of 80 ° C, 100 ° C and 120 ° C with a constant flow of 15 L / h were 5.10 ± 0.02a, 1.04 ± 0.02a, and 0.19 ± 0.03a respectively.

The evaluation of the physicochemical characteristics of anchovy fish oil without antioxidant, such as titratable acidity (2.52 ± 0.01), moisture and impurities (0.05 ± 0.01), density (0.92 ± 0.00), refractive index (1.39 ± 0.001), iodine index (184.52 ± 0.25), peroxide index (1.15 ± 0.01), anisidine index (6.87 ± 0.01), Totox value (6.87 ± 0.02) and fatty acid composition (EPA + 30.41%).

The order of efficiency of treatments with antioxidants of synthetic and natural origin was as follows: T1 (TBHQ, BHT and BHA)> T4 (TBHQ, BHT, BHA + Natural Tocopherols)> T5 (TBHQ, BHT, BHA + Tea Extract Green + Rosemary Extract)> T3 (Green Tea Extract + Rosemary Extract)> T2 (Natural Tocopherols)> T6 (Natural Tocopherols + Green Tea Extract + Rosemary Extract.

INDICE GENERAL

RESUMEN 1
ABSTRACT 1
I. INTRODUCCIÓN. 1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. Definición de aceite crudo de pescado. 3
La estructura química e un aceite o grasa es la siguiente: 3
2.2. Fuentes de los aceites y grasas. 4
a) Aceites Vegetales: 4
b) Cerdos y vacas 4
c) Aceites de especies marinas: 4
2.3. Características generales del aceite de pescado. 5
2.3.1. Importancia 6
2.4. Ácidos grasos de tipo omega (ω) 6
2.4.1. Nomenclatura. 7
2.5. Ácidos grasos poliinsaturados en aceites de pescado 8
2.5.1. La Familia de omega-3 8
2.5.1.1. Ácido Eicosapentaenico (EPA) 9
2.5.1.2. Ácido Docosahexaenoico (DHA) 10
2.5.2. La Familia de omega-6 11
2.6. Reacción de Auto-oxidación 11
2.7. Antioxidantes 14
2.7.1. Importancia de los Antioxidantes 15
2.7.2. Mecanismo de Acción de los Antioxidantes 16
2.7.3. Clases de antioxidantes 17
2.7.3.1. Antioxidantes primarios. 18

2.7.3.2. Atrapadores de oxígeno. 19
2.7.3.3. Antioxidantes enzimáticos. 19
2.7.3.4. Antioxidantes misceláneos. 19
2.7.3.5. Antioxidantes Sintéticos 20
2.7.3.5.1. Ter- butilhidroquinona (TBHQ) 20
2.7.3.5.2. Butilhidroxianisol (BHA) 22
2.7.3.5.3. Butilhidroxitolueno (BHT) 23
2.7.3.6. Uso de Antioxidantes Sintéticos. 24
2.7.4. Antioxidantes Naturales 25
2.7.4.1. Extracto de Romero 26
2.7.4.2. Té verde 27
2.7.4.3. Té verde y los polifenoles, flavonoides y catequinas 27
2.7.4.3.1. El té verde y sus cualidades antioxidantes 28
2.7.4.4. Tocoferoles 29
2.7.5. Mecanismos de los Antioxidantes 31
2.7.5.1. Mecanismo por transferencia de un hidrógeno (MTP) 32
2.7.5.2. Mecanismo por transferencia simple de un electrón (MTE) 33
2.8. Estabilidad Oxidativa 39
2.9. Antioxidantes permitidos 35
2.10. Importancia de la incorporación del antioxidante 36
2.11. Métodos empleados para determinar la oxidación de los aceites 40
2.11.1. Valor del Peróxido (VP) 40
2.11.2. Valor de la p-Anisidina (AOCS CD 18-90) 42
2.11.3. Índice de acidez 44
2.11.4. Índice de yodo. 45
2.11.5. Índice de estabilidad oxidativa 45

2.11.6. Método Rancimat. 47
III. MATERIALES Y METODOS 48
3.1. Materiales, equipos e instrumentos 49
3.1.1. Materiales 49
3.1.1.1. Materia Prima 49
3.1.1.2. Antioxidantes y reactivos 50
3.1.1.3. Materiales de vidrio. 51
3.1.2. EQUIPOS: 51
3.2. Metodología de Análisis 53
3.2.1. Análisis físico-químico: 53
3.2.2. Adición de Antioxidantes de origen sintético y natural. 60
3.2.3. Análisis en el Rancimat de Aceite de Pescado. 61
3.3. Procedimiento: 62
3.3.1. Recepción de la Materia Prima 62
3.3.2. Homogenización 62
3.3.3. Pesado 62
3.3.4. Dilución 62
3.3.5. Análisis de Rancimat 63
3.4. Diseño Experimental 63
3.4.1. Flujo del diseño experimental del aceite de pescado crudo. 63
3.4.2. Variables 64
3.4.2.1. Variables independientes. 64
3.4.2.2. Variables dependientes. 65
3.5. Diseño estadístico: 66
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69
4.1. De los análisis fisicoquímicos del aceite crudo de pescado. 69

4.1.1. Determinación las características organolépticas: color mediante los métodos: Escala Gardner y el CIELAB. 71
4.1.1.1. Determinación de color escala GARDNER. 72
4.1.1.2. Determinación de color método CIELAB. 73
4.1.1.3. Perfil porcentual de ácidos grasos del aceite crudo de pescado.... 74
4.2. Tiempos de inducción del aceite crudo de pescado sin y con incorporación de antioxidantes naturales y sintéticos. 79
4.2.1. ANOVA de los tiempos de inducción del aceite crudo de pescado sin y con incorporación de antioxidantes naturales y sintéticos a diferentes temperaturas 85
4.3. Análisis de Varianza (ANOVA)..... 91
4.4. Mecanismo de acción de los antioxidantes. 92
4.5. Efectos de los antioxidantes en los parámetros fisicoquímicos del aceite crudo de pescado. 94
4.6. Eficiencia de los antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite crudo de pescado. 97
4.7. Determinación de la vida útil. 101
4.8. Determinación de la energía de activación. 110
VI. CONCLUSIONES:.....113
VII. RECOMENDACIONES: 114
VIII. BIBLIOGRAFÍA: 115
IX. ANEXOS: 122

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA N° 1: Relación de los principales ácidos grasos poliinsaturados presentes en los aceites de pescado son los siguientes: 8
TABLA N° 2: Concentración máxima permitida para antioxidantes sintéticos. 38
TABLA N° 3: Diseño de bloque completamente al azar con arreglo factorial de 7x3 con 3 repeticiones 66
TABLA N° 4: ANVA para el diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 7x3 con 3 repeticiones. 68
TABLA N° 5: Calidad inicial del aceite crudo de pescado. 70
TABLA N° 6: Resultados la medición de color por medio de la escala Gardner. .. 72
TABLA N° 7: Resultados de los valores de colorimetría CIELAB para el aceite crudo de pescado 73
TABLA N° 8: Perfil porcentual de los ácidos grasos presente en el aceite crudo de pescado. 74
TABLA N° 9: Tiempo de inducción del aceite crudo de pescado sin adición y con adición de antioxidantes. 79
TABLA N° 10: ANOVA del tiempo de inducción a 80°C a los distintos tratamientos de antioxidantes. 85
TABLA N° 11: La prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey al 95%. 87
TABLA N° 12: ANOVA del tiempo de inducción a 100°C a los distintos tratamientos de antioxidantes. 87
TABLA N° 13: La prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey al 95%. 89
TABLA N° 14: ANOVA del tiempo de inducción a 120°C a los distintos tratamientos de antioxidantes. 89
TABLA N° 15: La prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey al 95%. 91

TABLA N° 16: Análisis de Varianza (ANOVA) 91
TABLA N° 17: Parámetros Fisicoquímicos de los tratamientos. 95
TABLA N° 18: Eficacia de los antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite crudo de pescado..... 97
TABLA N° 19: Valores de la extrapolación a 25°C. 101
TABLA N° 20: Energía de activación para los diferentes tratamientos 110
TABLA N° 21: Índices de Estabilidad Oxidativa del aceite de Aceite Crudo de Pescado. 131

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA N° 1: Anchoveta peruana *(Engraulis ringens).* 4
FIGURA N° 2: Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA). 9
FIGURA N° 3: Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA). 10
FIGURA N° 4: Mecanismo de acción de los antioxidantes. 13
FIGURA N° 5: Estructura química del TBHQ, BHT y BHA. 24
FIGURA N° 6: Estructura química de los tocoferoles, donde R1, R2 y R3 son H O CH3. 31
FIGURA N° 7: Mecanismo por transferencia de un hidrógeno 33
FIGURA N° 8: Mecanismo por transferencia simple de un electrón. 34
FIGURA N° 9: Determinación de los hidroperóxidos lipídicos. 41
FIGURA N° 10: Reacción de los compuestos aldehídos 43
FIGURA N° 11: Estados de la oxidación lipídico. 45
FIGURA N° 12: Tiempo de Inducción determinado por el Rancimat 47
FIGURA N° 13: Condiciones analíticas de Rancimat. 48
FIGURA N° 14: Muestra de aceite crudo de Pescado. 49
FIGURA N° 15: Diagrama de flujo de la adición de los antioxidantes en estudio. 60
FIGURA N° 16: Diagrama de flujo para análisis en el Rancimat del aceite crudo de pescado. 61
FIGURA N° 17: Diagrama de flujo del diseño experimental de la investigación. .. 63
FIGURA N° 18: Colorímetro de la escala Gardner. 73
FIGURA N° 19: Grafico de medias y 95% de Tukey HSD en Statgraphics Centurión XVI.I 86
FIGURA N° 20: Grafico de medias y 95% de Tukey HSD en Statgraphics Centurion XVI.I. 88
FIGURA N° 21: Grafico de medias y 95% de Tukey HSD en Statgraphics Centurion XVI.I. 90
FIGURA N° 22: Tiempos de inducción del aceite crudo de pescado en el Rancimat a 80°C, 100°C y 120°C. 99

FIGURA N° 23: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T0. 103
FIGURA N° 24: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T1. 104
FIGURA N° 25: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T2. 105
FIGURA N° 26: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T3. 106
FIGURA N° 27: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T4. 107
FIGURA N° 28: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T5. 108
FIGURA N° 29: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T6. 109

ÍNDICE DE ANEXOS.

ANEXO N° 1 122
ANEXO N° 2 131
ANEXO N° 3 139
ANEXO N° 4 148
ANEXO N° 5 157

I. INTRODUCCIÓN.

Actualmente, el Perú es el segundo productor mundial de aceite de pescado, superado solo por Chile. No obstante, es el primer exportador de este ingrediente marino, **según el último Anuario Estadístico de IFFO, publicado en 2015**. La industria oleo-química se ha preocupado de proveernos de una gran variedad de grasas y aceites para nuestros requerimientos alimentarios y nutricionales. No es difícil encontrar en los anaqueles de los centros de abastecimiento diferentes aceites, margarinas, mantecas, mayonesas, salsas, entre otros, a precios muy convenientes.

El aceite crudo de pescado (ACP) es un producto industrial de alto valor nutricional por su contenido de ácidos grasos omega-3 de cadena larga del tipoeicosapentaenoico (EPA, C20:5), docosapentaenoico (DPA, C22:5) y docosahexaenoico (DHA, C22:6). Estos ácidos grasos, particularmente el EPA y el DHA, son hoy día altamente valorados por sus propiedades profilácticas y terapéuticas, en diversas situaciones nutricionales y enfermedades, lo que ha sido ampliamente demostrado por la literatura científica y médica **(Uauy et al., 2000; Sanhueza et al., 2004; Lee et al., 2008).** Según el modelo de la norma ISO 9001- 2015, la calidad es el conjunto de características de un producto o servicio que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades del cliente.

Sin embargo, son altamente susceptibles a la oxidación. Estos ácidos son fácilmente destruidos durante la rancidez en los alimentos (por la peroxidación, resultando en productos tóxicos como peróxidos y aldehídos) a menos que sean protegidos por el uso de antioxidantes efectivos.

La rancidez oxidativa es sin duda la principal causa del deterioro de aceites y grasas y define la vida de almacenamiento de este tipo de productos. Para ello se ha desarrollado pruebas de oxidación acelerada, siendo el método del

Rancimat el más utilizado, adicionando antioxidantes sintéticos y naturales para determinar la vida útil del aceite crudo de pescado.

Por lo tanto, la estabilidad (resistencia a la oxidación) viene a ser uno de los factores que más preocupan a los productores, así como también es uno de los principales criterios de calidad en aceites y grasas. Innumerables factores determinan la estabilidad de aceites y grasas, destacando la composición química y las condiciones de procesamiento. **(Barrera D., 1998)**

De acuerdo a lo expuesto, los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar el tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado usando antioxidantes sintéticos y naturales mediante uso del Rancimat.
- Evaluar las características físico-químicas iniciales y finales del aceite crudo de pescado: densidad, índice de refracción, índice de yodo, % acidez titulable, %humedad e impurezas, composición de ácidos grasos, índice de anisidina, peróxidos, valor Totox.
- Determinar el tiempo de inducción del aceite crudo de pescado industrial con flujo de aire de 15L/h, a temperaturas 80, 100 y 120°C.
- Determinar las características organolépticas como el color mediante los métodos: Escala Gardner y el CILAB.
- Determinar la energía de activación (Ea) de la reacción de oxidación de aceite crudo de pescado.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Definición de aceite crudo de pescado.

Es líquido a temperatura ambiente, de origen marino, (jurel, caballa, anchoveta, etc.) de color amarillo anaranjado, que se ha obtenido por el prensado del pescado y seguidas centrifugaciones para separar los diferentes componentes. **(Roldán A., 2016).**

La estructura química e un aceite o grasa es la siguiente:

ESTER = ALCOHOL + ACIDO

ACEITE/GRASA = PROPANOTRIOL + ACIDO GRASO

La ecuación desarrollada de esterilización es la siguiente:

$$\begin{array}{lllll} CH_2OH & & HOOC.R_1 & & CH_2.OOC.R_1 \\ CHOH & + & HOOC.R_2 & \longrightarrow & CH.OOC.R_2 + 3H2O \\ CH_2OH & & HOOC.R_3 & & CH_2.OOC.R_3 \end{array}$$

Glicerina ácidos grasos Aceite o grasa

Donde R1, R2, R3 son los radicales de ácidos grasos.

La diferencia entre un aceite y una grasa está definida por la composición cualitativa y cuantitativa de sus ácidos grasos, en especial, por la proporción de sus componentes.

2.2. Fuentes de los aceites y grasas.

Son de origen animal o vegetal. Se encuentran formando parte de la composición de los animales y de las plantas: (Roldán A., 2016).

a) Aceites Vegetales:

- Semillas oleaginosas como: el algodón, soja, maíz, maní, etc.
- Frutos oleaginosos, de mayor importancia: palma, olivo, coco.
- Grasas de animales terrestres:

b) Cerdos y vacas

- Otros animales domésticos

c) Aceites de especies marinas:

- Anchoveta, sardina, jurel, caballa y machete
- Hígado de pescado (bacalao)
- Mamíferos marinos.

La figura N°1 muestra el tipo de pescado Anchoveta que se utilizó en el trabajo de investigación:

FIGURA N° 1: Anchoveta peruana *(Engraulis ringens).*

Fuente: Instituto del Mar del Perú (Imarpe), 2013.

2.3. Características generales del aceite de pescado.

Tiene una composición química compleja que depende de diversos factores, como la estructura de ácidos grasos, los cuales varían considerablemente en función de la especie de pescado y, en cierta medida, de la composición del plancton con que éste se alimentó y de la época del año. Todo ello influye en las propiedades del aceite tanto para sus aplicaciones comestibles como en las técnicas para elaborarlo. **(Roldán A., 2016)**

Los aceites de pescado se prestan a una fácil oxidación y se puede alterar hasta rancidez durante la extracción y el almacenamiento; esta oxidación se acelera por el calor, la luz y la presencia de catalizadores y puede ser contrarrestada administrando antioxidantes, o almacenándolos en lugares oscuros.

Debido a sus propiedades nutritivas, entre ellas su gran valor energético, los aceites resultan elementos indispensables en el régimen de alimentación de hombres y animales, además de que contienen vitaminas solubles A, D y E.

Los aceites de pescado tienen multitud de aplicaciones; se utilizan principalmente en la industria de la margarina, grasas de pastelería y aceites comestibles, y para esto se decoloran; además, gracias a la diversidad de sus propiedades resultan útiles para otros procesos, en particular para elaborar barnices y aceites secantes. Actualmente se emplean sus ácidos grasos de tipo Omega en farmacia y medicina y con fines de investigación científica. **(Roldán A., 2016)**

2.3.1. Importancia

Los ácidos grasos Omega-3 y omega-6 son conocidos como ácidos grasos esenciales debido a que son importantes para la buena salud, pero el cuerpo no puede producirlos por sí solo, de tal manera que los debe obtener de los alimentos, tales como pescado de agua fría, incluyendo el atún, el salmón y la caballa. También se encuentran en los vegetales de hoja verde, aceite de semillas de linaza y ciertos aceites vegetales.

Se ha demostrado experimentalmente que el consumo de grandes cantidades de omega-3 aumenta considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre, lo cual explica por qué en comunidades que consumen muchos alimentos con omega-3 (esquimales, japoneses, etc.) la incidencia de enfermedades cardiovasculares es sumamente baja. Algunas experiencias sugieren también que el consumo de omega-3 tiene efectos benéficos sobre el cerebro. El omega-3 es un objetivo añadido a ciertos alimentos funcionales que son enriquecidos artificialmente con omega-3 como puede ser la leche, la leche de soya, los huevos, etc. **(Roldán A., 2016)**

2.4. Ácidos grasos de tipo omega (ω)

2.4.1. Nomenclatura.

La nomenclatura de los ácidos grasos se realiza considerando la numeración que se les da a los átomos de carbono, desde el carbono del grupo carboxilo terminal según la siguiente estructura:

3 2 1

CH3 – (CH2) n – CH2 – CH2 - COOH

ω β α

Los átomos de carbono 2 y 3 frecuentemente son referidos como alfa y beta, respectivamente. El átomo de carbón metílico al final de la cadena carbonada es llamado carbono omega. La posición de un doble enlace es representada por el símbolo. Seguido de un superíndice numerario. Por ejemplo, cis - 9, lo que significa que hay un doble enlace cis entre los carbones 9 y 10. **(Roldán A., 2016)**

Alternativamente, la posición de un doble enlace puede ser denotado contando desde el carbono terminal considerando al carbono omega con el número uno. Un ácido graso Omega-3, por ejemplo tiene la siguiente estructura:

1 2 3

CH3 – CH2 – CH = CH – CH2 – R - COOH

ω

2.5. Ácidos grasos poliinsaturados en aceites de pescado

TABLA N° 1: Relación de los principales ácidos grasos poliinsaturados presentes en los aceites de pescado son los siguientes:

NOMBRE COMÚN	NOMBRE QUÍMICO	FORMULA GLOBAL	OMEGA
Oleico	9-octodecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$	ω
Linoleico	9,12-octodecadienoico	$C_{18}H_{34}O_2$	ω
Linolenico	9,12,15-octadecatrienoico	$C_{18}H_{34}O_2$	ω
EPA	5,8,11,14,17-eicosapentanico	$C_{20}H_{30}O_2$	ω
Araquidónico	5,8,11,14- eicosatetraenoico	$C_{20}H_{32}O_2$	ω
DHA	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	$C_{22}H_{32}O_2$	ω
Clupanodónico	4,8,12,15,19-docosapentaenoico	$C_{22}H_{34}O_2$	ω

Fuente: FDA, 2006

2.5.1. La Familia de omega-3

Forman parte de la estructura de las neuronas, cerebro, retina y nervios periféricos.

Son suplementarios durante la etapa fetal por la madre a través de la placenta y al nacer por la leche materna.

Ayudan a un buen desarrollo y crecimiento del tejido cerebral, a combatir el cáncer, desarrollo de la vista y funciones del tejido

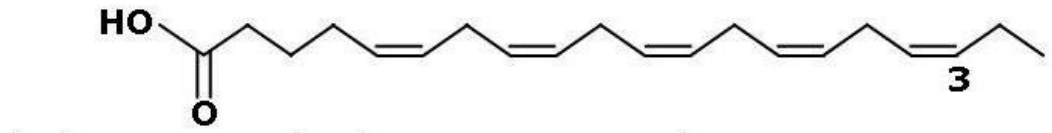
celular, ayudan a regular la presión sanguínea, la viscosidad de la sangre, enfermedades cardiovasculares, trombosis, inflamaciones y artritis. **(Roldán A., 2016)**

2.5.1.1. Ácido Eicosapentaenico (EPA)

Es miembro de la familia de ácidos grasos omega-3 y se origina de la prostaglandina, la cual controla la circulación de la sangre al igual que otras funciones arteriales.

Por otro lado ayuda a reducir el colesterol de baja densidad y ayuda a elevar los niveles de colesterol de alta densidad. Por otro lado, la prostaglandina es directamente responsable de la producción de plaquetas en la sangre, las cuales actúan como “parches” reforzando las arterias y venas que permiten una buena circulación de la sangre, particularmente en los pequeños capilares del corazón, combate la trombosis y enfermedades del sistema circulatorio. **(Roldán A., 2016)**

La figura n°2 muestra la formula estructural del EPA:



Ácido eicosapentanóico (EPA, C20:5, omega-3)

FIGURA N° 2: Fórmula estructural del ácido eicosapentaenóico (EPA).

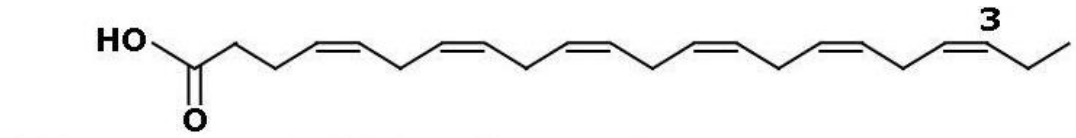
Fuente: Valenzuela, 2001.

2.5.1.2. Ácido Docosahexaenoico (DHA)

La importancia de este ácido graso radica en que es componente de los tejidos cerebrales del hombre y de la retina de los ojos, además ayuda en la transmisión de impulsos nerviosos al sistema nervioso central.

Las investigaciones realizadas sobre el uso de ácidos grasos de tipo omega en la alimentación humana, indican que el consumo de algún ácido graso omega en especial no es suficiente para mostrar efectos positivos a la salud, al parecer ello se lograría por la proporción o relación que presentan los contenidos de ácidos grasos omega-6 respecto a los omega-3, en los alimentos.

La figura n°3 muestra la fórmula estructural del DHA:



Ácido docosahexanóico (DHA, C22:6, omega-3)

FIGURA N° 3: Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA).

Fuente: Valenzuela, 2001.

2.5.2. La Familia de omega-6

Esencial para el recubriendo de las células del organismo y participa en actividades hormonales e inmunológicas.

Son indispensables para mantener la piel en estado saludable, ayudándola a mantenerse suave y flexible además de protegerla de infecciones, regulando su temperatura y pérdida de agua. **(Roldán A., 2016)**

2.6. Reacción de Auto-oxidación

La producción en exceso de especies de radicales de oxígeno, particularmente radicales hidroxilo, pueden afectar a las membranas de las células lipídicas para producir peróxidos y especies de oxígeno reactivo, las cuales están relacionadas a una variedad de enfermedades **(Maniak y Targonski 1996).**

La autooxidación, es la reacción directa del oxígeno molecular con compuestos orgánicos bajo determinadas condiciones. En el mecanismo de oxidación de los lípidos se pueden diferenciar tres etapas:

Iniciación: El oxígeno existe en dos estados, el estado más estable es el triplete ($^3O_2$), el cual tiene dos electrones sin aparear con el mismo sentido de espín; y el oxígeno singulete ($^1O_2$), que es un estado excitado y más reactivo, con los electrones sin aparear con sentidos opuestos de espín.

Las moléculas de oxígeno en estado singulete oxidan directamente al grupo –CH del ácido graso insaturado (RH) a la vez que desplazan el

doble enlace y forman un radical alquilo (R*). La velocidad de reacción de iniciación es lenta. El oxígeno en estado fundamental (triplete), no puede llevar a cabo esta reacción, sin embargo, por efecto de la radiación (luz), se puede transformar en singulete.

$$^1O_2 + RH \longrightarrow R^* \qquad \textit{(Ec. 1)}$$

Propagación: Los radicales alquilo (R*) formados en el paso de la iniciación son reactivos con el oxígeno disponible, formando radicales peroxi (ROO*) a una velocidad alta (Ec. 2). El radical peroxi desaparece a una velocidad lenta formando un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical libre puede propagar la reacción en cadena (Ec.3).

$$R^* + O_2 \longrightarrow ROO^* \qquad \textit{(Ec. 2)}$$

$$ROO^* + RH \longrightarrow ROOH + R^* \qquad \textit{(Ec. 3)}$$

Los hidroperóxidos (ROOH) también pueden descomponerse para producir alcoholes, aldehídos, ácidos, cetonas, y otras sustancias menos reactivas.

Terminación: Cuando los ácidos grasos poliinsaturados (RH) son consumidos, los radicales tienden a dimerizarse y la reacción en cadena termina. La terminación completa un ciclo de autoxidación lipídica.

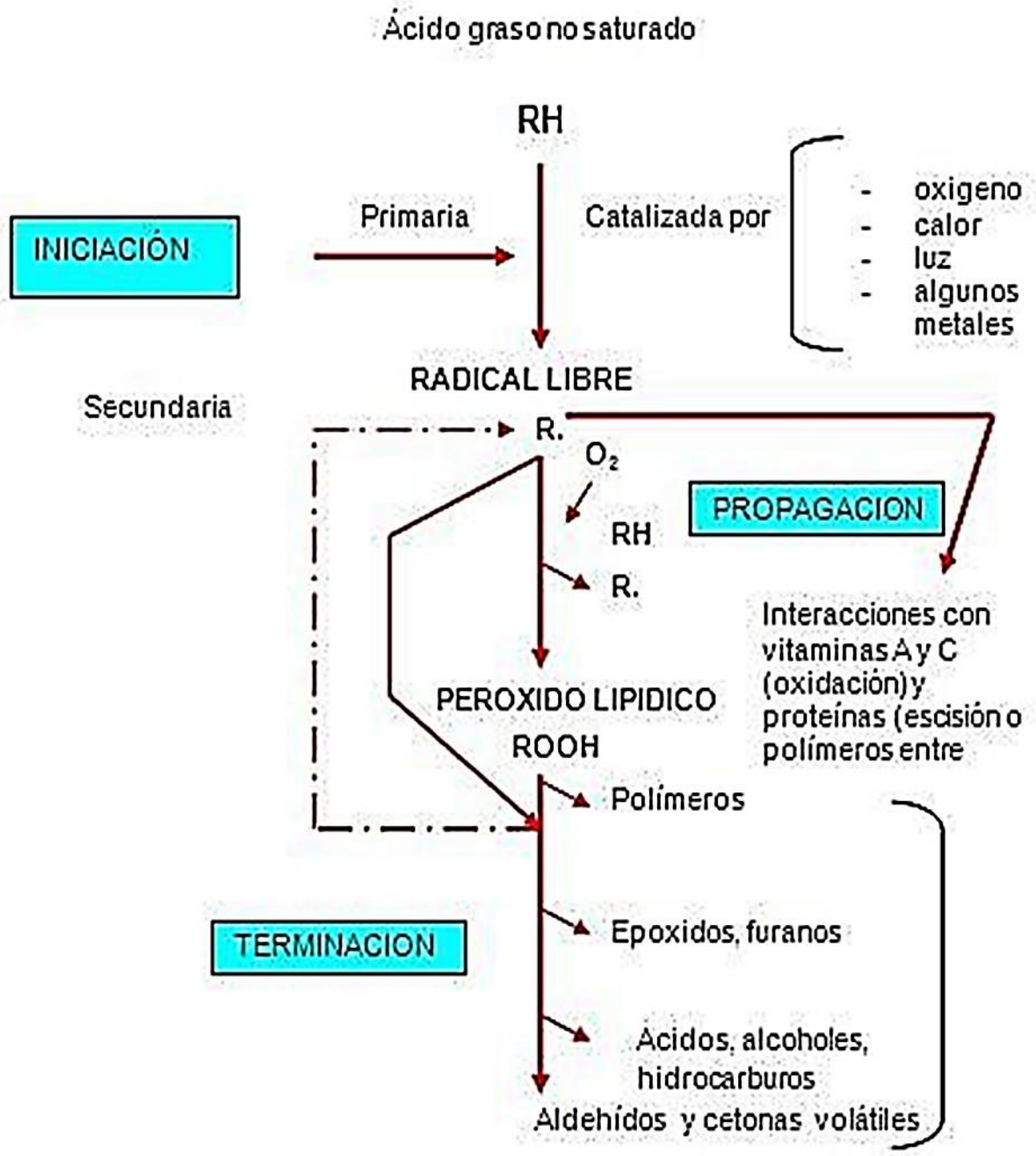


FIGURA N° 4: Mecanismo de oxidación de los lípidos.

Fuente: Shahidi y Wanasundara, 2002.

2.7. Antioxidantes

Un antioxidante primario es un compuesto fenólico, una fenilamina o cualquier sustancia que contenga al menos un grupo hidroxilo, tiol o amino, unido a un anillo bencénico. El papel de un antioxidante es interrumpir la segunda etapa de la cadena de propagación de oxidación de lípidos mediante la reacción con un peróxido (ROO-), cualquier radical libre(R-) o especie oxidante por transferencia de un átomo de hidrogeno o por transferencia de un electrón **(Rojano et al. 2008).** Un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de una molécula inestable de un radical libre sin perder su propia estabilidad electroquímica. **(Roldán A., 2016)**

Existen antioxidantes de tipo sintético utilizados para preservar los alimentos de consumo humano y animal, como el Butilhidroxianisol (BHA), el Butilhidroxitolueno (BHT), el propilgalato (PG), el ButilHidroxiquinona terciaria (BHQT) y los Tocoferoles sintéticos, entre otros. **(Moure et al. 2001)**

De igual forma, existen antioxidantes naturales como las vitaminas C, E y A y los carotenoides, y otros de naturaleza fenólica como las isoflavonas, ácidos fenólicos, polifenoles, catequinas, esteres fenólicos, el ácido carnosico, el ácido rosmarico, bioflavoides, chalconas, quercetina y camferol, entre otros(Avello y Uwalsky 2006). La selección de un antioxidante debe estar basada en el tipo de grasa o aceite que se esté usando y en factores de la producción como el costo, eficacia, condiciones de procesamiento, disponibilidad, conveniencia, estabilidad, seguridad, tipo de animal a ser alimentado y las preferencias de consumidor. **(Herrera y Zambrano 2005)**

Uno de los métodos más efectivos de controlar la oxidación y estabilizar el aceite de pescado, facilitando al mismo tiempo su comercialización, es

mediante el empleo de antioxidantes, siendo los más utilizados para este fin los antioxidantes del tipo fenólico; entre los sintéticos sobresalen: BHT, BHA, TBHQ como los más efectivos o también mezclas de éstos en formas comerciales muy utilizadas.

Recientemente se está observando una tendencia cada vez más creciente por el uso de sustancias naturales. El antioxidante natural más ampliamente utilizado es el alfatocoferol.

Asimismo hay estudios sobre la interacción sinergista efectiva del alfatocoferol con los fosfolípidos, utilizándose para este fin la lecitina por ser la más disponible comercialmente.

Desde el punto de vista práctico, los antioxidante tienen que poseer las siguiente propiedades: ser inocuos, muy activos a concentraciones bajas (0,01 – 0,02%) y liposolubles, para acumularse en la fase lipídica de un alimento, además deberán ser estables durante todos los procesos ordinarios de la tecnología alimentaria **(Belitz y Grosch, 1997).**

Los antioxidantes retrasan el desarrollo de compuestos tóxicos y de sabores indeseables en los alimentos, mantienen su calidad nutritiva y aumentan la vida útil de los mismos prolongando el periodo de inducción de la materia grasa. Los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos maneras: como limpiadores de radicales libres que actúan durante el periodo de inducción (antioxidante primario), o por un mecanismo que no implica la eliminación directa de los radicales libres, en este caso se habla de antioxidantes segundarios; estos funcionan por una variedad de mecanismos; complejando iones metálicos, como limpiadores de oxigeno singulete y expresan su actividad antioxidante cuando estos compuestos están presentes **(Gordon, 2001).**

2.7.1. Importancia de los Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo a concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes han sido utilizados para prevenir el deterioro de la calidad de los productos y mantener su valor nutrimental. También son de importancia en la salud ya que ayudan al cuerpo a protegerse contra el daño causado por las especies de oxígeno reactivo y las enfermedades degenerativas.

Son conocidos por actuar a diferentes niveles en la secuencia oxidativa de las moléculas lipídicas. Pueden disminuir la concentración de oxígeno (interceptando al oxígeno singulete), previniendo la reacción de iniciación por un radical hidroxilo; secuestrar metales; y degradar los productos de oxidación primarios a compuestos estables. El grado de oxidación depende de la estructura química de los ácidos grasos involucrados y otros factores que favorecen a la reacción de oxidación **(Shahidi y Wanasundara, 2002).**

2.7.2. Mecanismo de Acción de los Antioxidantes

Un método para controlar la velocidad de oxidación de los lípidos es mediante la adición de antioxidantes (AOH), los cuales interfieren con el proceso de oxidación por diferentes mecanismos.

Estos involucran la inactivación de los pro-oxidantes en el medio, tales como los carotenoides que neutralizan el oxígeno singulete o los agentes quelantes que inactivan a los catalizadores metálicos. Estas reacciones conducen a un retraso en el inicio de la oxidación y la extensión del periodo de inducción.

Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón a los radicales formados en los ácidos grasos insaturados (Figura 1), formando productos más estables. **(Shahidi y Wanasundara, 2002)**

2.7.3. Clases de antioxidantes

Hay numerosas sustancias con propiedades antioxidantes:

- Los compuestos de formación “in situ”, es decir durante la transformación de la materia prima en un alimento, como los productos de las reacciones de Maillard que se generan por reacción de los azucares y las proteínas, los péptidos y las fermentaciones. **(Herrera y Zambrano 2005).**
- Las enzimas: glucosa oxidasa, catalasa, superoxido dismutasa.
- Los constituyentes de los alimentos: aminoácidos, fosfolípidos, carotenos, proteínas.
- Las sustancias químicas definidas: tocoferoles, ácido ascórbico y sus derivados, hidroxibutilanisol (BHA), hidroxibutiltolueno (BHT).
- Los extractos de plantas: hierbas y especias, té, romero y salvia.

Los primeros antioxidantes utilizados fueron de origen natural, pero al transcurrir los años, estos fueron reemplazados por sustancias sintéticas, más baratas, de pureza controlada y poseedoras de una capacidad antioxidante más uniforme. **(Balentine DA, 1997).**

En los últimos años, el aumento del uso de aditivos sintéticos puso en tela de juicio su utilización por parte de los consumidores.

La industria alimentaria ha tratado de cubrir los deseos planteados y en consecuencia el uso de aditivos naturales ha aumentado.

La tendencia de hoy en día sitúa a los antioxidantes de origen natural en un lugar privilegiado.

Hasta el momentos la aplicación de aditivos de origen natural no ha podido extenderse a todo tipo de alimentos, es por esto que se mantiene en algunos productos aquellos de origen sintético los cuales hasta ahora no ha podido demostrarse su cuestionada toxicidad en humanos.

En el área de alimentos el mercado ofrece una variedad de antioxidantes sintéticos y naturales con distinta eficiencias. El uso de antioxidantes, no solo permite mantener la calidad normal del producto, sino también extender su vida útil. Se han utilizado muchas sustancias con este fin tanto sintéticas (BHT, BHA, TBHQ, galatos etc.), como naturales (vitamina C, vitamina E, extracto de romero, etc.).

Los antioxidantes han sido clasificados dentro de 6 tipos: antioxidantes primarios, atrapadores de oxígeno, sinergistas (antioxidantes secundarios), antioxidantes enzimáticos (biológicos), agentes quelantes, secuestrantes y los misceláneos. **(Frankel, 1998).**

2.7.3.1. Antioxidantes primarios.

Son compuestos que neutralizan a los radicales libres. Los principales antioxidantes de este grupo son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y el ter- butilhidroxiquinona (TBHQ) (Frankel, 1998). Algunos antioxidantes primarios cuando se mezclan entre si pueden tener una actividad sinergística mayor a la suma de sus efectos individuales También podrían incluirse dentro de este grupo a los tocoferoles y compuestos de fuente vegetal y animal, que pueden ser clasificados como antioxidantes primarios y/o sinergistas **(Frankel, 1998).**

2.7.3.2. Atrapadores de oxígeno.

Son compuestos que remueven el oxígeno de los sistemas cerrados. El ácido ascórbico y sus derivados son los mejores ejemplos de este grupo, los cuales actúan como sinergistas en la regeneración de los antioxidantes primarios **(Frankel, 1998).**

2.7.3.3. Antioxidantes enzimáticos.

Incluyen varias enzimas como a la glucosa oxidasa, el superóxido dismutasa, la catalasa y la glutation peroxidasa. Estos remueven el oxígeno de los compuestos altamente reactivos.

Agentes quelantes . Son compuestos secuestrantes de iones de complejos metálicos (cobre y hierro) que catalizan la oxidación lipídica. El ácido etilendiamintetracético (EDTA), el ácido cítrico, los compuestos fenólicos de las plantas y los aminoácidos son quizás los mejores compuestos de esta clasificación. También estos compuestos son clasificados frecuentemente como sinergistas **(Frankel, 1998).**

2.7.3.4. Antioxidantes misceláneos.

Se incluyen a materiales de plantas y animales que han sido estudiados como antioxidantes en aceites de origen vegetal como de la semilla de la soya, palma, arroz, olivo, algodón, cacahuate y germen de trigo. Varios hidrolizados de proteínas y aminoácidos son potentes antioxidantes. Algunos flavonoides y derivados del ácido cinámico, ácido cafeico y el ácido clorogénico han mostrado una fuerte actividad antioxidante **(Frankel, 1998).**

2.7.3.5. Antioxidantes Sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son definidos por la Administración de Alimentos y Medicinas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) como conservadores alimenticios que retardan específicamente el deterioro, rancidez, o decoloración, debidos a la oxidación lipídica.

Los más populares son los que se derivan de las estructuras fenólicas o los que tengan un grupo fenólico dentro de la configuración de su estructura molecular. Entre los fenólicos más frecuentemente usados como antioxidantes son los derivados de las estructuras, 2,6-di-ter-butil-4-metilfenol (BHT), el ter-butil-4- hidroxianiasol (BHA), ter-butil-hidroxiquinona (TBHQ).

La estabilidad térmica de los antioxidantes sintéticos es baja, sobre todo porque estos productos fueron diseñados para proteger a las grasas y aceites en el ambiente o temperaturas relativamente bajas. Sin embargo, el calentamiento que se aplica a los productos representa un estrés térmico que puede afectar seriamente la eficacia de los antioxidantes sintéticos tales como BHA, BHT, BHQ, EQ; cuando se añaden antes y / o durante la cocción o procesamiento **(Méndez et al., 1996).**

2.7.3.5.1. Ter- butilhidroquinona (TBHQ)

Este compuesto se considera como el mejor antioxidante para la protección de los aceites de freído contra la oxidación. El TBHQ es

liposoluble y no forma complejos con el hierro o el cobre. Este antioxidante está disponible como un polvo amarillento que es utilizado solo o en combinación con BHA o BHT a una cantidad máxima de 0.02%. Se ha reportado que este antioxidante es un buen estabilizador de aceites crudos **(Shahidi y Wanasundara, 2002).**

TBHQ, también llamada butil hidroquinona terciaria o conocido como antioxidante E-319, es un compuesto aromático, un tipo de fenol, derivada de la hidroquinona. Es un polvo de color blanco o marrón rojizo, tiene una fragancia especial y ligera, es apenas soluble en agua (aprox. 5%), se disuelve en etanol, ácido acético, ester etílico, éter, aceite vegetal y manteca de cerdo. Es muy eficaz como antioxidante, en los alimentos se utilizan como conservantes para aceites vegetales y grasas animales insaturadas, no causa decoloración, incluso en presencia de hierro y cobre, y no cambia el sabor o el olor de la materia a la que se añade, si está en presencia de un álcali, el color se cambia a rosa. Se puede combinar con otros conservantes como elbutilhidroxianisol (BHA). Se utiliza industrialmente como un estabilizador para inhibir la autopolimerización de peróxidosorgánicos, en perfumería se utiliza como fijador para reducir la tasa de evaporación y mejorar la estabilidad, se añade también a los barnices, lacas, resinas, en el campo de los aditivos de aceites, agente antienvejecimiento de industrias de cauchos y plásticos, aditivos alimentarios, PVC, síntesis orgánica de medicinas y para la conservación del monómero de poliolefina. **(Thorisson et al, 1992).**

TBHQ es un muy eficaz antioxidante. En los alimentos, se utiliza como conservante para aceites vegetales y muchas grasas comestibles de origen animal. No causa decoloración, incluso en presencia de hierro, y no cambia el sabor o el olor de la materia a

la que se añade. Se puede combinar con otros conservantes como el butilhidroxianisol (BHA). Como aditivo alimentario, su número E es E319. Se combina con una amplia variedad de alimentos, con el límite más alto (1.000 mg / kg) permitidos para el pescado congelado y productos pesqueros. Su ventaja principal es mejorar la vida de almacenamiento. Se utiliza industrialmente como un estabilizador para inhibir autopolimerización de peróxidos orgánicos. En perfumería, se utiliza como fijador para reducir la tasa de evaporación y mejorar la estabilidad. Aunque suele ser catalogado como un "antioxidante", es importante darse cuenta de que es un producto químico sintético con propiedades antioxidantes - NO es un antioxidante natural.

Este producto químico evita la oxidación de las grasas y aceites, extendiendo así la vida útil de los alimentos procesados. Es un ingrediente común en alimentos procesados de todo tipo, pero también se puede encontrar en barnices, lacas, pesticidas, así como cosméticos y perfumes para reducir la tasa de evaporación y mejorar la estabilidad. **(Thorisson et al, 1992).**

2.7.3.5.2. Butilhidroxianisol (BHA)

Este es un antioxidante fenólico monohídrico que posee una aceptación significativa en la industria de alimentos y químicamente es una mezcla de dos isómeros, 3-tert -butil-4-

hidroxianisol (90%) y 2-tert-butil-4-hidroxianisol (10%). El BHA está comercialmente disponible como hojuelas cerosas verdes y es extremadamente soluble en agua. Este compuesto es particularmente efectivo en el control de la oxidación de ácidos grasos de cadena corta tales como los que se encuentran en los aceites de coco y palma que son usados típicamente en productos de cereales y confitería. **(Shahidi y Wanasundara, 2002)**

2.7.3.5.3. Butilhidroxitolueno (BHT)

Es un antioxidante sintético utilizado ampliamente en la industria de alimentos. Está disponible comercialmente como un compuesto cristalino blanco. Como monofenol, el BHT puede donar un hidrógeno y así unirse a radicales peroxido de los lípidos. Es más efectivo para evitar la oxidación de grasas animales que de aceites vegetales. Debido a su naturaleza volátil, el BHT es un importante aditivo utilizado en el empaque de alimentos, por lo que se aplica como una emulsión **(Shahidi y Wanasundara, 2002).**

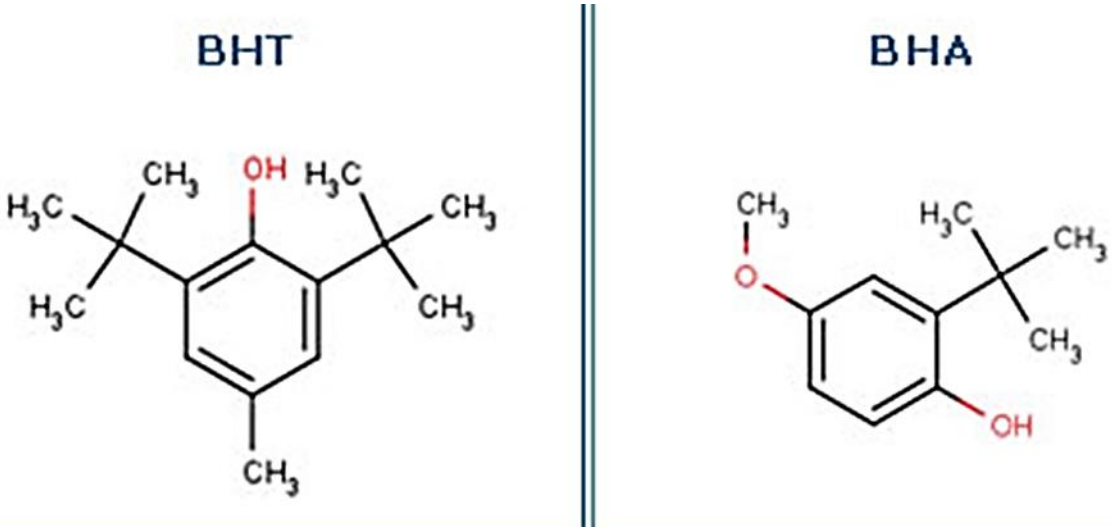


FIGURA N° 5: Estructura química del TBHQ, BHT y BHA.

Fuente: Ferretti G, 2010

2.7.3.6. Uso de Antioxidantes Sintéticos.

En los Estados Unidos de Norteamérica el uso de los antioxidantes está sujeto a regulación por la administración de drogas y alimentos (FDA, siglas en inglés), al igual que en México por la norma oficial NMX-F-252 SCFI-2005.

En general, la concentración total de antioxidantes sintéticos autorizados para ser adicionados solos o en combinación no debe exceder del 0.02% por peso de grasa en el alimento.

Los antioxidantes sintéticos se están restringiendo ya que se ha comprobado por medio de estudios toxicológicos que en animales experimentales causan lesiones estomacales, hemorragias y desarrollo de tumores carcinogénicos **(Frankel, 1998).**

Los antioxidantes sintéticos se han considerado relativamente seguros y se aplican ampliamente en una serie de productos manufacturados incluidos los productos farmacéuticos, cosméticos, alimentos para humanos, y en la alimentación animal **(Valenzuela y Nieto, 1993).**

Desde el punto de vista práctico, los antioxidantes tienen que poseer las siguientes propiedades: a) ser efectivos a bajas concentraciones (0.001-0.02%); b) no mostrar desarrollo de sabor, olor y color cuando son adicionados; c) ser compatibles con el alimento; d) ser de fácil aplicación; e) tener estabilidad bajo las condiciones del proceso y/o el almacenamiento del alimento; f) no tener efectos toxicológicos **(Hui, 2001).**

2.7.4. Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes naturales son sustancias capaces de prevenir o inhibir el proceso de oxidación en el cuerpo humano así como en productos alimenticios. Se encuentran en casi todas las partes de las plantas, ya que las protegen contra lesiones del tejido, oxidándose y combinándose con otros componentes, también pueden servir como

defensa contra herbívoros. Los polifenoles son el grupo más numeroso de componentes antioxidantes y están presentes en las frutas y los vegetales, las semillas leguminosas, los granos, los tés, las hierbas, las especias y los vinos **(Horubala, 1999; Borowska, 2003).**

2.7.4.1. Extracto de Romero

Las plantas tradicionales poseen infinidad de sustancias beneficiosas para nuestro organismo. A lo largo de la historia, han tenido un sinfín de aplicaciones, desde el condimento culinario a la conservación de los alimentos. Su aplicación llega hasta nuestros días, aunque en la actualidad la industria alimentaria demanda de un modo distinto. Es el caso del extracto de romero. **(Bouwens LC., 1997).**

El extracto de romero es ya un aditivo alimentario tras la aprobación de la directiva 2010/67 de la Comisión Europea. El uso de este aditivo por su potencial antioxidante es atractivo para la industria, que demandaba su regulación. **(Bouwens LC., 1997).**

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) analizó y aprobó el uso del extracto de romero como antioxidante. Más allá del uso de las hojas de romero como condimento, otros componentes de esta planta se han demostrado como potentes agentes antioxidantes, como los ácidos fenólicos, los flavonoides y los diterpenoides. **(Wiseman SA., 1997).**

El extracto de romero se consigue gracias a la extracción de hojas de Rosmarinus officinalis L. mediante el uso de un sistema de disolventes autorizado para uso alimentario. A ese proceso le sigue la desodorización y la decoloración de los extractos que, a su vez, pueden ser normalizados.

La directiva especifica los procesos de fabricación del mismo. Se extrae de las hojas secas de la planta mediante una extracción con

disolventes (etanol, acetona, hexano, y CO2 supercrítico), siguiendo por los procesos de filtración, el secado y el tamizado que permite obtener el extracto en un polvo fino o líquido. **(Wiseman SA., 1997).**

El uso en la industria alimentaria alargará la vida útil de los productos gracias a este nuevo aditivo que la Comisión aprueba.

2.7.4.2. Té verde

Cada vez existen más pruebas científicas sobre las diversas propiedades del té verde para la salud. Investigadores norteamericanos y japoneses descubren cada día más beneficios tanto preventivos como curativos del té verde. **(Vinson J. et al., 1995).**

Los tés derivados de la planta Camellia Sinensis: té negro, té Oolong y té verde, entre otros, todos contienen muchas sustancias naturales beneficiosas para el organismo, siendo el té verde al igual que el blanco, que en realidad es una variedad de té verde, los que contienen más cantidad debido a que no han sufrido los efectos de la oxidación. Por ese mínimo proceso los principios activos presentes en el té verde son muy parecidos a los que existen en el brote antes de su separación de la planta.

El té verde está compuesto principalmente por aceites esenciales, cafeína y polifenoles. Los aceites son los responsables del aroma del té y la cafeína es un estimulante. Ahora bien, los responsables de las propiedades antioxidantes y otros efectos curativos son los polifenoles. **(Vinson J. et al., 1995).**

2.7.4.3. Té verde y los polifenoles, flavonoides y catequinas

Los polifenoles son unos compuestos con propiedades antioxidantes que se hallan dentro de muchos alimentos y bebidas como el vino tinto y todos los tipos de té, pero sobre todo en el té verde y sus variantes.

A su vez, los polifenoles contienen flavonoides, que son nutrientes con alto poder antioxidante y que no pertenecen al grupo de las vitaminas y minerales.

Se conocen miles de flavonoides diferentes, pero en el caso del té verde, los más importantes son las llamadas catequinas, que a su vez se desglosan en cuatro tipos:

- Epicatequina (EC)
- Epigalocatequina galata (EGCG)
- Epicatequina galata (ECG)
- Epigalocatequina (EGC)

De todas ellas la más activa a la hora de combatir los temidos radicales libres es la epigalocatequina galata (EGCG).

Por tanto tenemos primeramente los polifenones y dentro de ellos los flavonoides que a su vez contienen la catequina, que es el poderoso antioxidante que contiene el té. **(Balentine D. et al., 1997).**

2.7.4.3.1. El té verde y sus cualidades antioxidantes.

Algunos estudios científicos, como el presentado en Las Vegas en 1997, por el doctor Lester A. Mistscher, demuestran que las catequinas del té verde superan en mucho a otros antioxidantes.

El doctor Lester, en uno de sus experimentos comprobó que las catequinas fueron 100 veces más efectivas que la vitamina C y 25

más que la vitamina E, así como su superioridad frente a los antioxidantes presentes en el vino o la uva.

No obstante, el té verde contiene también vitamina A, vitamina C y vitamina E, que junto a las catequinas ofrecen una alta protección contra los radicales libres. **(Balentine D. et al., 1997).**

2.7.4.4. Tocoferoles

Dentro de la familia de antioxidantes naturales son importantes los tocoferoles, es el grupo de sustancias mayormente estudiada y más ampliamente utilizadas, son sustancias liposolubles que presentan una estructura de una anillocromico con una cola fitica y un grupo hidroxilo en la cabeza. **(Gordon, 2001).**

El anillo crómico tiene grupos químicos sujetos a él los cuales son llamados grupos metilo. El alfa tiene todos sus sitios disponibles llenos, beta y gamma tiene dos grupos metilo en diferente posición y delta tiene solo uno. Los tocoferoles son las principales substancias con propiedades antioxidantes presentes de forma natural en aceites de semillas. Existen en cuatro formas químicas denominadas alfa, beta, gamma y delta tocoferol. **Gordon, 2001).**

Su acción antioxidante tiene una doble vertiente: por un lado ejercen una protección antioxidante in vivo, protegiendo a los lípidos celulares de la oxidación (actividad de vitamina E), y por otro ejercen una acción in vitro, protegiendo a los alimentos del posible enranciamiento oxidativo indeseado.

Los cuatro tipos de tocoferoles presentan distintas grados de actividad in vitro e in vivo. Así, alfa-tocoferol presenta la máxima actividad antioxidante in vivo pero una baja actividad in vitro, mientras que gamma-tocoferol presenta máxima actividad antioxidante in vitro pero escasa actividad de Vitamina E. Beta y delta-tocoferol presentan

propiedades intermedias. Adicionalmente, existen relaciones de sinergia entre distintos tocoferoles así como entre perfiles de tocoferoles y de ácidos grasos, aunque los estudios en este campo son escasos. **(Gordon, 2001).**

Los tocoferoles se encuentran en prácticamente la totalidad de los alimentos, al menos en cantidades de trazas.

Una ventaja importante de los tocoferoles es que son muy estables al calor y ejercen actividades sinergia con la vitamina C, al ácido cítrico y la lecitina en mezclas con determinadas concentraciones. **(Gordon, 2001).**

Los materiales de partida más importantes para la producción de tocoferoles por extracción de productos naturales, son los residuos del proceso de desodorización obtenidos por la destilación de los aceites vegetales.

El α-Tocoferol (denominado también como alfa-tocoferol, e incluso a-tocoferol en caso de problemas con caracteres griegos) es un antioxidante de origen natural de la familia de los tocoferoles. Cuando se refiere a la forma natural es el estereoisómero dextrógiro denominado D-Alfa-tocoferol, mientras que el sintético es el DL-Alfa-Tocoferol. Cuando se emplea en la industria alimentaria se suele codificar como: "E 307". El α-Tocopherol es considerado una forma de vitamina E que se absorbe y se acumula en el cuerpo humano. **(Challem J. et al, 2008).**

El alfa-tocoferol es un antioxidante que posee la propiedad de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y otras estructuras celulares de la peroxidación lipídica. Por ello, es la forma de vitamina E que preferentemente se absorbe y acumula en los seres humanos. La medición de la actividad de "vitamina E" en Unidades Internacionales (UI) se basa en la mejora de fertilidad en la prevención

de abortos espontáneos en ratas embarazadas en relación al alpha-tocoferol. Es muy poco soluble en agua, alcanzando mayores grados de solubilidad en aceites. En forma sintética, como aditivo alimentario, lleva el número E-307.

FIGURA N° 6: Estructura química de los tocoferoles, donde R1, R2 y R3 son H O CH3.

Fuente: Rodríguez, 1997

2.7.5. Mecanismos de los Antioxidantes

Para prevenir o detener las reacciones de oxidación en aceites y grasas vegetales se hace uso de antioxidantes, los cuales pueden actuar por medio de diferentes mecanismos **(Prior L. et al., 2005):**

- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.

- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases, el denominado espacio de cabeza.
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Los que actúan por los dos primeros mecanismos son los antioxidantes propiamente dichos, mientras que los que actúan de la tercera forma se agrupan en la denominación legal de "sinérgicos de antioxidantes", o más propiamente de agentes quelantes. Los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de destruirse ellos mismos. El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva. (Prior L. et al., 2005)

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

2.7.5.1. Mecanismo por transferencia de un hidrógeno (MTP)

Este mecanismo puede ser representado por medio de la siguiente reacción **(Prior L. et al., 2005):**

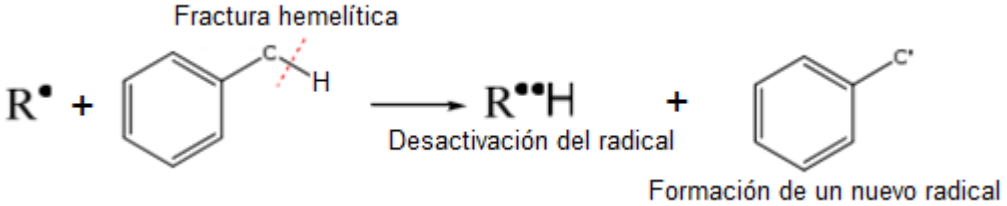


FIGURA N° 7: Mecanismo por transferencia de un hidrógeno.

Fuente: Prior L. et al., 2005.

La presencia de un radical libre altamente reactivo induce la ruptura hemolítica de un enlace en la molécula del antioxidante. Por lo general esta fractura se produce en una unión oxigeno – hidrógeno, como resultado ocurre la transferencia de un H* hacia el radical y la formación de un nuevo radical libre menos reactivo. Este mecanismo se ve en presencia de moléculas aromáticas y de otras moléculas que posean un elevado grado de conjugación, ya que los dobles enlaces alternos permiten la deslocalización del electrón no compartido y, como resultado el radical formado es más estable. En este caso, las medidas de capacidad antioxidante se basan en cinéticas competitivas, en las cuales se mide la rapidez con la cual diversas moléculas reaccionan con el radical libre. **(Prior L. et al., 2005)**

2.7.5.2. Mecanismo por transferencia simple de un electrón (MTE)

El mecanismo se fundamenta en la capacidad del antioxidante para ceder un electrón y con ello reducir sustancias tales como radicales libres, carbonilos, iones metálicos, etc. Una secuencia de reacciones característica de este tipo de mecanismo es la siguiente **(Prior L. et al., 2005):**

$$\mathbf{R}^{\bullet} + \mathrm{AOH} \rightarrow \mathbf{R}^{-} + \mathrm{AOH}^{\bullet+}$$

$$\mathrm{AOH}^{\bullet+} + \mathrm{H_2O} \leftrightarrows \mathrm{AO}^{\bullet} + \mathrm{H_3O}^{+}$$

$$\mathbf{R}^{-} + \mathrm{H_3O}^{+} \rightarrow \mathbf{RH} + \mathrm{H_2O}$$

FIGURA N° 8: Mecanismo por transferencia simple de un electrón.

Fuente: Prior L. et al., 2005

En este caso, el antioxidante cede un electrón al radical libre, por lo que el potencial de ionización de la molécula es muy importante para establecer la factibilidad de que el proceso ocurra. Como resultado se neutraliza al radical y se forma una especie altamente inestable (AOH*+) que cede un protón a la molécula de agua para producir un radical libre, que se estabilizará por los efectos inductivos o resonantes asociados a su estructura molecular. La medición de la capacidad antioxidante se basa por lo tanto, en el poder reductor que exhiba el compuesto. **(Prior L. et al., 2005).**

La oxidación de los aceites de pescado se puede retardar de diversas maneras; uno de los métodos más comunes de controlar la oxidación es mediante el uso de diferentes antioxidantes, los cuales pertenecen a varias categorías fundamentales: secuestradores de oxígeno (ácido ascórbico y ascorbil palmitato), queladores de metales (ácido cítrico, EDTA, aminoácidos), y donadores de protones. A este último grupo pertenece el etoxiquin (ETQ) y los antioxidantes fenólicos: tocoferoles naturales y sintéticos, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT). Galato de propilo y terbutilhidroxiquinona (TBHQ). Estos compuestos tienen una estructura química común consistente en un anillo aromático insaturado y grupos hidroxilo que funcionan como donadores de hidrógeno. La presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático del fenol es necesaria para que estos compuestos tengan actividad antioxidante. Los donadores de hidrógeno (antioxidantes primarios) actúan en los pasos de iniciación y propagación de la

oxidación, modificando la actividad de los radicales ácidos grasos o hidróperóxidos, según el mecanismo siguiente:

AH + ROO A ' + ROOH

AH +. R- A' + RH

AH + RO' A' + ROH

El radical A' que se forma es relativamente estable y no reacciona con los lípidos, sufre una reacción de paro, que conduce a la formación de productos no radicales:

A* + A* Productos no radicales

A* + X* Productos no radicales

Estas sustancias antioxidantes disminuyen el número de radicales libres y por lo tanto bajan la velocidad de oxidación y prolongan el período de inducción de la oxidación ***(Cheftel, 1976)***; se consumen en la reacción y por lo tanto, la estabilidad del lípido siempre va a depender de la cantidad residual del aditivo que contenga.

2.7.6. Antioxidantes permitidos

- Ácido Ascórbico y Eritórbico
- Ascorbato de Sodio y Calcio
- Eritorbato de sodio
- Galatos de propilo, octilo y dodecilo
- Butilhidroxianisol (BHA)
- Butilhidroxitolueno (BHT)
- Terbutilhidroxiquinona (TBHQ).
- Palmitato y Estearato de Ascorbilo

- Tocoferoles naturales y sintéticos
- Dioxido de azufre, hidrosulfito de sodio
- Lecitina.

(*) Aditivos autorizados como antioxidantes según Capitulo XVIII del código Alimentario pertenecientes a la lista positiva del mismo. Según el alimento destino variarán las dosis permitidas y el uso del aditivo en cuestión.

2.7.7. Importancia de la incorporación del antioxidante

Los antioxidantes cumplen un papel muy importante en la dieta ya que nos protegen del daño oxidativo: vivimos con alta exposición a varios factores ambientales, como el sol, la polución o el humo del cigarrillo cuyos componentes nocivos van dañando nuestro organismo, a través de la acción de los radicales libres.

Como en todo, la alimentación juega un papel muy importante: habrá que incorporar abundantes frutas y verduras, de todos colores y variedades.

Como bien recuerdan desde la Academia Americana de Médicos de Familia, con el tiempo los radicales libres pueden causar una reacción en cadena en el cuerpo que daña componentes orgánicos importantes, ADN y parte de las células. Si bien células pueden recuperarse otras quedan dañadas de forma permanente.

Los científicos creen que los radicales libres intervienen tanto en el proceso de envejecimiento como en el desarrollo de ciertas enfermedades como la diabetes, el cáncer o incluso las cardiopatías**. (Barrera D., 1993).**

Para propiciar la recuperación celular y contrarrestar los efectos de los radicales libres están los antioxidantes naturales, por lo que el consumir

frutas y vegetales con vitamina A, C y E, licopeno, betacarotenos, luteína y selenio es muy importante.

Sin embargo, los antioxidantes pueden proteger y revertir el daño causado por la oxidación hasta cierto punto. El cuerpo produce algunos antioxidantes para combatir los radicales libres formados por los procesos normales del cuerpo, pero también habrá que incorporarlos a través de los alimentos.

Muchos vegetales, frutas, cereales integrales, semillas y frutos secos son las principales fuentes de antioxidantes: la vitamina A se encuentra en la leche, el hígado, la mantequilla y los huevos, mientras que la vitamina C, en la mayoría de las frutas y vegetales, aunque en mayor medida en los kiwis, naranjas, papayas, fresas y en los pimientos. **(Barrera D., 1993).**

La vitamina E, por su parte, puede encontrarse en algunos frutos secos y semillas, entre las que se cuentan almendras, pipas de girasol, avellanas y cacahuetes. Otras fuentes ricas en esta vitamina son los vegetales de hoja verde como las espinacas, la col rizada y aceites vegetales como el de soja, girasol y maíz.

El betacaroteno se encuentra en frutas y vegetales como zanahorias, garbanzos, melón, albaricoque, papaya, mango, melocotones, calabaza, brócoli y calabacín. También son alimentos ricos en este antioxidante algunos vegetales de hoja verde, como son las espinacas, col rizada y las hojas de remolacha, **(Barrera D., 1993).**

La luteína se encuentra en los vegetales de hoja verde como espinacas, berza y col rizada, brócoli, maíz, garbanzos, papayas y naranjas, mientras que el licopeno se encuentra en las frutas rosas y rojas y en los vegetales como la uva tinta, la sandía, los albaricoques y el tomate.

El selenio está en los cereales (maíz, trigo y arroz), frutos secos, legumbres, productos animales (cordero, pescado, pavo, pollo, huevos y queso), pan y pasta.

TABLA N° 2: Concentración máxima permitida para antioxidantes sintéticos.

ANTIOXIDANTE	DOSIS (%)	DOSIS(ppm)
D,I alfa tocoferol sintético(TS)	0.1	1000
D,I alfa tocoferol sintético(TS)	0.2	2000
D alfa tocoferol acetato (TN)	0.1	1000
D alfa tocoferol acetato (TN)	0.2	2000

BHA	0.01	100
BHA	0.02	200
BHT	0.01	100
BHT	0.02	200
TBHQ	0.01	100
TBHQ	0.02	200
Proxil	0.03	
Proxil	0.05	
Tocoferol sintético y lecitina de huevo (LH)	0.1 y 3	
Tocoferol sintético y lecitina de huevo (LH)	0,1 y 5	
Tocoferol natural y lecitina de soya (LH)	0.1 y 5	
Tocoferol sintético y lecitina de soya (LH)	0.1 y 5	

Fuente: FDA, 2006.

2.8. Estabilidad Oxidativa

El estado oxidativo del producto, indica su situación oxidativa actual y que depende de las condiciones de manejo, almacenamiento y procesamiento de las materias primas y productos intermediarios y finales, en suma de la historia del producto, más no proporciona ninguna información acerca de su posible estabilidad. Cuando se trata de estabilidad, en realidad estamos queriendo estimar su comportamiento futuro, donde no solamente la historia del producto está implicada, sino también su

composición química, es decir la presencia o ausencia de antioxidantes o pro-oxidantes, la cantidad de ácidos grasos insaturados y su tipo, etc., factores de vital importancia en la estabilidad de un aceite o grasa. **(Barrera D., 1998).**

La estabilidad oxidativa se define como la resistencia de una matriz lipídica a la oxidación por efecto de la temperatura, luz, oxigeno, presencia de metales etc., lo que genera el deterioro de un aceite o grasa en un periodo de tiempo razonablemente corto. **(Frankel N., 1998).**

.

2.9. Métodos empleados para determinar la oxidación de los aceites

La industria de alimentos ha usado una seria de métodos para analizar diversos intermedios o productos de la oxidación estos varían desde las evaluaciones sensoriales sencillas, que son poco precisas y muy subjetivas, hasta algunos análisis químicos y físicos que requieren de instrumentos complejos, más reproducibles y sensibles que cuantifican objetivamente la intensidad de la oxidación. Los métodos utilizados miden la estabilidad oxidativa de las grasas y aceites.

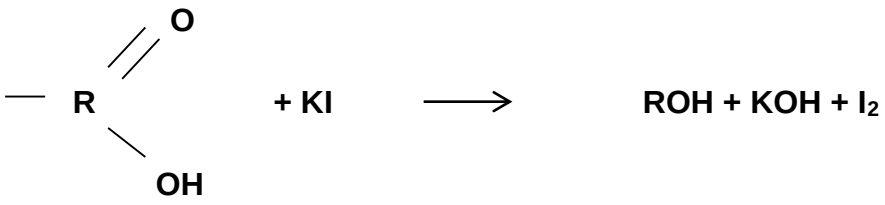
2.9.1. Valor del Peróxido (VP)

Este es el método clásico **(PV, AOCS Cd 8b-90)** para medir la oxidación de un aceite, tiene el inconveniente que solo permite apreciar compuestos peroxidados que se forman en las fases iniciales de la oxidación, motivo por el cual los valores tienen a disminuir bruscamente si la rancidez se encuentra en un estado muy avanzado por lo que también tiene poco valor para el aceite de fritura ya que esta prueba es altamente sensible a las temperaturas y el PV obtenido sería más una indicación del procesos de enfriamiento y

almacenamiento después del calentamiento que de los productos formados por efecto de la temperatura. **(Gordon M. et. Al., 2001).**

En las primeras fases de la oxidación (periodo de inducción) la formación de peróxidos es lenta variando desde una semana a varios meses, de acuerdo a la clases de aceite, a las condiciones de almacenamiento, al tipo y contenido de antioxidantes **(Nieblas M. et al., 2000).**

El método tradicional, se basa en la capacidad de los peróxidos, para oxidar el ion yodura de KI y producir yodo que se valora con una solución estandarizada de 2Na2S2O3; también se puede emplear oxido ferroso y cuantificar el ion férrico formado, la cantidad de 2Na2S2O3 consumido es proporcionar a la cantidad de peróxidos presentes en la muestra **(Gordon M. et. Al., 2001).**



$$I_2 + \text{ALMIDÓN} + 2Na_2S_2O_3\,(\text{Azul}) \longrightarrow 2NaI + \text{ALMIDÓN} + 2Na_2S_2O_6\ (\text{sin color})$$

FIGURA N° 9: Determinación de los hidroperóxidos lipídicos.

Fuente: Gordon M. et. Al., 2001.

El ensayo oficial de la AOAC es el que más se emplea y el que generalmente se usa para efectos comparativos **(Badui D., 1996).**

Este método es útil para lípidos voluminosos, como los presentes en los alimentos, un PV>a 2 es un indicador de que el producto tiene un gran potencial de rancidez.

Una sola medida del contenido de peróxidos puede ser usada como un índice del estado oxidativo de la grasa, sólo sí los peróxidos formados son lo bastante estables de modo que no se descompongan después de la formación.

Si bien el índice de peróxidos ha sido una medida corriente de la oxidación lipídica, su utilización se limita a las etapas iniciales de la reacción. Como los hidroperóxidos sufren reacciones posteriores de descomposición, la historia oxidativa completa de la grasa no se revela en su índice de peróxidos; esté puede ser bajo porque el material es de buena calidad o porque se ha reducido por algún proceso, enmascarando su deterioro verdadero **(Grompone M., 1991).**

2.9.2. Valor de la p-Anisidina (AOCS CD 18-90)

Los aldehídos son productos de la descomposición de los ácidos grasas peroxidados. Este valor mide los niveles de aldehídos utilizándolos como un indicador que determina la cantidad de material peroxidado que ha sido desdoblado dando lugar a diferentes tipos de compuestos carbonilicos.

Conjuntamente con los niveles de peróxidos presentes, el perfil de la degradación pasada y futura, un aceite puede ser mapeado o graficado especialmente en aceites procesados por segunda vez para reducir el nivel de los ácidos grasos libres. **(Navas P., 2010).**

La prueba del índice de p-anisidina es particularmente útil para aceites con bajos índices de peróxidos.

El principio de ése método radica en la reacción de condensación entre los dienales conjugados o 2-aqueles de la muestra y el reactivo dep-anisidina (p-metoxianilina) en solución de iso-octano seguido por determinación espectrofotométrica a 350 nm. **(Navas P., 2010).**

La intensidad de color de los productos amarillentos formados depende no solo de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes sino también de su estructura: un doble enlace en la cadena carbonada, conjugado con el doble enlace del carbonilo, aumenta la absorbancia molar **(Nieblas M. et al., 2001).**

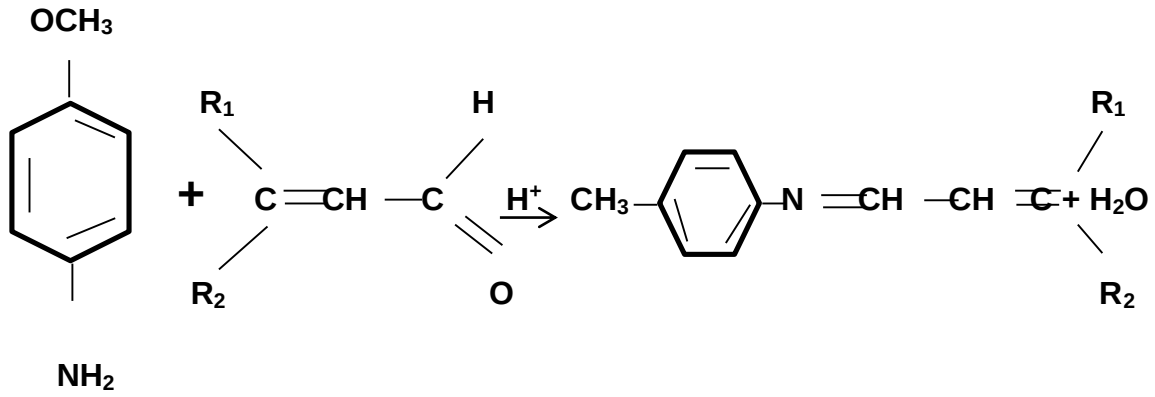


FIGURA N° 10: Reacción de los compuestos aldehídos con el reactivo p-anisidina.

Fuente: Gordon M. et. Al., 2001.

Los aldehídos son productos de la descomposición de los ácidos grasos peroxidados. Este ensayo mide los niveles de aldehídos utilizándolos como un indicador que determina la cantidad de material peroxidado que ha sido desdoblado. Los aceites con buena estabilidad oxidativa deberán tener valores de p-anisidina no mayores de 2 mmol/kg.

2.9.3. Índice de acidez

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

La medida de los ácidos grasos libres permite evaluar el estado general de enranciamiento de un alimento ya que usualmente el enranciamiento hidrolítico acompaña el enranciamiento oxidativo.

Los índices descritos anteriormente, pueden estar relacionados con los tres estados de oxidación como se muestra en la Figura 11.

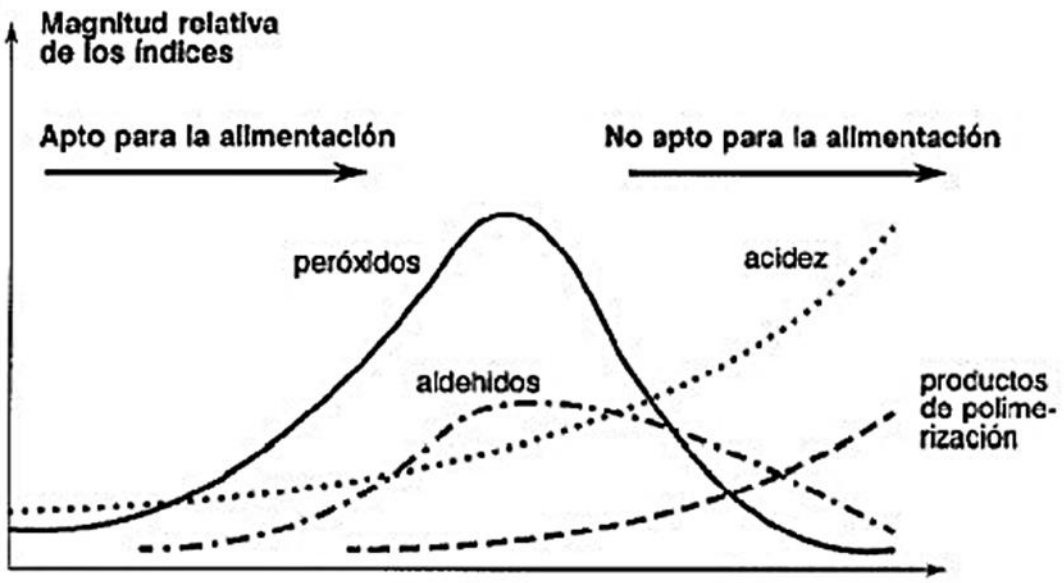


FIGURA N° 11: Estados de la oxidación lipídico.

Fuente: Tellado, 2013.

2.9.4. Índice de yodo.

Los peróxidos lipídicos con capaces de oxidar el ion yoduro (I-) a yodo (I2), que puede determinarse con una valoración volumétrica con tiosulfato de sodio. Este método es útil para lípidos voluminosos, como los presentes en los alimentos **(Frankel, 1998).**

El yodo se adiciona a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados cuantitativamente bajo condiciones controladas. En esto se basa químicamente la determinación del índice de yodo, el cual se define como: “El número de gramos de yodo absorbidos por 100g de aceite o grasa”.

2.9.5. Índice de estabilidad oxidativa

El índice de estabilidad de los aceites u oxidación inducida, permite determinar la estabilidad oxidativa automáticamente bajo condiciones de temperatura y tiempo estandarizado. Fue desarrollado por Hadorn y Zurcher, se fundamenta en el hecho de que la mayoría de los productos volátiles de bajo peso

molecular formados en la descomposición de los hidroperóxidos corresponden a ácido fórmico La estabilidad oxidativa se define como la resistencia de una matriz lipídica a la oxidación por efecto de la temperatura, luz, oxigeno, presencia de metales etc., lo que genera el deterioro de un aceite o grasa en un periodo de tiempo razonablemente corto **(Frankel, 1998).**

El estado oxidativo del producto, el cual medido por los índices mencionados, indica su situación oxidativa actual y que depende de las condiciones de manejo, almacenamiento y procesamiento de las materias primas y productos intermediarios y finales, en suma de la historia del producto, más no proporciona ninguna información acerca de du posible estabilidad. Cuando se trata de estabilidad, en realidad estamos queriendo estimar su comportamiento futuro, donde no solamente la historia del producto está implicada, sino también su composición química, es decir la presencia o ausencia de antioxidantes o pro-oxidantes, la cantidad de ácidos grasos insaturados y su tipo, etc., factores de vital importancia en la estabilidad de un aceite o grasa. **(Barrera D., 1993).**

A las temperaturas del ensayo, el ácido fórmico es arrastrado por la corriente de aire y se disuelve en agua fría, provocando un aumento de conductividad en la misma. Este cambio de conductividad permite definir el periodo de inducción del aceite analizado.

El periodo de inducción se define como el tiempo necesario para llegar al punto de inflexión de la gráfica que representa la conductividad en función del tiempo. Se establece que la mejor estabilidad oxidativa para una muestra de aceite, está relacionada con el tiempo de inducción más largo.

El tiempo de inflexión queda por tanto definido como el punto de intersección de las tangentes a las dos ramas de la gráfica **(Moreno C., 1998)**

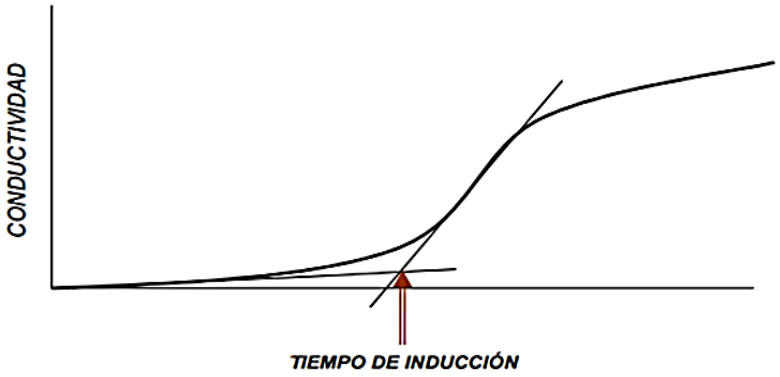


FIGURA N° 12: Tiempo de Inducción determinado por el Rancimat

Fuente: Moreno C., 1998.

2.9.6. Método Rancimat.

El método Rancimat, incluido en los estándares nacionales e internacionales (OSI, AOCS Cd 12b-92}, es la prueba automatizada del AOM, que mide el grado en el que un aceite se oxida cuando se, hace burbujear aire a través de él. El producto de desdoblamiento ·que es el ácido fórmico, es conducido hacia el agua destilada que se encuentra en una celda. El instrumento monitorea en forma continua la conductividad eléctrica del agua. En el momento en que la conductividad aumenta agudamente indica en forma inmediata el momento final de la prueba. En este método la estabilidad oxidativa se define como el tiempo (en horas) necesario para que la reacción de oxidación alcance el punto de inflexión en la representación gráfica de la conductividad vs Tiempo. **(Navas P., 2010).**

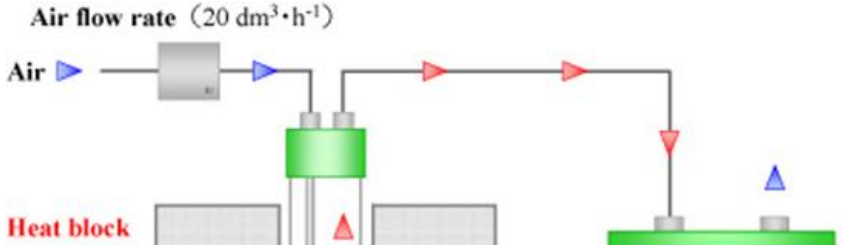


FIGURA N° 13: Condiciones analíticas de Rancimat.

Fuente: http://www.cyclochem.com

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Control de calidad del instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial de la Escuela de ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa; Nuevo Chimbote.

3.1. Materiales, equipos e instrumentos

3.1.1. Materiales

3.1.1.1. Materia Prima

Aceite de pescado crudo analizado corresponde a la pesca industrial del distrito de Coishco, provincia del Santa, departamento de Ancash, la muestra fue proporcionada por la empresa pesquera Cantabria quien nos brindó 1 litro de muestra de la superficie del tanque de almacenamiento, esta muestra de aceite es una mezcla de diferentes especies principalmente de anchoveta.

FIGURA N° 14: Muestra de aceite crudo de Pescado.

Fuente: Proveniente de Pesquera Cantabria.

3.1.1.2. Antioxidantes y reactivos.

- BHA (E-320) antioxidante sintético marca Dresen.
- BHT (E-321) antioxidante sintético marca Dresen.
- TBHQ (E-319) antioxidante sintético marca Dresen.
- Tocoferol (E-306) antioxidante natural marca Danisco.
- Extracto de romero antioxidante natural marca Danisco.
- Extracto de té verde antioxidante natural marca Danisco.
- Hidróxido de sodio 0.1M marca Merck.
- Alcohol 96% de pureza.
- Fenolftaleína 5% marca Merck.
- P-anisidina marca Merck.
- Hexano 98% marca Merck.
- Ácido acético glacial 99% marca Merck.
- Cloroformo 99% marca Merck.
- Tiosulfato de sodio marca Merck.
- Solución Hanus marca Merck.
- Isooctano 98% marca Merck.
- Cloruro de sodio marca Merck.
- Triofloruro de boro 20% marca Merck.

3.1.1.3. Materiales de vidrio.

- Probetas (50 y 100ml) marca Pirex.
- Vasos precipitados (100ml) marca Pirex.
- Tubos de ensayo marca Pirex.
- Tubos de centrifuga (15ml) marca Pirex.
- Pipetas de 1, 2,5 y 10ml marca Pirex.
- Viales marca Pirex.
- Matraces Erlenmeyer de 250ml marca Pirex.
- Celdas de cuarzo para cromatografía marca Pirex.
- Fiolas de 25 y 500ml marca Pirex.

3.1.2. EQUIPOS:

RANCIMAT:

- **Marca:** Metrohm.
- **Número de modelo:** 743
- **País:** Suiza.

BALANZA ANALÍTICA:

- **Marca:** Mettler Toledo.
- **Número de modelo:** NS204S
- **Max:** 250 gr.
- **País:** Suiza.

CENTRIFUGA:

- **Marca:** SIGMA.
- **Número de Modelo:** 2-16
- **Velocidad:** 15000 rpm.
- **País:** Barcelona

ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS:

- **Marca:** PG INSTRUMENT
- **Número de serie:** 23-1885-01-0232
- **Número de modelo:** T80+
- **País:** United Kingdom.

CROMATÓGRAFO DE GASES.

- **Marca:** Perkin Elmer.
- **Número de serie:** 646N8042902
- **Número de modelo:** CLARUS 400GL.
- **País:** Estados Unidos.

BAÑO MARÍA.

- **Marca:** LAB COMPANION.
- **Número de serie:** V105045**.**
- **Número de modelo:** BW-20G.
- **País** SEOUL KOREA

3.2. Metodología de Análisis

3.2.1. Análisis físico-químico:

Los análisis fisicoquímicos se realizarán a la muestra en su etapa inicial y en la etapa final de la experimentación.

3.2.1.1. Determinación de la composición de ácidos grasos

Se realizó de acuerdo la **AOCS método oficial Ce 1b-89**, aprobado nuevamente en el 2009, para el cual se utilizó el cromatógrafo de grases con sistema de inyección capilar CLARUS 400 marca Perkim Elmer, con columna capilar (sílice fundida) de 25mm de tamaño y 0,35 mm de diámetro interno. Las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo fueron: temperatura del detector = 210 °C; temperatura del inyector = 170 °C; temperatura del horno 110 °C - 5 minutos, 110 °C - 215 °C (5 °C / min) 21% °C durante 45 minutos; gas de arrastre = helio; volumen inyectado = 1,0 L; Split: 01:50.

3.2.1.2. Determinación de la densidad relativa (DR): Método del picnómetro

Se realizó la medición de la Densidad Relativa de los aceites de acuerdo a la Norma CODEX para aceites vegetales especificados **(CODEX STAN 210-1999).** Para ello se pesó el picnómetro (10 mL) vacío, luego con agua y finalmente lleno con cada muestra de aceite en la balanza analítica (± 0,0001). El cálculo se realizó de acuerdo a la ecuación y por triplicado.

$$\rho\, r\, aceite = \frac{Wm}{Wa}$$

Dónde:

Wm: Es la masa del aceite (muestra).

Wa: La masa de agua en el picnómetro, asimismo se utilizaron los factores de corrección correspondientes por temperatura.

3.2.1.3. Determinación del índice de refracción en aceites (IR).

Se realizó por triplicado siguiendo el método normado por la **AOCS 28 Cc-7-25, (2002).** Se utilizó el refractómetro digital marca Rudolph Research (Modelo J157).Para los cálculos se aplicó el factor de corrección 0,000385 para aceites a temperaturas menores de 40 °C

3.2.1.4. Determinación de color escala Gardner.

Método ITINTEC 312.011 Octubre, 1985. Colocar un tubo de agua destilada por uno de los orificios del bastidor y por el otro colocar un tubo con la muestra a medir previamente filtrada, colocar el bastidor en una fuente de luz natural y girar el disco hasta que uno de los vidrios patrones coincida o se aproxime más con el color de la muestra.

3.2.1.5. Determinación de impurezas y humedad.

Método ISO 662B: 1998 and ISO 663: 2007 (E), la muestra es calentada hasta los 50°C, posteriormente se adiciona a un tubo cónico graduado de vidrio 10mL y luego se centrifuga por 3 minutos. Se reporta el porcentaje de impurezas y humedad tomando en cuenta que los 10mL es el 100%.

3.2.1.6. Determinación del índice de acidez (IA)

De conformidad con el Método de la **UIQPA 2.201 o ISO 660: 1996**, se realizó por titulación directa y con tres repeticiones. Para ello se pesaron 5g de cada muestra de aceite en un matraz Erlenmeyer (250 mL), se añadieron 50mL de alcohol etílico neutralizado y dos gotas de indicador de fenolftaleína. Posteriormente, se tituló con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N hasta que la mezcla se tornó de un ligero color rosa. Posteriormente se realizó el cálculo de la acidez con la siguiente formula:

$$IA = \frac{V * N * 56.1}{W}$$

Dónde:

IA: Expresa los miligramos de NaOH requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres (oleico) de la muestra.

V: Es el volumen en mL de la solución valorada de NaOH utilizada.

N: Es la concentración normal de NaOH; y W el peso en gramos de la muestra de aceite utilizada.

3.2.1.7. Determinación del índice de iodo (II)

La medición del índice de Iodo de realizó por el método de Wijs, de conformidad con **ISO 3961:1996 o NMKL 39 (2003)** por triplicado. Primero se pesó aproximadamente 0,15 g de aceite, el cual se mezcló en un matraz Erlenmeyer (250 mL) con 20 mL de tetracloruro de carbono (CL4C) y 25 mL de reactivo de Wijs. El reactivo de Wijs se preparó con CL4C al cual se le añadió un exceso de monocloruro de iodo (CLI) disuelto en una mezcla de ácido glacial y tetracloruro de carbono). Se dejó reposar la mezcla en la oscuridad por 30 minutos, a continuación, se añadieron 20 mL de Ioduro de Potasio (KI 15%) y 100 mL de agua destilada. Por último, se tituló con una solución de Tiosulfato de Sodio 0,1 N, empleando almidón como indicador. Para el cálculo final empleamos la siguiente formula:

$$\boldsymbol{II = \frac{(B - M) * 12.69}{W}}$$

Siendo:

II: El Índice de Iodo expresado en gramos de Iodo que reaccionan con 100 gramos de muestra.

B y M: Son los gastos en mL de la solución de tiosulfato de sodio en la titulación del blanco y la muestra respectivamente.

N: Es la normalidad de la solución de tiosulfato y W el peso de la muestra en gramos.

3.2.1.8. Determinación del color instrumental de los aceites

Se utilizó el colorímetro digital marca **KONICA MINOLTA (CR-400T),** por el método CIELAB y con 3 repeticiones en tres puntos diferentes por muestra. Se vertió parte de la muestra de aceite en una superficie blanca, a fin de crear una capa lisa y homogénea, la cubrimos con una lámina de acrílico delgada y transparente, apoyamos el visor del colorímetro encima, y se realizó la lectura de la cual se obtuvo tres parámetros: L (luminosidad), a* (color entre magenta y verde) y b* (color entre amarillo y azul). Con estos datos se calcularon la luminosidad, saturación y tono del color de los aceites, según las siguientes formulas

$$\boldsymbol{SAT} = \sqrt{\boldsymbol{a}^{*2} + \boldsymbol{b}^{*2}}$$

$$\boldsymbol{TonoR} = \boldsymbol{arctg}\left(\frac{\boldsymbol{b}^*}{\boldsymbol{a}^*}\right)$$

$$\boldsymbol{TonoVA} = \boldsymbol{a}^* + \boldsymbol{b}^*$$

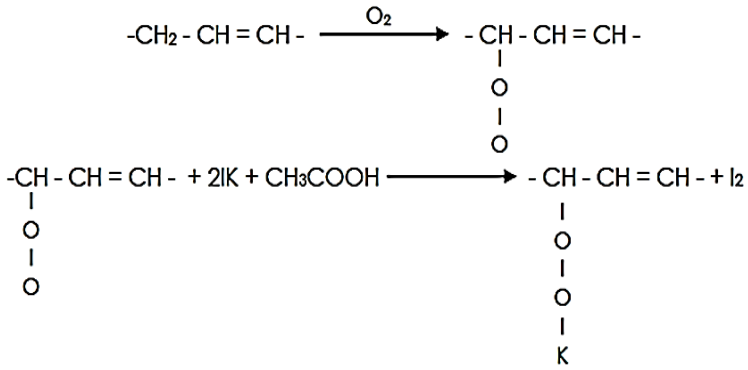
3.2.1.9. Índice de peróxido (Meq O2/kg)

Norma Técnica Peruana 209.006: 1968 (Revisada el 2011) ACEITES Y GRASAS COMESTIBLES. Método para la determinación del índice de peróxido. Durante el almacenamiento de los aceites y grasas, los enlaces insaturados absorben oxígeno y reaccionan analógicamente a los peróxidos: los peróxidos reaccionan con el ioduro de potasio (IK) en una solución acidad de acuerdo a:

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2I^- \longrightarrow I_2 + 2H_2O$$

EL Iodo liberado se titula con tiosulfato de sodio. La reacción es relativamente lenta, pero se acelera al aumentar la concentración del ácido.

En el caso de una grasa oxidada:



3.2.1.10. Índice de anisidina.

Método ISO 6885:2012. Se pesa aproximadamente 0.5 g de muestra previamente calentada y filtrada, en una fiola de 25 mL; enrasar hasta 25 mL con N-Hexano y homogenizar. Adicionar en dos tubos de ensayo 5 mL de la solución, a uno de ellos adicionar 1 mL de ácido cético glacial y al otro la solución de p-anisidina (0.25gp-anisidina/ 100mL solución), agitar por 1 minuto exacto y dejar en reposo en oscuridad por 8 minutos, leer las absorbancias a 350 nm.

$$\boldsymbol{I.A = 100 * 25 * 1.2 * 0.01 * \frac{(Abs2 - Abs1 - Abs0}{Peso\ de\ la\ muestra}}$$

Dónde:

Abs0: Absorbancia 5 mL de N-hexano y 1 mL de solución de p-anisidina (blanco)

Abs1: Absorbancia de la solución con la muestra con solución de p-anisidina.

Abs2: Absorbancia de la solución con la muestra con ácido acético.

3.2.1.11. Estimación de la vida útil por el índice de estabilidad oxidativa (OSI)

Para la American Oil Chemists Society **Cd 12b-92 (AOCS, 2013**) el método oficial para la medición del índice de estabilidad oxidativa (OSI) es el Rancimat el cual se basa en la inducción de la oxidación de la muestra por exposición a elevadas temperaturas y flujo de aire. La determinación del OSI se realizó por triplicado, donde se utilizó un equipo Rancimat 743 Metrohm, con 3 ± 0,2 g de muestra y un flujo de aire 10 L/h. Para el aceite crudo de pescado se utilizara las temperaturas de 80, 90 y 100°C; éstas se establecieron de tal manera que no se permita que el tiempo OSI sea menor a 4 horas resultara en una variación más amplia en la determinación del punto terminal. Para la determinación de la vida útil de cada muestra se realizó una extrapolación de la relación entre el tiempo de inducción y la temperatura de acuerdo a la ley de Van't Hoff, obteniendo un estimado del tiempo de almacenamiento en condiciones normales.

3.2.2. Adición de Antioxidantes de origen sintético y natural.

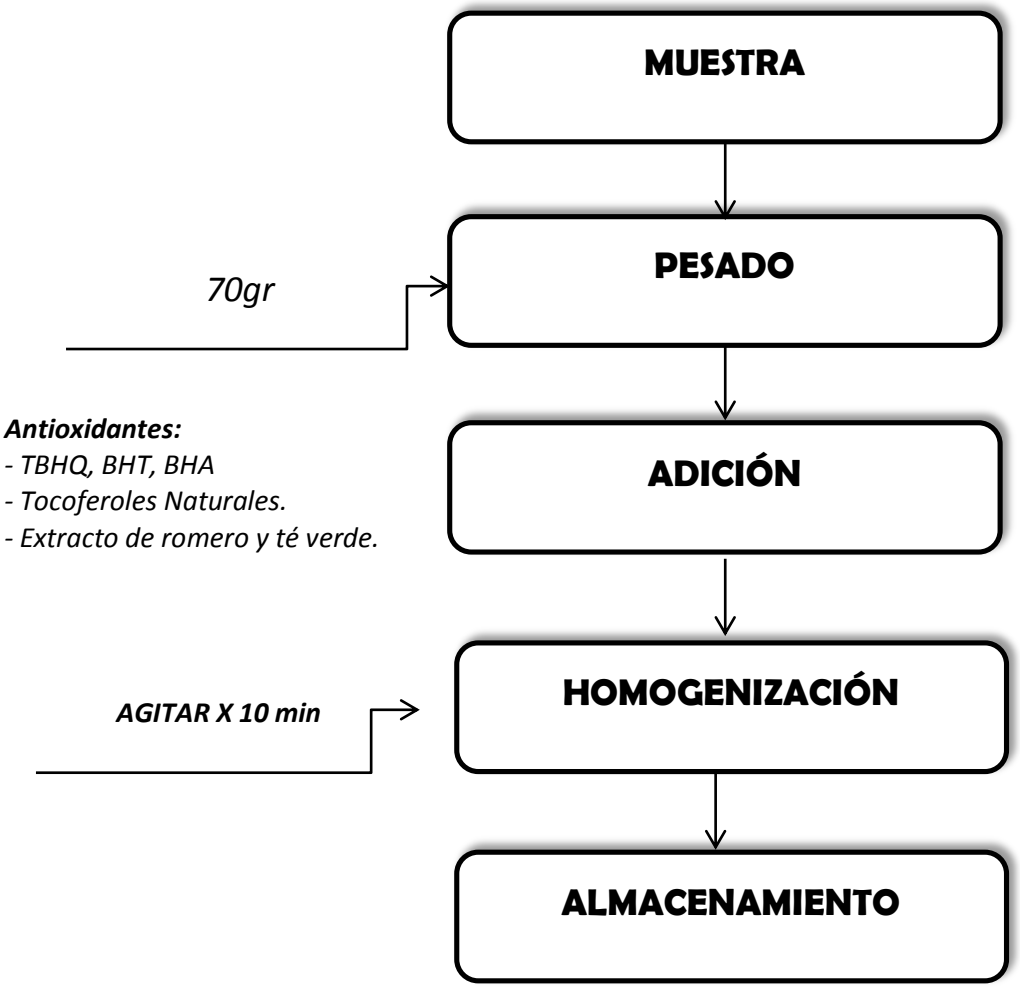


FIGURA N° 15: Diagrama de flujo de la adición de los antioxidantes en estudio.

3.2.3. Análisis en el Rancimat de Aceite de Pescado.

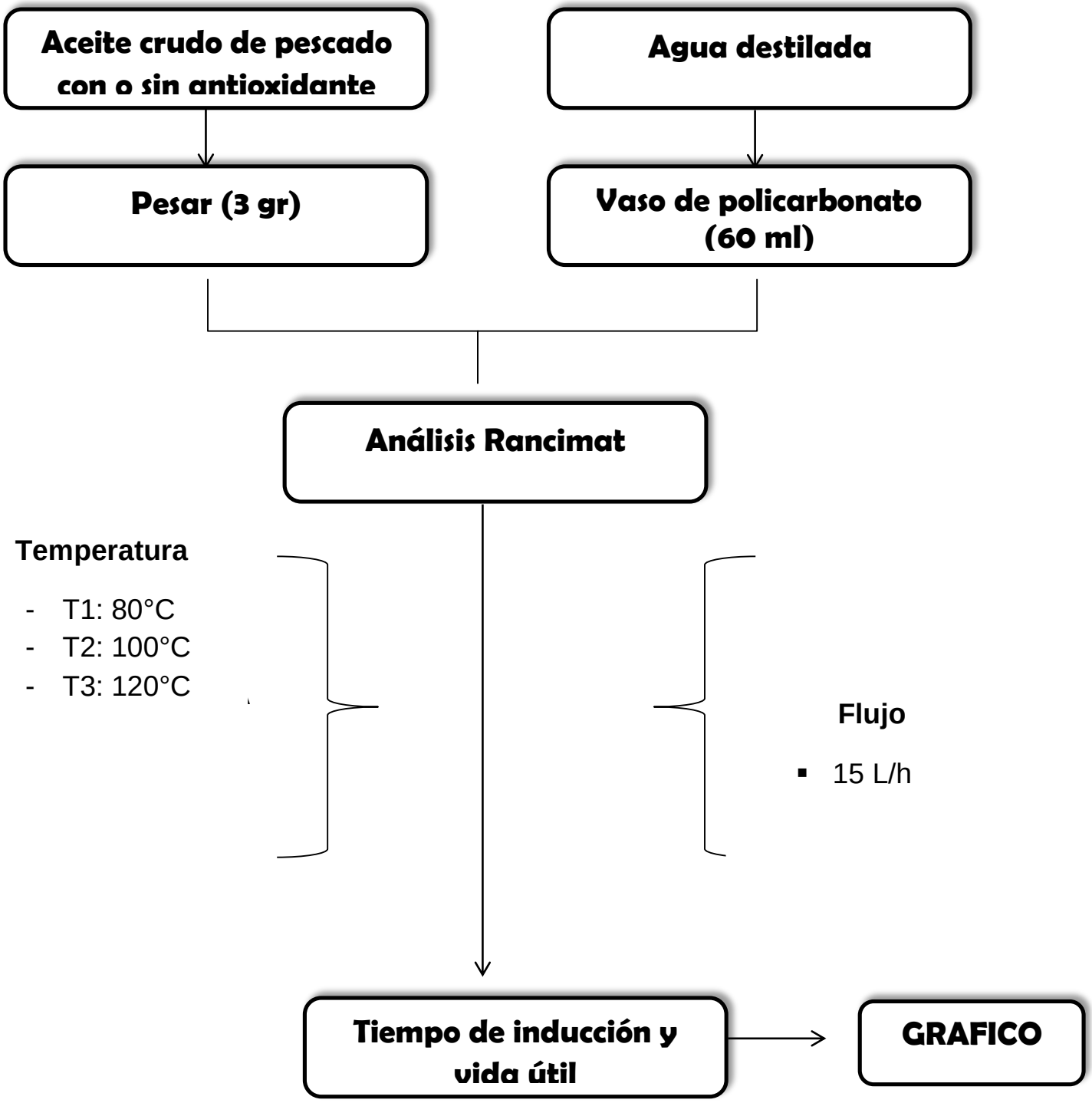


FIGURA N° 16: Diagrama de flujo para análisis en el Rancimat del aceite crudo de pescado.

3.3. Procedimiento:

3.3.1. Recepción de la Materia Prima

La muestra de aceite de pescado crudo industrial obtenido de empresa pesquera Cantabria, y antioxidantes fueron almacenados en recipientes de vidrio ámbar, bajo atmosfera de nitrógeno en refrigeración a 4± 1 °C.

3.3.2. Homogenización

En esta etapa la muestra se homogenizó, agitando fuertemente por 5 minutos.

3.3.3. Pesado

Se procedió a pesar 3 ± 0.5g. del aceite de pescado a diferentes concentraciones para cada tubo de reacción.

3.3.4. Dilución

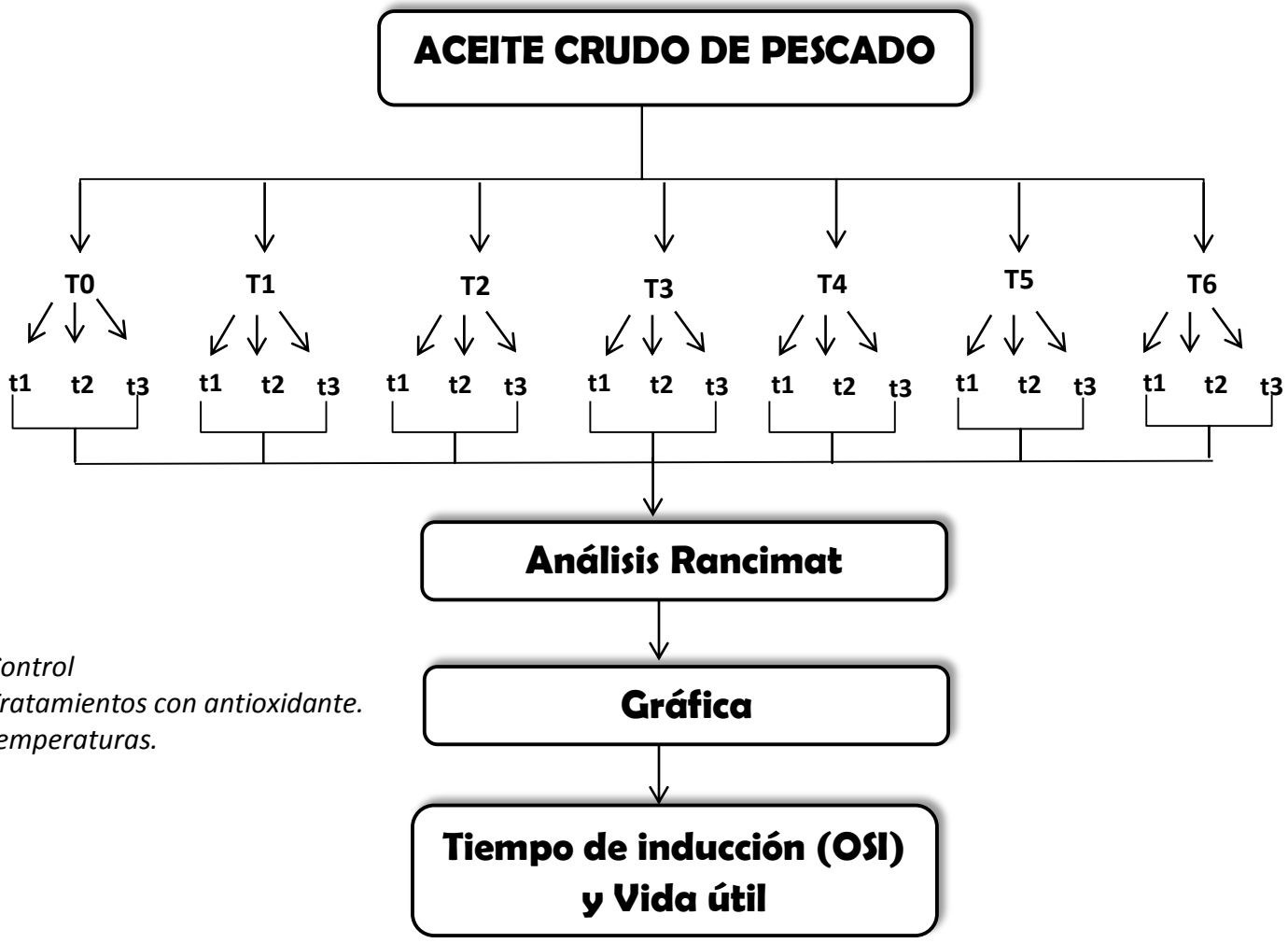
Primero se preparó la muestra patrón y se analizó a temperaturas 80, 100 y 120 °C y posteriormente con la siguientes muestras a distintas concentraciones establecidas según las dosis permitidas, teniendo en cuenta la densidad del aceite de pescado crudo (ρ=0.937 g/ml).

3.3.5. Análisis de Rancimat

El análisis se realizó en el Metrohm Rancimat 743, a una temperatura de 80°, 100° y 120°C y a un flujo de aire de 15 l/h.

3.4. Diseño Experimental

3.4.1. Flujo del diseño experimental del aceite de pescado crudo.



0: *Control*
T: *Tratamientos con antioxidante.*
t: *Temperaturas.*

FIGURA N° 17: Diagrama de flujo del diseño experimental de la investigación.

3.4.2. Variables

3.4.2.1. Variables independientes.

- **CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES:**

- **A0:** Control (0 ppm).**=** 0 ppm.
- **A1:** TBHQ (100ppm) + BHT (50ppm) +BHA (50ppm).
- **A2:** Tocoferoles Naturales (1000ppm).
- **A3:** Extracto de romero (500ppm) y té verde (500ppm)**.**
- **A4:** TBHQ (100ppm) + BHT (50ppm) +BHA (50ppm) - Tocoferoles Naturales (1000ppm).
- **A5:** TBHQ (100ppm) + BHT (50ppm) +BHA (50ppm) - Extracto de romero (500ppm) y té verde (500 ppm).
- **A6:** Tocoferoles Naturales (1000 ppm) - Extracto de romero (500ppm) y té verde (500 ppm).

- **TEMPERATURA RANCIMAT.**

  - **T1:** 80°C
  - **T2:** 100°C
  - **T3:** 120°C

3.4.2.2. Variables dependientes.

- **ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO:**

  - % Acidez.
  - Peróxido.
  - Índice de anisidina.

- **VIDA ÚTIL (horas).**

El diseño estadístico empleado será un “diseño de bloque completamente al azar (DBCA)” con arreglo factorial de 7x3 con 3 repeticiones, es decir 63 experiencias, cuyos resultados se evaluara con el método estadístico que permitirá evaluar las variables de respuesta en función a las variables independientes.

Los resultados obtenidos según el diseño y esquema experimental serán controlados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANVA).

TABLA N° 3: Diseño de bloque completamente al azar con arreglo factorial de 7x3 con 3 repeticiones

		CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTES						
		A0	**A1**	**A2**	**A3**	**A4**	**A5**	**A6**
TEMPERATURA	**T1**							
	T2							
	T3							

3.5. Diseño estadístico:

Modelo aditivo lineal:

$$\boldsymbol{Yiijk} = \boldsymbol{\mu} + \boldsymbol{\alpha i} + \boldsymbol{\beta j} + (\boldsymbol{\alpha\beta})\boldsymbol{ij} + \boldsymbol{\varepsilon\, ij}$$

Dónde:

Yiijk: Es la vida útil obtenido con el i-antioxidante, j-ésima temperatura.

μ = Es el efecto de la media general.

αi = Es el efecto del i-ésima antioxidante.

βj = Es el efecto de la j-ésima temperatura.

(αβ)ij = Es el efecto de la interacción en el i-ésimo antioxidante, j-ésima temperatura.

ε ij = es el efecto del error experimental en el i-esimo antioxidante , j-ésima temperatura.

p= 7, antioxidante.

q=3, temperatura.

r= 3, repetición.

TABLA N° 4: ANVA para el diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 7x3 con 3 repeticiones.

ente de variación	***Grados de libertad (gl)***	***Suma de cuadrados (SC)***	***Cuadrados medios (CM)***	***Fc***
Concentración de antioxidantes.	*p-1*	*SC(A)*	*SC(A)/gl(A)*	*C(A)/CM(Error)*
Temperatura	*q-1*	*SC(B)*	*SC(B)/gl(B)*	*C(B)/CM(Error)*
Efecto de concentración de antioxidante y temperatura.	*(p-1)(q-1)*	*SC(AB)*	*SC(AB)/gl(AB)*	*C(AB)/CM(Error)*
Error experimental	*(pq-1)(b-1)*	*SC(Error)*	*SC(Error)/gl(Error)*	
total	*pqr-1*	*SC(Total)*		

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La muestra utilizada para este trabajo de investigación fue proporcionada por la empresa **PESQUERA CANTABRIA** ubicada en el distrito de Coishco, provincia de la Santa, departamento de ANCASH.

4.1. De los análisis fisicoquímicos del aceite crudo de pescado.

Según los resultados que se muestra en el TABLA N° 5 referente a los análisis fisicoquímicos del aceite crudo de pescado (ACP) de la especie Anchoveta (*Engraulis ringens*) empleado en la presente investigación presentó antes de iniciar la prueba de oxidación acelerada (Test Rancimat); valores de índice acidez y humedad e impurezas de 2.52 % ± 0.01 y 0.05% ± 0.01 respectivamente, los cuales estuvieron dentro de los límites permitidos del estándar de calidad. Según **SANIPES (2010)** la acidez libre no deberá ser mayor a 3% y el contenido de impurezas no deberá superar el 1,0% en aceite crudo de pescado lo cual indica que el aceite estuvo en buenas condiciones.

El índice de yodo constituye una medida del grado de insaturación del aceite, característica muy importante que está relacionada con el punto de fusión del mismo, de tal manera que a mayor cantidad de insaturación el punto de fusión del aceite será menor. El valor del índice de yodo del aceite crudo de pescado antes de iniciar el test Rancimat fue de 184.52 cg I_2/g ± 0.25; este valor se encuentra dentro del rango establecido en las normas **CODEX (2003)** con valores máximos para aceite de pescado entre 160-200 cg I_2/g.

El índice de peróxido mide la oxidación del aceite fresco o el grado de rancidez en el momento de la prueba; se considera que los productos con índice superior a 2meq de O2/Kg son altamente propensos a mostrar rancidez **(Belén et al., 2005)**, en esta investigación el índice de peróxido resulto 1.15 MeqO2/Kg ± 0.01 lo que indica que la muestra utilizada aun no inicia el proceso de oxidación y se encuentra en el rango establecido.

A pesar de que el índice de peróxido es una medida corriente de la oxidación de los lípidos, su uso está limitado a las etapas iniciales de dicha reacción. Como los peróxidos pueden sufrir descomposiciones posteriores, la historia oxidativa completa del aceite no se conoce por ellos. Se considera que el índice de anisidina, una medida de los productos de la oxidación secundaria, es muy útil para evaluar el pasado del aceite **(Grompone, 1990)**. El valor del índice de anisidina de la muestra inicial fue 6.87 ± 0.01 lo cual refleja un grado de frescura en nuestra materia prima. De acuerdo con **Masson (1994),** se han establecido múltiples límites y estándares de calidad en el aceite de pescado para el alimentación de peces según los cuales un aceite fresco debe presentar niveles de peróxidos de entre 3.9 y 5 meq O2/kg, un índice de anisidina de entre 10-20, un aceite oxidado presenta niveles de entre 7 y 26 meq O2/kg, 25–30 de anisidina.

El valor TOTOX es un buen indicador del deterioro de los aceites que relaciona el PV y el valor p-AnV para determinar el grado total de oxidación del aceite debido a la oxidación tanto primaria y secundaria **(Shahidi y Wanasundara, 2002)**. El valor TOTOX en esta investigación fue de 9.17 MeqO2/Kg ± 0.02.

La densidad y el índice de refracción para el aceite en estudio fueron de 0.92 gr/ml ± 0.00 y 1.39 ± 0.00 respectivamente. Un estudio realizado por **Guerrero (2011**) estableció un rango normal de densidad e índice de refracción para aceites de pescado entre 0.90 - 093 gr/ml y 1.3 -1.4 respectivamente.

TABLA N° 5: Calidad inicial del aceite crudo de pescado.

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	VALOR
Acidez (% ácido oleico)	2.52 ± 0.01
Humedad e Impurezas (%)	0.05 ± 0.01
Densidad (gr/mL)	0.92 ± 0.00
Índice de refracción	1.39 ± 0.00
Índice de Yodo (cg I2/gr)	184.52 ± 0.25
Índice de peróxido (MeqO2/Kg)	1.15 ± 0.01
Índice de anisidina.	6.87 ± 0.01
Valor TOTOX (MeqO2/Kg)	9.17 ± 0.02

*Medición promedio realizada a cinco repeticiones por muestra

4.1.1. Determinación las características organolépticas: color mediante los métodos: Escala Gardner y el CIELAB.

4.1.1.1. Determinación de color escala GARDNER.

La Norma **ISO 4630** específica un método para la evaluación del color en aceites, por medio de la escala de color Gardner, para el color en productos líquidos transparentes, amarillos/parduzcos, con la ayuda de un colorímetro manual como instrumento de medida. Los resultados pueden ser erróneos si se ensayan en otros productos.

Este método es aplicable en aceites secantes, barnices y disoluciones de ácidos grasos, ácidos grasos polimerizados, resinas, etc. También se puede utilizar en productos con colores comprendidos entre el Gardner 1 (amarillo claro) y el Gardner 18 (marrón). La escala Gardner no es aplicable a productos de colores más claros o más oscuros que los mencionados. La escala Gardner es la escala internacional para comparar los colores en aceites.

Para **COPEINCA (2013),** el color Gardner del aceite crudo de pescado se encuentra en un rango entre 12 -14 en escala Gardner.

TABLA N° 6: Resultados la medición de color por medio de la escala Gardner.

ESCALA GARDNER	ACEITE CRUDO PESCADO
COLOR	12

Fuente: Laboratorio interno de la empresa DISAC

FIGURA N° 18: Colorímetro de la escala Gardner.

Fuente: Laboratorio interno de la empresa DISAC

4.1.1.2. Determinación de color método CIELAB.

ACP presentó un color amarillo oscuro con tendencia al marrón rojizo. Según la NTP 312.010 (1985) el color del ACP debe ser marrón / amarillento pues aun contiene pigmentos, impurezas, entre otros que se eliminarán durante su refinación para dar paso a un aceite más claro. Según **Valenzuela (2009)** el color del aceite de pescado también depende de la materia prima que se utilice para su elaboración, en este caso el tipo de pescado utilizado para la obtención del ACP fue la Anchoveta (*Engraulis ringens*).

TABLA N° 7: Resultados de los valores de colorimetría CIELAB para el aceite crudo de pescado.

VALORES COLORIMÉTRICOS	ACEITE CRUDO PESCADO
L	65.21 ± 0.11
a*	-2.65 ± 0.03
b*	78.38 ± 0.34
C*	91.81 ± 0.13
h*	56.92 ± 0.10

*Medición promedio realizada a cinco repeticiones por muestra

Valores similares arroja el trabajo de investigación **(Paúcar et al., 2015)** acerca del estudio comparativo de las características físico-químicas del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis l.),* aceite de oliva (*Olea europaea*) y aceite crudo de pescado en el que obtuvo valores de colorimetría CIELAB para el aceite de pescado de L: 65.32 ± 0.01, a*: -2.66 ± 0.04, b*: 77.01 ± 0.07, C: 91.25 ± 0.38 y h°:59.14 ± 0.34.

4.1.1.3. Perfil porcentual de ácidos grasos del aceite crudo de pescado.

La composición de ácidos grasos se muestra en TABLA N°8, se puede observar su alto contenido de ácidos grasos insaturados (70 - 80%). El aceite crudo de pescado predominan los ácidos grasos EPA (~20%), y DHA (~20%), los cuales ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, además bajan la presión vascular y tienen efectos antitrombóticos y antiinflamatorios **(Calder, 2006).**

TABLA N° 8: Perfil porcentual de los ácidos grasos presente en el aceite crudo de pescado.

ÁCIDOS GRASOS	(%)
Ácido Miristico C14:0	6.82
Ácido Palmitico C16:0	18.73
Ácido Estearico C18.0	4.05
Ácido Araquidico C20:0	0.4
Ácido Behenico C22:0	0.14
Ác. grasos saturados totales	**30.14**
Ácido Palmitoleico C16:1	7.54
Ácido Oleico (Omega 9) C18:1 n9c	8.08
Ácido Oleico (Omega 7) C18:1 n7	2.54
Ácido Eicosenoico (Omega 9) 20:1n9	1.15
Ác. grasos monoinsaturados totales	**19.31**
Ácido Hexadecadienoico (omega 4) C16:2	1.07
Ácido Hexadecatrienoico (omega 4) C16:3	0.86
Ácido Linoleico (Omega 6) C:18:2n6c	1.2
Ácido Linolenico (Omega 4) C18:3n4	0.28
Ácido Linolenico (Omega 3) C18:3n3	0.96
Ácido Octadecatetraenoico (omega 3) C18:4n3	1.54
Ácido Eicosadienoico (Omega 6) C20:2n6	0.18
Ácido Eicosatrienoico (Omega 6) C20:3n6	0.16
Ácido Araquidonico (Omega 6) C20:4n6	2.04
Ácido Eicosatrienoico (Omega 3) C20:3n3	0.12
Ácido Eicosatetraenoico (Omega 3) C20:4n3	0.59

Ácido Docosenoico C22:1n11+9	< 0.1
Ácido Heneicosapentaenoico (Omega 3) C21:5n3	0.55
Ácido Docosatetraenoico (Omega 6) C22:4n6	< 0.1
Ácido Docosapentaenoico (Omega 6) C22:5n6	0.44
Ácido Docosapentaenoico (Omega 3) C22:5n3	2.2
Ácido Eicosapentaenoico (Omega 3) C20:5n3 (EPA)	16.74
Ácido Docosahexaenoico (Omega 3) C22:6n3 (DHA)	13.67
EPA+DHA	30.41
No identificados	7.95
Omega 3	36.37
Omega 6	4.02
Ácido Eicosenoico (Cis 11) C20:1n9 (omega 9)	1.15
Ácido Erucico C22:1 (omega 9)	< 0.1
Ác. grasos poliinsaturados totales	42.6

*Resultados de análisis cromatógrafico.

En este estudio la cantidad de ácidos grasos insaturados totales presentes en el aceite crudo de pescado fue de 61.91% entre ácidos grasos monoiinsaturados (19.31%) y ácidos poliinsaturados (42.6%). En un trabajo de investigación referente a la estabilización de aceite

de pescado por medio de antioxidantes naturales se constató que en los aceites de origen marino predominó la fracción de ácidos grasos poliinsaturados, con aproximadamente un 40%, respecto de la fracción de ácidos grasos saturados y monoiinsaturados que presentaron rangos entre 20 - 33% y 27 - 35% respectivamente. **(Méndez et al., 1996).**

Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales son los n-6 (omega-6) y los n-3 (omega-3). Ambos se denominan esenciales porque no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, de forma que su única fuente de adquisición es la dieta ingerida. Son fundamentales para el crecimiento y el desarrollo normal de nuestro cuerpo, y para el óptimo funcionamiento del cerebro, el corazón. **(Bover, 2006).**

La cantidad de EPA y DHA en el aceite crudo de pescado sin adición de antioxidante fue 16.74% y 13.67% respectivamente en comparación con **Cortez y Huerta (2015)** las concentraciones en porcentajes de EPA y DHA son de 11.389% y 1.0.125% respectivamente, la suma de ambos ácidos grasos es de 21.514%, valores que se ubican por debajo de las especificaciones de exportación, la variación del porcentaje de los ácidos grasos DHA y EPA depende de la época de captura, el nivel y tipo de alimentación, la especie dominante en la captura y las condiciones del proceso de extracción del aceite. La composición de ácidos grasos en los aceites de las especies marinas varía según la estación, el área de captura, dieta, edad y madurez sexual **(Carrizo, 1999).**

Estudios de alimentación controlada y de cohortes de ingesta de ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) han demostrado beneficios fisiológicos en la presión arterial, latido cardíaco, niveles de triglicéridos y, probablemente, inflamación, función endotelial y función diastólica cardíaca, y evidencia

consistente de riesgo reducido de CHD fatal y muerte súbita cardíaca con un consumo de alrededor de 250 mg/d de EPA más DHA **(Burr et al., 1989; Gissi-Hf., 2008)**

El DHA también desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebro y de la retina durante el desarrollo fetal y los dos primeros años de vida **(Cetin and Koletzko, 2008)** lo cual supone también una "ventana de oportunidad" para prevenir el fallo de crecimiento evitable, la desnutrición y la reducción de muerte y enfermedad, incluyendo el desarrollo de obesidad y de enfermedades no transmisibles en etapas posteriores de la vida.

Además, se ha demostrado que tanto los ácidos grasos n-6 como los n-3 tienen propiedades anti-inflamatorias protectoras de los cambios aterogénicos en las células vasculares endoteliales **(De Caterina et al., 2000).**

Con respecto a los ácidos grasos saturados en el aceite crudo de pescado el ácido palmítico fue el que mayor porcentaje presentó con 18.73%, según el perfil de ácidos grasos realizado por **Méndez et al., (1996)** en tres tipos de aceites marinos dieron valores de 16,36%, 12,22% y 18,26% de ácido Palmítico muy similares al aceite en estudio.

Los alimentos con menor contenido en ácidos grasos saturados son los aceites, siendo el aceite de girasol el que menor contenido en ácidos grasos saturados tiene, con un 12.17%, otros aceites son el de girasol (13.37%), el aceite de girasol desechado (15.15%), el aceite de pescado (15.90%), el aceite de oliva refinado (16.70%), el aceite de oliva (16.77%) **(Toledano, 2001).**

4.2. Tiempos de inducción del aceite crudo de pescado sin y con incorporación de antioxidantes naturales y sintéticos.

Para la determinación de los tiempos de inducción del aceite crudo de pescado se empleó el método Rancimat método **AOCS Cd 12b-92 (1993)**, utilizando el equipo Rancimat Metrohm 734. La muestra fue sometida a condiciones aceleradas como a diferentes temperaturas (80, 100°C y 120°C) y un flujo de aire constante de 15L/h, con el fin de oxidar y generar compuestos volátiles como peróxidos, aldehídos y cetonas.

Con el tiempo la muestra empieza a oxidarse liberando ácidos orgánicos volátiles. Una célula de conductividad examina continuamente los productos volátiles de la descomposición, quedando atrapados en el vaso medidor lleno de agua destilada. El periodo de inducción es aquel en que ocurre la aceleración rápida de la oxidación, y se registra por el número de horas. **(Viera 2005).**

TABLA N° 9: Tiempo de inducción del aceite crudo de pescado sin adición y con adición de antioxidantes.

TRATAMIENTO	MUESTRA	Periodo de inducción (horas)		
		80°C	100°C	120°C
T0	Sin antioxidante	5.10 ± 0.02a	1.04 ± 0.02a	0.19 ± 0.03a

T1	TBHQ + BHT + BHA	39.77 ± 0.01f	5.88 ± 0.08e	1.41 ± 0.01d
T2	Tocoferoles Naturales	12.54 ± 0.23d	2.00 ± 0.01b	0.22 ± 0.03a
T3	Extracto de té verde + Extracto de Romero	7.25 ± 0.02c	1.89 ± 0.16b	0.46 ± 0.00b
T4	TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales	48.45 ± 0.11g	4.98 ± 0.13d	1.08 ± 0.03c
T5	TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero	20.96 ± 0.15e	4.40 ± 0.06c	1.07 ± 0.02c
T6	Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero	6.47 ± 0.02b	1.10 ± 0.06a	0.20 ± 0.02a

*Medición promedio realizada a tres repeticiones por muestra más desviación estándar.

Según análisis de varianza con α=0.05 existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos, siendo el mejor T4 (TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales) que tuvo un tiempo de inducción a 80°C de 48.45 ± 0.11g horas, comparado con el control T0 (Sin antioxidante) cuyo tiempo de inducción a la misma temperatura fue de 5.10 ± 0.02a horas. En trabajos similares **(Méndez et al., 1996)** se encontró que la adición de TBHQ fue la que produjo la mejor protección a los tres aceites ensayados, con TI de 83,4; 117,5 y 64,6 horas para los aceites de pescado y de salmón; en su investigación, se utilizó un flujo de aire constante de 20 mL/min y una temperatura de 60 ºC, ya que a la temperatura de 110 °C que emplea el método original, los aceites marinos se oxidan muy rápidamente y además no permite establecer una diferencia entre el aceite control y el adicionado de antioxidantes.

T3 y T6 fueron significativamente iguales, debido a que en ambos se utiliza antioxidantes naturales, mientras que en los demás tratamientos se incluyen antioxidantes sintéticos. Según **Maure et al., (2001)** los antioxidantes sintéticos tienen un mayor efecto o poder en la conservación de los aceites que los antioxidantes de origen natural.

Con el fin de retrasar el proceso autoxidativo aumentando la vida útil de la materia grasa y mejorar su estabilidad, se emplean antioxidantes sintéticos o naturales. Entre los primeros, el butilhidroxianisol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT) y la terbutil hidroquinona (TBHQ) han sido los más empleados como aditivos alimentarios permitidos, debido a que son efectivos a bajas concentraciones y económicamente más rentables que los antioxidantes naturales **(Suja, 2004).**

El mejor tratamiento a temperaturas elevadas fue T1 debido a que el tiempo de inducción fue de 1.41 ± 0.01d horas a 120°C. El TBHQ por su poder captador de electrones se usa como inhibidor de las reacciones de polimerización por mecanismo de radicales y como antioxidante. Algunos derivados son antioxidantes alimentarios que se utilizan para evitar el enrancimiento de las grasas, el cual también transcurre por mecanismo de radicales. **(Primo, 1996).**

El TBHQ es un antioxidante sintético que también se utiliza en aceites vegetales comerciales. Su mayor estabilidad a las altas temperaturas y la menor volatilización hacen de él un antioxidante para aceites de fritura más adecuado que la asociación BHA-BHT. **(Viera, 2005).**

El tiempo de inducción para el tratamiento T0 (Sin antioxidante) a un flujo de aire constante de 15L/h y a las temperaturas de 80°C ,100°C y 120°C fue de 5.10 ± 0.02a horas, 1.04 ± 0.02a horas y 0.19 ± 0.03a horas respectivamente. Comparado con valores de tiempo de inducción (OSI) del aceite de Sacha Inchi 0,49 ± 0,01h a 110 ºC, 1,59 ± 0,06h a 100 ºC, 4,64 ± 0,1h a 90 ºC y 20,51 ± 0,02h a 80 ºC a un flujo de aire constante de 15L/h. **(Rodríguez et al., 2015),** se puede observar que el aceite de pescado es más inestable debido a la gran cantidad de dobles enlaces que presenta por tanto requiere de la acción de un antioxidante para su conservación. Los aceites de origen marino son las materias grasas más inestables por dos razones: carecen de protección natural a diferencia de

los aceites vegetales y son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente aquellos de la familia omega-3 como el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) que por su estructura son altamente sensibles a sufrir este deterioro oxidativo tanto primario como secundario, desarrollándose estos sabores y olores indeseados a muy bajos niveles de oxidación esto se debe principalmente a la presencia de los numerosos dobles enlaces de estructura metileno interrumpida (activos), distribuidos en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos de cadena larga con 20 a 22 átomos de carbono, los cuales son blanco del ataque de especies reactivas del oxígeno **(Boran et al.,2006).**

Los tratamientos T2, T3 y T6 que solo contiene antioxidantes naturales como tocoferoles naturales y extractos de romero y té verde, presentaron tiempos de inducción bajos a 80°C de 12.54 ± 0.23d h, 7.25 ± 0.02c h y 6.47 ± 0.02b h, frente a los tratamientos T1, T4 y T5 con adición de los antioxidantes sintéticos los cuales fueron de 39.77 ± 0.01f, 48.45 ± 0.11g y 20.96 ± 0.15e h. Al adicionar los antioxidantes de origen natural y sintético se puede notar el incremento de los tiempos de inducción notoriamente lo cual confirma la protección de estos antioxidantes en la materia prima. Según **Cortez y Huerta, (2015)** el tiempo de inducción para el ACP industrial especie de anchoveta de la muestra control sin antioxidante a 80°C, 90°C y 100°C a un flujo de aire de 10L/h resultó 6.65h, 3.29h y 1.61h respectivamente.

Según estudios realizados con distintos antioxidantes (sintéticos y naturales) fueron aplicados en aceite de pescado y su estabilidad oxidativa fue analizada durante un período de 25 días a una temperatura de 24-26ºC, sin exposición a la luz. Los análisis del índice de la estabilidad oxidativa (OSI) fueron realizados a una temperatura de 80ºC y el aceite de pescado sin antioxidante, presentaron una estabilidad de 7,05h. La

inclusión del antioxidante sintético TBHQ a una dosis de 200 ppm, resultó en una estabilidad de 21,83h. Y la inclusión de una mezcla de extractos de romero y té verde resultó en una estabilidad de 19,93 h, muy cercanas a la performance del antioxidante sintético. **(QSI, 2016).**

Además, el producto natural con base en los extractos de romero y té verde presentó resultados más positivos (valores más bajos) cuando lo comparamos con el tratamiento con TBHQ para los niveles de peróxidos (compuestos primarios de la oxidación) y alquenal (compuesto de la oxidación secundaria). **(QSI, 2016)**

Se cuenta con datos referenciales en ensayos realizados al aceite del hígado de bacalao a flujo de aire de 10 L/h y temperaturas de 80 y 90°C cuyos tiempos de inducción fueron 4.22 y 1.97h respectivamente **(García et. al 2013)**, asimismo se determinó el Tiempo de inducción (5.4h) al aceite de hígado de merluza en condiciones de 8.3 L/h y 70°C **(Rodríguez et. al 1993)**.

Tiempos de inducción para aceite de salmón (36.4 h) y aceites de pescado procedentes de ,la pesca industrial (18.9 h y 11.7 h) determinados a 60°C y 20 L/h **(Méndez et. al 1996),** se explicaría las diferencia en la estabilidad al tipo de materias primas empleadas en la dieta de engorde que reciben los salmones en cautiverio **(Watanabe el al 1981)** y la alimentación natural de los peces, basada en algas y placton, fuentes importantes de tocoferoles **(Abd ElBaky et. al 2004).**

Resultados encontrados en estudios que adicionaron extracto de romero (1000ppm) a aceite de sardina a 40°C mostraron una efectividad mayor con respecto al uso de BHT**(Pizzocaro et al. 1985),** y este comportamiento se presentó cuando se adicionó extracto de té verde sin clorofila a aceites marinos a 65°C, observándose un importante efecto

frente al deterioro oxidativo **(Wanasundara et al. 1998)**, con ello se corrobora la baja efectividad del BHT, causando por su volatilización, siendo en muchos casos preparados naturales utilizados en altas concentraciones quienes muestran mayor eficiencia antioxidante a altas temperaturas.

En estudios de estabilidad oxidativa de aceite de hígado de merluza **(Rodríguez 1993)** el TBHQ es más efectivo a la concentración máxima permitida (0,02%) y aún a menor concentración (0,01%), que los demás antioxidantes ensayados, para ello se determinó el periodo de inducción (horas) en el Rancimat (70° O, flujo de aire 8,3 l/h y 5 gramos de muestra). Los antioxidantes usados fueron BHT, BHA, TBHQ, palmitato de ascorbilo (PA) y galato de propilo (GP) y los preparados comerciales Ronoxan A, Tocomix D y Antracine 220, siendo antioxidante más eficiente fue TBHQ en la concentración de 0.02% (aumentando el periodo de inducción 6,5 veces respecto al aceite sin antioxidantes). Los antioxidantes naturales no mejoraron significativamente la estabilidad oxidativa del aceite, utilizados en la concentración de 0,02%.

Por lo otro lado **(Méndez et al, 1996)** realizo un trabajo acerca de la estabilización de aceite de pescado por medio de antioxidantes naturales en la cual comparo con un antioxidante sintético TBHQ a una concentración de 200ppm se encontró que la adición de TBHQ fue la que produjo la mejor protección a los tres aceites ensayados, con TI de 83,4; 117,5 y 64,6 horas para los Aceites 1 (Pescado); 2 (Salmón) y 3 (Pescado) respectivamente a una temperatura de 60°C.

Según **Méndez et al., (1996)** en ensayos realizados a 30 ºC en aceite de sardina adicionado con α- tocoferol (0,02%) y extracto de romero (0,02%) se observó un fuerte sinergismo entre ambos antioxidantes y un aumento significativo en el tiempo de inducción del aceite adicionado con los antioxidantes señalados con respecto al control. Otros autores **(Nieto et al, 1993)** adicionaron catequinas, morina y quercetina a aceites de

sardina a 60 ºC mostrando un importante efecto antioxidante de estos polifenoles, los cuales fueron comparables con α- tocoferol. Por otra parte, los resultados encontrados en estudios que adicionaron extracto de romero (1%) a aceite de sardina a 40 ºC mostraron una efectividad mayor con respecto al uso de BHT **(Pizzocaro et al, 1985**) y este mismo comportamiento se presentó cuando se adicionó un extracto de té verde sin clorofila a aceites marinos a 65 ºC, observándose un importante efecto frente al deterioro oxidativo.

4.2.1. ANOVA de los tiempos de inducción del aceite crudo de pescado sin y con incorporación de antioxidantes naturales y sintéticos a diferentes temperaturas

Los resultados del ANOVA presentados en el TABLA N°10, muestra que el valor P de la prueba F es menor que 0.05, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de TIEMPO DE INDUCCIÓN A 80°C entre un nivel de TRATAMIENTOS y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

TABLA N° 10: ANOVA del tiempo de inducción a 80°C a los distintos tratamientos de antioxidantes.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P

Entre grupos	5474.9	6	912.483	71287.76	0.0000
Intra grupos	0.1792	14	0.0128		
Total (Corr.)	5475.08	20			

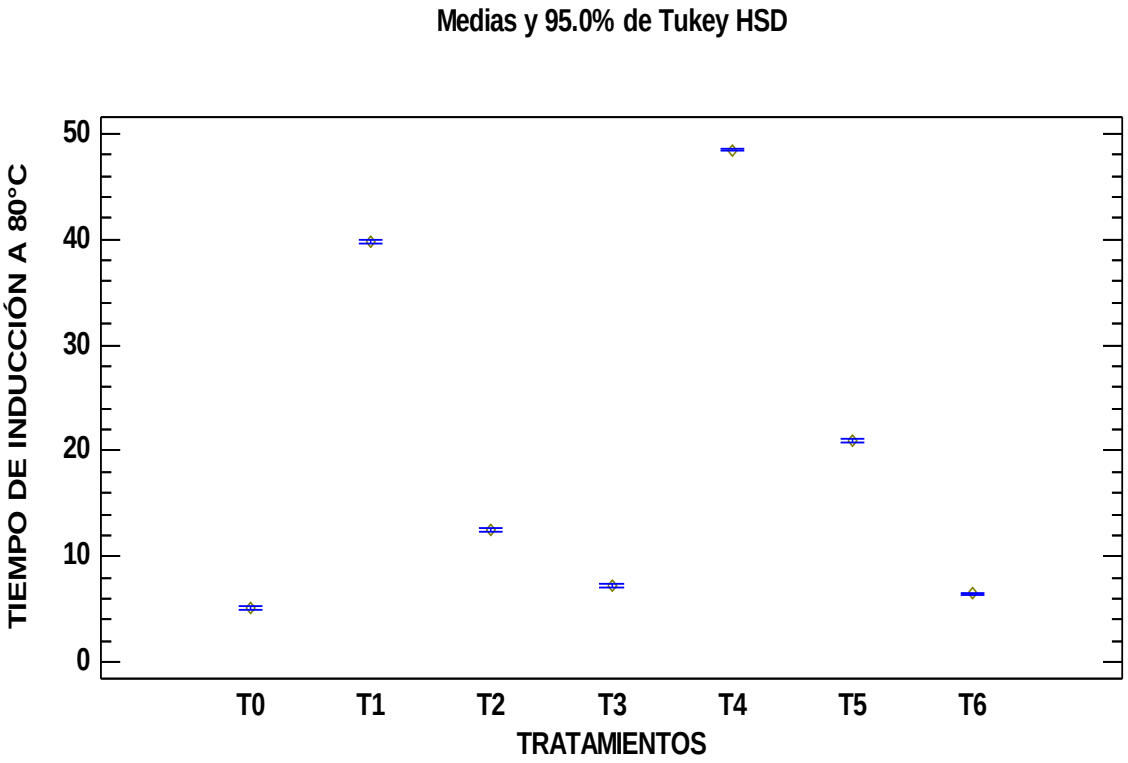


FIGURA N° 19: Grafico de medias y 95% de Tukey HSD en Statgraphics Centurión XVI.I

Mediante el análisis de varianza ANOVA a 80°C y la prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey los tiempos de inducción de los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4, T5 y T6 son estadísticamente diferentes.

TABLA N° 11: La prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey al 95%.

TRATAMIENTOS	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
T0	3	5.09667	a
T6	3	6.46667	b
T3	3	7.24667	c
T2	3	12.5433	d
T5	3	20.96	e
T1	3	39.7733	f
T4	3	48.4533	g

Los resultados del ANOVA presentados en el TABLA N°11, muestra que el valor P de la prueba F es menor que 0.05, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de TIEMPO DE INDUCCIÓN a 100°C entre un nivel de TRATAMIENTOS y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

TABLA N° 12: ANOVA del tiempo de inducción a 100°C a los distintos tratamientos de antioxidantes.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P
Entre grupos	71.4579	6	11.9096	1496.72	0.0000
Intra grupos	0.1114	14	0.00795714		
Total (Corr.)	71.5693	20			

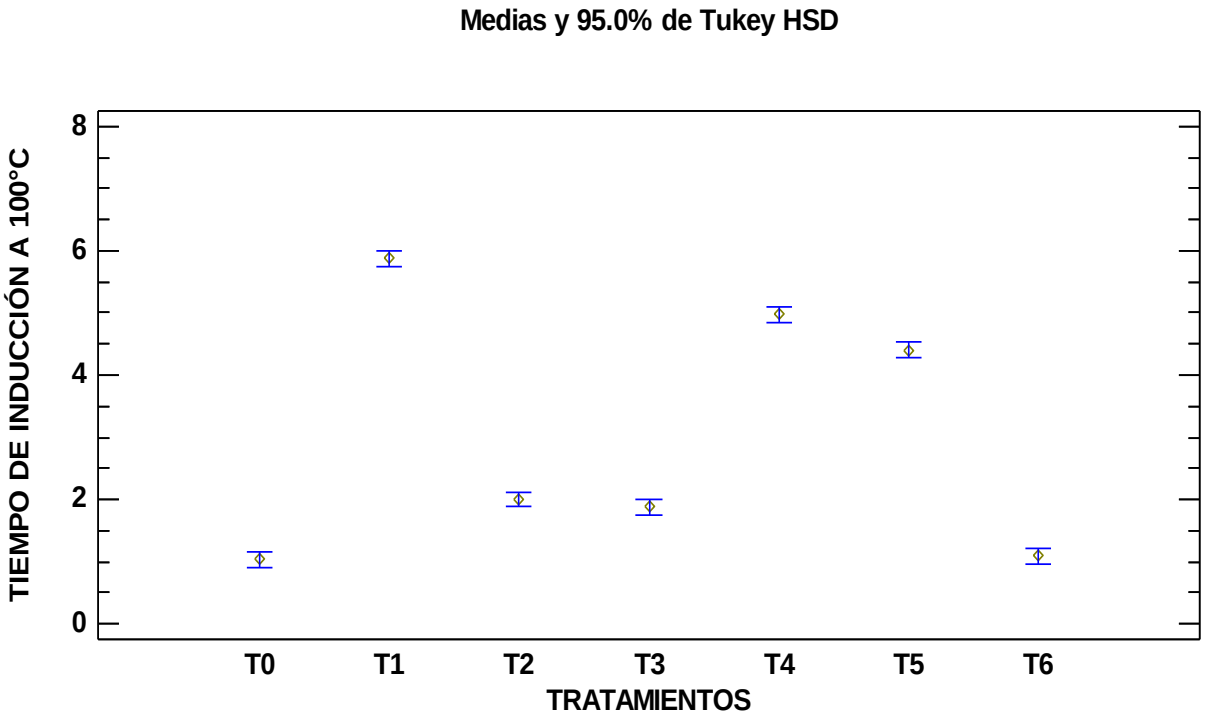


FIGURA N° 20: Grafico de medias y 95% de Tukey HSD en Statgraphics Centurion XVI.I.

Según la prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey los tiempos de inducción de los tratamientos T0 y T6 tiene grupos de medias iguales, de igual manera T3, T2, lo contrario T5, T4 y T1 tienen grupos medias diferentes.

TABLA N° 13: La prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey al 95%.

TRATAMIENTOS	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
T0	3	1.04	a
T6	3	1.09667	a
T3	3	1.88667	b
T2	3	2.00333	b
T5	3	4.39667	c
T4	3	4.97667	d
T1	3	5.87667	e

El ANOVA presentado en el TABLA N°13, muestra que el valor P de la prueba F es menor que 0.05, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de TIEMPO DE INDUCCIÓN A 120°C entre un nivel de TRATAMIENTOS y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

TABLA N° 14: ANOVA del tiempo de inducción a 120°C a los distintos tratamientos de antioxidantes.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón F	Valor P

Entre grupos	4.72518	6	0.78753	1968.83	0.0000
Intra grupos	0.0056	14	0.0004		
Total (Corr.)	4.73078	20			

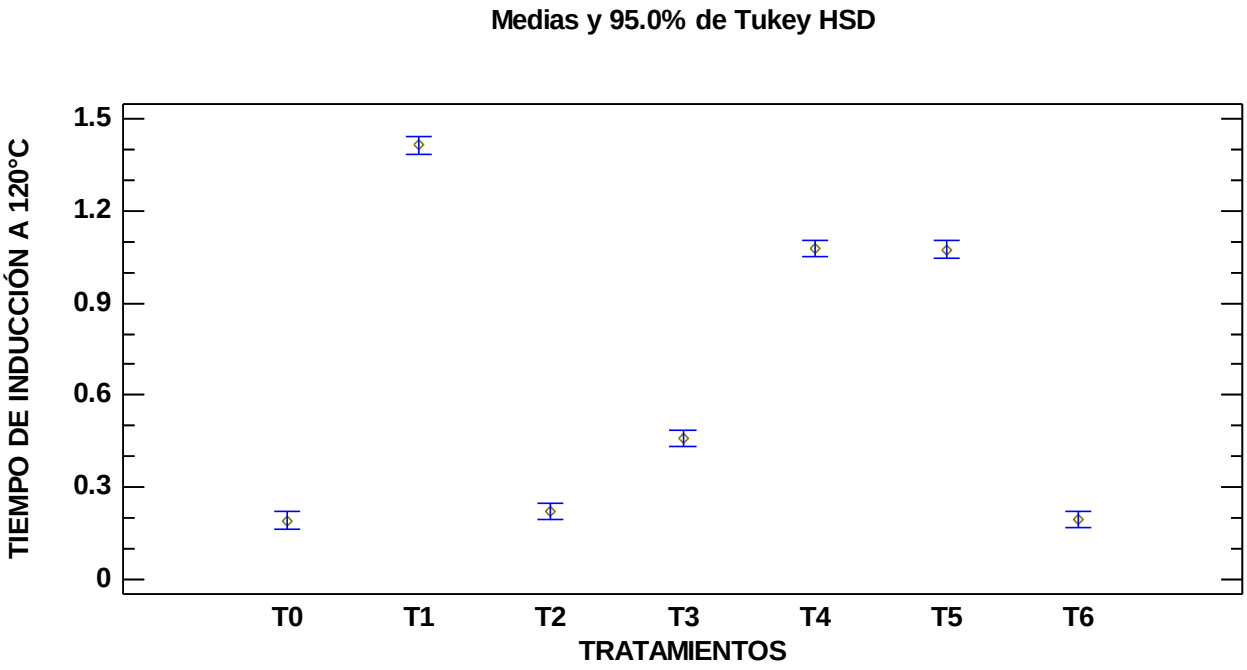


FIGURA N° 21: Grafico de medias y 95% de Tukey HSD en Statgraphics Centurion XVI.I.

Según la prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey los tiempos de inducción de los tratamientos T0, T6 y T2 tiene grupos de medias iguales, de igual manera T5 y T4, lo contrario T3, T4 y T1 tienen grupos de medias diferentes.

TABLA N° 15: La prueba de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey al 95%.

TRATAMIENTOS	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
T0	3	0.193333	a
T6	3	0.196667	a
T2	3	0.223333	a
T3	3	0.46	b
T5	3	1.07333	c
T4	3	1.07667	c
T1	3	1.41333	d

4.3. Análisis de Varianza (ANOVA)

El TABLA N° 16, muestra los resultados en cuanto al índice de estabilidad oxidativa, donde los factores temperatura y antioxidante tienen diferencias altamente significativa a un nivel de significancia del 5%, ya que los valores P, resultaron ser menores a 0.05 ($p<0.05$) y también menores a 0.01 ($p<0.01$) estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el OSI con un 95,0% de nivel de confianza.

TABLA N° 16: Análisis de Varianza (ANOVA)

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P

EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	2105.96	6	350.993	6.55	0.0000
B:TEMPERATURA	5448.03	2	2724.02	50.83	0.0000
RESIDUOS	2893.78	54	53.5885		
TOTAL (CORREGIDO)	10447.8	62			

En estudios recientes acerca de la influencia de los parámetros del Test Rancimat sobre la determinación del índice de estabilidad oxidativa de aceite de hígado de bacalao, utilizando flujos de aire de (10, 15, 20 y 25 Llh) y temperaturas de (60, 70, 80 y 90°C) se concluyó mediante el análisis de varianza (ANOVA) el valor de OSI es altamente dependiente de los efectos lineales de temperatura y flujo de aire, ,con probabilidades ,$p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente. **García et al., (2013).**

4.4. Mecanismo de acción de los antioxidantes.

La acción antioxidante del BHT es similar a la de la vitamina E: dona eficientemente un átomo de hidrógeno a un radical peroxi o alcohoxi, interfiriendo con la propagación de la peroxidación lipídica **(López, 1996),**

Rajalakshmi y Narasimhan, (1996) mencionan que la actividad de un antioxidante se incrementa con la sustitución con grupos dadores de electrones, dentro de ellos, los tocoferoles, BHT, BHA Es importante resaltar que, por muy alta que sea la eficiencia del antioxidante como dador de electrones (BHT) al ser sometido a la termoxidación en el Rancimat, este se volatilizará produciendo una baja efectividad algo que no sucedió en este trabajo.

El antioxidante cede átomos de hidrógeno o electrones a radicales libres(-R), peróxidos (ROO-), o alguna especie oxidante (aquellos producidos durante la primera etapa de oxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite de pescado) convirtiéndoles en productos más estables. **(Rojano et al., 2008)**. Los antioxidantes se convierten en radicales mucho menos reactivos debido a su capacidad de estabilizar por deslocalización el electrón desapareado sobre su estructura **(Yanishlieva y Marinova, 2001).**

Un antioxidante primario es un compuesto fenólico, una fenilamina o cualquier sustancia que contenga al menos un grupo hidroxilo, tiol o amino, unido a un anillo bencénico. El papel de un antioxidante es interrumpir la segunda etapa de la cadena de propagación de oxidación de lípidos mediante la reacción con un peróxido (ROO-), cualquier radical libre (R-) o especie oxidante por transferencia de un átomo de hidrógeno o por transferencia de un electrón **(Rojano et al. 2008**). Un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de una molécula inestable de un radical libre sin perder su propia estabilidad electroquímica. Existen antioxidantes de tipo sintético utilizados para preservar los alimentos de consumo humano y animal, como el Butilhidroxianisol (BHA), el Butilhidroxitolueno (BHT), el

Propilgalato (PG), el ButilHidroxiquinona terciaria (TBHQ) y los Tocoferoles sintéticos, entre otros **(Moure et al. 2001).**

De igual forma, existen antioxidantes naturales como las vitaminas C, E y A y los carotenoides, y otros de naturaleza fenólica como las isoflavonas, ácidos fenólicos, polifenoles, catequinas,ésteres fenólicos, el ácido carnósico, el ácido rosmárico, bioflavonoides, chalconas, quercetina y camferol, entre otros **(Avello y Suwalsky 2006)**. La selección de un antioxidante debe estar basada en el tipo de grasa o aceite que se esté usando y en factores de la producción como el costo, eficacia, condiciones de procesamiento, disponibilidad, conveniencia, estabilidad, seguridad, tipo de animal a ser alimentado y las preferencias del consumidor **(Herrera & Zambrano 2005)**. Los radicales libres consumieron los antioxidantes empleados en los diferentes tratamientos de esta investigación los cuales fueron efectivos y de gran poder antioxidante debido a que la muestra inicial estaba en la etapa de iniciación esto se comprobó mediante el análisis fisicoquímico realizado.

4.5. Efectos de los antioxidantes en los parámetros fisicoquímicos del aceite crudo de pescado.

Al adicionar los antioxidantes de origen natural y sintético hubo una mejora en los parámetros fisicoquímicos.

TABLA N° 17: Parámetros Fisicoquímicos de los tratamientos.

PARAMETROS FISICOQUIMICOS DE LOS TRATAMIENTOS*

TRATAMIENTO	MEZCLA	%AGL	%H/S	I.A	I.PEROX	TOTOX
T0	Sin antioxidante	2.53 ± 0.02	0.05 ± 0.05	6.85 ± 0.15	1.12 ± 0.50	9.09 ± 0.05
T1	TBHQ + BHT + BHA	2.20 ± 0.05	0.01 ± 0.11	2.15 ± 0.05	1.01 ± 0.01	4.17 ± 0.05
T2	Tocoferoles Naturales	2.21 ± 0.01	0.01 ± 0.25	3.20 ± 0.03	1.03 ± 0.05	5.26 ± 0.16
T3	Extracto de té verde + Extracto de Romero	1.87 ± 0.05	0.01 ± 0.01	4.19 ± 0.15	0.99 ± 0.15	6.17 ± 0.05
T4	TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales	2.21 ± 0.01	0.01 ± 0.25	3.32 ± 0.05	1.04 ± 0.10	5.40 ± 0.20
T5	TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero	2.19 ± 0.03	0.01± 0.05	3.19 ± 0.01	1.05 ± 0.01	5.29 ± 0.03
T6	Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero	2.45 ± 0.05	0.01 ± 0.01	4.10 ± 0.05	1.09 ± 0.02	6.28 ± 0.05

*Medición promedio realizada a tres repeticiones por muestra más desviación estándar.

Como demuestra el TABLA N° 17, los valores de acidez %, índice de anisidina y peróxido han sufrido una reducción del % de acidez de 2.53% a 1.87%, índice de anisidina de 6.85 a 2.15 y el índice de peróxido de 1.12 a 0.99 lo que indica que con el poder antioxidante de cada tratamiento está estabilizando el producto.

Según **(Barrera 1998).** La aplicación de antioxidantes, debe ser decidida después que las otras formas de aumentar la estabilidad se hayan revelado ineficientes para alcanzar las metas propuestas, siempre llevando en cuenta que: Un antioxidante no mejora el sabor de aceites o grasas de baja calidad, no mejora un aceite rancificado, no evita el crecimiento bacteriano, no evita la rancidez hidrolítica y menos evita la reversión.

4.6. Eficiencia de los antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite crudo de pescado.

TABLA N° 18: Eficacia de los antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite crudo de pescado.

TRATAMIENTO	MEZCLA	EFICIENCIA DEL ANTIOXIDANTE			PROMEDIO
		80°C	100°C	120°C	
T0	Sin antioxidante	1.00	1.00	1.00	1.00
T1	TBHQ + BHT + BHA	9.65	5.65	7.42	7.57
T2	Tocoferoles Naturales	2.46	1.92	1.16	1.85
T3	Extracto de té verde + Extracto de Romero	1.42	1.82	2.42	1.89
T4	TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales	6.14	4.79	5.68	5.54
T5	TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero	4.11	4.23	5.63	4.66
T6	Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero	1.27	1.06	1.05	1.13

En el TABLA N°18, muestra la eficiencia de los distintos tratamientos según lo calculado lidera el antioxidante sintético, el orden de eficiencia de forma descendente es T1 > T4 > T5 > T3 > T2 > T6 > T0.

Según **(Rodríguez et al., 1993)** los efectos inhibitorios de varios antioxidantes sobre el aceite de hígado de merluza, determinados por el método Rancimat, a la concentración de 0,02% de antioxidante su orden de eficiencia fue TBHQ > GP > BHA > BHT > PA > tocoferoles. TBHQ aumenta 6,5 veces el periodo de inducción del aceite y el siguiente en la escala, GP, sólo 2,6 veces. Demostrando la gran eficiencia del antioxidante sintético.

Es importante enfatizar el empleo de un antioxidante sintético puede ser más económico que uno natural, por ser tan efectivo a bajas concentraciones, sin embargo teniendo en cuenta el creciente uso de antioxidantes para estabilizar aceites de pescado en alimentos y productos farmacéuticos destinados a grupos humanos y animales es recomendable el empleo de antioxidantes naturales por no mostrar efectos secundarios a largo plazo **(Méndez C. et al., 1996).**

.

V. Comportamiento del Aceite Crudo de pescado y la adición de antioxidantes sintéticos y naturales en la Prueba Rancimat.

Gordon (2001) Explica que la curva de inducción para la oxidación de la mayoría de los aceites de pescado crudos resulta considerablemente aplanada, sin el pronunciamiento descenso que se aprecia al final del periodo de inducción, aun con el empleo de antioxidantes, ya que la adicción de estos después de terminado este periodo tiende a ser ineficaz en retardar el desarrollo de la rancidez.

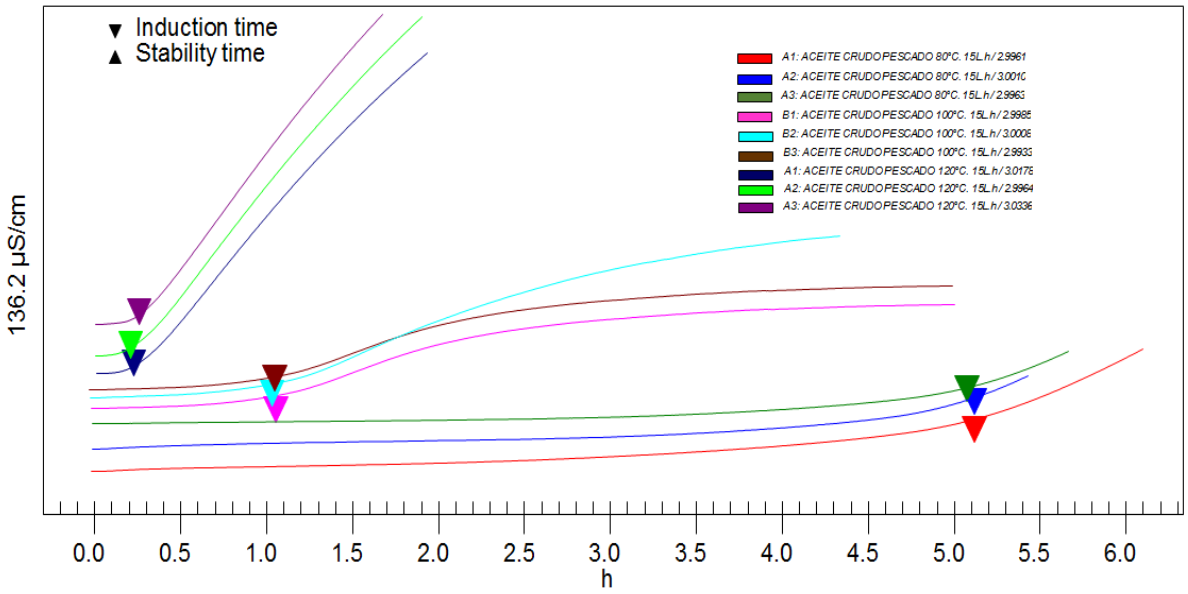


FIGURA N° 22: Tiempos de inducción del aceite crudo de pescado en el Rancimat a 80°C, 100°C y 120°C.

Evidentemente la temperatura ejerció el efecto más importante sobre los valores de OSI en el aceite evaluado, lo cual era de esperarse ya que es conocido que la velocidad de las reacciones químicas tiende a duplicarse por cada 10 °C de aumento de la temperatura a la cual ellas ocurren. **(Navas, 2010).**

Este comportamiento podría atribuirse a la aceleración producida en la descomposición de hidroperóxidos de lípidos. **(Frankel, 1998).** Por lo tanto, los valores más altos de OSI se obtuvieron a medida que la temperatura decrece en orden de: 120, 100, y 80 °C. **(Figura n°22).**

El tiempo requerido para producir un aumento repentino de la conductividad debido a la formación de ácidos volátiles, principalmente ácido fórmico, determina el índice de estabilidad oxidativa (OSI), que se puede definir como una medida de la resistencia a la oxidación de una grasa o aceite. Además, estudios previos han demostrado la correlación existente entre los datos de estabilidad obtenidos por el test Rancimat y las determinadas por otros métodos sensoriales y/o analíticos**. (Farhoosh, R. 2007).**

4.7. Determinación de la vida útil.

El TABLA N° 19, muestra los valores de la extrapolación de la vida útil a temperatura de 25°C (T ambiente) la cual señala una fuerte influencia de los flujos de aire sobre la extrapolación del OSI de aceite crudo de pescado 25°C.

TABLA N° 19: Valores de la extrapolación a 25°C.

TRATAMIENTO		A	B	r2	Tiempo (h)	Tiempo (Meses)
T0	**Sin antioxidante**	3604.1	-0.082	0.9997	463.97	0,6
T1	**TBHQ + BHT + BHA**	53371	-0.089	0.9873	5767.67	7,92
T2	**Tocoferoles Naturales**	41987	-0.101	0.9974	3361.41	4,56
T3	**Extracto de té verde + Extracto de Romero**	1818.2	-0.069	0.9998	323.95	0,48
T4	**TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales**	25012	-0.084	0.9972	3062.88	4,2
T5	**TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero**	7793.4	-0.074	0.9991	1225.41	1,68
T6	**Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero**	6695.7	-0.087	0.9999	760.69	1,08

La vida útil de las grasas y aceites comestibles en condiciones ambientales se estima mediante el trazado del logaritmo de los resultados de la estabilidad a la oxidación frente a altas temperaturas y extrapolando a la temperatura ambiente. Se ha demostrado que la extrapolación de los valores Rancimat (índice de estabilidad oxidativa, OSI) a condiciones ambientales conducen a cualquiera de exceso o déficit de la predicción de la vida de anaquel real, dependiendo de la composición de ácidos grasos de los aceites. **(Kaya et al., 1993).**

Debido a su contenido rico en ácidos grasos insaturados, el aceite crudo de pescado es susceptible al deterioro y tienen una vida útil relativamente baja (comparada con aceites refinados comerciales). Sin embargo, su consumo es necesario, pues el cuerpo humano es capaz de producir todos los ácidos grasos que necesita, excepto dos: el ácido linoléico (LA), un ácido graso omega-6, y el ácido alfa-linolénico (ALA), un ácido graso omega-3, ambos son necesarios para el crecimiento y la reparación de las células y además pueden utilizarse para producir otros ácidos grasos (Ácido Araquidónico) **(Davidson et al., 2004)**

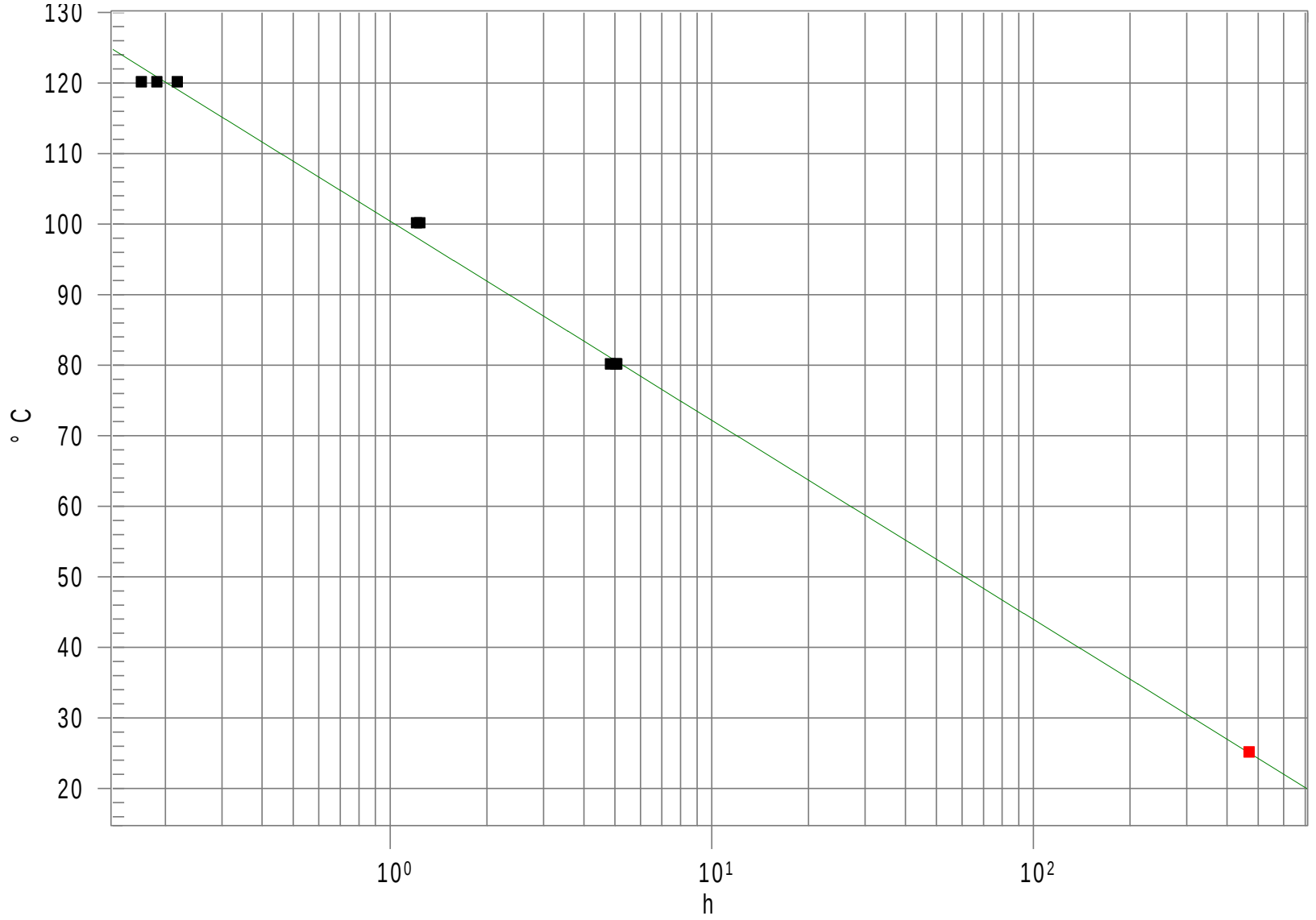


FIGURA N° 23: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T0.

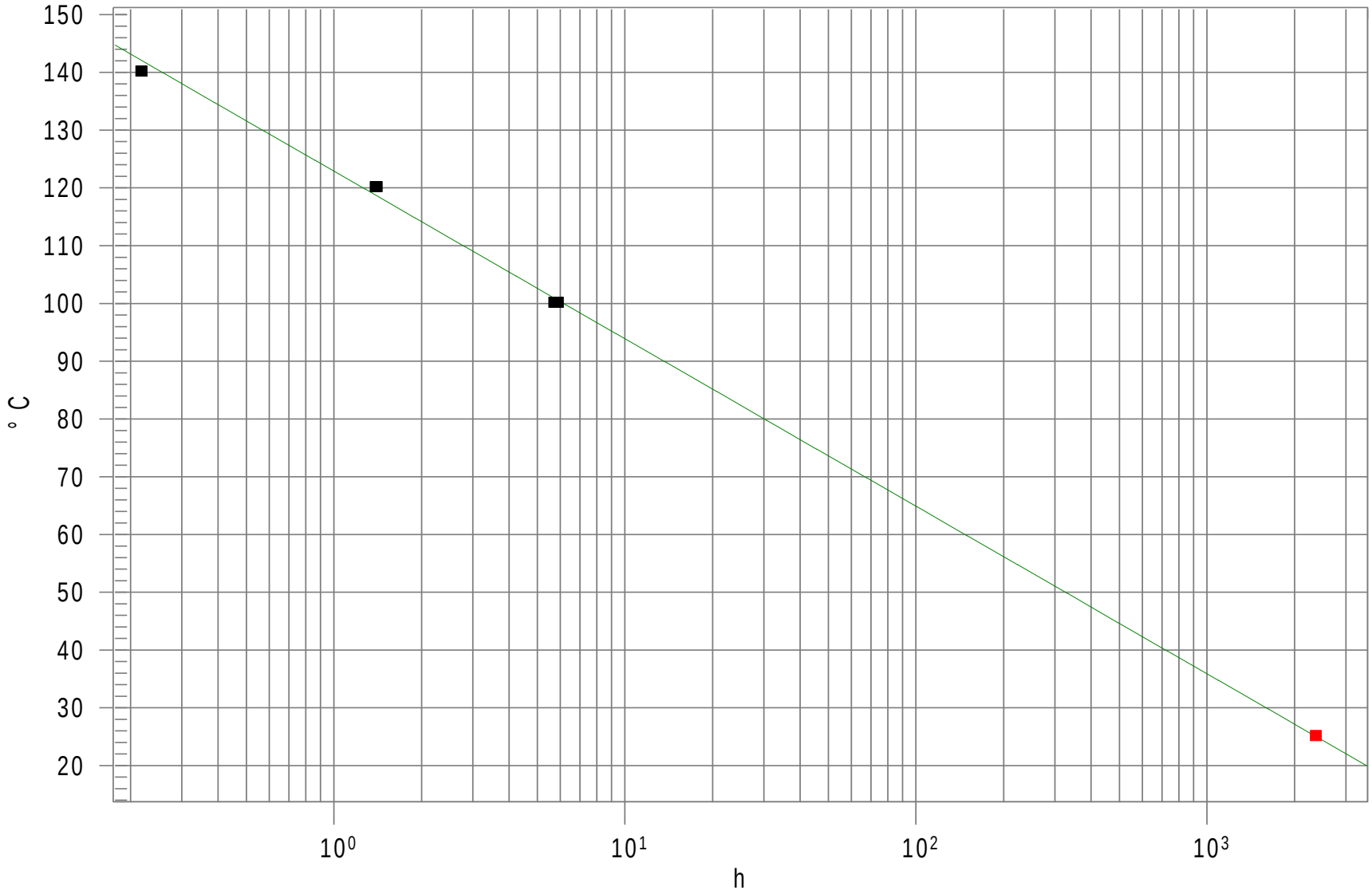


FIGURA N° 24: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T1.

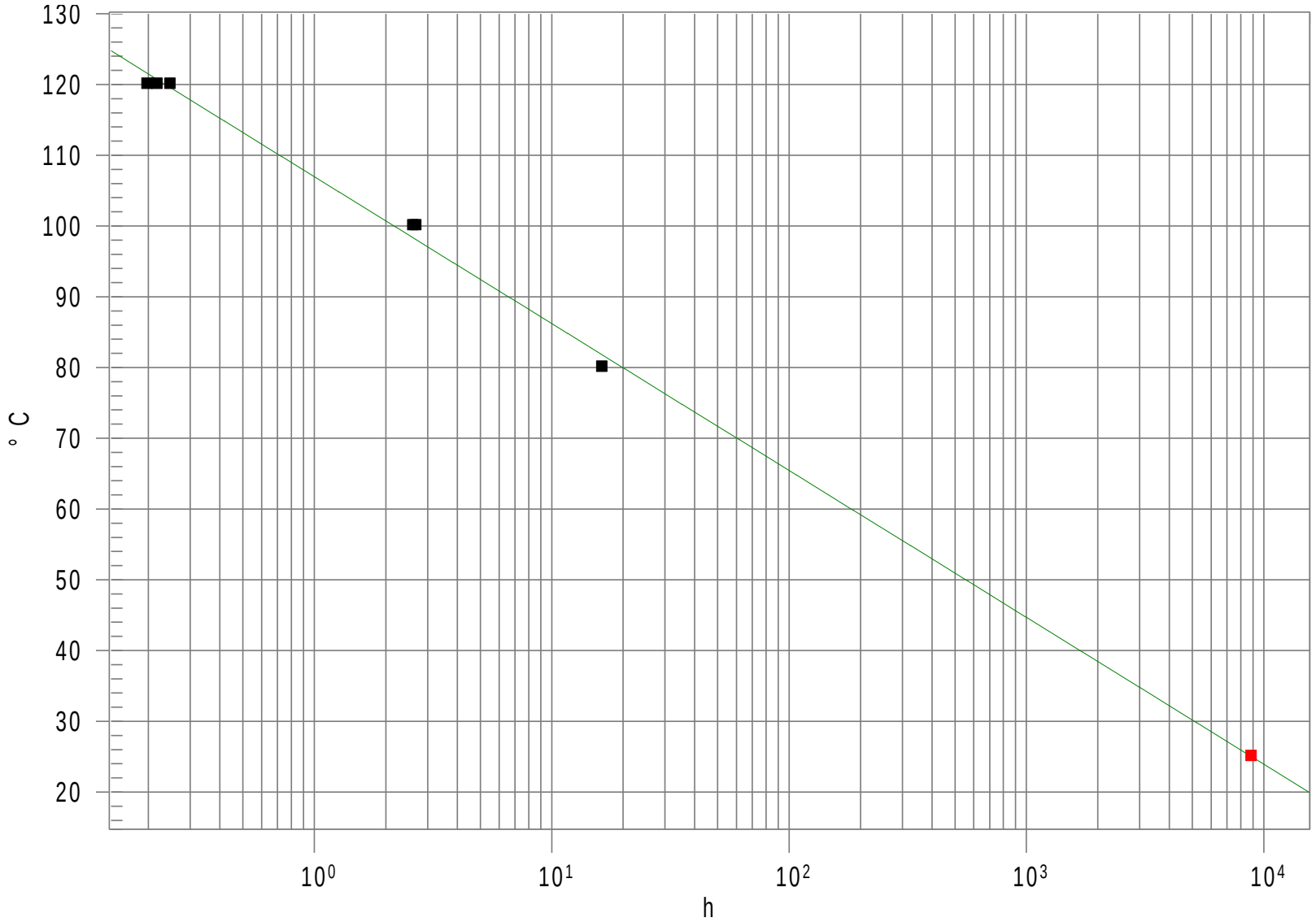


FIGURA N° 25: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T2.

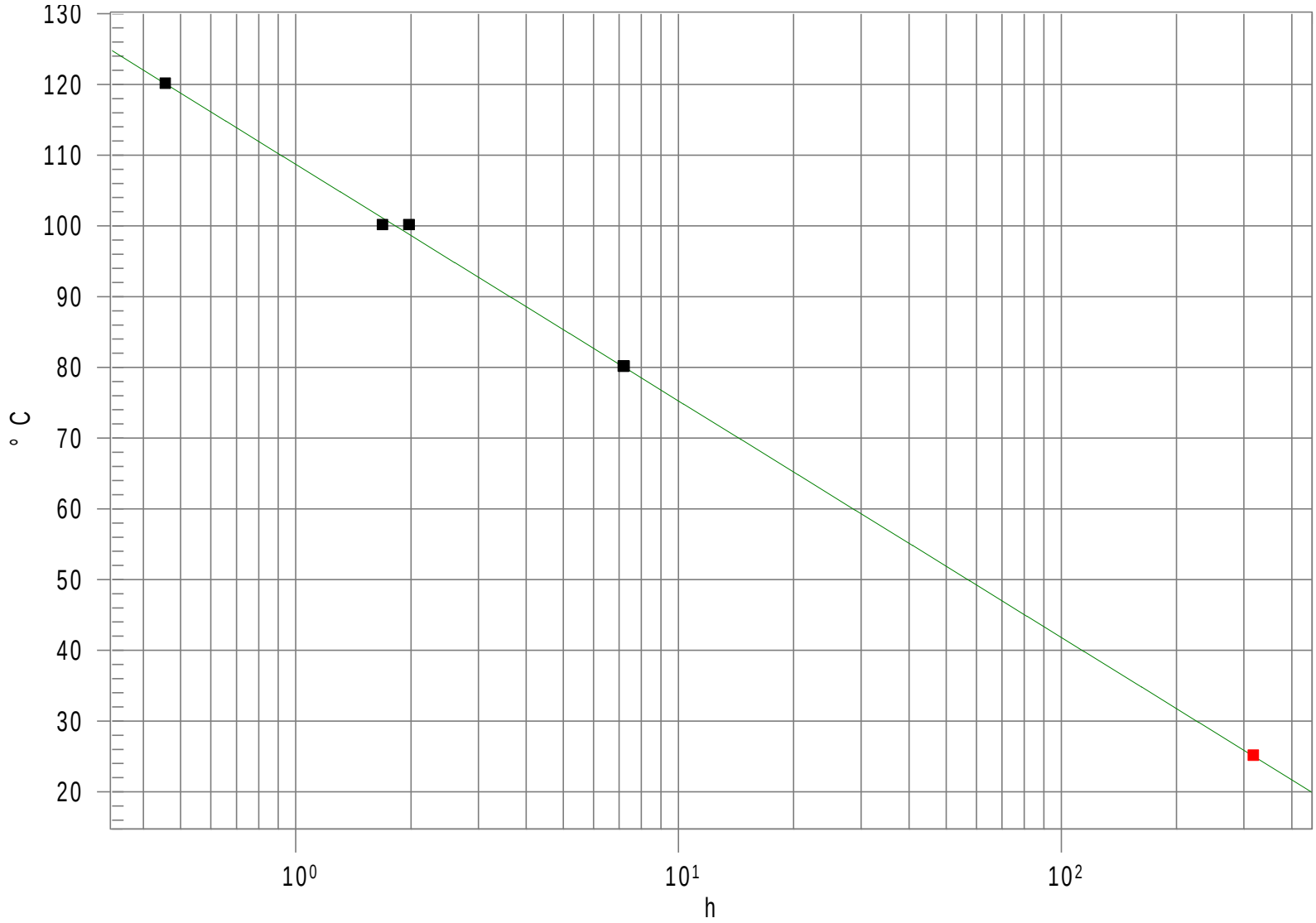


FIGURA N° 26: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T3.

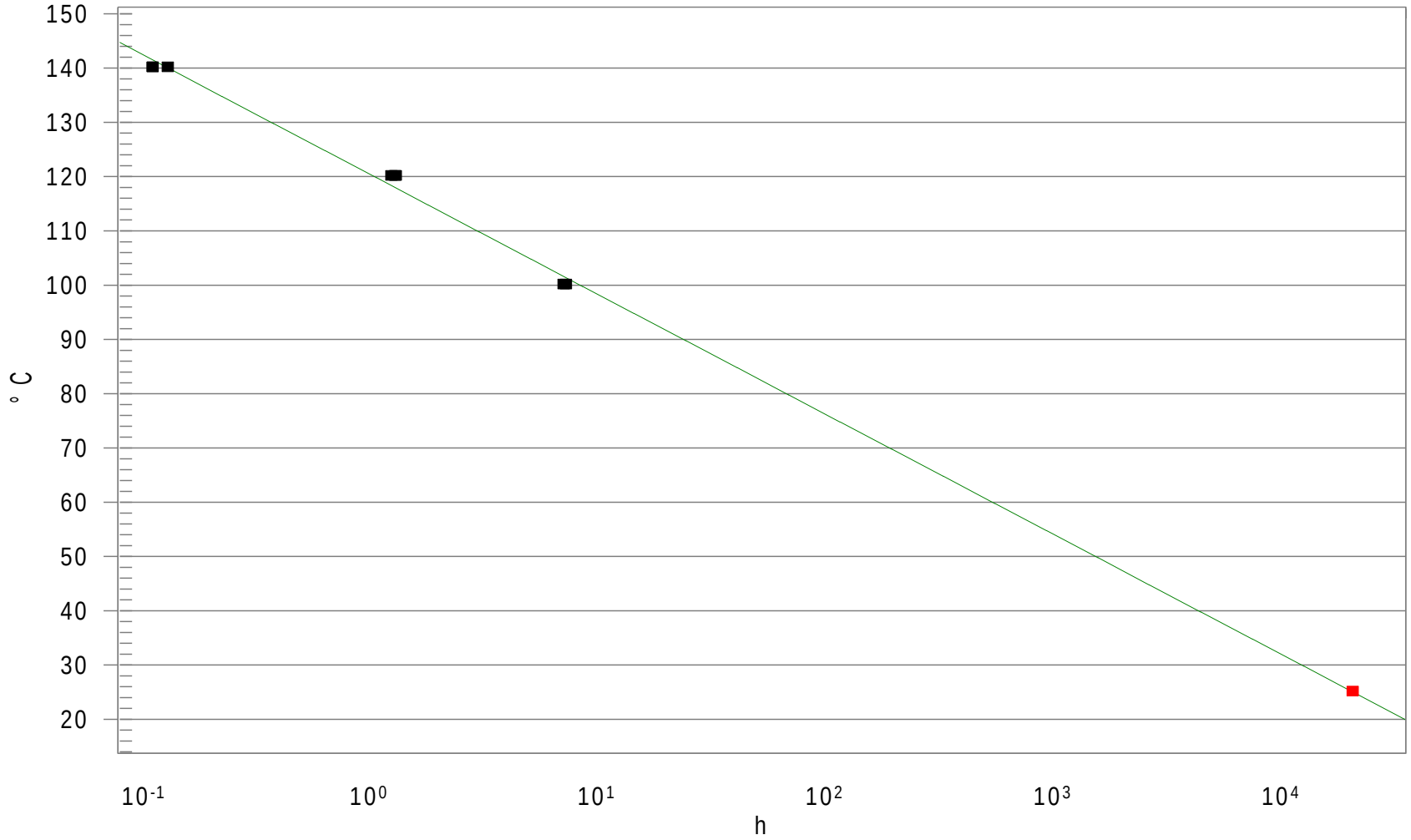


FIGURA N° 27: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T4.

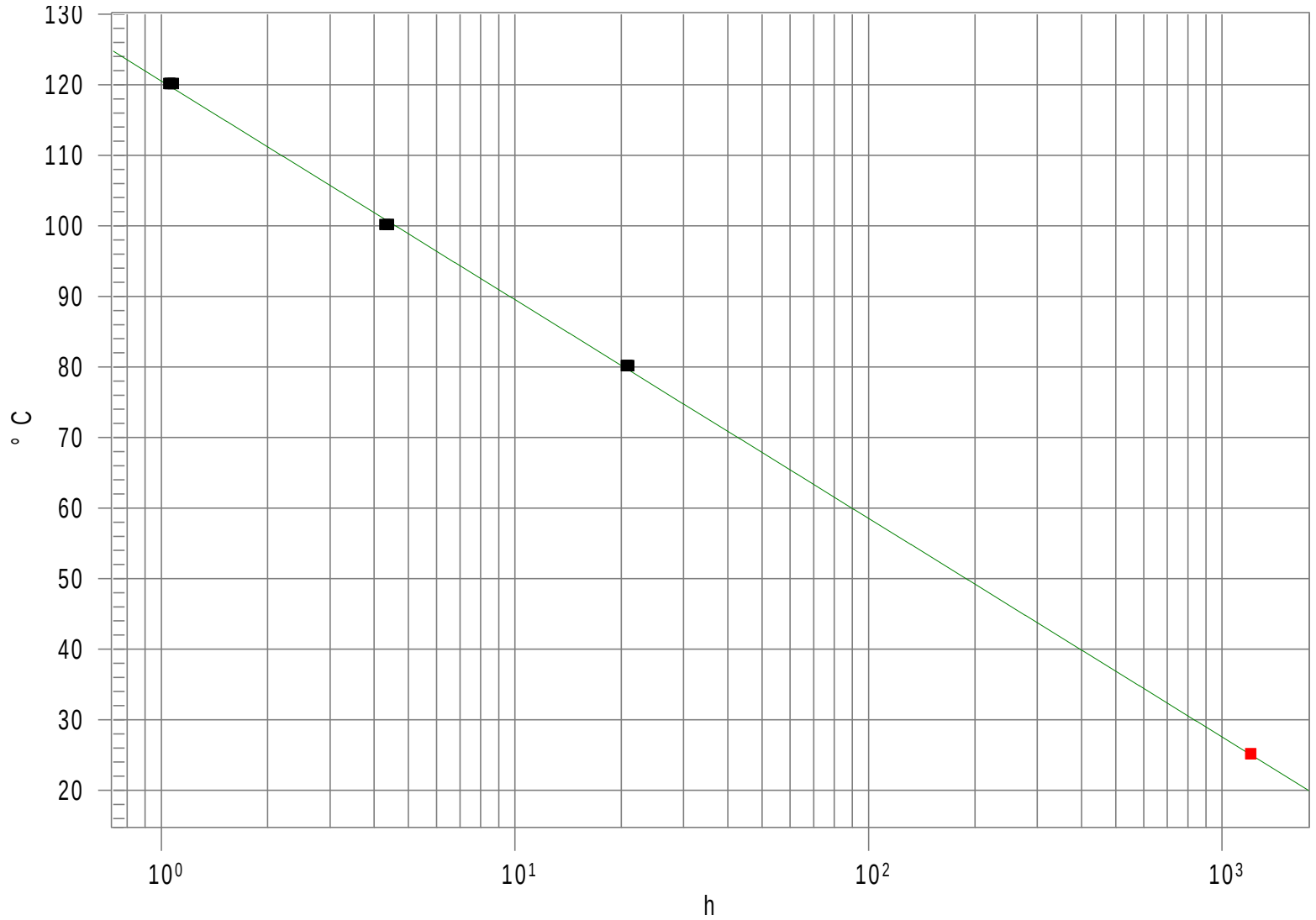


FIGURA N° 28: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T5.

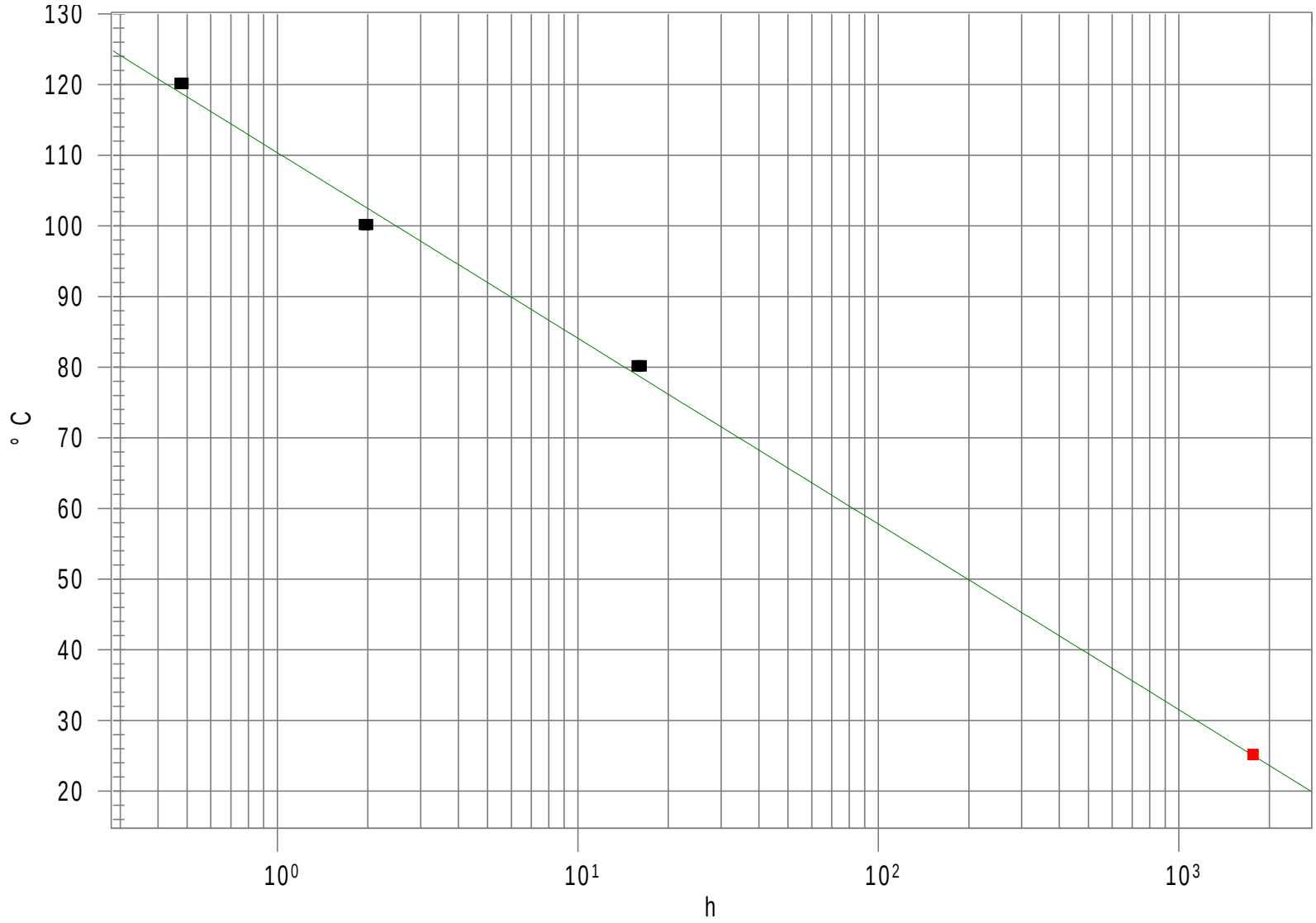


FIGURA N° 29: Determinación del tiempo de vida útil por extrapolación del OSI a 25 °C del tratamiento T6.

4.8. Determinación de la energía de activación.

En el TABLA N° 20, se puede apreciar los resultados de la energía de activación para diferentes tratamientos, los cuales varían de 85.76 kJ/mol a 115.96 kJ/mol.

TABLA N° 20: Energía de activación para los diferentes tratamientos

.

TRATAMIENTO	MEZCLA	PENDIENTE	R^2	Ea (kJ/mol)
T0	Sin antioxidante	11343.00	0.998	94.31
T1	TBHQ + BHT + BHA	11610.00	0.993	96.53
T2	Tocoferoles Naturales	13947.00	0.993	115.96
T3	Extracto de té verde + Extracto de Romero	9556.60	0.998	79.46
T4	TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales	13236.00	0.993	110.05
T5	TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero	10315.00	1.000	85.76
T6	Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero	12060.00	0.999	100.27

Energía de activación (75.46 kJ mor1) obtenida en aceite crudo de pescado de la especie Anchoveta **(Cortez et al 2015),** comparable con la Ea obtenida en el aceite de pescado en estudio (94.31 kJ/mol) dichos valores muestran una alta Ea, a pesar que los aceites marinos son más inestables ante la oxidación acelerada, se demostró la frescura del aceite en cuestión. Además, se observa en el TABLA N° 20 que, la mayor Ea (115.96/mol) corresponde a muestra con antioxidante Tocoferol Natural, que en primera instancia, su actividad antioxidante mostró una barrera energética que retardó la difusión del ·oxígeno, lográndose una mejor estabilidad.

Según **Dunn R., (2008),** la energía de activación en diferentes materiales oleaginosos destinados a la obtención de biodiesel; por ejemplo, los metil esteres del aceite de girasol (Ea = 90 kJ/mol) o los esteres provenientes de aceites utilizados en frituras con una energía de activación de 106,4 kJ/mol, el oleato de metilo puro tuvo un valor de Energía de activación igual a 82 kJ/mol.

Para el aceite esencial de coco atomizado la energía de activación resultó en un intervalo (108.27- 113,51 kJ mol-1), aceite de semilla de uva fue el más inestable ante la oxidación acelerada es justificable desde un punto de vista termodinámico ya que la Ea de este aceite fue la más baja (84,5 a 86 kJmor\ **(Navas P, 2010).**

Litwinienko et al., (1999), aplicaron la calorimetría diferencial al estudio de la cinética de la oxidación de los ácidos grasos laurino, mirística, palmítico y esteárico, obteniendo reacciones de primer orden y energías de activación entre 106 y 123 kJ/mol.

Por otro lado, **Márquez-Ruiz et al., (2008),** determinaron las constantes de velocidad de reacciones de oxidación de aceite de oliva, midiendo la velocidad de desaparición de los monómeros de los triacilgliceroles oxidados a distintas temperaturas empleando la prueba de Rancimat. Estas constantes fueron usadas para el cálculo de las energías de activación de acuerdo a la

ecuación de Arrhenius y se obtuvieron resultados del orden de 104.9 kJ/mol. Estos resultados son similares a los obtenidos en la muestra con adicción de antioxidante, lo que comprueba la gran efectividad de estos tratamientos a pesar que dicho aceite fue de origen marino, pueden darse debido a factores moleculares, entre ellos la cantidad de ácidos monoinsaturados y poliinsaturados y no a factores termodinámico, como lo afirma **Navas P., (2010).**

VI. CONCLUSIONES:

- Se determinó el tiempo de vida útil mediante uso del Rancimat del aceite crudo de pescado así como también de los tratamientos con adición de antioxidante resultando el mejor tratamiento el T1 (TBHQ, BHT y BHA) con 8 meses de vida útil.

- Se evaluó las características físicoquímicas del aceite crudo de pescado tales como: % Acidez , %Humedad e impurezas, Densidad ,Índice de refracción, Índice de yodo ,Índice de peróxido , Índice de anisidina, valor Totox y composición de ácidos grasos, valores que mostraron estados de deterioro aceptables y dentro de los parámetros de calidad permitidos en empresas de comercialización de aceites marinos.

- Se determinó los tiempos de inducción (5.10, 1.04 y 0,19h) a las temperaturas de 80°C, 100°C y 120°C respectivamente para el aceite crudo de pescado con un flujo de aire de 15 L/h así como también a los tratamientos con antioxidantes los cuales tienen mayor tiempo de inducción, comprobando que cuanto más largo es el tiempo de inducción, más estable es la muestra.
- Se determinó por escala GARDNER un color de 12, y por método CIELAB y sus parámetros: L, a*, b*, C*, y h* para el aceite crudo de pescado, comprobando así la intensidad del color amarillento del aceite el cual está relacionado con la cantidad de compuestos aldehídicos.
- Se determinó la energía de activación (Ea =94.31 KJ/mol) para el aceite crudo de pescado y para el mejor tratamiento T1 fue 102.87 KJ/mol, así se concluye que a mayor eficiencia del antioxidante mayor es la Ea.

VII. RECOMENDACIONES:

- Se recomienda determinar la acción de estos antioxidantes en el aceite refinado u otros aceites comerciales que presentan inestabilidad a altas temperaturas, tales como el aceite de Chía, Sacha Inchi, linaza entre otros.
- Se recomienda que se realicen estudios que puedan eliminar el olor y sabor poco agradable característico del aceite de pescado ya que sería excelente incluirlo en el consumo directo en la dieta por el alto contenido de ácidos grasos esenciales como DHA y EPA.
- Finalmente se pueden realizar estudios de vida útil a aceites utilizando enzimas que aporten resistencia a la oxidación lipídica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA:

- ✓ **Ackman, R. (2000).** Fish is more than a Brain Food. IIFET 2000 Proccedings. Canadian Institute of Fisheries Technology. Dalhousie University, Nova Scotia. Canadá. pp 1-6.
- ✓ **Avello, M & M Suwalsky. (2006**). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea (Concepc.), 494:pp 161-172.
- ✓ **Badui D., (1984).** Química de los Alimentos. Editorial Perrazo Educación. Mexico.
- ✓ **Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. (1997).** The chemistry of tea flavonoids. Crit Rev Food Sci Nutr; 37: 693-704.
- ✓ **Barrera A.D. (1993).** Simple procedure to evaluate the performance of fats and Oils at Frying Temperatures, Grasas Aceites .Brasil. 48:231-235
- ✓ **Barrera D., (1998).** Estabilidad y utilización de nitrógeno en aceites y grasas. Grasas y Aceites, 49. Fase. 1, 55-63
- ✓ **Barrera A.D. (1997).** Simple procedure to evaluate the performance of fats and Oils at Frying Temperatures, Grasas Aceites .Brasil. 48:231-235
- ✓ **Belén, D.J., I .López, M. González., M. J Moreno., C.Medina, (2005).** Evaluación fisicoquímica de la semilla y del aceite de corozo (Acrocomia aculeata Jac), Grasas y Aceites: 56, 311-316.
- ✓ **Belitz et al., (1997).** Química de los alimentos, 2da.Edición. Edit. Acribia, Zaragoza, España.
- ✓ **Bimbo, A. (1999).** Pautas para la clasificación del aceite de pescado comestible. Aceites y Grasas 410-421.
- ✓ **Boran, G., Karacam, H. and Boran, M. (2006).**Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. Food Chemistry, 98(4): 693-698.
- ✓ **Borowska J., (2003).** Fruits and vegetables as source of natural antioxidants. 1, 11-12. Polish.
- ✓ **Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C. & Deadman, N.M. (1989).** Effects of

changes in fat, fi sh, and fi bre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet, 2(8666): 757-761.

- ✓ **Calder, F. (2006).** n−3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases1,2,3. American Society for Clinical Nutrition 83(6) 1505- 1519.
- ✓ **Carrizo, J. (1999).** El aceite de pescado: sus propiedades. Aceites y Grasas 407-408.
- ✓ **Cetin, I. & Koletzko, B. (2008).** Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation.
- ✓ **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care,. De Caterina, R., Liao, J.K. & Libby, P. (2000).** Fatty acid modulation of endothelial activation. Am. J. Clin. Nutr., 71(1 Suppl.): 213S-223S. 11(3): 297-302
- ✓ **Davidson, L.; Nguyen, D.; Hokanson, R,; Callaway, E.; Iseff, R.; Turne, N. (2004).** Chemopreventive n–3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. Cancer Research 64: 6797–804.
- ✓ **Dyerberg J. (1986).** Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. Nutr. Rev.; 44: 125–134.
- ✓ **Eastman C. Company. (1996).** "Antioxidantes de calidad alimentaria para aceites refinados".
- ✓ **Eastman C. Company. (1998).** "Food-Grade antioxidants for cereals, flavoring materials, confectioneries and snack foods".
- ✓ **FAO / OMS (1999).** CODEX Stan 19-1981, Norma del Codex para Grasas y Aceites Comestibles No Regulados por Normas Individuales, Codex Alimentarius Official Standards, Canadá.
- ✓ **FAO / OMS(2003).** Codex Stan 19-1981, Norma delCodex para los Aceites de Oliva y Aceites de Orujo de Oliva. Codex Alimentarius Official Standards. Canadá.
- ✓ **Farhoosh, R. (2007).** El efecto de los parámetros operacionales del método Rancimat en la determinación de las medidas de estabilidad oxidativa y

predicción de vida útil del aceite de soja. Revista de la American Oil Chemists Society 84: 205-209.

- ✓ **Frankel N., (1998).** Lipid Oxidation. The Oily Press, Bridgewater, UK.
- ✓ **Ferretti G, Bacchetti T, Belleggia A, Neri D. (2010).** Cherry antioxidants: from farm to table. Molecules. ; 15(10):6993-7005.
- ✓ **Gissi-Hf, I. (2008).** Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet, 372: 1223-1230.
- ✓ **Gordon M. H. & Mursi E., (1999).** A comparison of oil stability based on the Metrohm Rancimat with storage at 20°C. Journal of American Oil Chemists Society. 71, 649-651.
- ✓ **Gordon M. et al., (2001).** Measuring antioxidant activity en: Antioxidant in food, Eds. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publihing Ltd, Cambridge.
- ✓ **Grompone M. A. (1991).** El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. Facultad de Química. Casilla de Correo 1157. Montevideo, URUGUAY.
- ✓ **Harris William S., PhD*, Varvel Stephen A., PhD, Pottala James V., Warnick PhD, G. Russell, MBA MS, , McConnel Joseph P. l, PhD (2013**). Comparative effects of an acute dose of fish oil on omega-3 fatty acid levels in red blood cells versus plasma: Implications for clinical utility. Journal of Clinical Lipidology. USA.7, 433–440
- ✓ **Herrera, E & J Zambrano. (2005).** Efecto de la inclusión de lípidos con diferentes grados de oxidación sobre los parámetros productivos de Oreochromis niloticus variedad chitralada. Trabajo de grado (Zootecnia). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 32 p.
- ✓ **Horubała A., (1999).** Antioxidant capacity and their changes in fruit and vegetables processing.Polish.
- ✓ **Hui Y.H. (2001).** Meat Science and Aplications. Cap.20 en: Meat Curing Technology, 2001. Edit. Marcel Research in Meat Color, 71: 100-121.

- ✓ **Kaya A., Tekin A.R. & Oner M.D., (1993).** Oxidative stability of sunflower and olive oils: Comparison between a modified active oxygen method and long term storage. Lebensmittel Wissenschaft und Technology, 26, 464–468.
- ✓ **Kinsella, J.E. (1986).** Food components with potential therapeutic benefits: The n3 polyunsaturated fatty acids of fish oils, Food Technol. 40(2):89-97.
- ✓ **Masson, L. y Mella M, (1985).** Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile. Composición en ácidos grasos. Monografía. Santiago Chile. Ed. Universitario.
- ✓ **Maniak B., Targoński Z., (1996).** Antioxidant naturally occurs in food . Przem. Ferm. Owoc. Warz. 4, 7-9 Polish.
- ✓ **Méndez, E., González, R.M., Inocente, G., Giudice, H. and Grompone, M. A. (1996).** Lipid content and fatty acid composition of fillets of six fishes from the Rio de la Plata. J. Food Comp. An., 9: 163 – 170.
- ✓ **Moure, A, JM Cruz, D Franco, MJ Domínguez, J Sineiro, H Domínguez, AJ Núñez & JC Parajó. (2001)**. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem. 72: 145-171.
- ✓ **Nash, D.M. and Ackman, R.G. (1977).** Mackerel lipids as an unsaturated fat model system for the determination of the antioxidative potency of TBHQ and other antioxidant compounds».-J. Am. Oil Chemists'Soc. 54,417-420
- ✓ **Navas, P. (2010).** Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla La Mancha, Facultad de Ciencias Químicas. España.
- ✓ **Nieto, S., Garrido, A., San-Hueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela, A. (1993).** Flavonoids as stabilizers in fish oil: an alternative to synthetic antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70: 773-778.
- ✓ **Ortega Nieblas, M.R. Robles Burgueño y L. Vázquez Moreno (2001).** Evaluación oxidativa de las mezclas de aceites de leguminosas del Desierto de Sonora con aceites de maíz y soja durante su almacenamiento.

Departamento de Investigación Universidad de Sonora. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C. México. Vol. 52. 6, 355-362

- ✓ **Prior R.L., Wu X., Schaich K., (2005).** Standarized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplments. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 4290 - 4302.
- ✓ **Pizzocaro, F., Caffa, F., Gas-Paroli, A., Fideli, E. (1985).** Antioxidative properties of some aromatic herbs on sardine muscle and oil. Revista Italiana delle Sostanze Grasse, 62: 351-356,
- ✓ **Primo, E. (1996).** Química orgánica Básica y aplicada de la molécula a la industria. Editorial REVERTÉ, S. A. España.
- ✓ **Rojano, B.A. (1997).** Oxidación de lípidos y antioxidantes. Universidad Nacional De Colombia. Departamento de Química. Medellín.
- ✓ **Sanhueza, J.; Nieto, S.; Valenzuela, A. (2004).** Ácido docosa-hexaenoico (DHA), desarrollo cerebral, memoria y aprendizaje. Rev Chil Nutr 31: 84-92.
- ✓ Lee, J.; 0'Keefe, J.; Lavie, C.; Marchioli, R.; Harris, W. 2008. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. Mayo Clinic Proc. 83(3): 324-32.
- ✓ **Salas, M. A. (2008).** Uso de antioxidantes para la estabilidad oxidativa de la pulpa de anchoveta (Engraulis ringens) almacenada en congelación. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia Y Bioquímica Unidad De Postgrado. Ciencia de los Alimentos.
- ✓ **Shahidi, F.; Wanasundara, U. (2002).** Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In C. C. Akoh, & D. B. Min (Eds.), Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology. New York, EEUU.
- ✓ **Rojano, B, C Gaviria, M Gil, J Saez, G Schinella & H Tournier. (2008).** Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. Vitae: Revista de la facultad de química farmacéutica 15: 173-181.
- ✓ **Roldán A., (2016).** Extracción y Refinación de aceite crudo de pescado.
- ✓ **Thorisson, S.; Gunstone, F. and Hardy, R. (1992).** "The antioxidant properties of ethoxyquin and of some of its oxidation products in fish oil and meal".-J. Am. Oil Chemists'Soc.

- ✓ **Toledano, D.G. (2001).** Ingesta de ácidos grasos “trans” vía dieta total del conjunto de la población española y de cuatro comunidades autónomas: Andalucía, Galicia, Madrid y Valencia.
- ✓ **Uauy, R.; Valenzuela, A. (2000).** Marine oils: The health benefits of n-3 fatty acids. Nutrition 16: 680 – 684.
- ✓ **Valenzuela, A. (2009).** Aceites de origen marino y su importancia en la nutrición humana y en la ciencia de alimentos. Rev Chil Nutr 36: 246-57.
- ✓ **Valenzuela, A.; Nieto, S.; Uauy, R. (1993).** Desafíos Tecnológicos para evaluar ácidos grasos N-3 Poliinsaturados en aceites marinos de uso alimenticio y farmacológico. Aceites y Grasas 53 - 61.
- ✓ **Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; De la Barra, F. (2012).** El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. Rev. Chil. Nutr. 39: 201-209.
- ✓ **Viera, J.P. (2005).** Estabilidad del aceite de fritura de chifles. Facultad De Ingeniería. Área Departamental de Ciencias de la Ingeniería. Piura.
- ✓ **Vinson J, Dabbagh Y, Serry M, Jang J. (1995).** Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. J Agric Food Sci; 43: 2800-2802.

SITIOS WEB:

- ✓ http://www.medicadeterragona.es/consejos/200210.htm.(Acceso 01/10/2016)

- ✓ http://www.tandfonline.com/loi/tcyt19.(Acceso 10/11/2016)
- ✓ http://www.unuftp.is/static/fellows/document/pak05prf.pdf. (Acceso 20/11/2016)
- ✓ http://dei.uca.edu.sv/conuca/archivos/papers/6_Paper_5_conia2012_submission_53.pdf. (Acceso 15/10/2016).
- ✓ http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/curzoz/guia_de_practicas_de_aceites_y_grasas.pdf. (Acceso 01/12/2016).
- ✓ http://www.academia.edu/8508533/Informe_2_de_aceites_._indice_refraccion. (Acceso 12/11/2016).
- ✓ http://www.cyclochem.com/cyclochembio/research_e/035.html (Acceso 30/11/2016).
- ✓ http://www.academia.edu/10558641/EXTRACCI%C3%93N_Y_REFINACI%C3%93N_DE_ACEITE_CRUDO_DE_PESCADO. (Acceso 15/11/2016). http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v6n4/a05v6n4.pdf. (Acceso 15/11/2016).
- ✓ http://www.metrohmmexico.com/dowloadpdf/OXIDACIxN_GRASA_ALIMENTOS.pdf (Acceso 10/12/2016).

IX. ANEXOS:

ANEXO N° 1

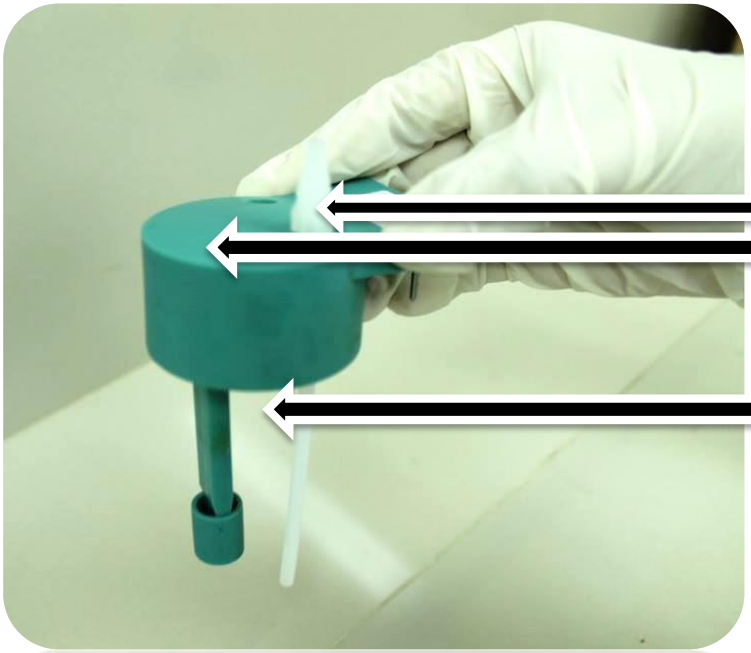
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Muestra de aceite crudo de pescado proveniente de la empresa PESQUERA CANTABRIA.

Preparación de Muestras (Pesado 3±0.1g)

PRUEBA RANCIMAT.

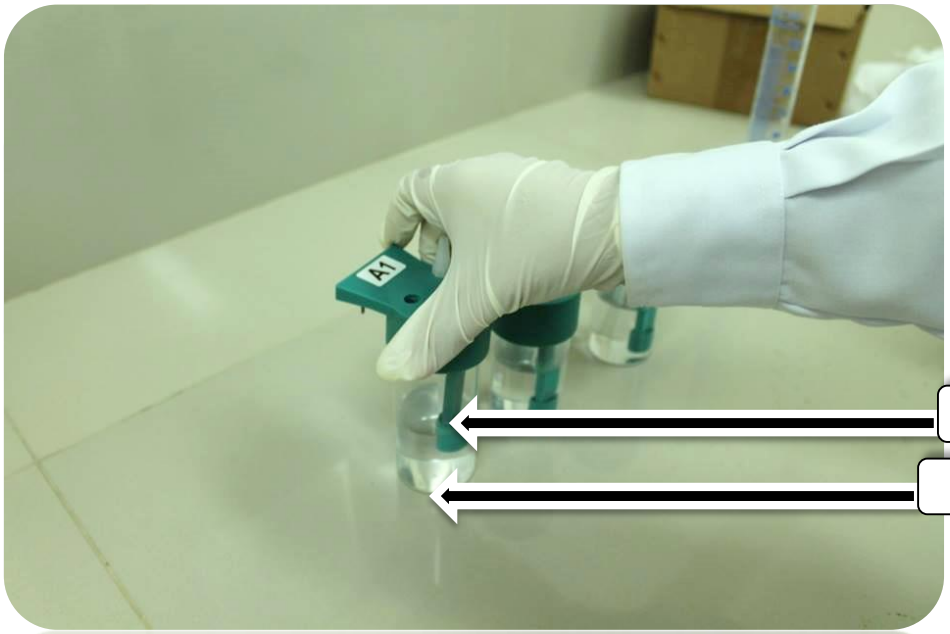
ELECTRODOS



ENTRADA DE VOLÁTILES.

SALIDA DE VOLÁTILES.

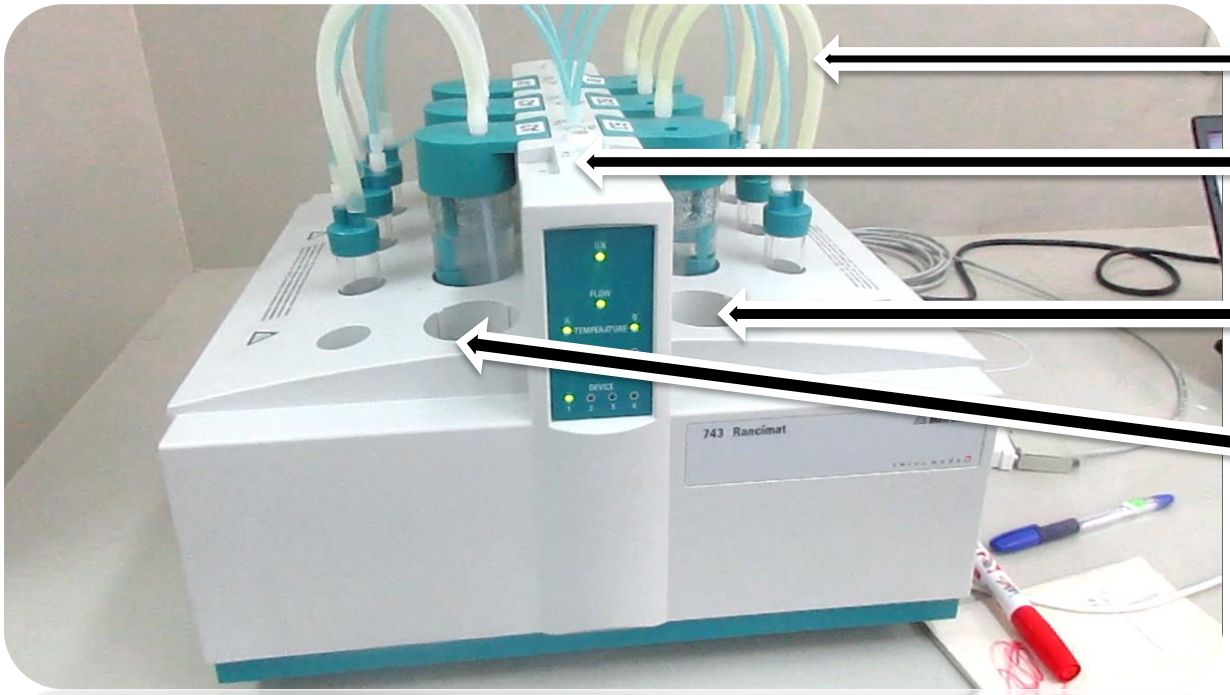
ÁNODO / CÁTODO



DETECTOR

VASO POLICARBONATO 60ml

EQUIPO RANCIMAT METHORM 743



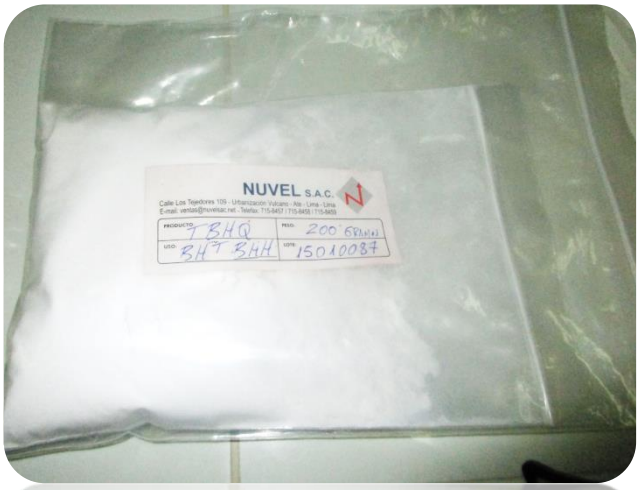
ÁCIDO FÓRMICO

CANALES

BLOQUE B

BLOQUE A

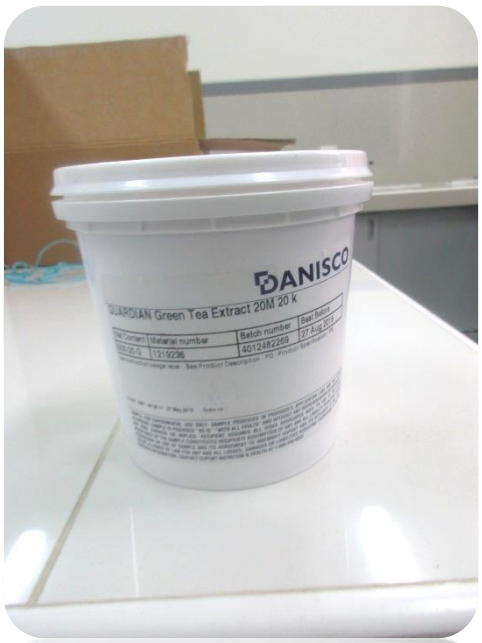
ANTIOXIDANTES UTILIZADOS DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO.



MEZCLA DE TBHQ + BHT + BHA MARCA NUVEL.

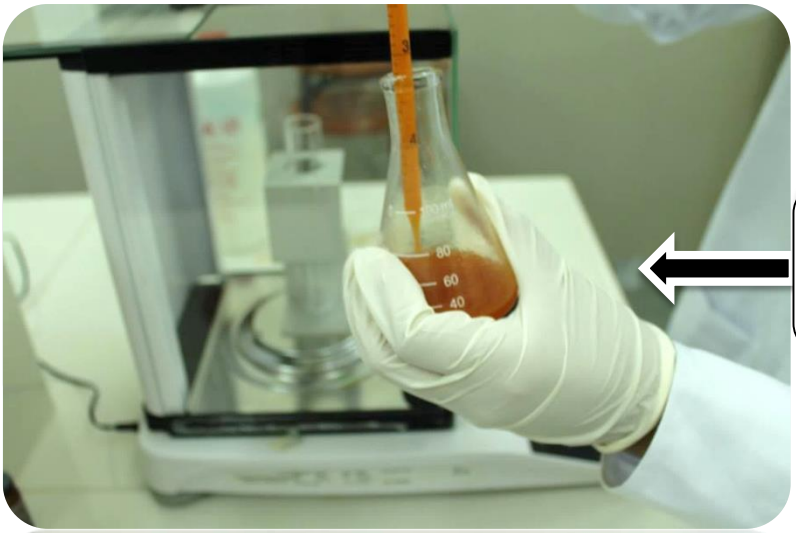
MEZCLA DE TOCOFEROLES NATURALES MARCA DANISCO

EXTRACTO DE ROMERO MARCA DANISCO

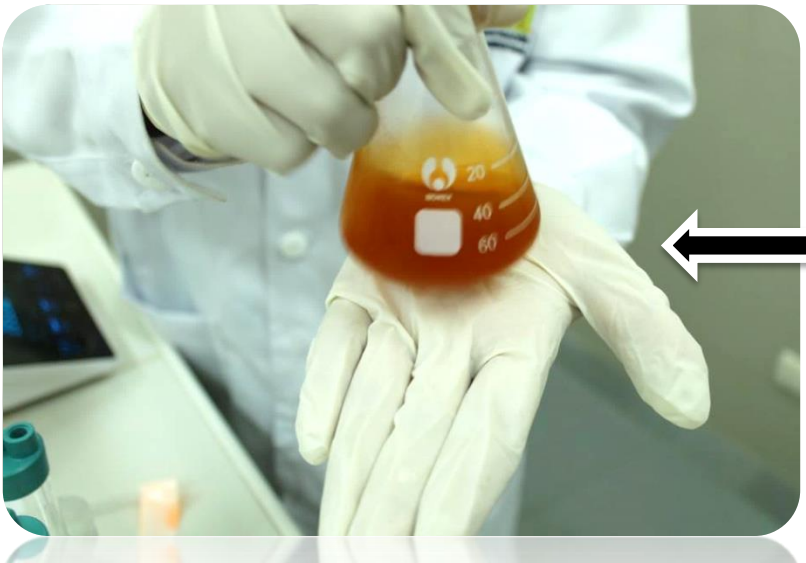


EXTRACTO DE TE VERDE MARCA DANISCO

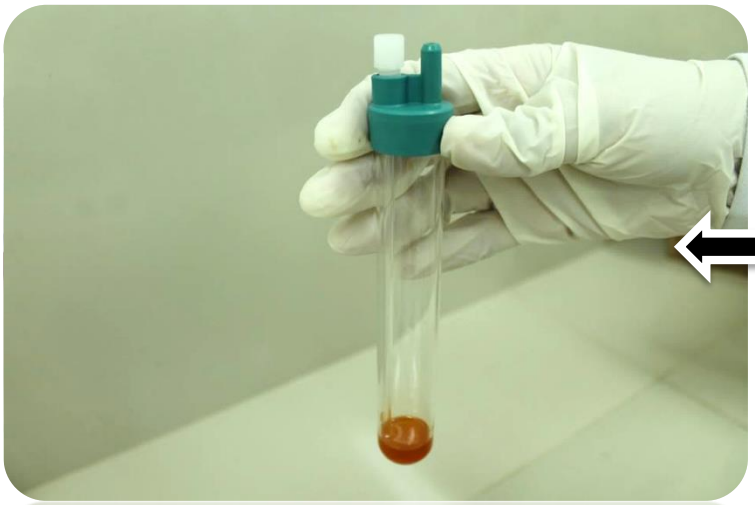
ADICIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.



Pesar las concentraciones de antioxidantes y agregar en el aceite crudo de pescado.

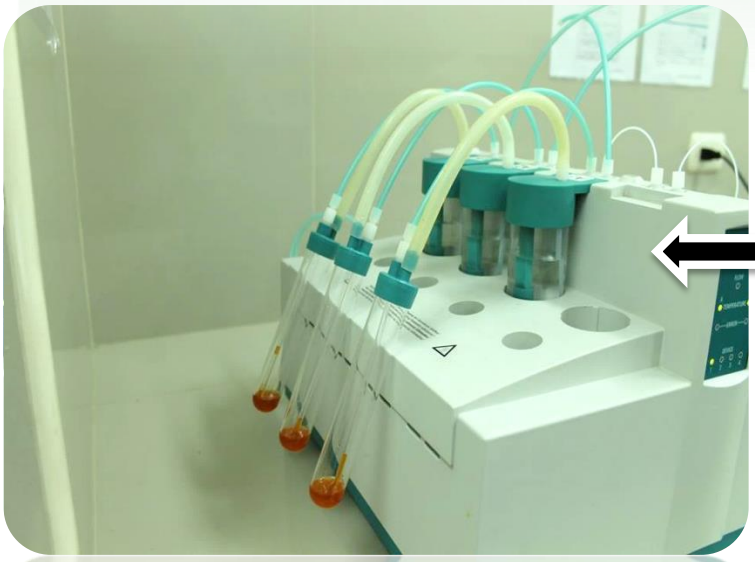


Homogenizamos la muestra con antioxidante.



Colocar las muestras en los tubos del Rancimat.

Todos los tratamientos del trabajo de investigación listos para ingresar al Rancimat.



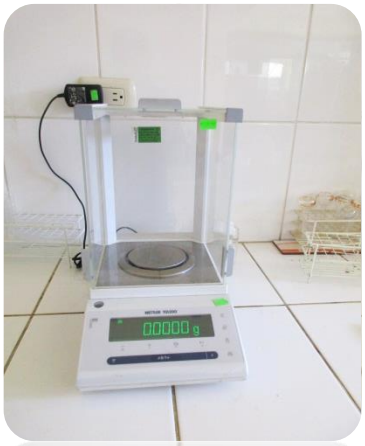
Tratamientos corriendo en el Equipo Rancimat para determinar la Vida útil.

EQUIPOS Y REACTIVOS PARA ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS.

CENTRIFUGA

ESPECTROFOTÓMETRO

CROMATÓGRAFO

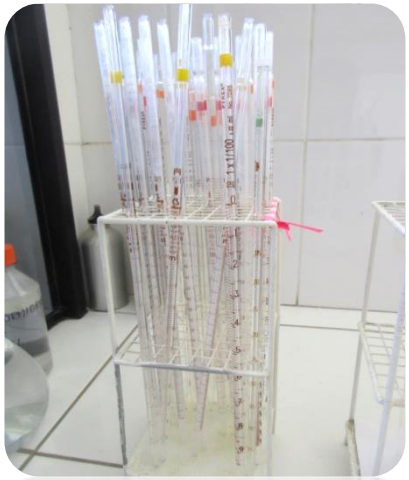


BALANZA ANALÍTICA

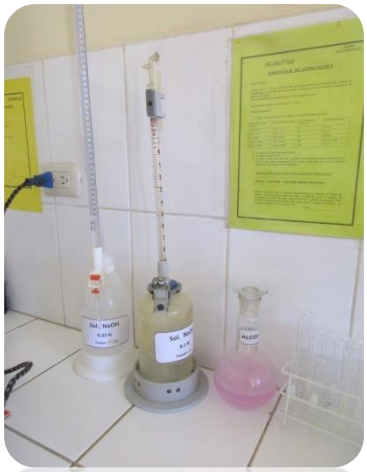
BAÑO MARÍA

DESECADOR

TUBOS DE VIDRIO

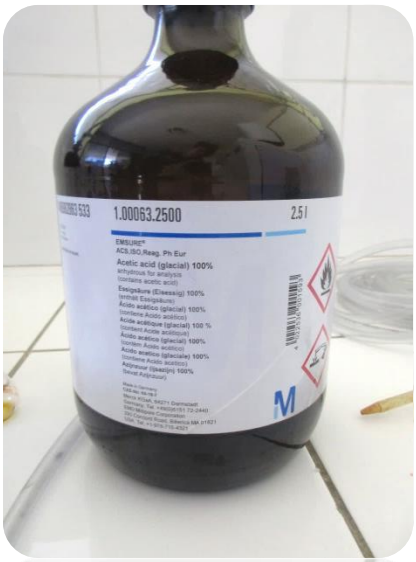


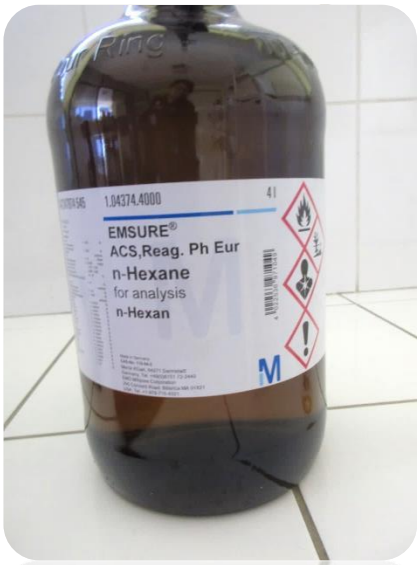
PIPETAS DE VIDRIO

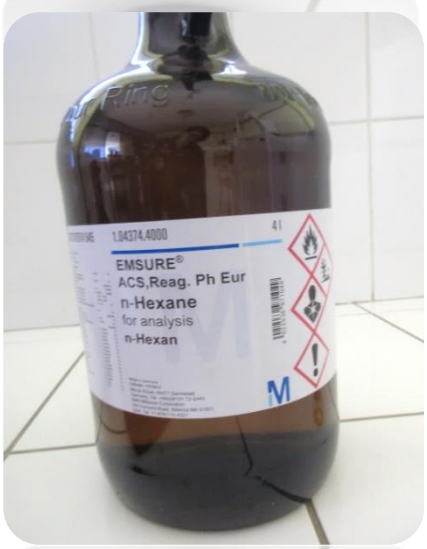


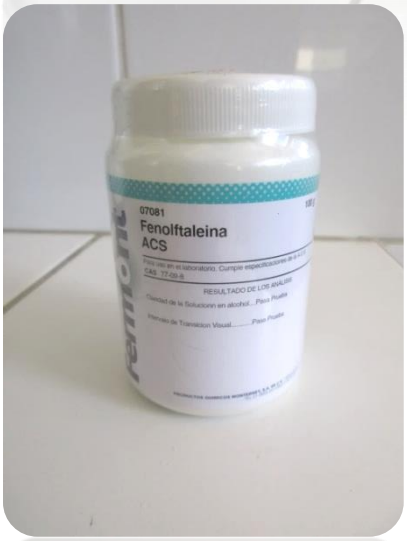
BURETAS

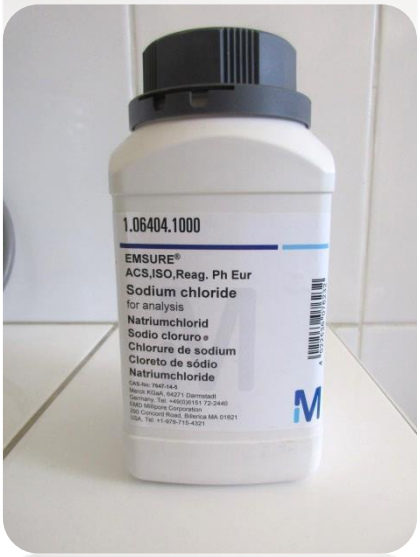
REACTIVOS PARA ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS.











ANÁLISIS COLORIMÉTRICO

COLORIMETRO GARDNER

EQUIPO CIELAB

ANEXO N° 2

Índice de Estabilidad Oxidativa en Aceite Crudo de Pescado

Los resultados del TABLA N°21, muestra que todos los tratamientos tienden a un ligero aumento de los valores de OSI como respuesta al incremento de temperatura.

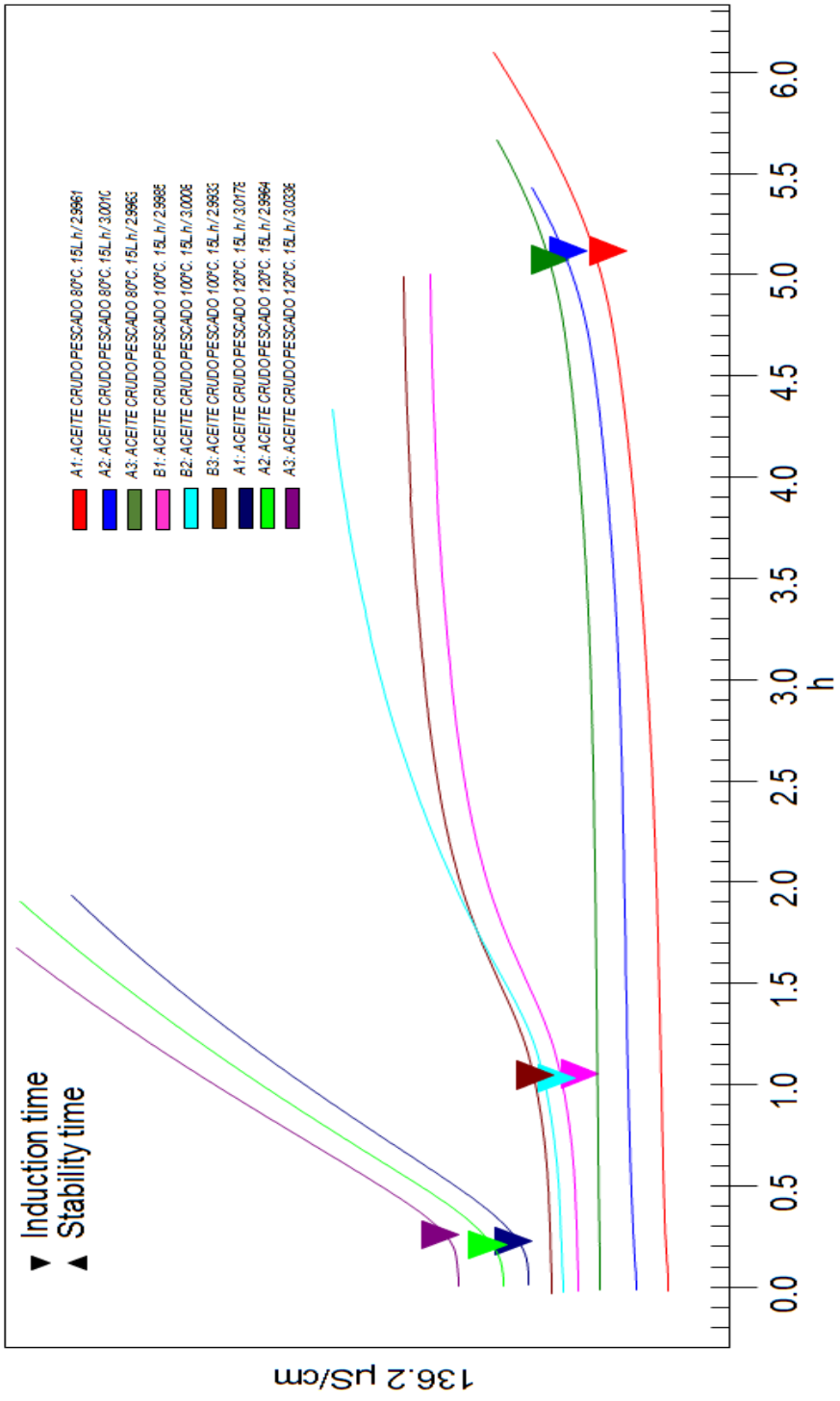
TABLA N° 21: Índices de Estabilidad Oxidativa del aceite de Aceite Crudo de Pescado.

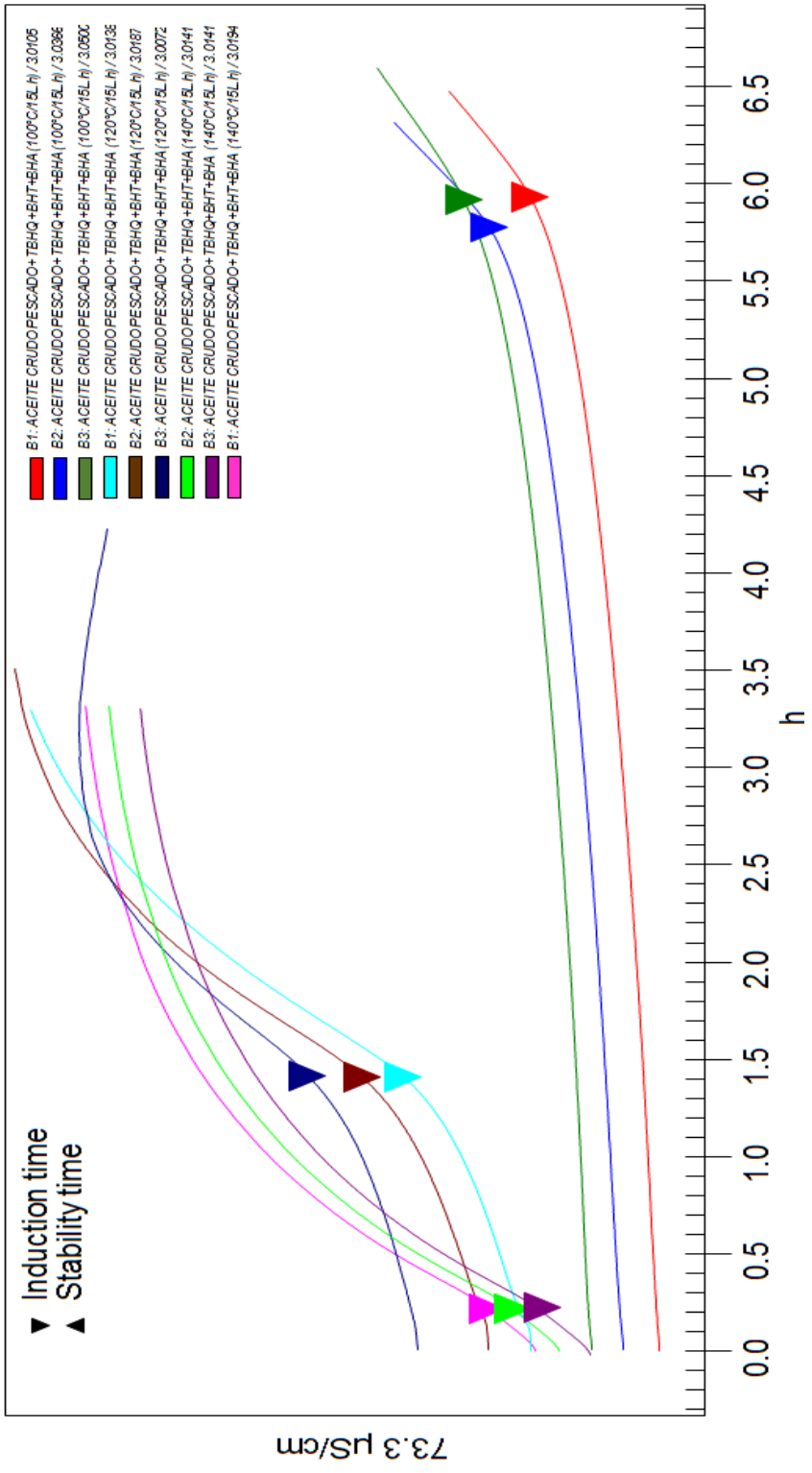
TIEMPO DE INDUCCIÓN (HORAS)

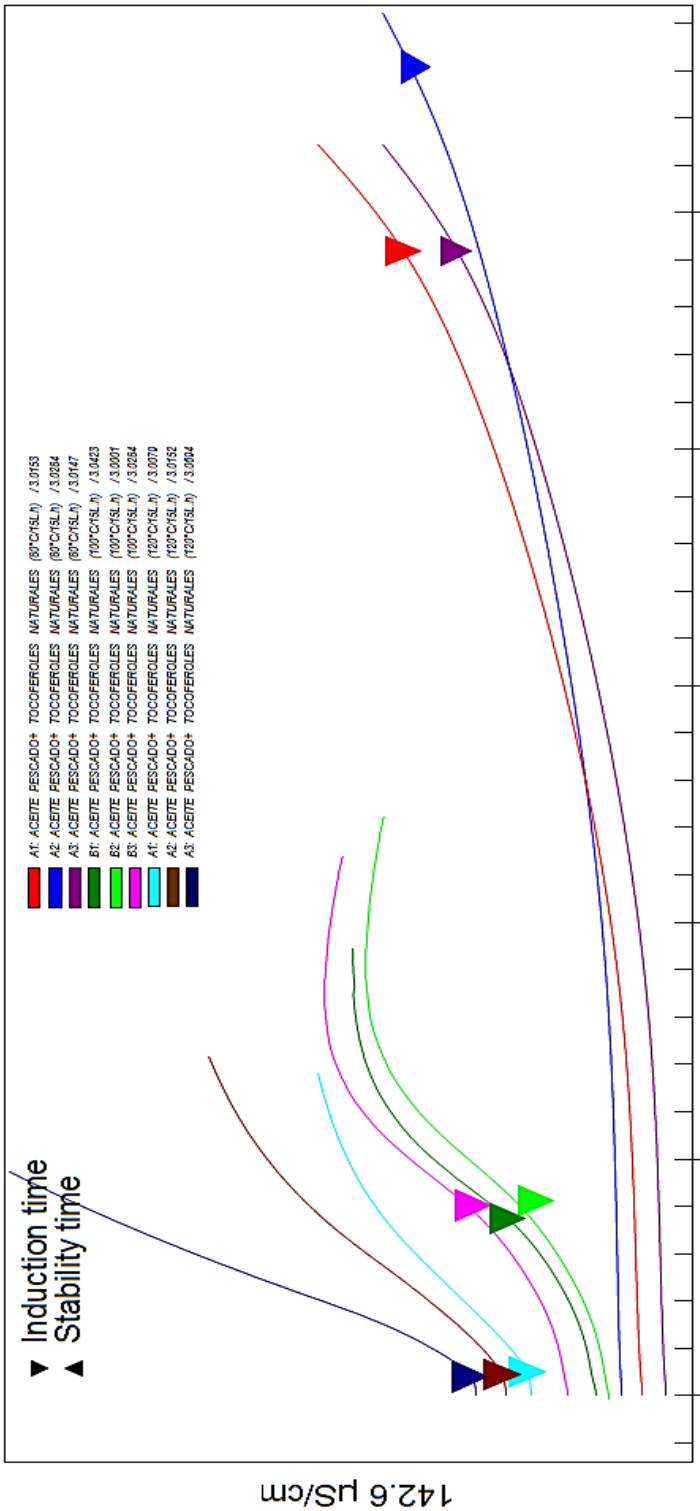
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
80 ° C	5.12	39.78	12.41	7.27	48.46	20.84	6.47
	5.09	39.78	12.41	7.23	48.56	21.13	6.45
	5.08	39.76	12.81	7.24	48.34	20.91	6.48
PROMEDIO	5.10	39.77	12.54	7.25	48.45	20.96	6.47
Desvesta	**0.02**	**0.01**	**0.23**	**0.02**	**0.11**	**0.15**	**0.02**
100 ° C	1.05	5.93	2.01	1.7	5.12	4.43	1.07
	1.02	5.78	1.99	1.99	4.92	4.33	1.06
	1.05	5.92	2.01	1.97	4.89	4.43	1.16
PROMEDIO	1.04	5.88	2.00	1.89	4.98	4.40	1.10
Desvesta	**0.02**	**0.08**	**0.01**	**0.16**	**0.13**	**0.06**	**0.06**
120 ° C	0.19	1.41	0.25	0.46	1.09	1.09	0.18
	0.17	1.41	0.22	0.46	1.04	1.06	0.2
	0.22	1.42	0.2	0.46	1.1	1.07	0.21
PROMEDIO	0.19	1.41	0.22	0.46	1.08	1.07	0.20
Desvesta	**0.03**	**0.01**	**0.03**	**0.00**	**0.03**	**0.02**	**0.02**

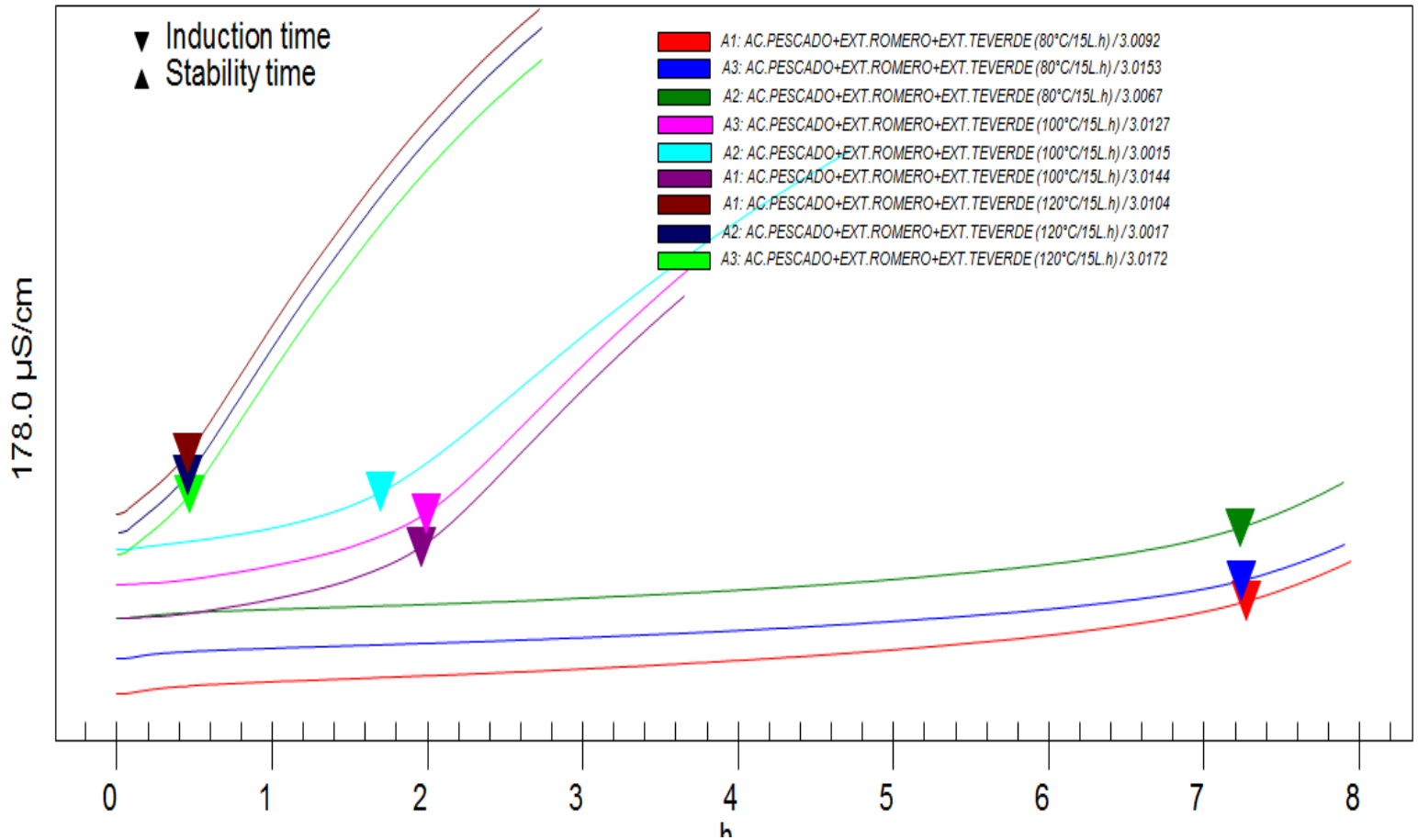
*Medición promedio realizada a tres repeticiones por muestra más desviación estándar.

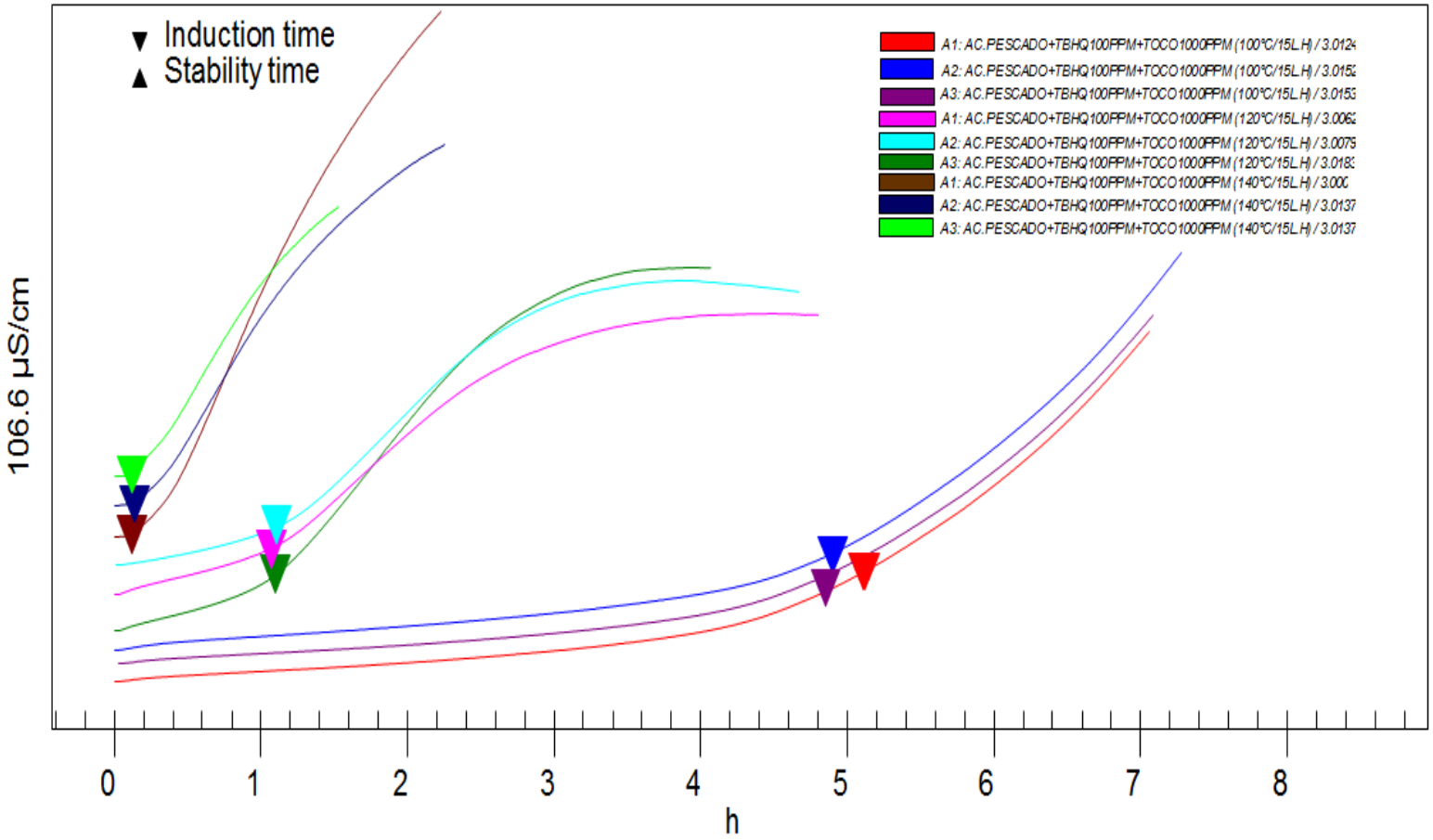
A continuación se muestran las curvas Rancimat, conductividad (us/cm) vs tiempo (h), que evidencian el efecto de las condiciones experimentales de temperatura y antioxidantes sobre los valores de OSI para el aceite crudo de pescado.



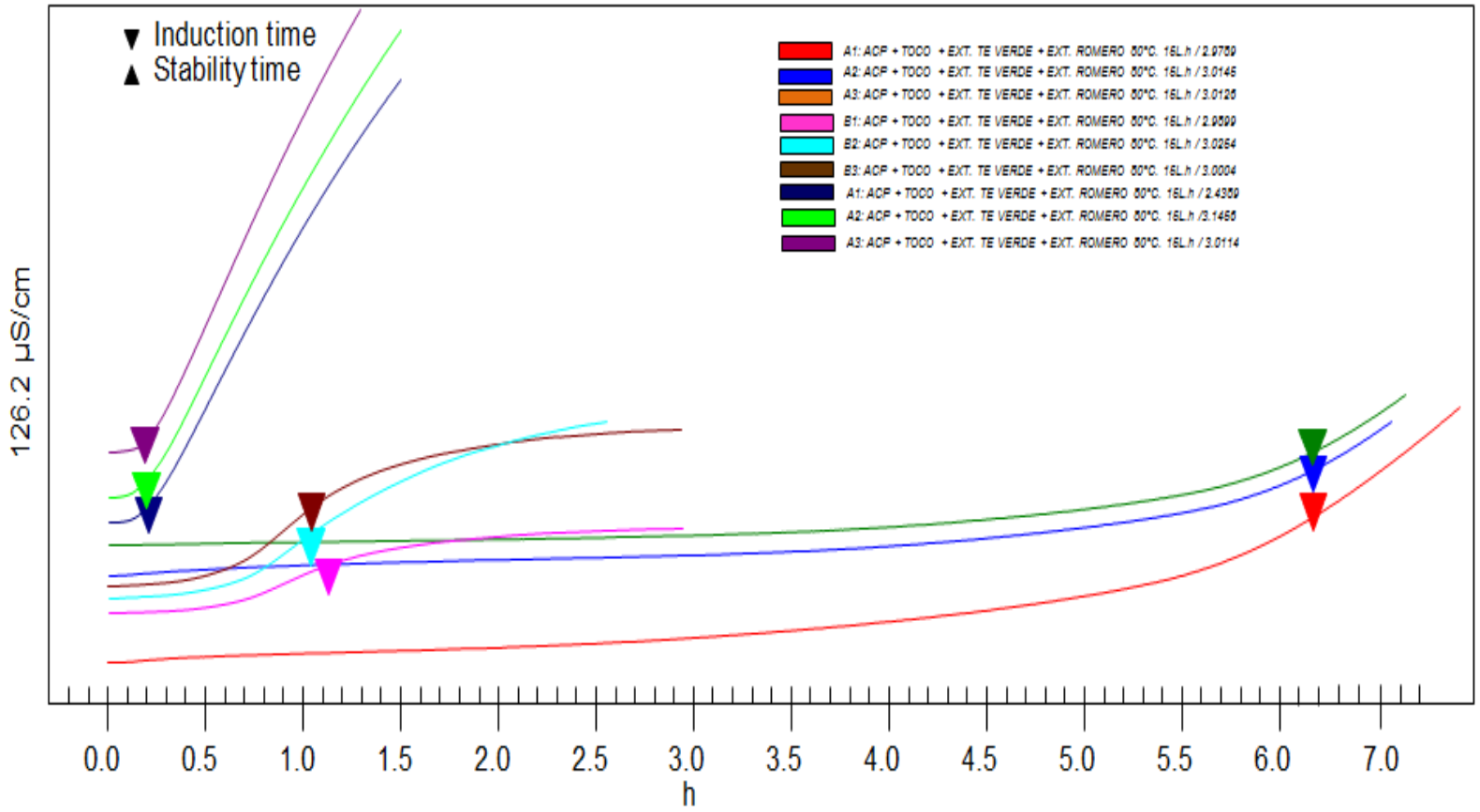

B1: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (100°C/15L /h) / 3.0105
B2: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (100°C/15L /h) / 3.0386
B3: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (100°C/15L /h) / 3.0600
B1: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (120°C/15L /h) / 3.0138
B2: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (120°C/15L /h) / 3.0187
B3: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (120°C/15L /h) / 3.0072
B2: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (140°C/15L /h) / 3.0141
B3: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (140°C/15L /h) / 3.0141
B1: ACEITE CRUDO PESCADO + TBHQ+BHT+BHA (140°C/15L /h) / 3.0194
▼ Induction time
▲ Stability time
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
h
73.3 µS/cm


▼ Induction time
▲ Stability time
A1: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (60°C/15L/h) /3.0153
A2: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (80°C/15L/h) /3.0284
A3: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (80°C/15L/h) /3.0147
B1: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (100°C/15L/h) /3.0423
B2: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (100°C/15L/h) /3.0001
B3: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (100°C/15L/h) /3.0284
A1: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (120°C/15L/h) /3.0079
A2: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (120°C/15L/h) /3.0152
A3: ACEITE PESCADO+ TOCOFEROLES NATURALES (120°C/15L/h) /3.0604
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
h
142.6 µS/cm


Induction time
Stability time
A1: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (80°C/15L.h) / 3.0092
A3: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (80°C/15L.h) / 3.0153
A2: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (80°C/15L.h) / 3.0067
A3: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (100°C/15L.h) / 3.0127
A2: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (100°C/15L.h) / 3.0015
A1: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (100°C/15L.h) / 3.0144
A1: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (120°C/15L.h) / 3.0104
A2: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (120°C/15L.h) / 3.0017
A3: AC.PESCADO+EXT.ROMERO+EXT.TEVERDE (120°C/15L.h) / 3.0172
178.0 µS/cm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
h


Induction time
Stability time
A1: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (100°C/15L.H) / 3.0124
A2: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (100°C/15L.H) / 3.0152
A3: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (100°C/15L.H) / 3.0153
A1: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (120°C/15L.H) / 3.0062
A2: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (120°C/15L.H) / 3.0079
A3: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (120°C/15L.H) / 3.0183
A1: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (140°C/15L.H) / 3.000
A2: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (140°C/15L.H) / 3.0137
A3: AC.PESCADO+TBHQ100PPM+TOCO1000PPM (140°C/15L.H) / 3.0137
106.6 µS/cm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
h

132.7 µS/cm
Induction time
Stability time
A1:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT.TEV/ERD (80°C/15L.H)/ 3.0142
A2:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT.TEV/ERD (80°C/15L.H)/ 3.0022
A3:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT.TEV/ERD (80°C/15L.H)/ 3.0052
A1:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT. TEVERD(100°C/15L.H)/ 3.0021
A2:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT. TEVERD(100°C/15L.H)/ 3.0142
A3:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT. TEVERD(100°C/15L.H)/ 3.0098
A1:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT. TEVERD(120°C/15L.H)/ 3.0173
A2:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT. TEVERD(120°C/15L.H)/ 3.0082
A3:AC.PESCADO+TBHQ+EXT.ROM+EXT. TEVERD(120°C/15L.H)/ 3.0131
0
5
10
15
20
h


Induction time
Stability time
A1: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 2.9759
A2: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 3.0145
A3: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 3.0125
B1: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 2.9599
B2: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 3.0264
B3: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 3.0004
A1: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 2.4359
A2: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h /3.1456
A3: ACP + TOCO + EXT. TE VERDE + EXT. ROMERO 50°C. 1SL.h / 3.0114
126.2 µS/cm
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
7.0
h

ANEXO N° 3

Determinación de la energía de activación a partir de la ecuación de Arrhenius

TRATAMIENTOS:

T0 : Sin antioxidante.

T1 : TBHQ + BHT + BHA.

T2 : Tocoferoles Naturales.

T3 : Extracto de té verde + Extracto de Romero.

T4 : TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales.

T5 : TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero.

T6 : Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero.

Según las consideraciones ·de Blaine y Savage (1992) y García-Ochoa et al. (1989), se puede hacer uso de la ecuación:

$$\boldsymbol{Ln\,(OSI) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{T}} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ (1)$$

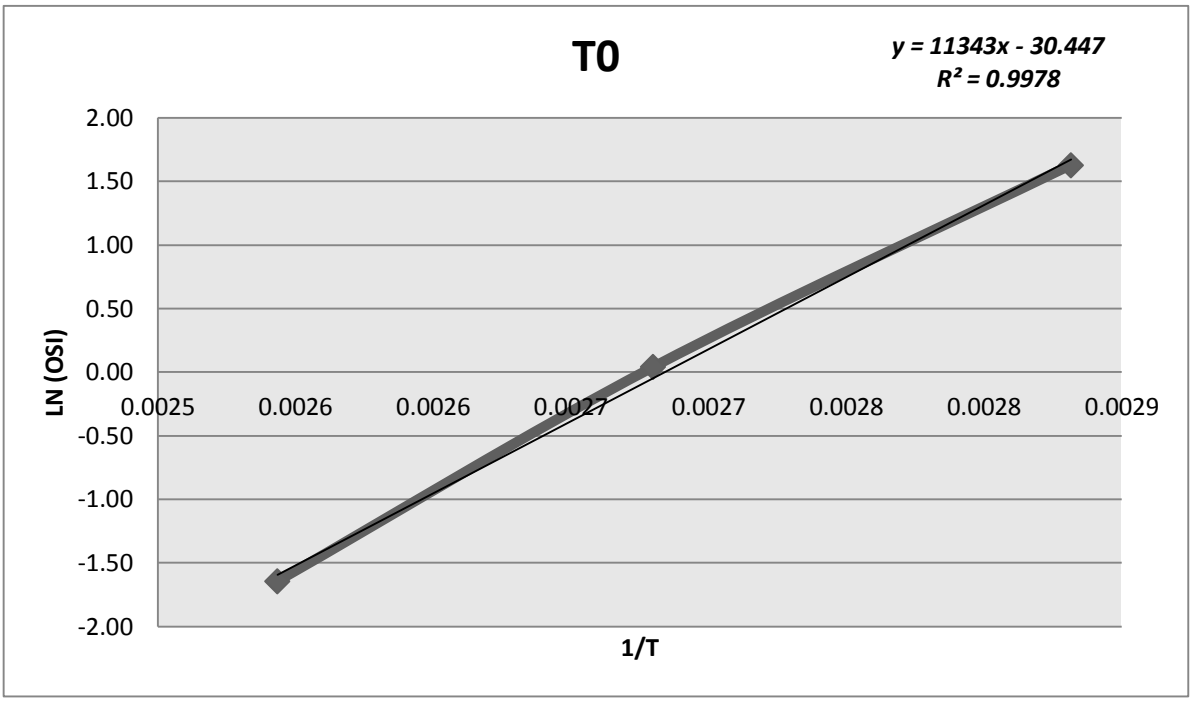
Reemplazamos la ecuación (1) para cada tratamiento:

Para T0: Control

$$\boldsymbol{Ln\,(5.1) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\,(1.04) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\,(0.19) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$

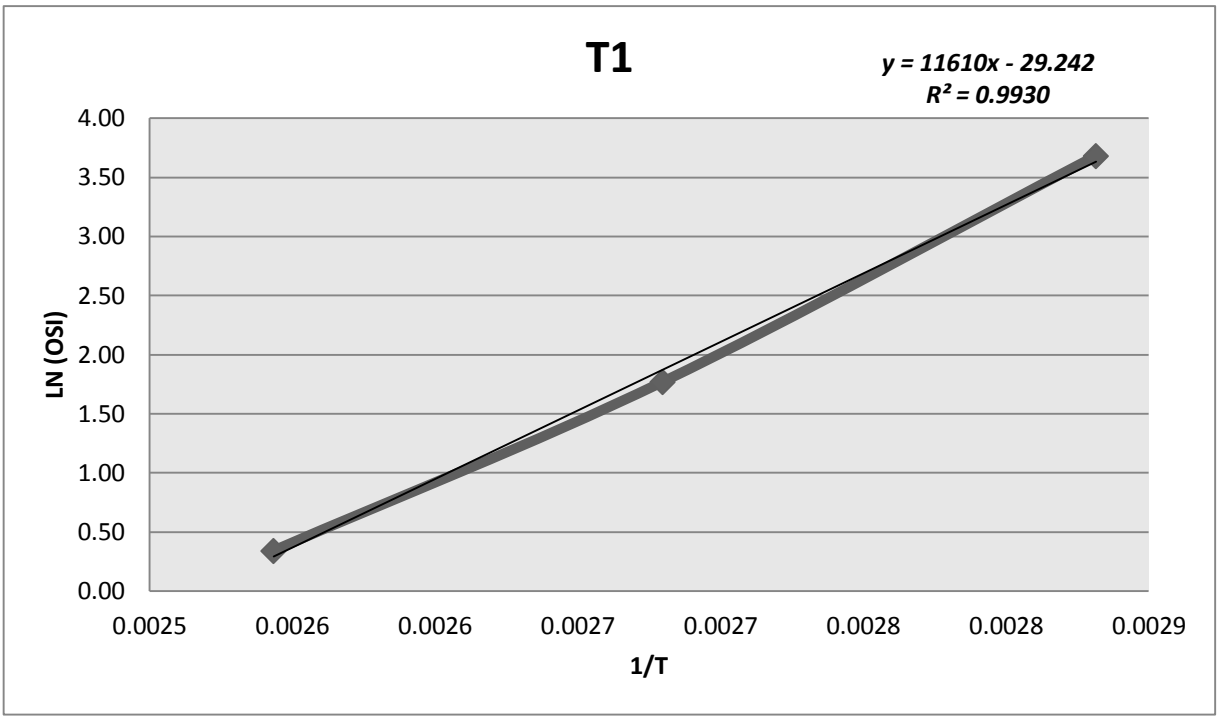


Para T1: TBHQ + BHT + BHA.

$$\boldsymbol{Ln\,(39.77) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\,(5.88) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\,(1.41) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$

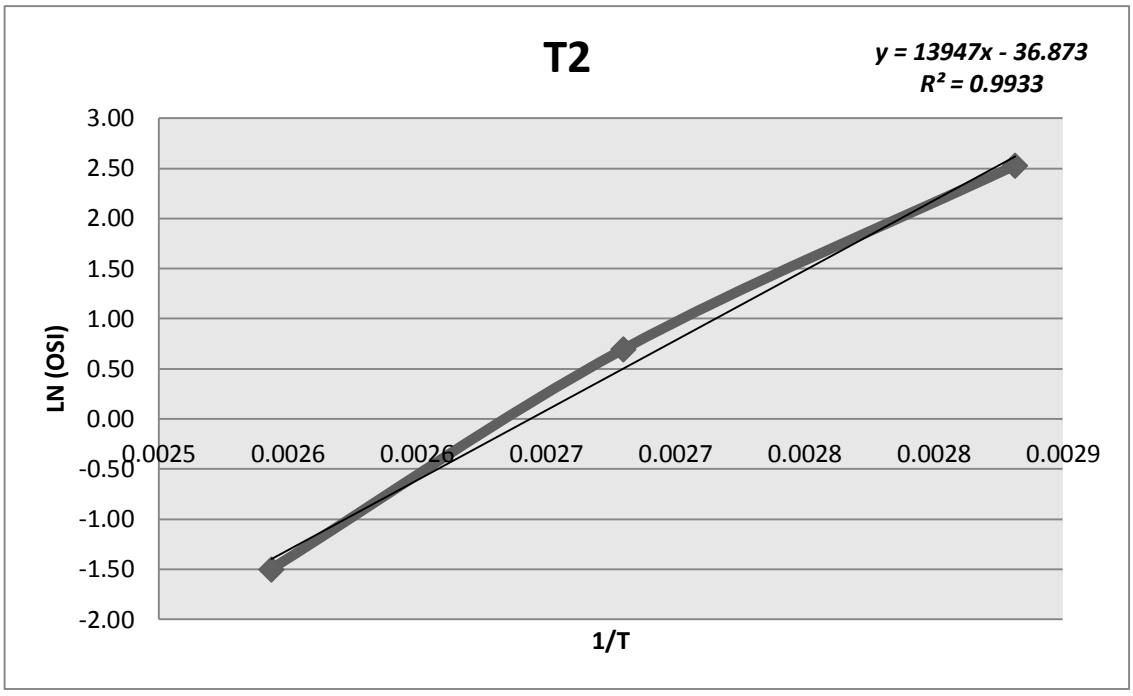


Para T2: Tocoferoles Naturales.

$$\boldsymbol{Ln\ (12.54) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (2.00) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (0.22) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$

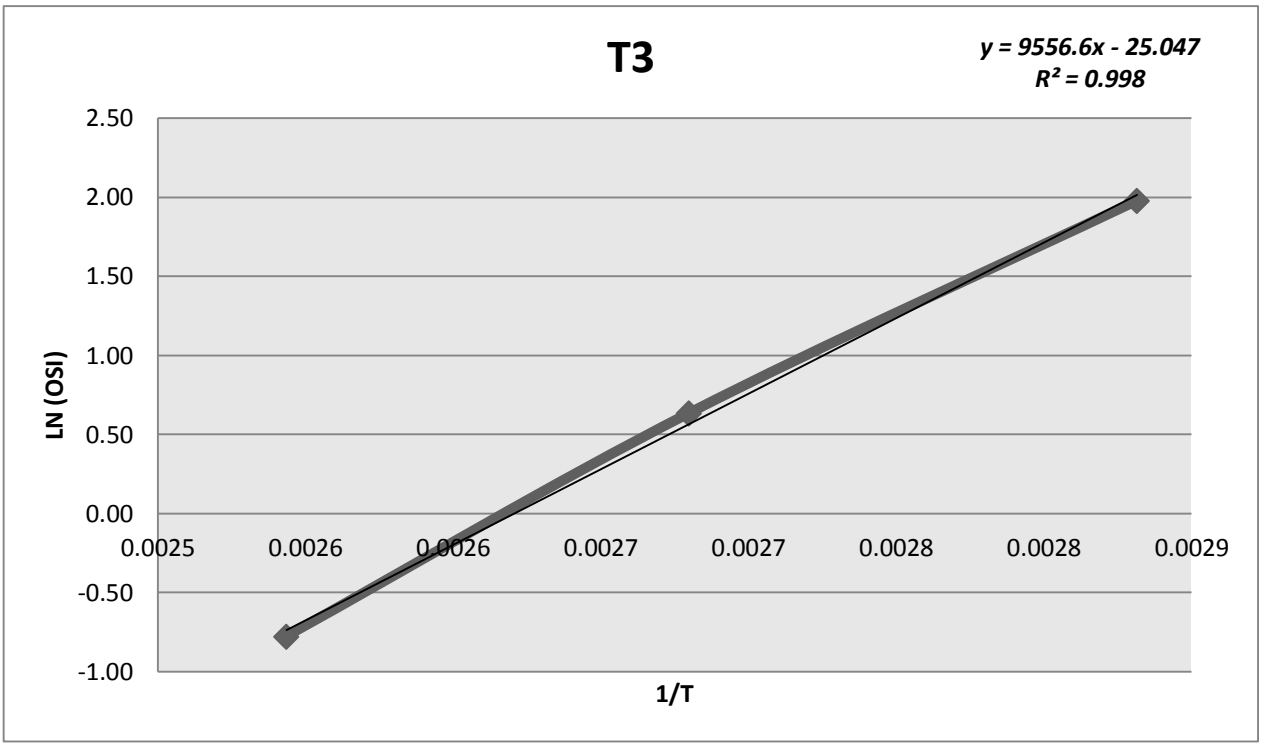


Para T3: Extracto de té verde + Extracto de Romero.

$$\boldsymbol{Ln\ (7.25) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (1.89) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (0.46) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$

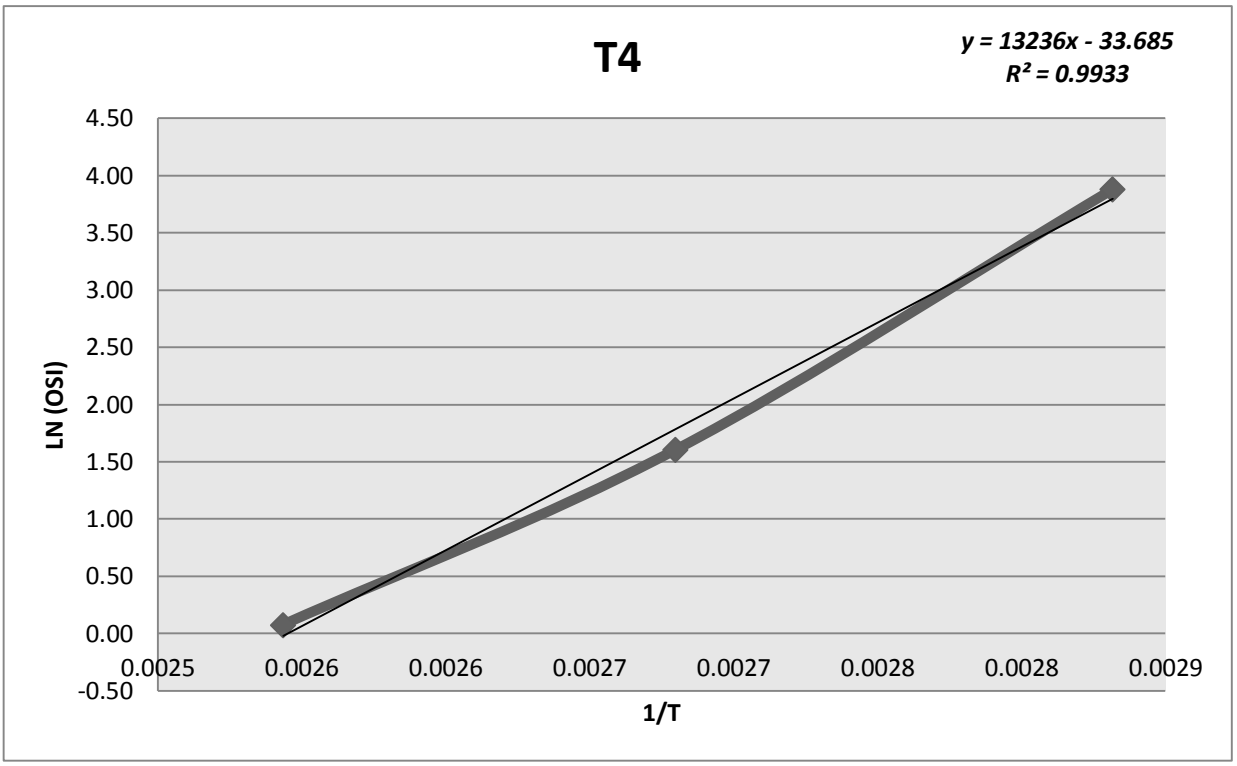


Para T4: TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales.

$$\boldsymbol{Ln\ (48.45) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (4.98) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (1.08) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$

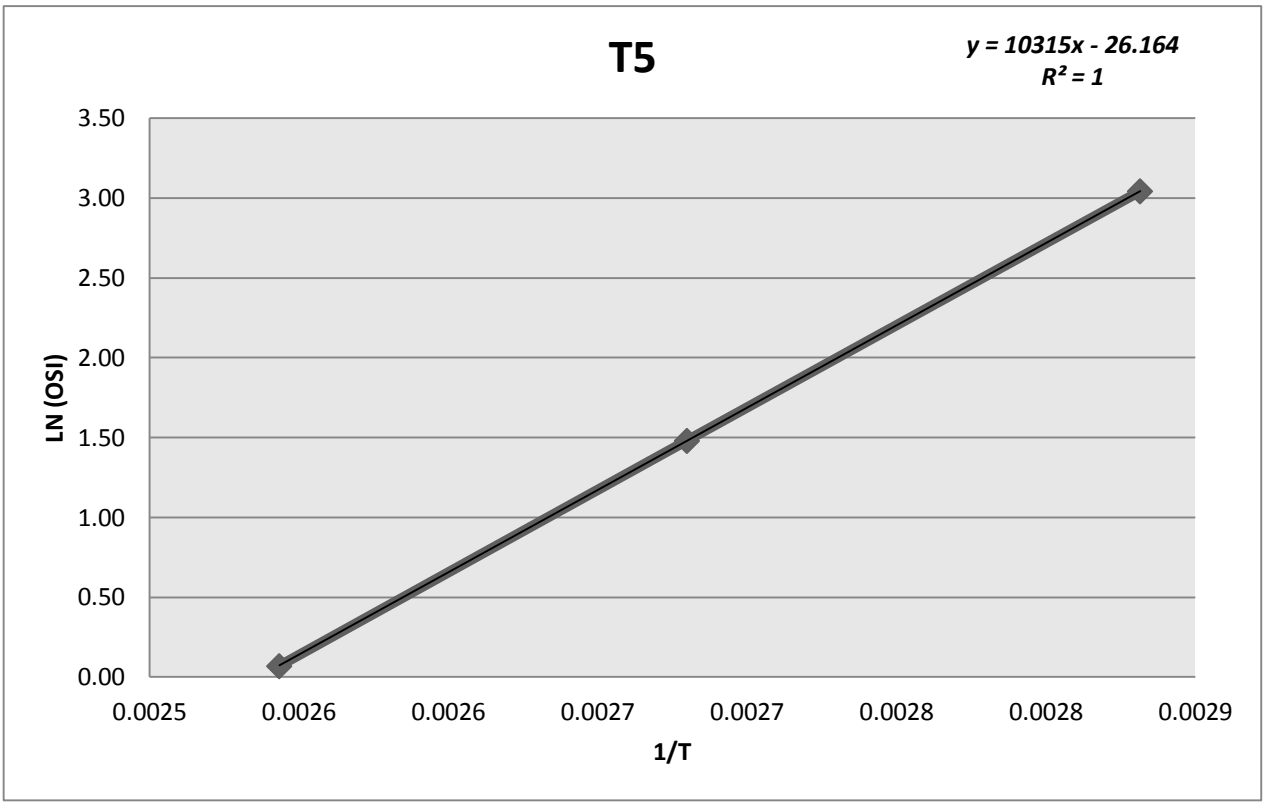


Para T5: TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero.

$$\boldsymbol{Ln\,(20.96) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\,(4.40) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\,(1.07) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$

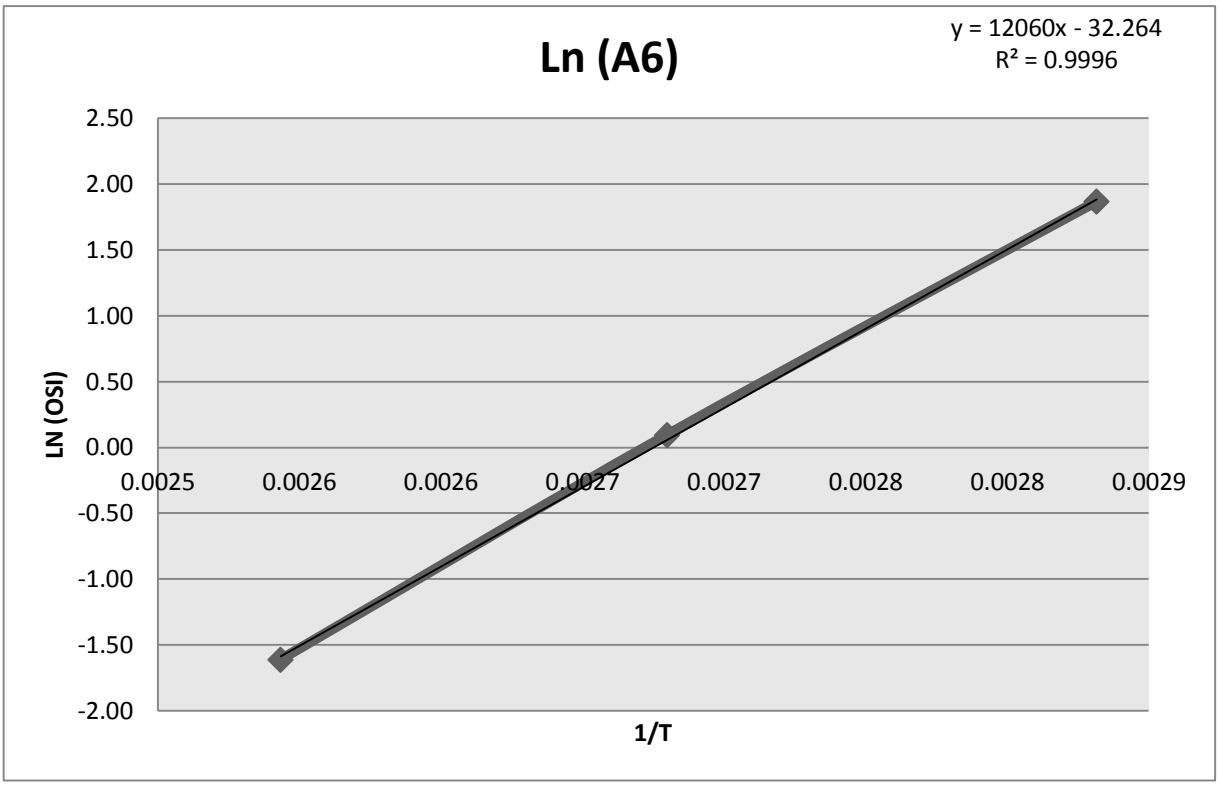


Para T5: Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero.

$$\boldsymbol{Ln\ (6.47) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{80}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (1.1) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{100}}$$

$$\boldsymbol{Ln\ (0.2) = Ln\left(\frac{-Ln(1-\propto)}{z}\right) + \frac{Ea}{R} * \frac{1}{120}}$$


Ln (A6)
y = 12060x - 32.264
R² = 0.9996
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
LN (OSI)
0.0025
0.0026
0.0026
0.0027
0.0027
0.0028
0.0028
0.0029
1/T

Los valores de la pendiente para cada flujo de aire se encuentran en el siguiente TABLA:

TRATAMIENTO	MEZCLA	PENDIENTE	R^2	Ea (kJ/mol)
T0	Sin antioxidante	11343.00	0.998	94.31
T1	TBHQ + BHT + BHA	11610.00	0.993	96.53
T2	Tocoferoles Naturales	13947.00	0.993	115.96
T3	Extracto de té verde + Extracto de Romero	9556.60	0.998	79.46
T4	TBHQ + BHT + BHA + Tocoferoles Naturales	13236.00	0.993	110.05
T5	TBHQ + BHT + BHA + Extracto de té verde + Extracto de Romero	10315.00	1.000	85.76
T6	Tocoferoles Naturales+ Extracto de té verde + Extracto de Romero	12060.00	0.999	100.27

ANEXO N° 4

Ficha técnica de los antioxidantes

ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL.

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Valid from: June 16, 2014

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 215033-7.0EN **Material no. 1219236**

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M
20 kg

Description

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M is a natural extract of green tea, with maltodextrin as carrier. The product exhibits the flavour, aroma and antioxidant activity characteristic of green tea extract.

Application areas

Margarine and spreads, meat, poultry, seafood and similar products

Potential benefits

- Improvement of products by retarding lipid oxidation
- Longer shelf life of processed products
- Consistent quality
- Excellent alternative to BHA and BHT based antioxidants and rosemary extract
- Excellent carry-through effect
- Uniform distribution of green tea extract due to the carrier present

Usage levels

The recommended dosage of GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M is in the range 100-500 ppm (100-500 g per metric ton). Exact dosage cannot be stated as it depends on the fat/oil content of the product for which it is intended.

Directions for use

Add GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M to the water phase, where it will dissolve. If no water phase is present, pre-mix GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M with other dry ingredients.

Composition

Green tea extract
(20 % catechins)
and
Maltodextrin

Physical/chemical specifications

Form at 25°C	powder
Colour	light peach

Colour variations may occur from batch to batch.

Nutritional data

Approximate values for Nutrition labelling per 100g.

Energy	395 Calories/100g
Protein	4.2 g/100g
Carbohydrate	93.6 g/100g
- of which sugars	0.4 g/100g
Fat	0.2 g/100g
Ash	0.4 g/100g
Moisture	1.6 g/100g
Total sodium	59 mg/100g

Storage

Conditions:
Store unopened below 25°C in dry conditions, away from direct sunlight and odorous products.

When opened, store below 25°C in original packaging in dry conditions, away from direct sunlight and odorous products.

Shelf life:
Shelf life is 18 months when stored according to recommendations.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

CULTURES DIVISION
food.protection@danisco.com
www.danisco.com

Valid from: June 16, 2014

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 215033-7.0EN

Material no. 1219236

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M

20 kg

Packaging

GUARDIAN™ Green Tea Extract 20M is available in 20 kg PE pouches in carton.
Other forms of packaging may be available on request

Purity and legal status

In the United States, green tea extract is considered generally recognized as safe (GRAS) for use as a natural flavor in foods under 21 CFR 182.20.

In the EU, green tea extract is approved for use as a natural flavouring.

Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country. Advice regarding the legal status of this product is available on request.

Safety and handling

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

Country of origin

Denmark

Kosher status

This product is certified by the Orthodox Union as kosher pareve.

Halal status

This product is certified Halal by Halal Food Council of Europe and IFANCA International.

GMO status

According to regulations EC nos. 1829/2003 and 1830/2003:

The raw materials and processing aids used in the production of this product do not contain or consist of GMOs, and are not produced from GMOs.

Questionnaire has been used as documentation.

Allergens

Below table indicates the presence (as added components) of the following allergens and products thereof:

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	Wheat	
	X	Other cereals containing gluten	
	X	Crustaceans	
	X	Eggs	
	X	Fish	
	X	Peanuts	
	X	Soybeans	
	X	Milk (including lactose)	
	X	Nuts	
	X	Celery	
	X	Mustard	
	X	Sesame seeds	
	X	Sulphur dioxide and sulphites (>10mg/kg)	
	X	Lupin	
	X	Molluscs	

Local regulation has always to be consulted as allergen labelling requirements may vary from country to country.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 228672-4.1EN

Material no. 999008879

GUARDIAN® Rosemary Extract 08

Fat Soluble, 6 GAL Drum

Description

GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is a natural extract of rosemary, Rosmarinus officinalis, with propylene glycol and a food grade emulsifier as carrier. The product exhibits the flavor, aroma and antioxidant activity characteristic of rosemary.

GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is soluble in fats and oils, but insoluble in water.

Application areas

Vegetable and animal fats and oils, frying oils, shortenings, margarine and spreads, mayonnaise and dressings, baked products, snack foods, meat and poultry products, sea food products, potato granules/flakes, cereal products, cosmetics, and similar products.

Potential benefits

- Improvement of products by retarding lipid oxidation
- Longer shelf life of fats and oils and of processed products
- Consistent quality
- Excellent carry-through effect
- Uniform distribution of rosemary extract due to the carrier present

Usage levels

The recommended dosage of GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is in the range 400-1200 ppm. Exact dosage cannot be stated as it depends on the fat/oil content of the product for which it is intended as well as maximum legal limits as defined by regulations.

Directions for use

Apply GUARDIAN® Rosemary Extract 08 to product either directly or as a fat or oil solution by spraying, dipping, kneading or injecting.

Directly:
Add the calculated quantity of GUARDIAN® Rosemary Extract 08 (68-158°F/20-70°C) to melted fat or oil (68-158°F/20-70°C), stirring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is completely dissolved.

Using a presolution:
Add 1 g GUARDIAN® Rosemary Extract 08 (68-176°F/20-80°C) to at least 9 g melted fat or oil (140-176°F/60-80°C), stirring slowly. Maintain temperature (140-176°F/60-80°C) and continue stirring slowly until GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is completely dissolved.

If a weaker solution is required, dilute further with melted fat or oil (68-176°F/20-80°C). Stir until the solution is homogeneous.

Composition

GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is composed of:

Propylene glycol
Natural rosemary extract
Acetic acid esters of
mono- and diglycerides of
fatty acids
and
Mono- and diglycerides of
fatty acids

Raw materials used for the production of GUARDIAN® Rosemary Extract 08 are not of animal origin.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 228672-4.1EN

Material no. 999008879

GUARDIAN® Rosemary Extract 08

Fat Soluble, 6 GAL Drum

Physical/chemical specifications

Phenolic diterpenes (compound present in rosemary extract)	4 %
Form at 77°F (25°C)	liquid
Color	brown

Color variations may occur from batch to batch.

Nutritional data

Antioxidants, whose significant function in food is to slow and / or prevent oxidation rather than nutritional, do not make any significant contribution to the nutritional profiles of the products in which they are used.

ANALYSIS	TYPICAL VALUES
Calories	approx 629 Calories/100g
-Calories from fat	629
Total Fat	27 g
- Monounsaturated fat	13 g
- Polyunsaturated fat	2-7 g
- Saturated fat	2-7 g
- Trans fat	0-5 g
Protein	< 1 g
Moisture	< 1 g
Ash	< 1 g
Carbohydrate	67.5 g

Storage

Conditions:
Store product between 59-77°F (15-25°C) in closed containers.

When opened, store between 59-77°F (15-25°C) in original container.

GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is a concentrated solution and may therefore form precipitates or lumps on prolonged storage, especially at low temperatures. Should this occur, re-melt at 122-158°F (50-70°C) and shake or stir thoroughly before use.

Shelf life:
Shelf life is 18 months when stored according to recommendations.

Packaging

GUARDIAN® Rosemary Extract 08 is available in 6 GAL drums.

Purity and legal status

In the United States rosemary extract is approved as GRAS for use in foods under 21 CFR 182.20 and may be labelled "natural flavouring".

Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country. Advice regarding the legal status of this product is available on request.

Safety and handling

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

Country of origin

United States of America

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 990070-7.1EN

Material no. 990070849

GUARDIAN® TOCO 70

Antioxidant, Fat Soluble, 5 GAL Pail

Description

GUARDIAN® TOCO 70 is a highly effective antioxidant mixture of natural tocopherols with a selected food grade soybean oil, RBD as carrier.

GUARDIAN® TOCO 70 is soluble in fats and oils, but insoluble in water.

Application areas

Animal fats and oils, baked products, snack foods, meat and poultry products, seafood products, potato granules/flakes, cereal products, cosmetics, and similar products.

Potential benefits

- Improvement of products by retarding lipid oxidation
- Longer shelf life of fats and oils and of processed products
- A minimum of change or deterioration of taste, odor, color, texture and nutritional value
- Consistent quality
- Excellent carry-through effect
- Excellent alternative to BHA and BHT based antioxidants

Usage levels

The recommended dosage of GUARDIAN® TOCO 70 is in the range 100-500 ppm. Exact dosage cannot be stated as it depends on the fat/oil content of the product for which it is intended as well as maximum legal limits as defined by regulations.

Directions for use

Apply GUARDIAN® TOCO 70 to product either directly or as a fat or oil solution by spraying, dipping, kneading or injecting.

Using a presolution:
Add 1 g GUARDIAN® TOCO 70 (68-176°F/20-80°C) to at least 4 g melted fat or oil (68-176°F/20-80°C), stirring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN® TOCO 70 is completely dissolved.

Directly:
Add the calculated quantity of GUARDIAN® TOCO 70 (68-176°F/20-80°C) to melted fat or oil (68-176°F/20-80°C), stiring slowly. Maintain temperature and continue stirring slowly until GUARDIAN® TOCO 70 is completely dissolved.

If a weaker solution is required, dilute further with melted fat or oil (68-176°F/20-80°C). Stir until the solution is homogeneous.

Composition

GUARDIAN® TOCO 70 is composed of:

Natural mixed tocopherols	70%
Soybean oil	30%

All percentages are by weight.

Physical/chemical specifications

Form at 77°F (25°C)	liquid
Color	light to dark brown

Color variations may occur from batch to batch.

Heavy metal specifications

Mercury (Hg)	max. 1 mg/kg
Arsenic (As)	max. 3 mg/kg
Lead (Pb)	max. 2 mg/kg
Heavy metals (as Pb)	max. 10 mg/kg

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 990070-7.1EN

Material no. 990070849

GUARDIAN® TOCO 70

Antioxidant, Fat Soluble, 5 GAL Pail

Nutritional data

GUARDIAN® TOCO 70 typical results:

Calories	200 Calories/100g
Other (mixed tocopherols)	min. 70 g
Fat	24.8 g
Saturates	3.8 g
Total carbohydrate content	0 g
Protein	1 g
Total sodium	< 0.2 g

Storage

Conditions:
Store product between 59-77°F (15-25°C) in closed containers.

When opened, store between 59-77°F (15-25°C) in original container.

Shelf life:
Shelf life is 24 months when stored according to recommendations.

Packaging

GUARDIAN® TOCO 70 is available in 5 GAL pails.

Purity and legal status

GUARDIAN® TOCO 70 meets FAO/WHO, EU and Food Chemicals Codex specifications. Components are permitted for use in the US under following regulations: 9 CFR 424.21, 21 CFR 182.3890, and 182.8890

Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country. Advice regarding the legal status of this product is available on request.

Safety and handling

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

Kosher status

This product is certified Kosher.

Halal status

This product is certified Halal by The Islamic Food and Nutrition Council of America-IFANCA.

GMO status

GUARDIAN® TOCO 70 is not certified Identity Preserved and is not marketed as a non-GM product.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

DRESEN	ESPECIFICACIÓN COMERCIAL	CÓDIGO:	H-024
		FECHA DE ACTUALIZACION:	AGOSTO 2014
	TBHQ	Nº REVISIÓN:	04
		PÁGINAS:	1 DE 1

Descripción: Antioxidante de origen sintético.

Componentes: TBHQ (terbutil hidroquinona).

Uso específico: Antioxidante usado para la protección de aceites vegetales refinados, productos fritos (frituras y botanas), grasas vegetales y animales.

Características organolépticas y fisicoquímicas:

Aspecto:	Polvo fino
Olor:	Característico del producto, exento de olores extraños o rancios.
Color:	Blanco
Pureza:	99.0 % mínimo.
Punto de fusión:	126.5 - 128.5° C.
2,5 Di-terbutilhidroquinona:	0.2 % máx.
Hidroquinona:	0.10 % máximo.
T-butil-p-benzoquinona:	0.20 % máximo.
Tolueno:	0.0025 % máximo.
Plomo (Pb):	2 ppm máximo.
Metales pesados:	10.0 ppm máx.
Arsénico:	3.0 ppm máx.
Solubilidad:	Solventes orgánicos, propilenglicol, aceites y grasas (vegetales y animales).

Inocuidad:

Materia extraña objetable:	Libre de cuerpos extraños.
Contaminantes químicos:	Libre de contaminantes químicos.
Riesgo biológico:	Los componentes no permiten la actividad microbiana.
GMO:	Libre de organismos genéticamente modificados.
Riesgo alergénico:	Libre de alérgenos

Dosis: Adicionar hasta 200 g/t de acuerdo al contenido de grasa en el producto final.

Presentación: Cuñete de cartón con bolsa interior de polietileno con peso neto de 25 ó 50 kg.

Caducidad: 2 años a partir de la fecha de elaboración y en su envase original.

Almacenamiento y traslado: Almacenar en lugar fresco y seco, resguardar de la luz solar directa. Evitar almacenar o transportar con agentes oxidantes fuertes.

DRESEN QUIMICA, SA de CV. Hidalgo No. 71.Col del Carmen
Tel +52 55 5688 9292, 5688 8673. e-mail: ventas@dresen.com.mx, exp

NUVEL S.A.C.

Ing. Carlos Avila Cipriani
Coordinador General de Ventas

Calle Los Tejedores 109 Urb. Vulcano Ate, Lima - Perú
Teléfono (511) 715-8458 / (511) 946183440
E-mail: ventas3@nuvelsac.net www.dresen.com.mx

DRESEN	ESPECIFICACIÓN COMERCIAL	CÓDIGO:	H-026
		FECHA DE ACTUALIZACION:	AGOSTO 2014
	BUTILHIDROXITOLUENO (BHT)	Nº REVISIÓN:	04
		PÁGINAS:	1 DE 1

Sinónimos: Butilhidroxitoluol. Hidroxitolueno dibutilado. 2-*tert*-Butil-4-metoxifenol. E-321.

INCI: BHT

Formula Molecular: $C_{15}H_{24}O$

Peso Molecular: 220,35

Datos Fisico-Quimicos: Polvo cristalino blanco o blanco-amarillento. Prácticamente insoluble en agua, muy soluble en acetona, fácilmente soluble en etanol al 96 por ciento y en aceites vegetales. Punto de fusión: 70 °C.

Propiedades y usos: Antioxidante utilizado en farmacia y cosmética, y especialmente indicado para aceites y grasas para prevenir y retrasar el enranciamiento de este tipo de productos, y para disminuir la pérdida de actividad de las vitaminas liposolubles.
Para mejorar la eficacia antioxidante se suele combinar con otros antioxidantes, como BHA y derivados del ácido gálico, o con secuestrantes y sinérgicos como los ácidos cítrico o fosfórico.
También presenta acción antiviral, habiéndose usado en el tratamiento del herpes simple labial en forma de solución oleosa.
Se ha de incorporar en frío para evitar su propia oxidación, en la fase grasa o alcohólica de los preparados.

Dosificación: Como antioxidante se utiliza normalmente a la dosis de 0,01 – 0,03 %.
Se han utilizado dosis de hasta un 0,5 % en el caso de aceites esenciales y aromas.
Para el tratamiento del herpes labial, al 15 %.

Incompatibilidades: Agentes oxidantes, sales de hierro, y trazas de metales en general.
Trazas de metales y la exposición a la luz causan su oscurecimiento y pérdida de actividad.

Observaciones: Es alterable por la luz, humedad, y calor.

Conservación: En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.

DRESEN QUIMICA, SA de CV. Hidalgo No. 71.Col del Carmen
Tel +52 55 5688 9292, 5688 8673. e-mail: ventas@dresen.com.mx, exp

NUVEL S.A.C.

Ing. Carlos Avila Cipriani
Coordinador General de Ventas

Calle Los Tejedores 109 Urb. Vulcano Ate, Lima - Perú
Teléfono (511) 715-8458 / (511) 946183440
E-mail: ventas3@nuvelsac.net www.dresen.com.mx

DRESEN	ESPECIFICACIÓN COMERCIAL	CÓDIGO:	H-025
		FECHA DE ACTUALIZACIÓN:	AGOSTO 2014
	BUTILHIDROXIANISOL (BHA)	Nº REVISIÓN:	04
		PÁGINAS:	1 DE 1

Sinónimos: 2-Tertbutil-4-metoxifenol. E320.

INCI: BHA.

Formula Molecular: $C_{11}H_{16}O_2$

Peso Molecular: 180,24

Datos Físico-Químicos: Polvo cristalino blanco, amarillento o débilmente rosado, prácticamente insoluble en agua, muy soluble en cloruro de metileno, fácilmente soluble en etanol al 96 por ciento y en aceites vegetales. Se disuelve en disoluciones diluidas de hidróxidos alcalinos. Punto de fusión: 48 – 55 °C.

Propiedades y usos: Antioxidante utilizado en farmacia y cosmética, especialmente indicado para aceites y grasas para prevenir y retrasar el enranciamiento de este tipo de productos, y para disminuir la pérdida de actividad de las vitaminas liposolubles.
Tiene también cierta actividad antimicrobiana.
Para mejorar la eficacia antioxidante se suele combinar con otros antioxidantes, como BHT y derivados del ácido gálico, o con secuestrantes y sinérgicos como los ácidos cítrico o fosfórico.
En las emulsiones se incorpora en la fase grasa y siempre en frío para evitar su oxidación.

Dosificación: Como antioxidante se utiliza normalmente a la dosis de 0,005 – 0,02 %.
Se han utilizado dosis de hasta un 0,5 % en el caso de aceites esenciales y aromas.

Incompatibilidades: Agentes oxidantes, sales férricas, y trazas de metales en general.

indicado para aceites y grasas para prevenir y retrasar el enranciamiento de este tipo de productos, y para disminuir la pérdida de actividad de las vitaminas liposolubles.
Tiene también cierta actividad antimicrobiana.
Para mejorar la eficacia antioxidante se suele combinar con otros antioxidantes, como BHT y derivados del ácido gálico, o con secuestrantes y sinérgicos como los ácidos cítrico o fosfórico.
En las emulsiones se incorpora en la fase grasa y siempre en frío para evitar su oxidación.

Dosificación: Como antioxidante se utiliza normalmente a la dosis de 0,005 – 0,02 %.
Se han utilizado dosis de hasta un 0,5 % en el caso de aceites esenciales y aromas.

Incompatibilidades: Agentes oxidantes, sales férricas, y trazas de metales en general.

Observaciones: Es alterable por la luz, humedad, y calor.

Conservación: En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.

DRESEN QUIMICA, SA de CV. Hidalgo No. 71,Col del Carmen
Tel +52 55 5688 9292, 5688 8673. e-mail: ventas@dresen.com.mx, ext

NUVEL S.A.C.

Ing. Carlos Avila Cipriani
Coordinador General de Ventas

Calle Los Tejedores 109 Urb. Vulcano Ate, Lima - Perú
Teléfono (511) 715-8458 / (511) 946183440
E-mail: ventas3@nuvelsac.net www.dresen.com.mx

ANEXO N° 5

Análisis estadístico en el software STATGRAPHICS CENTURIÓN XVI.I realizado a los tiempos de inducción obtenidos para determinar el efecto de los antioxidantes sobre el aceite crudo de pescado.

Análisis de Varianza para TIEMPO DE INDUCCION - Suma de Cuadrados

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	2105.96	6	350.993	6.55	0.0000
B:TEMPERATURA	5448.03	2	2724.02	50.83	0.0000
RESIDUOS	2893.78	54	53.5885		
TOTAL (CORREGIDO)	10447.8	62			

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

EL STATADVISOR

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de TIEMPO DE INDUCCION en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre TIEMPO DE INDUCCION con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para TIEMPO DE INDUCCION por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
T0	9	2.11	2.44014	X
T3	9	3.19778	2.44014	X
T2	9	4.92333	2.44014	X
T6	9	5.83667	2.44014	X
T5	9	8.81	2.44014	XX
T1	9	15.6878	2.44014	XX
T4	9	18.1689	2.44014	X

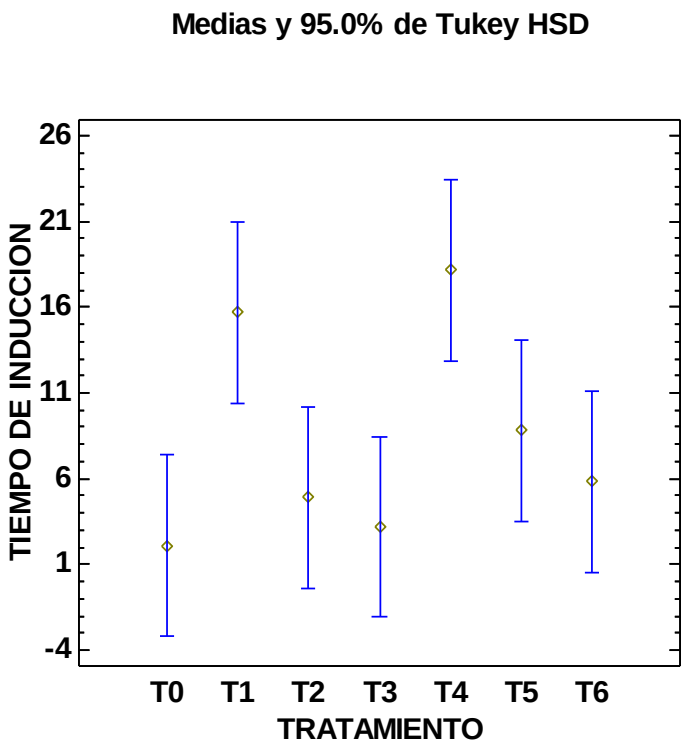
Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
T0 - T1	*	-13.5778	6.9186
T0 - T2		-2.81333	6.9186

T0 - T3		-1.08778	6.9186
T0 - T4	*	-16.0589	6.9186
T0 - T5		-6.7	6.9186
T0 - T6		-3.72667	6.9186
T1 - T2	*	10.7644	6.9186
T1 - T3	*	12.49	6.9186
T1 - T4		-2.48111	6.9186
T1 - T5		6.87778	6.9186
T1 - T6	*	9.85111	6.9186
T2 - T3		1.72556	6.9186
T2 - T4	*	-13.2456	6.9186
T2 - T5		-3.88667	6.9186
T2 - T6		-0.913333	6.9186
T3 - T4	*	-14.9711	6.9186
T3 - T5		-5.61222	6.9186
T3 - T6		-2.63889	6.9186
T4 - T5	*	9.35889	6.9186
T4 - T6	*	12.3322	6.9186
T5 - T6		2.97333	6.9186

* Indica una diferencia significativa.

EL STATADVISOR

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.



I. DATOS GENERALES (PRE GRADO):

1.1. UNIVERSIDAD:

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

1.2. ESCUELA O CARRERA PROFESIONAL:

INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

1.3. TITULO DE TRABAJO:

"DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DEL ACEITE CRUDO DE PESCADO USANDO ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS Y NATURALES MEDIANTE USO DEL RANCIMAT"

1.4. AREA DE INVESTIGACION:

EXPERIMENTAL Y APLICADO

1.5. AUTOR:

DNI: 70220714; NATALIA ELENA ARDILES FALCON

DNI: 47051325; VANESSA JANEEL MOZO MALCA

1.6. TITULO PROFESIONAL AL QUE CONDUCE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

1.7. AÑO DE APROBACION DE LA SUSTENTACION:

2017

II. CONTENIDO DEL RESUMEN:

2.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO:

2.1.1. Objetivo de la Investigación:

El objetivo general de la investigación es determinar el tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado usando antioxidantes sintéticos y naturales mediante uso del Rancimat, con el fin de encontrar una mezcla ideal de antioxidantes que brinden mayor tiempo protección al producto; para ello se tiene como variables independientes la concentración de antioxidantes con los siguientes niveles BHA,BHT,TBHQ: 200ppm, TC: 1000ppm, E:1000ppm, BHA,BHT,TBHQ -TC: 100-1000ppm, BHA,BHT,TBHQ -E :100-1000 ppm y TC-E:1000-1000ppm, y la temperatura del Rancimat con los siguientes niveles: 80, 100 y 120 °C; las variables dependientes serán los parámetros fisicoquímicos tales como % AGL, Índice de peróxido y índice de anisidina y el tiempo de vida útil, las cuales determinaran la calidad final del producto. Asimismo se caracterizarán físico-químicamente tanto la materia prima con y sin adición de antioxidantes. Este proyecto será realizado en los laboratorios del instituto tecnológico de investigación, laboratorios de la EAP Ing. Agroindustrial y Laboratorio de autocontrol de la

2.1.2. Formulación del Problema:

¿Cuál será la mejor mezcla de antioxidantes sintéticos y naturales para obtener el mayor tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado mediante el uso del Rancimat?

2.2. OBJETIVOS:

2.2.1. Objetivo General:

- Determinar el tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado usando antioxidantes sintéticos y naturales mediante uso del Rancimat.

2.2.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar las características físico-químicas iniciales y finales del aceite crudo de pescado: densidad, índice de refracción, índice de yodo, % acidez titulable, %humedad e impurezas, composición de ácidos grasos, índice de anisidina, peróxidos, valor Totox.
- Determinar el tiempo de inducción del aceite crudo de pescado industrial con flujo de aire de 15L/h, a temperaturas 80, 100 y 120°C.
- Determinar las características organolépticas como el color mediante los métodos: Escala Gardner y el CILAB.
- Determinar la energía de activación (Ea) de la reacción de oxidación de aceite crudo de pescado.

2.3. HIPOTESIS:

Al adicionar el antioxidante TBHQ, BHT, BHA a 200ppm en el aceite de pescado crudo industrial y sometido en equipo Rancimat a temperatura de 80°C y 15 L/h, incrementará en 8 veces su estabilidad oxidativa. El orden de eficacia de los antioxidantes sintéticos será mucho mayor que los antioxidantes de origen natural.

2.4. MARCO TEORICO:

El aceite crudo de pescado; es líquido a temperatura ambiente, de origen marino, (jurel, caballa, anchoveta, etc.) de color amarillo-anaranjado, que se ha obtenido por el prensado del pescado y seguidas centrifugaciones para separar los diferentes componentes. El aceite de pescado se obtiene como subproducto de la elaboración de harina de pescado, la cual se obtiene principalmente de las especies sardina y anchoveta. Ambas especies poseen gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados, sujetos a variaciones, dependiendo de la época de captura. El aceite de pescado es la principal fuente de ácidos grasos omega 3, ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexenoico (DHA) siendo las especies ecuatorianas muy ricas en estos componentes.(Gruger, 1987).

La oxidación de los aceites de pescado se puede retardar de diversas maneras; uno de los métodos más comunes de controlar la oxidación es mediante el uso de diferentes antioxidantes, los cuales pertenecen a varias categorías fundamentales: secuestradores de oxígeno (ácido ascórbico y ascorbil palmitato), queladores de metales (ácido cítrico, EDTA, aminoácidos), y donadores de protones. A este último grupo pertenece el etoxiquin (ETQ) y los antioxidantes fenólicos: tocoferoles naturales y sintéticos, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT). Galato de propilo y terbutilhidroxiquinona (TBHQ).

2.5. CONCLUSIONES:

- Se determinó el tiempo de vida útil mediante uso del Rancimat del aceite crudo de pescado así como también de los tratamientos con adición de antioxidante resultando el mejor tratamiento el T1 (TBHQ, BHT y BHA) con 8 meses de vida útil.

- Se evaluó las características físicoquímicas del aceite crudo de pescado
  tales como: % Acidez , %Humedad e impurezas, Densidad ,Índice de refracción, Índice de yodo ,Índice de peróxido , Índice de anisidina, valor Totox y composición de ácidos grasos, valores que mostraron estados de deterioro aceptables y dentro de los parámetros de calidad permitidos en empresas de comercialización de aceites marinos.

- Se determinó los tiempos de inducción (5.10, 1.04 y 0,19h) a las temperaturas de 80°C, 100°C y 120°C respectivamente para el aceite crudo de pescado con un flujo de aire de 15 L/h así como también a los tratamientos con antioxidantes los cuales tienen mayor tiempo de inducción, comprobando que cuanto más largo es el tiempo de inducción, más estable es la muestra.
- Se determinó por escala GARDNER un color de 12, y por método CIELAB y sus parámetros: L, a*, b*, C*, y h* para el aceite crudo de pescado, comprobando así la intensidad del color amarillento del aceite el cual está relacionado con la cantidad de compuestos aldehídicos.

- Se determinó la energía de activación (Ea =94.31 KJ/mol) para el aceite crudo de pescado y para el mejor tratamiento T1 fue 102.87 KJ/mol, así se concluye que a mayor eficiencia del antioxidante mayor es la Ea.

2.6. RECOMENDACIONES:

- Se recomienda determinar la acción de estos antioxidantes en el aceite refinado u otros aceites comerciales que presentan inestabilidad a altas temperaturas, tales como el aceite de Chía, Sacha Inchi, linaza entre otros.
- Se recomienda que se realicen estudios que puedan eliminar el olor y sabor poco agradable característico del aceite de pescado ya que sería excelente incluirlo en el consumo directo en la dieta por el alto contenido de ácidos grasos esenciales como DHA y EPA.
- Finalmente se pueden realizar estudios de vida útil a aceites utilizando enzimas que aporten resistencia a la oxidación lipídica.

2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- ✓ **Avello, M & M Suwalsky. (2006**). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea (Concepc.), 494:pp 161-172.
- ✓ **Barrera A.D. (1993).** Simple procedure to evaluate the performance of fats and Oils at Frying Temperatures, Grasas Aceites .Brasil. 48:231-235
- ✓ **Bimbo, A. (1999).** Pautas para la clasificación del aceite de pescado comestible. Aceites y Grasas 410-421.
- ✓ **Boran, G., Karacam, H. and Boran, M. (2006).**Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. Food Chemistry, 98(4): 693-698.
- ✓ **Borowska J., (2003).** Fruits and vegetables as source of natural antioxidants. 1, 11-12. Polish.
- ✓ **Calder, F. (2006).** n−3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases1,2,3. American Society for Clinical Nutrition 83(6) 1505- 1519.
- ✓ **Nash, D.M. and Ackman, R.G. (1977).** Mackerel lipids as an unsaturated fat model system for the determination of the antioxidative potency of TBHQ and other antioxidant compounds».-J. Am. Oil Chemists'Soc. 54,417-420
- ✓ **Navas, P. (2010).** Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla La Mancha, Facultad de Ciencias Químicas. España.

- ✓ **Rojano, B.A. (1997).** Oxidación de lípidos y antioxidantes. Universidad Nacional De Colombia. Departamento de Química. Medellín.
- ✓ **Salas, M. A. (2008).** Uso de antioxidantes para la estabilidad oxidativa de la pulpa de anchoveta (Engraulis ringens) almacenada en congelación. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia Y Bioquímica Unidad De Postgrado. Ciencia de los Alimentos.
- ✓ **Shahidi, F.; Wanasundara, U. (2002).** Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In C. C. Akoh, & D. B. Min (Eds.), Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology. New York, EEUU.
- ✓ **Valenzuela, A. (2009).** Aceites de origen marino y su importancia en la nutrición humana y en la ciencia de alimentos. Rev Chil Nutr 36: 246-57.
- ✓ **Valenzuela, A.; Nieto, S.; Uauy, R. (1993).** Desafíos Tecnológicos para evaluar ácidos grasos N-3 Poliinsaturados en aceites marinos de uso alimenticio y farmacológico. Aceites y Grasas 53 - 61.
- ✓ **Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; De la Barra, F. (2012).** El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. Rev. Chil. Nutr. 39: 201-209.
- ✓ **Viera, J.P. (2005).** Estabilidad del aceite de fritura de chifles. Facultad De Ingeniería. Área Departamental de Ciencias de la Ingeniería. Piura.

✓ **Vinson J, Dabbagh Y, Serry M, Jang J. (1995).** Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. J Agric Food Sci; 43: 2800-2802.