

**ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DEL ACEITE DE *Terminalia catappa* L.,
EXPUESTO A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, USANDO GC-ECD Y GC-FID**

**JUAN CAMILO HENRÍQUEZ SANABRIA
CÓDIGO: 2090144**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2016**

**ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DEL ACEITE DE *Terminalia catappa* L.,
EXPUESTO A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, USANDO GC-ECD Y GC-FID**

JUAN CAMILO HENRÍQUEZ SANABRIA

CÓDIGO: 2090144

**Trabajo de grado presentado como requisito
para optar por el título de Químico**

Directores:

Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su esfuerzo y sacrificio, por enseñarnos que solo la educación rompe las cadenas de la esclavitud.

A la Doctora Elena y al Doctor Jairo, por el conocimiento científico aportado, pero sobre todo por mostrarnos que en Colombia si hay con qué.

A mis tíos Jaime Henríquez, Guillermo Henríquez y Ángela de Henríquez, quienes me apoyaron económicamente durante el paso por la Universidad.

A Leonardo Niño y Rogerio Saavedra, de quienes aprendí el significado de la palabra amigo. También a mis compañeros del CENIVAM.

Al Centro de Excelencia CENIVAM, que me permitió desarrollar el proyecto de grado y otros trabajos de investigación, con los que pude participar en Congresos Internacionales.

Muchas gracias.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. ESTADO DEL ARTE	18
2. MARCO TEÓRICO	22
2.1 TERMINALIA CATAPPA L.	22
2.2 ACEITES VEGETALES	24
2.3 OXIDACIÓN LIPÍDICA	25
2.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE OXIDACIÓN	27
2.4.1 Análisis por cromatografía	27
2.4.1.1 Detectores	28
2.4.1.1.1 Detector de captura de electrones (ECD)	28
2.4.1.1.2 Detector de ionización en llama (FID)	30
2.4.2 Derivación	31
2.4.2.1 Aldehídos	31
2.4.2.2 Ácidos grasos	32
2.5 ACEITES ESENCIALES	33
2.5.1 <i>Lippia</i> origanoides H.B.K	34
2.6 ANTIOXIDANTES	35
3. METODOLOGÍA	36
3.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL	36
3.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE	37
3.3 OXIDACIÓN LIPÍDICA	37
3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.	38
3.4.1 Análisis FAME	39
3.4.2 Análisis de hexanal	40
3.4.2.1 Cuantificación de pentafluorofenilhidrazona del hexanal	40

3.5 PROTECCIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EMPLEADO ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia origanoides</i> .	41
3.5.1 Análisis por GC-MS	42
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE <i>Terminalia catappa</i> .	43
4.2 ANÁLISIS DE FAME	43
4.2.1 Perfil lipídico del aceite de <i>Terminalia Catappa</i>	43
4.2.2 Determinación del grado de oxidación por el método FAME	46
4.3 ANÁLISIS DEL HEXANAL	48
4.4 COMPARACIÓN CON OTROS ACEITES DE SEMILLA	49
4.4.1 Comparación de la oxidación de los aceites vegetales	51
4.5 ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES POR GC-MS	52
4.5.1 Quimiotipo “timol”	52
4.5.2 Quimiotipo “carvacrol”	53
4.5.3 Quimiotipo “felandreno”	54
4.6 PROTECCIÓN CONTRA LA OXIDACIÓN EMPLEANDO ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia origanoides</i> .	56
CONCLUSIONES	59
5. CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Número de publicaciones por año de <i>Terminalia catappa</i> con la ecuación de búsqueda en la base de datos de Scopus (Elsevier): <i>TITLE-ABS-KEY</i> (" <i>Terminalia catappa</i> "). Rango de búsqueda: 1995-2015. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2015.	18
Figura 2. a) Árbol <i>Terminalia catappa</i> L. b) Fruto seco. c) Semilla.	23
Figura 3. Esquema del detector de captura de electrones (ECD). Imagen adaptada de Scoott [26].	29
Figura 4. Esquema del detector de ionización en llama (FID). Imagen adaptada de Scoott [28].	30
Figura 5. Reacción de derivatización de aldehídos con pentafluorofenilhidracina (PFPH); formación de hidrazonas [33].	32
Figura 6. Reacción de transesterificación de ácidos grasos catalizada con BF ₃ . Formación de ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol [30].	33
Figura 7. Semilla de <i>TC</i> en el vivero del Centro de Excelencia CENIVAM. Fotografía tomada por el autor.	36
Figura 8. Reactor de luz ultravioleta <i>home-made</i> , A) Con las paredes de espejos, B) Sin las paredes de espejos. Fotografías tomadas por el autor.	38
Figura 9. Perfil lipídico del aceite de semilla de <i>Terminalia catappa</i> obtenido por extracción con solventes, columna DB-23, detector FID.	44
Figura 10. Estructuras de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de <i>Terminalia catappa</i> .	45
Figura 11. Concentración de PFPH-H VS. tiempo de exposición a la luz ultravioleta, de los cinco aceites vegetales.	52

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción taxonómica de la especie <i>Terminalia catappa</i> [2].	22
Tabla 2. Soluciones preparadas para construir la curva de calibración de PFPH-H	41
Tabla 3. Composición y cantidad relativa de ácidos grasos en el aceite de <i>Terminalia catappa</i> .	45
Tabla 4. Variación de la concentración de los FAME con respecto al tiempo de oxidación.	47
Tabla 5. Concentración de PFPH-H para las muestras de aceite de <i>Terminalia catappa</i> oxidadas por diferentes periodos de tiempo.	48
Tabla 6. Comparación de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de <i>Terminalia catappa</i> con los aceites de semillas de girasol, nueces de Brasil, almendras y el aceite de girasol comercial marca Girasoli®	50
Tabla 7. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales (>1.0 %) del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo “timol”.	53
Tabla 8. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales (>1.0 %) del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo “carvacrol”.	54
Tabla 9. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales (>1.0 %) del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo “felandreno”.	55
Tabla 10. Comparación de la concentración PFPH-H del blanco del aceite de <i>Terminalia catappa</i> con aquellos a los que se les adicionó antioxidante.	56

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. CURVA DE CALIBRACIÓN EMPLEADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PFPH-H	76
Anexo B. PERFILES LIPÍDICO DEL ACEITE DE DIVERSAS SEMILLAS	77
Anexo C. PERFILES CROMATOGRÁFICO OBTENIDOS POR GC-MS DE DIVERSOS ACEITES ESENCIALES	81

ABREVIATURA Y ACRÓNIMOS

AE	<i>Aceite Esencial</i>
BHA	<i>Butilhidroxianisol</i>
BHT	<i>Butilhidroxitolueno</i>
DETBA	<i>1,3-Diethyl-2-Thiobarbituric Acid</i> (ácido 1,3-dietil-2-tiobarbitúrico)
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo).
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones)
et al.	<i>et alii</i> (y otros)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GLC	<i>Gas-Liquid Chromatography</i> (Cromatografía gas-líquido)
GSC	<i>Gas-Solid Chromatography</i> (Cromatografía gas-sólido)
IRD	<i>Infrared Detector</i> (detector de infrarrojo)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (detector selectivo de masas)
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i> (detector selectivo de nitrógeno y fósforo)
PFPH-H	Pentafluorofenilhidrazona del hexanal

PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> (Ácidos grasos poli-insaturados)
PV	<i>Peroxide Value</i> (Índice de peroxidación)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TC	<i>Terminalia catappa</i>
TCD	<i>Thermal Conductivity Detector</i> (Detector de conductividad térmica)
TEA	<i>Thermal Energy Analyser detector</i> (Detector- analizador de energía térmica)
UVA	Ultravioleta A

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DEL ACEITE DE *Terminalia catappa* L., EXPUESTO A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA, USANDO GC-ECD Y GC-FID*.

AUTOR: Juan Camilo Henríquez Sanabria**

PALABRAS CLAVE: *Terminalia catappa*, aceite vegetal, peroxidación lipídica, aceite esencial, *Lippia origanoides*.

DESCRIPCIÓN: La especie *Terminalia catappa* L., es un árbol de tipo ornamental que pertenece a la familia *Combretaceae*, es endémica de las áreas costeras del Océano Índico, sur de Malasia, este de la India, entre otros lugares. Las semillas de esta especie son ricas en aceite vegetal. En el presente trabajo, se estudió la degradación oxidativa del aceite de semilla de esta especie, por el efecto de la exposición a la luz ultravioleta. Las técnicas analíticas para el estudio de la degradación fueron GC-FID y GC-ECD. En los resultados, se identificaron cuatro ácidos grasos que componen el aceite vegetal de *T. catappa*, que fueron ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico, similar con lo reportado en literatura científica. La mayor oxidación del aceite se observó a partir de las 32 horas. Estos resultados se compararon con los obtenidos para otros aceites semillas, entre los que *T. catappa* evidenció la menor degradación bajo las mismas condiciones. También se estudió el efecto protector de aceites esenciales de diferentes quimiotipos *Lippia origanoides*, contra la oxidación lipídica. Los aceites esenciales fueron analizados por GC-MS. Se encontró que los aceites esenciales con mayor contenido de compuestos fenólicos evidenciaron el mayor efecto protector, similar a la sustancia de referencia BHA.

* Tesis de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.; Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: ANALYSIS OF THE DEGRADATION of *Terminalia catappa* L. OIL, EXPOSED TO UV RADIATION, USING GC-ECD AND GC-FID*.

AUTHOR: Juan Camilo Henríquez Sanabria**

Keywords: *Terminalia catappa*, vegetable oil, lipid peroxidation, essential oil, *Lippia origanoides*.

DESCRIPTION: The specie *Terminalia catappa* L., is an ornamental tree that belongs to the *Combretaceae* family. It is indigenous to the coastal areas of the Indian Ocean, southern Malaysia, eastern India, and other places. The seeds of this plant are rich in vegetable oil. In this study, the oxidative degradation by ultraviolet light exposure of the seed oil was investigated. The analytical techniques to study this degradation were GC-FID and GC-ECD. Four fatty acids from the *T. catappa* oil were identified: palmitic, stearic, oleic and linoleic acid, as reported in literature. The mayor oxidation of the oil was observed after 32 hours of UV light exposure. These results were compared with those obtained from different seeds. *T. catappa* oil showed the least degradation under the same conditions. The protective effect of essential oils of different chemotypes of *Lippia origanoides* H.B.K. against lipid peroxidation was also studied. Essential oils were analyzed by GC-MS. It was found that essential oils with higher content of phenolic compounds showed the highest protective effect, similar to the reference substance, BHA.

* Graduation Project.

** Science Faculty. School of Chemistry. Directors: Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.; Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Para el año 2009, en el mundo, se produjeron cerca de 120.000 millones de toneladas de los principales aceites y grasas vegetales, entre los que se encuentran el aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de maíz, aceite de maní, entre otros. Existe una demanda creciente de aceites vegetales, tanto para el sector de alimentos, como para el sector energético, por lo que se han investigado nuevas fuentes de aceites vegetales entre las que se destacan el aceite de moringa, salvado de arroz, entre otras [1].

Una especie promisoría es *Terminalia catappa* L., un árbol de tipo ornamental, endémico de las zonas tropicales y subtropicales cercanas al Océano Índico. Esta especie, se encuentra alrededor del mundo y se distingue por el cambio de coloración en sus hojas a través del año y por la sombra que genera, debido a la distribución de sus ramas [2]. En Colombia se conoce con el nombre de “almendro”, por el parecido de su semilla con una almendra. La semilla presenta un contenido de 49% p/p de aceite graso. Cerca del 57% de la composición química del aceite corresponde a ácidos grasos insaturados. El perfil lipídico del aceite vegetal de esta especie, es similar al de los aceites que se encuentran comercialmente; por ejemplo, los aceites de oliva, de girasol, entre otros [3]. Lo anterior proyecta a *T. Catappa* como una fuente promisoría para la producción de aceite vegetal, con la cual, se podría contribuir a cubrir la demanda mundial de aceites, y a darle un valor agregado a esta especie.

Sin embargo, este aceite al igual que los aceites comerciales presenta entre su composición química triacilgliceroles y ácidos grasos libres [4]. Tanto los ácidos grasos libres como aquellos que forman parte de los triacilgliceroles pueden presentar insaturaciones (enlaces dobles) que los hacen susceptibles a ataques

electrofílicos, y a la generación de cambios fisicoquímicos, que se ven reflejados en cambios de coloración, composición, olor, lo que conlleva pérdidas nutricionales. Estos ataques son conocidos con el nombre de peroxidación lipídica. Este tipo de reacciones son generalmente iniciadas por la presencia de trazas de metales, peróxidos presentes como impurezas, radiaciones ionizantes, o ultravioleta [5].

Los productos generados en las reacciones de oxidación se dividen en dos grupos, conocidos como productos primarios de oxidación y productos secundarios de oxidación [6]. Los primeros generalmente son hidroperóxidos de los ácidos grasos; los secundarios, los constituyen un amplio grupo de compuestos, entre los que se encuentran aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, alcoholes, hidrocarburos de cadena corta, entre muchos otros, que varían según los ácidos grasos que se oxiden [7].

Todo este grupo de compuestos secundarios de oxidación permite tener a la mano un amplio espectro de técnicas analíticas que pueden ser empleadas para el estudio de la degradación de aceites. Entre las técnicas más comunes se encuentran cromatografía de gases, cromatografía líquida, resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de ultravioleta-visible, entre otras [7].

Para este proyecto se planteó como objetivo el estudio de la degradación del aceite de la especie *T. catappa* L.; para esto, el aceite de esta especie se expuso a estrés oxidativo, empleando la radiación ultravioleta A (UVA) en un equipo *home-made*. Los análisis fueron realizados por dos técnicas analíticas, cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) y cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD).

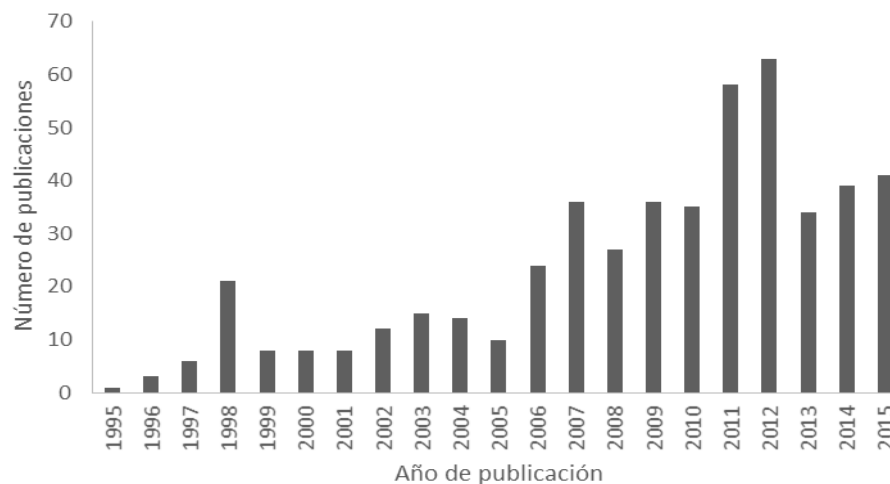
En los resultados encontrados, se observó, bajo las condiciones de trabajo planteadas, que la mejor técnica analítica para estudiar la degradación de un aceite vegetal fue aquella en la que se analizó uno de los compuestos secundarios de oxidación, que para este estudio fue el hexanal, previamente derivado con pentafluorofenilhidracina (PFPH), y que fue analizado por GC-ECD.

1. ESTADO DEL ARTE

Con el fin de conocer los estudios realizados y reportados sobre la especie vegetal *Terminalia catappa* L. (TC) se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), con la ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("*Terminalia catappa*") para la que se encontraron publicados, desde el año 1943 hasta la fecha de la consulta (17 de diciembre de 2015), un total de 516 artículos y 22 artículos de revisión.

En la **Figura 1**, se ilustra el número de publicaciones realizadas desde el año 1995 hasta el año 2015, donde se observa un aumento en el número de publicaciones a través de los años.

Figura 1. Número de publicaciones por año de *Terminalia catappa* con la ecuación de búsqueda en la base de datos de *Scopus* (*Elsevier*): TITLE-ABS-KEY ("*Terminalia catappa*"). Rango de búsqueda: 1995-2015. Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2015.



Entre los años 2011 y 2012, se observó un crecimiento en el número de publicaciones con respecto a los años anteriores, con un total de 111 artículos publicados en esta base de datos. En ese período, se encontraron 60 artículos relacionados con el área de agricultura y ciencias biológicas, 26 con bioquímica, genética y biología molecular, 20 con medicina, 20 sobre farmacología, toxicología y farmacéutica y 10 sobre inmunología y microbiología.

La especie *TC*, según se observa en la literatura, ha sido ampliamente usada en medicina folklórica debido a sus valores terapéuticos. Esta planta ha sido empleada para el tratamiento del envejecimiento de la piel, irritación, hiperpigmentación y alergias. También, se ha usado con fines antiinflamatorios, anticancerígenos, antihepatotóxicos, antigenotóxicos [8]. Según reportaron Naz *et al.* [8], los extractos etanólicos de las hojas y frutos de esta especie mostraron actividad antimicrobiana para combatir las siguientes bacterias: *Corynebacteria*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*. También, se estudió la composición química de estos extractos, en los que se encontraron: ácido ferrúlico, ácido vanílico, pelargonidina, cianidina, miricetina, quercetina y ácido gálico, a los que se les atribuye la actividad biológica observada en los extractos [8].

Igualmente, en Taiwán, se reportó el uso de esta planta, como medicina tradicional para tratar hepatomas¹ y hepatitis; esto debido a la presencia de taninos en los extractos de hojas, entre los cuales el de mayor proporción es la punicalagina [9]. En Colombia, Gómez *et al.*, reportaron un estudio estadístico en el que se mostró, que esta planta también se usa en medicina tradicional en la costa norte de Colombia, para tratar enfermedades de la piel [10].

¹ Hepatoma: tipo de cáncer de hígado.

Otro estudio de importancia es el reportado por Chyaua *et al.* [11], en el que se realizaron extracciones a las hojas caídas de color rojo, verde y amarillo, usando metanol, etanoato de etilo, diclorometano y pentano como solventes de extracción. A los extractos se les evaluó la capacidad antioxidante, usando el método DETBA (por sus siglas en inglés, 1,3- diethyl-2-thiobarbituric acid). En el estudio se encontró que los extractos metanólicos presentaron mayor capacidad antioxidante que el butilhidroxitolueno (BHT), la vitamina C y vitamina E. Entre los tres colores de hojas, se encontró mayor capacidad antioxidante en los extractos de las hojas amarillas [11]. Los autores también realizaron extracciones acuosas variando el tiempo de calentamiento, a los tres tipos de hojas (rojas, verdes y amarillas) y se usó el mismo método DETBA para evaluar su capacidad antioxidante. Los extractos, de los tres tipos de hojas, mostraron buena capacidad antioxidante, y se encontró que con tan solo 3 minutos de calentamiento, los compuestos antioxidantes se solubilizaron [12].

Respecto a la semilla, Ezeokonk *et al.* [13] estudiaron el potencial de TC como fuente de proteína. Para esto se estimó el contenido de nitrógeno, usando el método macro-Kjeldahl. El contenido de proteína cruda se calculó como $N \times 6.25$, donde N fue la cantidad de nitrógeno presente. Este estudio permitió conocer el alto valor nutricional de esta semilla, ya que presentó un contenido de proteína de 26%. Entre los aminoácidos esenciales presentes en la semilla se encontraron: leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, triptófano, metionina, lisina, treonina, histidina y tirosina [13].

El primer artículo sobre el aceite vegetal de TC se publicó en el año de 1943; allí se reportó, por primera vez, la extracción del aceite con solvente y por prensado, con rendimientos del 55% (p/p) y del 35% (p/p), respectivamente. El perfil lipídico reportado para el aceite de semilla lo constituyeron los siguientes ácidos grasos: ácido oleico (35.1%), ácido linoleico (17.9%), ácido palmítico (36.5%) y ácido

esteárico (3.8%). Además, se reportó el porcentaje de humedad, ceniza, proteína y se presentó una breve descripción cualitativa del aceite [14]. Este perfil lipídico fue confirmado por Ajayi *et al.*, en Nigeria y Dos Santos *et al.*, en Brasil [3,15].

Por otra parte, Omeje *et al.* [16] publicaron, en el 2008, un estudio que mostró la cinética de la auto-oxidación del aceite de semilla de *Terminalia catappa* L., a cinco temperaturas diferentes, para aceite crudo y refinado. Esta medición también se realizó, en presencia de un antioxidante (α -tocoferol). La degradación se analizó midiendo el índice de peroxidación por un periodo de 96 horas; los resultados mostraron que el aceite refinado, presentó una menor tendencia a la degradación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 TERMINALIA CATAPPA L.

La especie *Terminalia catappa* L., es un árbol de tipo ornamental, (véase **Figura 2**), endémico de las áreas costeras del Océano Indico, sur de Malasia, este de la India, Islas Andamán, Indochina, Indonesia, entre otros lugares. Este árbol puede medir entre 25 y 40 m de altura, crece en climas tropicales y subtropicales, por lo que se encuentra distribuido alrededor del mundo [2]. La taxonomía de esta especie se muestra en la **Tabla 1**.

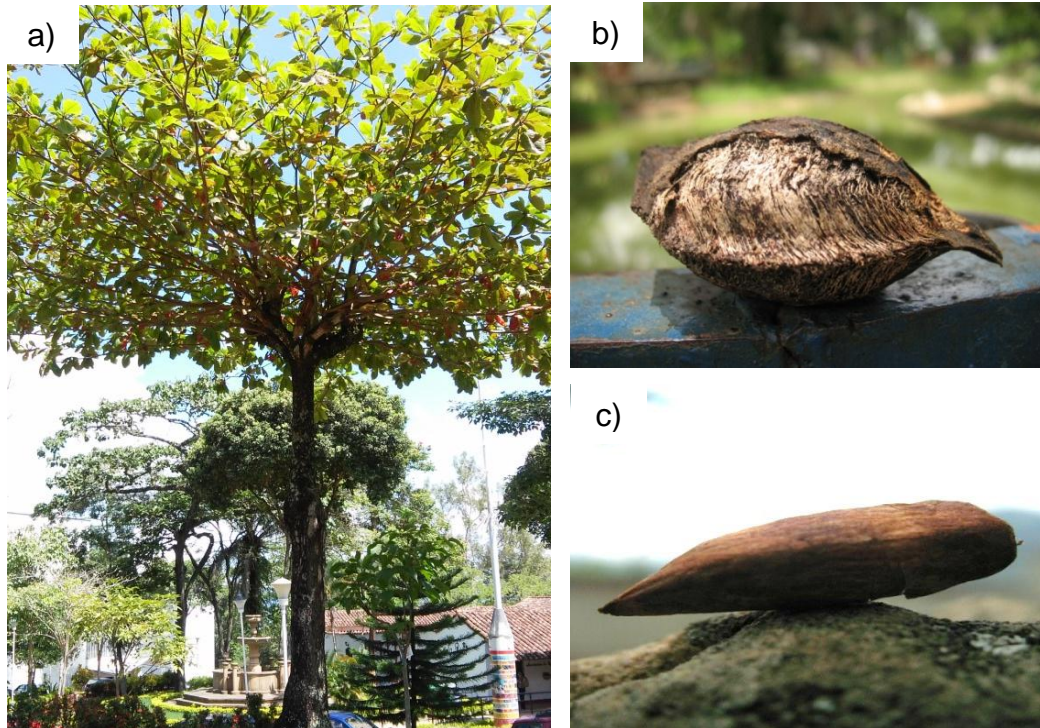
Tabla 1. Descripción taxonómica de la especie *Terminalia catappa* [2].

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Mytales</i>
Familia	<i>Combretaceae</i>
Género	<i>Terminalia</i>
Especie	<i>Terminalia catappa</i> L.

Este árbol se propaga fácilmente, empleando su semilla; crece rápidamente y necesita poco cuidado, en un ambiente adecuado. Usualmente comienza a florecer a partir del segundo o tercer año después de haber sido plantado, pero esto puede variar con el lugar de siembra y el genotipo. El fruto de esta planta es de forma ovoide, puede medir entre 4 y 7 cm de largo y entre 2 y 5 cm de ancho [17]. El fruto crece en la espiga de las flores, de las cuales pueden crecer entre 1 y 5 frutos. El fruto consiste en epicarpio, mesocarpio carnoso, mesocarpio pedregoso y una almendra que presenta una forma ovoide y puede medir

alrededor de los 2.5 cm, es de consumo humano según reportan Dos Santos *et al.*; y Thomson *et al.* [2,3]. En Australia este árbol es sembrado para conservación del suelo, protección de las costas y estabilización de las playas [17].

Figura 2. a) Árbol *Terminalia catappa* L. b) Fruto seco. c) Semilla.



Fuente: Autor.

En algunas regiones del Sur de Asia, *TC* ha sido incorporado en la economía de algunas comunidades, dándole un valor comercial agregado, en especial por la semilla y la madera. En el año 2006 en Melanesia, Nueva Guinea, la compañía Vanuto, comercializó las semillas de este árbol con un costo entre los 6 y 7 dólares por kilogramo [2].

En un trabajo de investigación realizado en Nigeria por Oboh *et al.* [17], se estudiaron diferentes características morfológicas de *TC*, como tamaño y peso,

tanto de hojas como de frutos, porcentaje de proteína en el fruto, porcentaje de aceite en la semilla, entre otras. Según las características morfológicas encontradas para las especies estudiadas, se distinguieron cuatro grupos, basados principalmente en el tamaño de las hojas y frutos. Este estudio permitió reconocer la diversidad genética que presenta la especie, que puede ser usada en programas para un mejor aprovechamiento de esta especie [17].

2.2 ACEITES VEGETALES

Los aceites vegetales son mezclas complejas de compuestos lipídicos de origen natural. Estos se extraen de las semillas y frutos de un gran número de especies vegetales, como la palma de aceite, el maní, el girasol, el algodón, el maíz, entre otras. Estos aceites pueden ser extraídos por medio de solventes o por métodos mecánicos (prensado en frío o caliente). La composición química de los aceites vegetales presenta, en mayor proporción, triacilglicerol, diacilglicerol y monoacilglicerol, y en menor proporción, fosfolípidos, esfingiolípidos, ácidos grasos libres, entre otros compuestos. El perfil lipídico de los aceites determina sus propiedades fisico-químicas, a saber: estado de agregación, viscosidad, estabilidad oxidativa, índice de refracción, constante dieléctrica, entre otras [3,4].

2.2.1 Ácidos grasos. Como se mencionó en el numeral 2.2, los ácidos grasos son compuestos lipídicos, denominados ácidos monocarboxílicos alifáticos que están presentes en los aceites vegetales. Cerca de 1000 ácidos grasos han sido identificados. Sin embargo, el número de ácidos grasos, con mayor frecuencia en la naturaleza, es mucho más pequeño (pocas decenas).

Los ácidos grasos se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de su cadena (corta de 4 a 10, media de 12 a 14, y larga de 16 o más átomos de carbono), la presencia de enlaces dobles (saturados e insaturados), la presencia de ramas hidrocarbonadas, ciclos u otros grupos funcionales [18]. Los ácidos grasos insaturados (PUFA, por sus siglas en inglés, *Poly-unsaturated fatty acids*), son aquellos en los que, es sus estructuras, presentan enlaces dobles (a diferencia de los saturados, que no los presentan). En la naturaleza, la mayoría de los PUFA presentan configuraciones geométricas de la forma *cis*-. Sin embargo, la configuración geométrica *trans*- también puede estar presente en la naturaleza, como es el caso de la leche de rumiantes, en la que la configuración *trans*- puede ser alrededor del 10% de los PUFA totales presentes [19].

2.3 OXIDACIÓN LIPÍDICA

Los aceites están expuestos a reacciones de oxidación lipídica, conocida también como peroxidación lipídica (debido a la formación de peróxidos de los ácidos grasos). Estas reacciones son desencadenadas por diversos factores, a saber, actividad enzimática (lipooxigenasas y/o ciclooxigenasas), presencia de trazas de metales, luz ultravioleta [18], oxígeno singulete, entre otras [7]. Estas reacciones producen compuestos tóxicos, responsables del cambio de sabor y coloración del aceite, que disminuyen la calidad nutricional del aceite vegetal [6]. Las oxidaciones se deben a las oxigenaciones de los enlaces dobles presentes en los ácidos grasos insaturados, e.g., ácido linoleico.

Las reacciones que tienen lugar en la oxidación lipídica, se desarrollan principalmente, por un mecanismo de radicales libres en tres pasos: Iniciación, propagación y terminación. El paso determinante en la reacción en cadena, es la

iniciación y puede ser catalizado por calentamiento en presencia de oxígeno, por presencia de metales, acción enzimática y por la luz ultravioleta [6].

Cuando ocurren los procesos de oxidación es necesario el oxígeno. La especie molecular de oxígeno más abundante en la atmósfera es el oxígeno triplete, que presenta un número cuántico de *spin* (*S*) de 1, una multiplicidad de *spin* ($2S + 1$) de 3, y un comportamiento diradical. Sin embargo, el oxígeno triplete no puede reaccionar directamente con los enlaces dobles de los ácidos grasos, debido a que estos no poseen la misma multiplicidad de *spin*. Por tanto, solo hasta que se generen los primeros radicales en un aceite, el oxígeno triplete podrá, por su naturaleza biradical, reaccionar espontáneamente con los radicales libres de los ácidos grasos. Esta reacción genera otra especie radical, que será capaz de tomar un hidrógeno de otro ácido graso presente en el aceite y dará inicio al paso de la propagación, que tiene una velocidad relativamente alta [18].

Al tomar el hidrógeno del ácido graso, se formarán los primeros compuestos de oxidación, conocidos como hidroperóxidos. Sin embargo, en presencia de algún ion metálico o altas temperaturas, estas especies se descomponen fácilmente, para dar paso a una cascada de reacciones que producen otros grupos de compuestos oxidados, conocidos como compuestos secundarios de oxidación, lo que constituye el paso de terminación, dando como resultado moléculas de bajo peso molecular tales como aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos, hidrocarburos y otras especies como epóxidos, y compuestos de alto peso molecular como dímeros o trímeros que pueden ser tanto alifáticos como cíclicos, y dependen del ácido graso que se oxide [7].

2.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE OXIDACIÓN

La medición del grado de oxidación de los aceites vegetales es un área bastante interesante en la química analítica, debido a la diversidad de moléculas que se forman en el proceso de oxidación. Algunos reportes indican métodos de análisis de hidroperóxidos, epóxidos, dienos conjugados, ácidos carboxílicos, aldehídos, entre otros, haciendo uso de técnicas analíticas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), técnicas espectroscópicas como ultravioleta visible (UV-Vis), cromatografía de gases (GC), espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), entre otras [18]. Sin embargo, el principal método para medir el grado de oxidación es el índice de peroxidación (PV, por sus siglas en inglés, peroxide value), que es un método yodométrico, que consiste en la reducción del yodo por los hidroperóxidos. Este método libera yodo gaseoso, el cual es proporcional al grado de oxidación; la reacción se muestra a continuación en la **Ecuación 1** [6].



2.4.1 Análisis por cromatografía. La cromatografía es una técnica analítica que permite separar diferentes compuestos de una mezcla. El principio fundamental se basa en un proceso de absorción (o adsorción) y desorción de los analitos entre una fase móvil y una fase estacionaria, de tal forma que dependiendo de las diferencias en el coeficiente de distribución, las moléculas se pueden separar [20]. Los métodos cromatográficos generalmente pueden ser clasificados como: cromatografía de columna, de papel, capa fina, gases, cromatografía líquida de alta eficiencia, de intercambio iónico, filtración en gel y fluido supercrítico [21].

La cromatografía de gases (GC) se fundamenta en una distribución asimétrica de los analitos entre la fase móvil, que es gaseosa, y la fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida. Los gases usados en cromatografía de gases como fase móvil se conocen como gases permanentes. Entre los más comunes se encuentran, Ar, He, H₂, N₂, entre otros. Dependiendo del estado de agregación de la fase estacionaria, GC se puede clasificar en: cromatografía gas-sólido (GSC) y cromatografía gas-líquido (GLC) [22]. En GLC, la fase estacionaria es un líquido, o un sólido que a la temperatura de trabajo se vuelve líquido. Esta fase está inmovilizada, ya que se encuentra enlazada a un soporte sólido, el cual es inerte para la mayoría de las aplicaciones. Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases, en su orden lógico son: cilindro de gas, controladores de flujo, inyector, horno, columna, detector y sistema de datos [21].

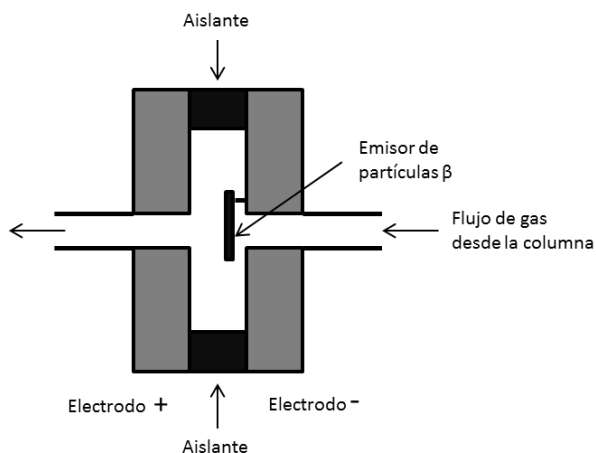
2.4.1.1 Detectores. Un gran número de detectores, con diferentes principios de funcionamiento, han sido introducidos en cromatografía. Estos detectores pueden ser clasificados, según su selectividad, área de aplicación, mecanismo de respuesta, si son destructivos, si son sensibles a la masa, si son sensibles a la concentración, entre otras. Los detectores más comunes son, detector de conductividad térmica (TCD), detector selectivo de masas (MSD), detector de ionización en llama (FID), detector selectivo de nitrógeno y fósforo (NPD), detector (analizador) de energía térmica (TEA), detector de captura de electrones, entre otros [22]. Los detectores empleados en cromatografía de gases para el análisis de la degradación de aceites comúnmente son, el FID, ECD y MSD [23].

2.4.1.1.1 Detector de captura de electrones (ECD). El detector de captura de electrones (ECD, por sus siglas en inglés, *electron capture detector*), introducido y patentado por Lovelock (en 1975) [24], presenta una buena respuesta para compuestos con orbitales moleculares desocupados de baja energía, por lo cual es usado en la determinación de compuestos que poseen grupos halógenos, nitro,

compuestos organometálicos y algunos sistemas conjugados. Este detector posee una fuente radioactiva, que es usada para bombardear con partículas β al gas de arrastre, mientras este pasa por una cámara de ionización; cada partícula β (electrones primarios) puede generar entre cien y mil electrones (secundarios), que tienen energías entre 0.02 y 0.05 eV [25] y que se colectan al aplicarse un potencial [23] (véase **Figura 3**). Al pasar una molécula con grupos electronegativos, parte de los electrones son capturados, lo que genera moléculas cargadas, y provoca una caída en la corriente de fondo en el electrodo.

Este detector puede funcionar en dos modos diferentes, bien sea aplicando un potencial constante o en pulsos [26]. Las principales ventajas de usar este detector es que responde de forma selectiva, sensible (aprox. 1×10^{-13} g/mL) [26] y reproducible [27], además es de muy fácil uso y relativamente económico [26].

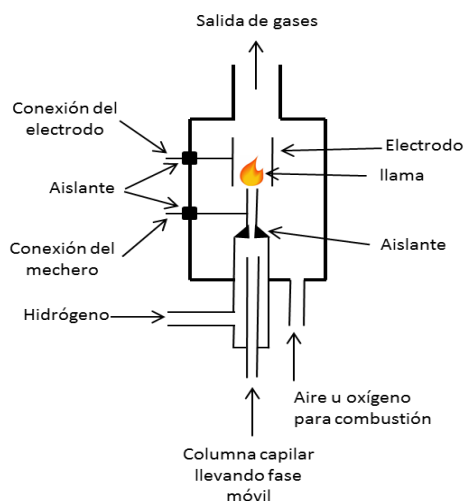
Figura 3. Esquema del detector de captura de electrones (ECD). Imagen adaptada de Scott [26].



2.4.1.1.2 Detector de ionización en llama (FID). El detector de ionización en llama (FID) se encuentra entre los detectores más usados en cromatografía, debido a que puede ser usado para casi todos los compuestos orgánicos, con algunas excepciones (e.g. CO₂, CS₂) (23). El FID, **Figura 4**, funciona de la siguiente manera: el eluyente de la columna cromatográfica se mezcla con hidrógeno, esta mezcla se quema en un pequeño mechero; cerca a la llama se encuentra un electrodo cilíndrico; un voltaje relativamente alto se aplica entre la llama y el electrodo para recolectar los iones que se generan en la llama; la corriente generada es amplificada en un amplificador de alta impedancia, y la corriente resultante pasa por un sistema de adquisición de datos [28].

Las principales ventajas de este detector son: posee alta sensibilidad y estabilidad, poco volumen muerto, tiempo de respuesta rápido y responde de forma lineal para un rango basta grande [23].

Figura 4. Esquema del detector de ionización en llama (FID). Imagen adaptada de Scott [28].

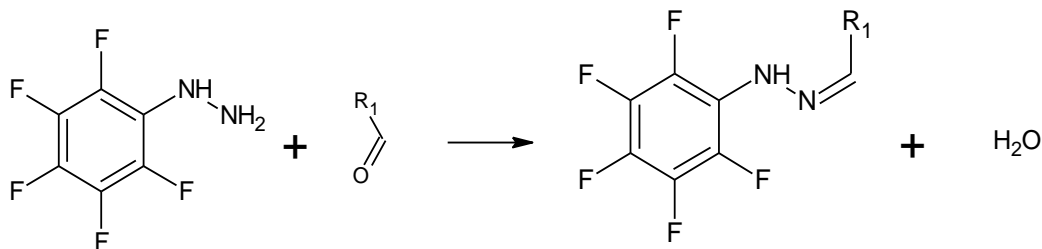


2.4.2 Derivación. Los procedimientos de derivación son un subgrupo de reacciones orgánicas, que proceden únicamente en fase condensada y que son usadas en cromatografía, para compuestos con un grupo selecto de grupos funcionales. Sin embargo, no todas las reacciones pueden ser empleadas para derivatizar. Estos procesos deben cumplir unas condiciones específicas. Algunas de las recomendaciones al momento de recurrir a estos procedimientos son: 1) Las operaciones experimentales deben ser tan simples como sea posible; 2) El número de pasos de derivatización debe ser pequeño (uno o dos); 3) El grado de transformación de los compuestos a los productos debe ser máximo y reproducible; 4) El origen químico de los productos formados debe ser altamente predecible; 5) Debe asegurarse correspondencia inequívoca entre el número de analitos iniciales y sus derivados; el caso óptimo, es en el que la reacción es 1→1; 6) Las características estructurales de los derivados se deben tener en cuenta, de tal forma que, si se desconoce el número de nuevos grupos protectores añadidos en las moléculas, para los derivados de compuestos orgánicos complejos polifuncionales, estos deben ser clasificados de acuerdo con derivados conocidos. Uno de los principales propósitos de la derivatización, es la conversión de compuestos no volátiles, termolábiles y/o altamente reactivos a derivados estables volátiles [29], como es el caso de la mayoría de los ácidos grasos (no volátiles) presentes en aceites vegetales [30] o aldehídos (muy reactivos) [31], que son productos de la oxidación de aceites.

2.4.2.1 Aldehídos. El análisis de aldehídos (compuestos secundarios de oxidación lipídica), presenta algunas restricciones en el análisis cromatográfico, debido a sus propiedades fisicoquímicas, tales como: baja masa molecular, alta volatilidad, solubilidad en agua y reactividad. Además, presentan índices de retención pequeños, para fases estacionarias polares y apolares [32]. Estos analitos se encuentran a nivel de trazas y generan una señal débil en los detectores convencionales usados en cromatografía de gases, a saber: TCD, FID

y MSD. Por lo anterior, estas moléculas deben ser derivadas previamente a su detección. Los aldehídos pueden derivarse con pentafluorofenilhidrazina (PFPH) [33], para formar las respectivas hidrazonas, como se muestra en la Figura 5. Estas hidrazonas presentan grupos electronegativos en sus estructuras (5 átomos de flúor por molécula), que hacen favorable utilizar un ECD, ya que es un detector sensible a estos grupos.

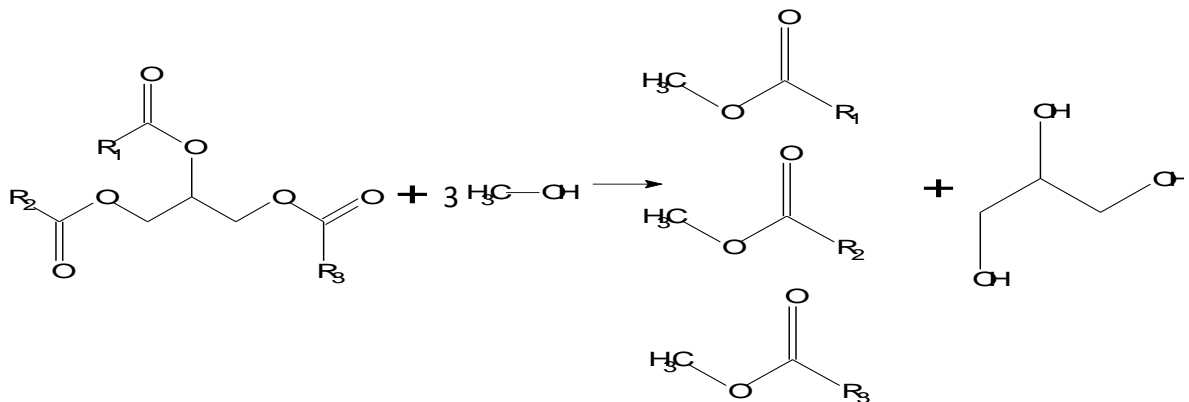
Figura 5. Reacción de derivatización de aldehídos con pentafluorofenilhidracina (PFPH); formación de hidrazonas [33].



2.4.2.2 Ácidos grasos. La cromatografía de gases ha sido la técnica analítica más empleada, por más de medio siglo, en el análisis de ácidos grasos [34]. La única técnica que se compara con GC-FID para el análisis de ácidos grasos es HPLC en fase reversa con detector UV; sin embargo, el costo de análisis puede ser mayor que GC-FID [23]. Para el análisis de ácidos grasos por GC-FID, es necesario un procedimiento previo de derivación; el método más utilizado para derivatizar es la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés). La razón de realizar este procedimiento de derivación en los ácidos grasos, es que sus derivados presentan menor punto de ebullición y menor polaridad, lo que contribuye a disminuir el coleo en los picos cromatográficos (*Peak-tailing*), siendo así, más adecuados para el análisis cromatográfico [30].

Para la preparación de los FAME, se encuentran en literatura diferentes métodos de derivación, a saber, esterificación y transesterificación catalizada por ácidos, transesterificación catalizada por bases [23], esterificación con diazometano, entre otros. Uno de los procedimientos con mayor reporte en la literatura científica es la transesterificación ácida, usando como catalizador el trifluoruro de boro en metanol (BF_3/MeOH)(véase **Figura 6**) [35].

Figura 6. Reacción de transesterificación de ácidos grasos catalizada con BF_3 . Formación de ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol [30].



2.5 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (**AE**) son una mezcla compleja de compuestos volátiles y de naturaleza química muy diversa, que se caracterizan por su olor, generalmente agradable [36]. Arnaldo Bandoni, describe un aceite esencial como “**una parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles y generan en conjunto el olor de dicho vegetal**” [37]. Los aceites esenciales son

producidos por plantas que se denominan “aromáticas”, a saber: limonaria, geranio, patchouli, entre otras. En las plantas los aceites esenciales se pueden encontrar en las diferentes células oleíferas, canales secretorios, glándulas o en los tricomas. Para la obtención del aceite esencial es necesario que el material vegetal sea sometido a vapor de agua. Existen tres métodos principales para obtención de los AE, los cuales son: 1) Arrastre con vapor, 2) Destilación con agua-vapor y 3) Hidrodestilación. Los rendimientos, generalmente, varían entre 0.1 y 1.0% [36]. Los principales sectores y ramas de la industria donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados son: Industria cosmética y de productos de aseo, industria de alimentos y la industria farmacéutica [36].

2.5.1 *Lippia organoides* H.B.K. Es un arbusto que crece hasta los 3 metros de altura, que se encuentra en Centro América, incluyendo las Antillas, y el norte de Sur América. En Colombia crece entre los 400 y 2500 m de altura sobre el nivel del mar [38]. Las hojas y flores de esta especie son empleadas en infusiones y en medicina popular para tratar dolores de estómago, indigestiones y náuseas, además como antiséptico general para la boca, gargantas y heridas [39]. En un trabajo de investigación realizado por Stashenko *et al.* [40] se estudió la actividad antioxidante de dos quimiotipos de *Lippia organoides* que crecen en Colombia, el quimiotipo con menor cantidad de compuestos fenólicos presentó baja capacidad antioxidante por el ensayo de decoloración del catión radical ABTS [por sus siglas en inglés; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)].

El Centro de Excelencia CENIVAM, en sus instalaciones, cuenta con tres quimiotipos de *Lippia organoides*, que son “timol”, “carvacrol” y “felandreno”. Los aceites esenciales de esta especie se escogieron para estudiar el grado de protección que ejercen sobre la degradación oxidativa del aceite de TC inducido por la exposición a la luz ultravioleta.

2.6 ANTIOXIDANTES

El término, antioxidante, no está restringido a ninguna definición internacional [41]. Sin embargo, la definición más empleada, fue dada por Halliwell *et al.*, quienes la definieron como **“cualquier sustancia, que cuando está presente en bajas concentraciones, comparadas con la de los sustratos oxidables, retrasa o inhibe la oxidación de los sustratos”** [42], entre estos sustratos están los lípidos, carbohidratos, ADN y proteínas. Algunos conceptos claves relacionados con los antioxidantes son, sinergismo, antagonismo, co-antioxidantes y antioxidantes retardadores. El sinergismo se define como un fenómeno en el que un número de compuestos, que están presentes en el mismo sistema, presentan un efecto más pronunciado, que el que se deriva de un concepto de adición simple; antagonismo de igual manera se puede definir cambiando el “más” por un “menos”, co-oxidante cambiando el “más”, por un “mismo” y un antioxidante retardador se puede definir como aquel que reduce la rata de oxidación [41].

Los antioxidantes, en general, pueden ser clasificados en dos grandes grupos, que son: los endógenos y exógenos. Los endógenos, son aquellos que son fabricados por las células, a saber: proteínas que actúan como enzimas (peróxido dismutasa) y ferritina, entre otros. Los antioxidantes exógenos son aquellos que no son fabricados por las células, y que se obtienen de alimentos o aquellos que se producen sintéticamente. Entre los antioxidantes exógenos más comunes se encuentran la vitamina C, vitamina E, polifenoles [43].

3. METODOLOGÍA

La metodología empleada para este proyecto, comenzó con la recolección de los frutos de *Terminalia catappa* L., a los que se les extrajo su semilla. El aceite vegetal de las semillas, se extrajo por medio de extracción con solventes con ayuda de ultrasonido. El aceite se sometió a diferentes periodos de radiación con luz ultravioleta A (UVA) empleando un equipo *home-made*. Posteriormente, se analizó el grado de oxidación de las muestras por las técnicas, GC-ECD y GC-FID.

3.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal (frutos) de *TC.*, se llevó a cabo en el campus central de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga - Colombia. Se recolectaron los frutos que se encontraron en el suelo, en áreas cercanas a árboles de *TC.* Los frutos se mantuvieron extendidos por 60 días en un vivero del Centro de Excelencia CENIVAM, tal como se muestra en la **Figura 7.**

Figura 7. Semilla de *TC* en el vivero del Centro de Excelencia CENIVAM.



Fuente: Autor

3.2 EXTRACCIÓN DE ACEITE

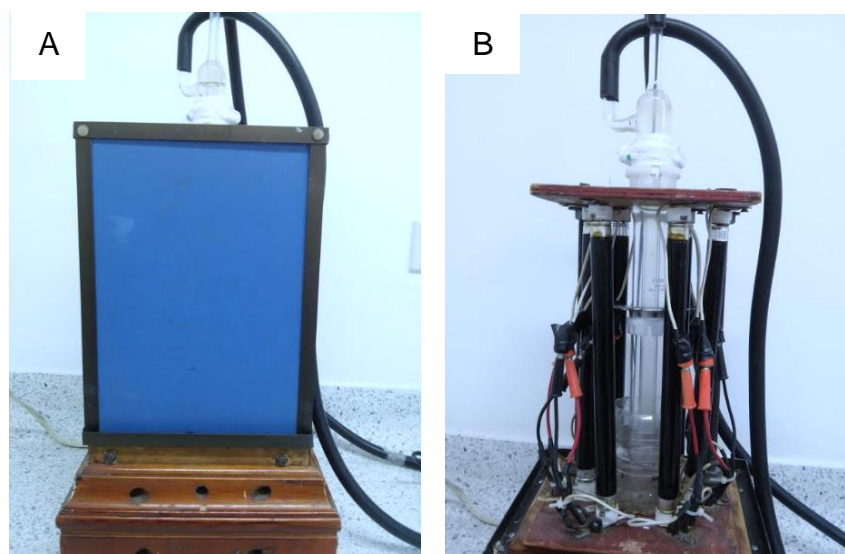
La obtención de la semilla del fruto de *Terminalia catappa* L. se realizó de forma manual con ayuda de un martillo. Se redujo el tamaño de partícula de las semillas, empleado una licuadora comercial marca *Oster*. Para la extracción del aceite vegetal se depositaron semillas trituradas (ca. 85 g), junto con 350 mL de hexano, en un frasco ámbar de 500 mL. El frasco se ubicó en un equipo de ultrasonido (*Elmasonic S 15 H, Elma*). La extracción se realizó a temperatura ambiente (24 °C), por una hora. Posteriormente, se filtró la mezcla con papel franja negra. El extracto se concentró en un rotoevaporador (*Basis hei-VAP HL, Heidolph*), la temperatura del baño y presión del equipo fueron de 45 °C y 350 mbar, respectivamente. El solvente recuperado se empleó en una segunda extracción. En total se realizaron tres extracciones sucesivas para el mismo material vegetal. Finalmente, se hizo pasar una corriente de nitrógeno gaseoso para eliminar los rastros de solvente, a temperatura ambiente para evitar la oxidación por calentamiento. El aceite extraído se filtró, con papel franja negra, para remover impurezas, se almacenó en un frasco color ámbar, y se mantuvo en refrigeración a 4 °C, para los posteriores análisis.

3.3 OXIDACIÓN LIPÍDICA

El ensayo de oxidación lipídica se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Contreras *et al.* (2002) [44]. El ensayo consistió en irradiar con luz ultravioleta las muestras de aceite vegetal, en un reactor *home-made*, **Figura 8**, que cuenta con seis lámpara, que emiten luz en la región del ultravioleta A (334, 364, 365 y 366 nm) y el ultravioleta B (404, 408 y 435 nm). Se tomó aceite vegetal (0.79 g) y se depositó en tubos cónicos de poli(propileno). Las muestras se expusieron por 8, 16, 24, 32 y 40 h, a la luz ultravioleta. Culminado cada tiempo, se adicionó, a cada

muestra, solución de BHT/aceite vegetal (10 mg), con una concentración de 120 g/kg; lo anterior se realizó con el fin de detener los procesos de oxidación, que tienen lugar fuera del periodo de exposición a la luz UV. Las muestras se almacenaron en un refrigerador hasta ser analizadas. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Figura 8. Reactor de luz ultravioleta *home-made*, A) Con las paredes de espejos, B) Sin las paredes de espejos.



Fuente: Autor

3.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

El análisis de la degradación de las muestras, después de ser irradiadas con la luz ultravioleta, se realizó por dos métodos diferentes: 1) Derivación de los ácidos grasos y análisis por cromatografía de gases con detector de ionización en llama

(GC-FID); y 2) Derivación del hexanal y análisis por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD).

3.4.1 Análisis FAME. El análisis de la composición de ácidos grasos presentes en cada una de las muestras de aceite de *TC* se realizó mediante la obtención de sus ésteres metílicos, de la siguiente manera: se tomó aceite vegetal (60 mg), se depositó en un tubo de ensayo, se agregó solución de trifloruro de boro al 14% en metanol (5 mL) y se depositó una barra de agitación magnética. La reacción se mantuvo en agitación por 1 h, tiempo establecido en experimentos previos realizados en el Laboratorio de Cromatografía, entre 80 y 84 °C en un baño de aceite mineral. Al finalizar el proceso de derivación, se retiró del baño de aceite y se dejó reposar durante 10 min. Finalmente, se realizó la extracción de los ácidos grasos, en forma de sus ésteres metílicos (FAME) con *n*-heptano (3 X 1 mL). Se tomó 1 mL del extracto, se adicionaron 100 µL de una solución de *n*-tetradecano/heptano, con una concentración de 10.000 ppm, la mezcla se aforó a 2 mL, con el mismo solvente. Modo de inyección *split* (30:1). Se inyectaron 2 µL de la solución en un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama GC-FID (6890N, *Agilent Technologies*, Palo Alto, California, EE.UU.) con columna DB-23 cubierta con 50%-cianopropil-poli(metilsiloxano) (60 m, L x 0.25 mm, d.i. x 0.25 µm, d_f) (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EEUU).

La identificación de los ácidos grasos en el aceite de *Terminalia catappa* L., se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de las mezclas certificadas de FAME GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 Y GLC100, adquiridas de *Matreya, Inc* (Pennsylvania, EE.UU). Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras.

La cuantificación de los ácidos grasos, en forma de ésteres metílicos de los ácidos grasos, se llevó a cabo por el método de adición de estándar interno.

3.4.2 Análisis de hexanal. El hexanal generado en el proceso de oxidación en los aceites, fue derivado con pentafluorofenilhidracina para formar pentafluorofenilhidrazona del hexanal (PFPH-H). Para esto, se tomó aceite oxidado (0.5 g), se depositó en un tubo de ensayo, se adicionaron 2 mL de una solución metanólica de pentafluorofenilhidrazina (5.0 $\mu\text{mol/mL}$), se agitó (1 min a 1800 rpm), se dejó decantar (10 min), se tomó 1 mL de la fase metanólica, y se aforó a 2 mL con metanol. Se tomó 1 μL de solución y se inyectó en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), **HP 6890 Plus, acoplado a un detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni , 280 °C), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (se inyectó en modo *Split* 1:10)**, la temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C. **Se empleó una columna HP-5 de 30 m, L x 0.25 mm, d.i., x 0.25 μm d_f, 5%-fenil-95%-poli (metilsiloxano) (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.)**. La temperatura del horno se programó desde 100 °C (5 min) hasta 250 °C (10 min) a 6 °C/min [25].

3.4.2.1 Cuantificación de pentafluorofenilhidrazona del hexanal. La cuantificación de pentafluorofenilhidrazona del hexanal se llevó a cabo por el método de calibración externa empleando material de referencia certificado. Se realizó una curva de calibración de pentafluorofenilhidrazona del hexanal en un rango de concentración entre 2 y 120 nmol/mL. Para esto, se prepararon una solución *stock* de hexanal (21.48 mM) y una solución *stock* de PFPH (123,15 mM), con estas soluciones se preparó una solución de trabajo de hexanal:PFPH en una relación 1:100 de la siguiente manera: se tomaron 93 μL de la solución *stock* de hexanal y se depositaron en un balón aforado de 10 mL, luego se adicionaron

162.2 μL de la solución *stock* de PFPH, se aforó con metanol, se trasvasó a un frasco color ámbar, se selló con papel parafina y se dejó en agitación por 12 h. Con esta solución de trabajo se prepararon las soluciones para los puntos de la curva de calibración, tal como se muestra en la **Tabla 2**. Cada uno de los puntos de la curva se preparó en balones aforados de 2 mL, por triplicado.

Tabla 2. Soluciones preparadas para construir la curva de calibración de PFPH-H

Volumen de solución de trabajo [μL]	Concentración de PFPH-H[nmol/mL]
20	2
60	6
100	10
140	14
260	26
300	30
600	60
1200	120

3.5 PROTECCIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EMPLEADO ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides*.

Para proteger el aceite vegetal de *TC* contra la oxidación lipídica, por el efecto de la luz ultravioleta, se emplearon aceites esenciales de *Lippia origanoides*, quimiotipos “timol”, “carvacrol” y “felandreno”, que fueron suministrados por el Centro de Excelencia CENIVAM. Para esto, se disolvieron 25 mg de aceite esencial, quimiotipo “timol”, en 5 g de aceite de *TC*, para obtener una concentración de 0.5 % p/p. Lo anterior se realizó para los quimiotipos “carvacrol” y “felandreno”. Las muestras se expusieron a la luz ultravioleta. El tiempo de exposición se determinó con base en la mayor producción de hexanal observada

en los resultados del numeral **3.4.2**. Como sustancia de referencia se empleó el antioxidante sintético butilhidroxianisol (BHA). Para esto se preparó una solución de BHA en aceite de *TC*, de concentración 200 ppm, esta concentración es la máxima permitida en aceites vegetales según normas internacionales [45].

3.5.1 Análisis por GC-MS. Para el análisis de la composición química de los aceites esenciales, se tomaron 50 µL de aceite esencial y se aforó a 1 mL con diclorometano. Los aceites esenciales fueron analizados en un cromatógrafo de gases (GC 6890, *Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU) equipado con un espectrómetro de masas (MSD 5973, *Agilent Technologies*, Palo Alto). El volumen de inyección fue 2 µL. La separación de los compuestos se realizó en las columnas DB-5MS (*J&W Scientific*) cubierta con 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (60 m X 0.25 mm d.i. X 0.25 µm) y DB-WAX (*J&W Scientific*) cubierta con poli(etilenglicol) (60 m X 0.25 mm d.i. X 0.25 µm). Para la columna DB-5MS la temperatura del horno cromatográfico se programó desde 45 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a 4 °C/min, luego hasta 250 °C (5 min) a 5 °C/min y finalmente hasta 275 °C (15 min) a 10 °C/min. Para la columna DB-WAX la temperatura del horno cromatográfico se programó desde 45 °C (min) hasta 150 °C (5 min) a 3 °C/min, luego hasta 220 °C (5 min) a 4 °C/min. La temperatura del puerto de inyección, de la cámara de ionización y la línea de transferencia se fijaron en 250, 230 y 285 °C, respectivamente. El gas de arrastre empleado fue helio. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masas con las bases de datos *Adams*, *NITS*, *WILEY* y los índices de retención lineal reportados en literatura.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE SEMILLA DE *Terminalia catappa*.

Se recolectaron en total 210 semillas de *TC*, con un peso promedio de 0.5 ± 0.1 g. El rendimiento de extracción del aceite fue de 30 ± 2 %. Este rendimiento, se calculó, dividiendo la masa del aceite vegetal obtenido, entre la masa de las semillas empleadas para la extracción, multiplicado por 100, como se muestra en la **Ecuación 2**.

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa del aceite}}{\text{masa de las semillas}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

4.2 ANÁLISIS DE FAME

4.2.1 Perfil lipídico del aceite de *Terminalia Catappa*. El perfil lipídico del aceite de semilla de *TC* se muestra en la Figura 9. Cada pico cromatográfico corresponde al éster metílico de un ácido graso presente en el aceite. En la Figura 10, se observan los nombres y las estructuras de los ácidos grasos presentes en el aceite, y en la Tabla 3 se muestra la cantidad relativa de cada ácido graso.

De los datos de la **Tabla 3**, se observó que el aceite de semilla de *TC* consistió principalmente de ácidos grasos insaturados (ca. 56%). El ácido graso insaturado más abundante fue el oleico (C18:1) (33%), seguido por el linoleico (C18:2) (23%), lo que indica que este aceite vegetal es una buena fuente de ácidos grasos insaturados.

El contenido de ácidos grasos saturados fue cercano al 44%. El ácido grasos más abundante fue el palmítico (C16:0) (ca. 38%), seguido del esteárico (C18:0) (ca. 6%).

Figura 9. Perfil lipídico del aceite de semilla de *Terminalia catappa* obtenido por extracción con solventes, columna DB-23, detector FID.

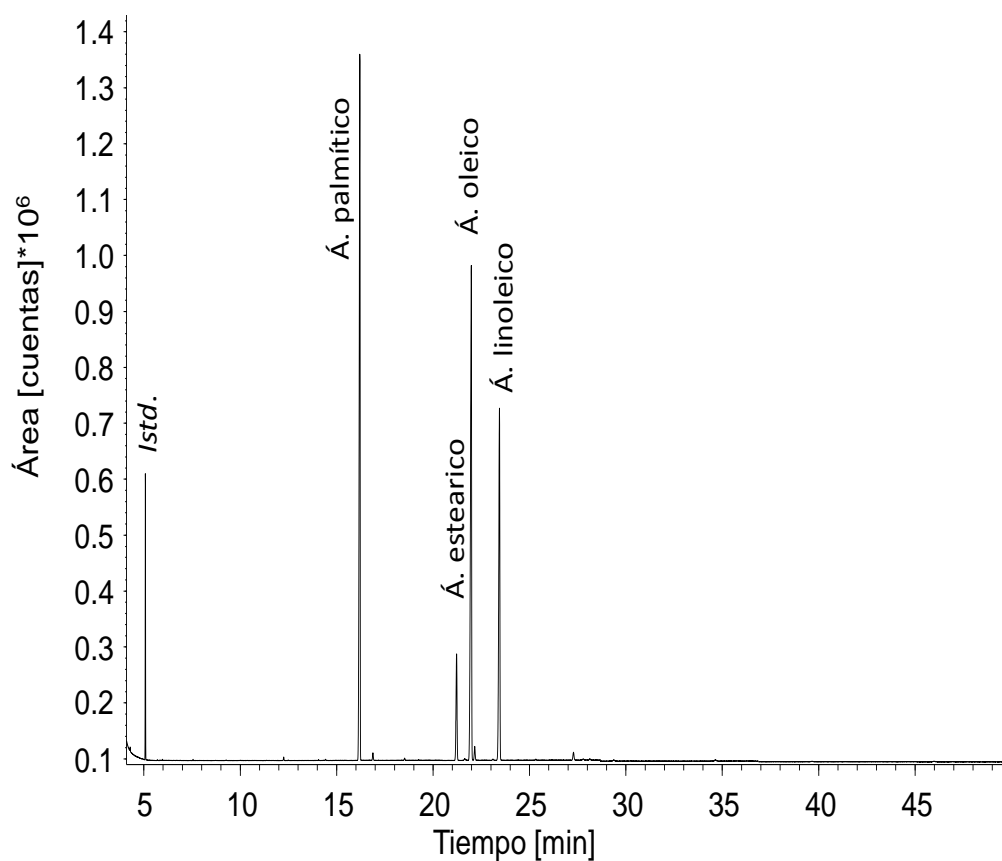


Figura 10. Estructuras de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de *Terminalia catappa*.

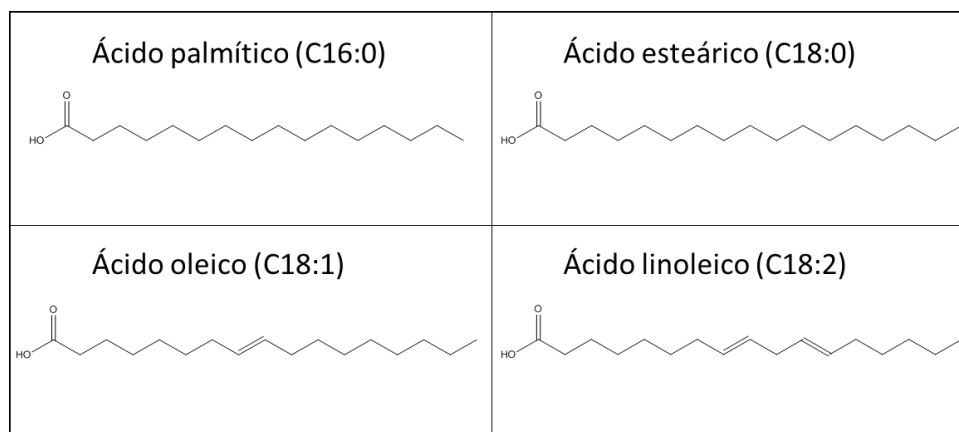


Tabla 3. Composición y cantidad relativa de ácidos grasos en el aceite de *Terminalia catappa*.

Ácido graso	Área relativa, % (\pm SD, n=3)
Palmítico (C16:0)	38.4 \pm 0.3
Esteárico (C18:0)	6.2 \pm 0.1
Oleico (C18:1)	32.6 \pm 0.1
Linoleico (C18:2)	22.8 \pm 0.3

Este resultados muestran que el aceite vegetal de las semillas de *TC*, que crece en Colombia, es cercano al reportado en Puerto Rico por Asenjo *et al.* [14], y al reportado en Brasil por Dos Santo *et al.* [3]. Además, los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de *TC*, se encuentran también en los aceites de mayor consumo en el mundo, a saber, aceite de calza, oliva, girasol, cártamo y linaza [46].

4.2.2 Determinación del grado de oxidación por el método FAME. Para el análisis de la degradación del aceite por el método FAME, se realizó la cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por el método de adición de un estándar. Para el cálculo de la concentración de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (C_x), se tiene en cuenta el área cromatográfica del estándar interno ($A_{Istd.}$) y su concentración ($C_{Istd.}$), tal como se muestra en la Ecuación 3.

$$C_x = \frac{C_{Istd.} \times A_x}{A_{Istd.}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**, donde se observa la variación de la concentración, de cada ácido graso, con el tiempo de oxidación.

Tabla 4. Variación de la concentración de los FAME con respecto al tiempo de oxidación.

Tiempo de oxidación [h]	Éster metílico del ácido palmítico		Éster metílico del ácido esteárico		Éster metílico del ácido oleico		Éster metílico del ácido linoleico
	Concentración, [ppm] (\pm SD, n=3)	CV%	Concentración, [ppm] (\pm SD, n=3)	CV%	Concentración, [ppm] (\pm SD, n=3)	CV%	Concentración, [ppm] (\pm SD, n=3)
0	3300 \pm 150	5	520 \pm 33	6	2800 \pm 140	5	1900 \pm 87
8	3300 \pm 570	17	500 \pm 120	24	2800 \pm 660	23	2000 \pm 460
16	3300 \pm 390	12	500 \pm 76	14	2900 \pm 400	14	2200 \pm 300
24	3050 \pm 33	1	490 \pm 15	3	2560 \pm 77	3	1890 \pm 54
32	3900 \pm 410	13	540 \pm 84	16	2800 \pm 450	16	2000 \pm 360
40	3200 \pm 200	7	500 \pm 48	10	2600 \pm 230	9	1900 \pm 220

Sin embargo, se observó que las desviaciones estándar se superponen entre las muestras oxidadas por diferentes periodos de tiempo, por lo que, bajo esta metodología no hay una variación significativa de la concentración de los ácidos grasos a medida que aumenta el tiempo de oxidación. Además, los CV% no mantuvieron una tendencia entre muestras, esto se puede deber, en gran medida, a errores en la cadena de preparación de la muestra.

4.3 ANÁLISIS DEL HEXANAL

Como se mencionó en el numeral **3.4.2**, el hexanal se midió en forma de pentafluorofenilhidrazona del hexanal (PFPH-H). La curva y la ecuación que se emplearon para cuantificación del PFPH-H se muestran en el **Anexo 1**. Los resultados encontrados se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Concentración de PFPH-H para las muestras de aceite de *Terminalia catappa* oxidadas por diferentes periodos de tiempo.

Tiempo de oxidación [h]	Concentración de PFPH-H, [nmol/g] (\pm SD, n=3)	CV%
0	3 \pm 0.1	1.8
8	8 \pm 0.4	5.8
16	10 \pm 1.3	12.6
24	11 \pm 1.0	9.0
32	20 \pm 0.4	2.2
40	19 \pm 0.7	3.8

De la **Tabla 5**, se observa que la muestra blanco, 0 h de oxidación, presentó 3 nmol/g de PFPH-H, lo que indica que el aceite presentaba un pequeño grado de oxidación. Una posible explicación para este hecho, es que en el proceso de

extracción, el aceite no está en una atmósfera inerte, por tanto, es posible que una pequeña parte del aceite vegetal se oxide. Las muestras expuestas por 16 y 24 h, no mostraron una variación significativa entre sí, debido a que se observó una superposición de las desviaciones estándar; lo mismo para la muestra expuesta por 32 y 40 h.

También, se puede observar que las muestras que fueron expuestas a la luz ultravioleta por tan solo 8 horas evidenciaron degradación. Este resultado es importante ya que indica que para otras investigaciones, empleado la misma metodología descrita anteriormente, se puede escoger este periodo de tiempo para observar el efecto protector contra la oxidación de sustancias químicas de interés.

Según la **Tabla 5**, la producción hexanal está en el orden de los nmol. Si se supone que la conversión del ácido linoleico a hexanal presenta una relación estequiométrica ideal de 1 →1 (se conoce que la oxidación del ácido linoleico puede tener varias rutas [47]), se tendría que a 32 horas, de exposición de las muestras a la luz ultravioleta, se han oxidado 20 nmol de ácido linoleico por cada gramo de aceite, 5.0 ppm. Si se observa en la **Tabla 4**, 5.0 ppm es un valor más pequeño que la desviación estándar de la concentración del ácido linoleico, para todas las muestras. Por tal motivo no se pudo apreciar un cambio en la composición de ácidos grasos por el método FAME.

4.4 COMPARACIÓN CON OTROS ACEITES DE SEMILLA

Con el fin de comparar los resultados de la oxidación del aceite de *TC* con otros aceites de semillas, se procedió a comprar semillas de girasol (*Helianthus annuus*), nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*) y almendras (*Prunus dulcis*) en la

plaza de mercado del centro de la ciudad de Bucaramanga, y además, se compró un aceite de girasol comercial, marca Girasoli®. Para las semillas se realizó la extracción del aceite tal como se muestra en el numeral **3.2**. Los rendimientos de las extracciones fueron: semillas de girasol $30 \pm 2\%$, nueces de Brasil $44 \pm 1\%$ y almendras $42 \pm 2\%$. Para conocer el perfil lipídico de cada aceite, se realizó el procedimiento descrito en el numeral **3.4.1**. En la **Tabla 6**, se comparan los ácidos grasos presentes en el aceite de semillas de *TC*, con los aceites mencionados anteriormente. En el **Anexo 2** se reportan los cromatogramas de los FAME para cada uno de los aceites.

Tabla 6. Comparación de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de *Terminalia catappa* con los aceites de semillas de girasol, nueces de Brasil, almendras y el aceite de girasol comercial marca Girasoli®.

Aceite	Ácido graso, [%] (\pm SD, n=3)			
	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico
<i>Terminalia catappa</i>	38.4 ± 0.3	6.2 ± 0.1	32.6 ± 0.1	22.8 ± 0.3
Nuez de Brasil	15 ± 1	9.7 ± 0.5	28.3 ± 0.7	46 ± 2
Girasoli®	8.2 ± 0.2	5.9 ± 0.1	26.7 ± 0.2	59.3 ± 0.1
Semilla de girasol	7.1 ± 0.3	3.9 ± 0.1	54 ± 1	35 ± 1
Almendra	7.9 ± 0.1	2.05 ± 0.05	62.2 ± 0.4	27.9 ± 0.6

Según la **Tabla 6**, el aceite de *TC* posee un perfil lipídico cualitativamente similar al de los aceites de las otras semillas y al aceite comercial. Sin embargo, se puede observar, que el aceite de *TC* presentó mayor cantidad de ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico), que son más resistentes a la oxidación [6]. Los aceites de girasol de semilla y el comercial mostraron una gran diferencia en la cantidad de ácido linoleico, siendo mayor para el comercial.

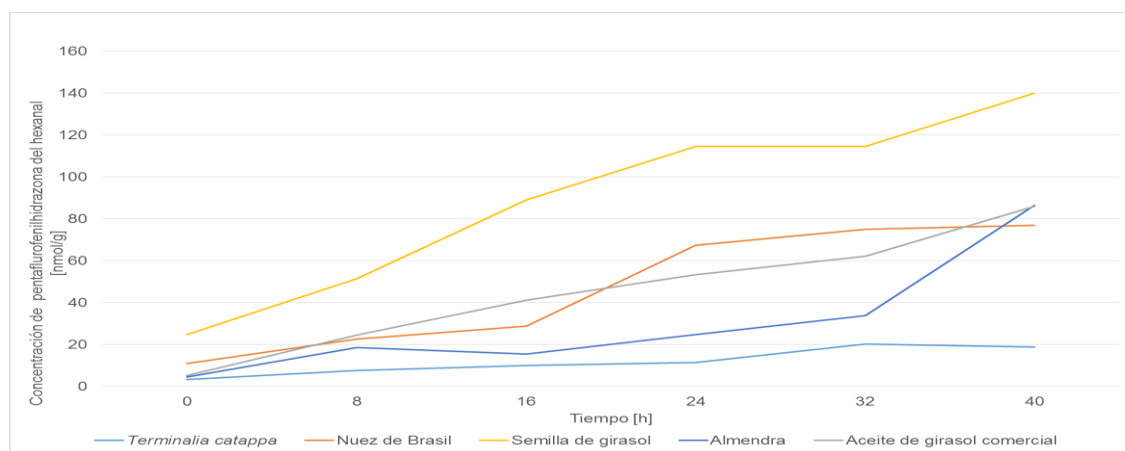
De los cinco aceites vegetales, el aceite de *TC* junto con el aceite de almendra presentaron la mayor cantidad de ácido oleico. Según reportaron Raß *et al.*, existe una creciente demanda de aceites con mayor contenido de ácido oleico, esto debido a que existe la recomendación de sustituir el ácido linoleico, que pertenece a la familia del omega 6, por ácidos grasos mono-insaturados. Estudios con los ácidos linoleico y oleico mostraron efectos similares con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sin embargo, un alto consumo de ácido linoleico presenta algunas desventajas nutricionales, ya que, este ácido graso es más fácilmente oxidable en los humanos, que el ácido oleico, lo que conlleva un mayor riesgo de sufrir de aterosclerosis [46].

4.4.1 Comparación de la oxidación de los aceites vegetales. Los cuatro aceites se expusieron a la luz ultravioleta, siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 3.3. En la Figura 11, se comparan las líneas de tendencia de la oxidación, representada por la producción de hexanal en forma de hidrazona, para los cinco aceites. De la Figura 11, se observa que el aceite que presentó menor tendencia a la oxidación fue el aceite de *TC*. Este comportamiento se puede deber a que este aceite presenta mayor cantidad de ácidos grasos saturados en comparación con los otros cuatro aceites, por lo que resultó ser menos susceptible de sufrir reacciones de oxidación. Sin embargo, se desconoce la cantidad de antioxidantes naturales como el α -tocoferol, que están disueltos en cada uno de los aceites.

Por otra parte, se puede observar que el aceite de semillas de girasol presentó mayor tendencia a la oxidación. Al comparar el perfil lipídico del aceite de semilla de girasol con el aceite de girasol comercial, se puede observar que el aceite de semilla de girasol presentó menor cantidad de ácido linoleico, por lo que se esperaría que este aceite presentara menor tendencia a la oxidación que el aceite

comercial. Sin embargo, en la industria, a los aceites comerciales se les adiciona antioxidantes sintéticos como el BHT o el BHA, para proteger el aceite de la oxidación. Por esta razón, el aceite comercial de girasol resistió más a las reacciones de oxidación que el aceite de semilla de girasol.

Figura 11. Concentración de PFPH-H VS. tiempo de exposición a la luz ultravioleta, de los cinco aceites vegetales.



4.5 ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES POR GC-MS

4.5.1 Quimiotipo “timol”. Para el quimiotipo “timol” se identificaron 14 compuestos (porcentaje de área >1.0%), que corresponden a un 93.2 % de área cromatográfica total. Este aceite esencial se compone mayoritariamente por compuestos oxigenados (60.4 %). El perfil cromatográfico se observa en el Anexo 3 y la composición química se detalla en la Tabla 7. Según los resultados obtenidos, el componente mayoritario es el timol, con un porcentaje de área cromatográfica del 51.5 %, seguido por *p*-cimeno (9.2 %), *trans*- β -cariofileno (7.0 %) y γ -terpineno (4.0 %).

Tabla 7. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales (>1.0 %) del aceite esencial de *Lippia organoides* quimiotipo “timol”.

N°	Compuesto	Tipo	Índices de retención lineal (IRL)				ÁREA %
			DB-5MS		DB-WAX		
			Exp.	Ref. [48]	Exp.	Ref. [48]	
1	β -Mirceno	HM	991	982	1156	1160	1.8
2	α -Terpineno	HM	1021	1017	1174	1177	1.0
3	<i>p</i> -Cimeno	HM	1030	1024	1262	1270	9.2
4	γ -Terpineno	HM	1063	1059	1240	1245	4.0
5	Terpinen-4-ol	MO	1188	1177	1594	1601	1.7
6	Metil timil éter	CO	1234	1234	1582	1587	3.5
7	Timol	CO	1304	1290	2155	2164	51.5
8	Carvacrol	CO	1309	1300	2183	2186	3.9
9	Acetato de timilo	CO	1348	1356	1835	1867	1.5
10	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1435	1420	1602	1598	7.0
11	<i>trans</i> - β -Bergamoteno	HS	1442	1434	1586	1575	1.5
12	α -Humuleno	HS	1470	1453	1672	1666	3.7
13	β -Bisaboleno	HS	1515	1508	1721	1727	1.0
14	Óxido de cariofileno	SO	1598	1580	1980	1986	1.9
Hidrocarburos monoterpénicos (HM)							16.0
Monoterpenos oxigenados (MO)							1.7
Compuestos oxigenados (CO)							60.4
Hidrocarburos sesquiterpénicos (HS)							13.2
Sesquiterpenos oxigenados (SO)							1.9

4.5.2 Quimiotipo “carvacrol”. Mediante el análisis cromatográfico se detectaron 12 compuestos (porcentaje de área >1.0%), que corresponden al 85.2 % del área cromatográfica total. Este aceite esencial presentó en su composición 55.8 % de compuestos oxigenados, entre estos, timol y carvacrol con un porcentaje de área de 25.2 % y 28.2 %, respectivamente. El perfil cromatográfico se observa en el **Anexo 3** y la composición química se detalla en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales (>1.0 %) del aceite esencial de *Lippia organoides* quimiotipo “carvacrol”.

N°	Compuesto	Tipo	Índices de retención lineal (IRL)				ÁREA %
			DB-5MS		DB-WAX		
			Exp.	Ref. [48]	Exp.	Ref. [48]	
1	α -Terpineno	HM	1019	1017	1174	1177	1.0
2	<i>p</i> -Cimeno	HM	1028	1024	1263	1270	7.6
3	γ -Terpineno	HM	1062	1059	1240	1245	7.8
4	Terpinen-4-ol	MO	1187	1177	1595	1601	1.0
5	Metil timil éter	CO	1232	1234	1582	1587	2.4
6	Timol	CO	1298	1290	2155	2164	25.2
7	Carvacrol	CO	1308	1300	2183	2186	28.2
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1432	1420	1602	1598	4.5
9	α -Humuleno	HS	1468	1453	1672	1666	2.4
10	Elemol	SO	1558	1553	2067	2078	1.2
11	Óxido de cariofileno	SO	1597	1580	1981	1986	1.0
12	α -Eudesmol	SO	1672	1651	2210	2222	3.0
Hidrocarburos monoterpénicos (HM)							16.4
Monoterpenos oxigenados (MO)							1.0
Compuestos oxigenados (CO)							55.8
Hidrocarburos sesquiterpénicos (HS)							6.9
Sesquiterpenos oxigenados (SO)							5.2

4.5.3 Quimiotipo “felandreno”. Para este aceite esencial se identificaron 20 componentes (porcentaje de área >1.0%), que representan un 86.6 % del área cromatográfica total. Los hidrocarburos sesquiterpénicos fueron la familia de compuestos con mayor área relativa (41.3 %), seguida de los hidrocarburos monoterpénicos (20.3 %). El compuesto con mayor área relativa fue *trans*- β -cariofileno (18.2 %) seguido de α -humuleno (10.6 %) y 1,8-cineol (9.8 %). El felandreno presentó un área relativa del (6.6 %). El perfil cromatográfico se observa en el Anexo 3 y la composición detallada se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales (>1.0 %) del aceite esencial de *Lippia organoides* quimiotipo “felandreno”.

N°	Compuesto	Tipo	Índices de retención lineal (IRL)				ÁREA %
			DB-5MS		DB-WAX		
			Exp.	Ref. [48]	Exp.	Ref. [48]	
1	α -Felandreno	HM	1009	1004	1160	1167	6.6
2	<i>p</i> -Cimeno	HM	1029	1024	1262	1270	8.2
3	Limoneno	HM	1034	1029	1193	1198	4.1
4	1,8-Cineol	MO	1037	1031	1206	1211	9.8
5	γ -Terpineno	HM	1061	1059	1240	1245	1.4
6	Timol	CO	1295	1290	2155	2164	1.2
7	Carvacrol	CO	1304	1300	2183	2186	1.1
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno	HS	1435	1420	1604	1598	18.2
9	<i>trans</i> - β -Bergamoteno	HS	1441	1434	1587	1575	1.9
10	α -Humuleno	HS	1470	1453	1673	1666	10.6
11	α -Muuroloeno	HS	1485	1476	1690	1689	1.4
12	Germacreno D	HS	1493	1480	1711	1708	3.6
13	Biciclogermacreno	HS	1507	1494	1733	1734	2.4
14	δ -Cadineno	HS	1527	1523	1599	1755	3.1
15	<i>trans</i> -Nerolidol	SO	1566	1560	2025	2036	2.3
16	Óxido de cariofileno	SO	1597	1580	1981	1986	3.3
17	1- <i>epi</i> -Cubenol	SO	1626	1625	2078	2088	1.0
18	γ -Eudesmol	SO	1646	1630	2157	2176	1.3
19	β -Eudesmol	SO	1655	1650	2219	2238	1.3
20	α -Eudesmol	SO	1672	1651	2210	2222	3.7
Hidrocarburos monoterpénicos (HM)							20.3
Monoterpenos oxigenados (MO)							9.8
Compuestos oxigenados (CO)							2.3
Hidrocarburos sesquiterpénicos (HS)							41.3
Sesquiterpenos oxigenados (SO)							12.8

Las composiciones químicas encontradas en los tres aceites esenciales de *Lippia organoides*, se asemejan a las composiciones encontradas en Colombia, por Stashenko *et al.* [39], quienes estudiaron 10 plantas recolectadas en diferentes departamentos de Colombia y las distinguieron en tres quimiotipos, que coinciden con los encontrados en este trabajo de investigación.

Sin embargo, las composiciones químicas encontradas fueron diferentes a las reportadas en Belém, Brasil, por Ribeiro *et al.* [49], quienes reportaron un aceite esencial de *Lippia origanoides* rico en *trans*-metil cinamato y *trans*-nerolidol, y en Bahía, Brasil, por Teles *et al.*, [50] quienes reportaron un aceite esencial con carvacrol como componente mayoritario (33 - 56%).

4.6 PROTECCIÓN CONTRA LA OXIDACIÓN EMPLEANDO ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides*.

Las muestras de aceite vegetal con adición de aceites esenciales o con BHA fueron expuestas a la radiación ultravioleta por un periodo de 32 h. En la **Tabla 10** se compara la cantidad del PFPH-H para el blanco, que es la muestra sin adición de ningún tipo de antioxidante y expuesta a la luz ultravioleta A por 32 h, con respecto a las muestras a las que se les adicionó aceite esencial o BHA, también expuestas por 32 h.

Tabla 10. Comparación de la concentración PFPH-H del blanco del aceite de *Terminalia catappa* con aquellos a los que se les adicionó antioxidante.

Aceite de TC	Tiempo de exposición a la luz UV [h]	Concentración de PFPH-H, [nmol/g] (\pm SD, n=3)	CV%
Sin adición de antioxidantes	32	20.0 \pm 0.44	2.2
Con AE de <i>L. origanoides</i> (felandreno) [0.5%]	32	7.3 \pm 0.88	12.1
Con AE de <i>L. origanoides</i> (carvacrol) [0.5%]	32	12 \pm 2.0	16.6
Con AE de <i>L. origanoides</i> (timol) [0.5%]	32	5.8 \pm 0.2	3.4
Con BHA [200 ppm]	32	6.5 \pm 0.56	8.6

De la **Tabla 10**, se observa que las muestras con aceites esenciales o la sustancia de referencia BHA, presentaron menor cantidad de PFPH-H que la muestra blanco, lo que muestra que estas sustancias ejercieron un efecto protector contra la oxidación inducida en el aceite vegetal por la luz ultravioleta.

El aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo “timol” presentó la menor cantidad de PFPH-H, es decir experimentó el mayor efecto protector. La principal causa de este efecto puede deberse a la cantidad de compuestos fenólicos que presentó el aceite esencial de este quimiotipo (ca. 60 %), entre estos el timol y el carvacrol. Estudios realizados con plantas colombianas, a saber: Orégano cimarrón, Orégano de castilla, tomillo y Orégano común, con alto contenido de timol y carvacrol en sus aceites esenciales, mostraron, igualmente una buena actividad antioxidante, pero menor que la sustancias de referencias BHA [51].

El aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo “felandreno” presentó el menor efecto protector. La principal razón se puede deber a que este aceite esencial presentó la menor cantidad de sustancias con capacidad antioxidante como timol y carvacrol.

Según reportaron Yanishlieva *et al.* [52], la introducción de un antioxidante en un sistema lipídico oxidable conlleva a un cambio en el mecanismo de oxidación y como resultado un cambio en la cinética de la reacción. El efecto del antioxidante depende de la participación de sus moléculas y sus radicales en la reacción. El estudio demostró la efectividad del timol como antioxidante, que fue mayor que la del carvacrol. Lo anterior se debe a que el timol interviene en un mayor número de reacciones que el carvacrol en las reacciones secundarias de oxidación (aquellas que tiene lugar después de la formación de los peróxidos).

Como se observó, el aceite de semilla de *Terminalia catappa* presentó una composición de ácidos grasos cualitativamente similar al de los otros aceites estudiados en esta investigación, que fueron aceite de girasol, almendra, nuez de Brasil y aceite comercial de girasol; y similar a los aceites de mayor consumo. El perfil lipídico de este aceite mostró un alto contenido de los ácidos palmítico (ca. 38%) y oleico (ca. 33%), que lo hizo menos susceptible a degradarse bajo el efecto de la luz ultravioleta. El alto contenido de ácido oleico en el aceite de TC lo hace interesante para el sector de alimentos, ya que existen recomendaciones internacionales de sustituir el consumo de ácidos grasos poli-insaturados por ácidos grasos monoinsaturados.

Al comparar las dos metodologías empleadas para el monitoreo de la degradación de aceites vegetales oxidados por luz ultravioleta, como son: obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (GC-FID) y de PFPH-H (GC-ECD), se observó que la última permite hacer un mejor seguimiento, por lo que se recomienda para próximas investigación en esta área, el uso de esta metodología. Los aceites esenciales de *L. origanoides* empleados para la protección contra la degradación del aceite de TC por el efecto de la luz ultravioleta, presentaron, en su composición, compuestos con capacidad antioxidante como timol y carvacrol. El efecto protector de cada aceite esencial estuvo relacionado con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en cada aceite.

5. CONCLUSIONES

El rendimiento de extracción del aceite vegetal de *Terminalia catappa*, extraído con *n*-hexano y un equipo ultrasonido, fue menor comparado con los de otras semillas. El aceite de semilla de *Terminalia catappa* presentó un alto contenido de ácido oleico (ca. 33%), lo que le da un mayor valor a este aceite, ya que existen recomendaciones internacionales de consumir aceites con alto contenido de este ácido graso.

Se encontró que el mejor método para evaluar la oxidación del aceite por el efecto de la luz ultravioleta es el método del hexanal. El conjunto de valores experimentales permitió encontrar que con tan solo 8 horas de oxidación se generan compuestos secundarios de oxidación, detectables por GC-ECD.

El aceite de *Terminalia catappa* presentó menor degradación que los aceites de semillas de girasol (*Helianthus annuus*), nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), almendras (*Prunus dulcis*) y un aceite comercial de girasol. Los perfiles lipídicos de los cinco aceites fueron, cualitativamente, similares entre sí.

Se encontró que los aceites esenciales de *Lippia origanoides* analizados por GC-MS, presentaron composición química similar a las reportadas en literatura científica. Las cantidades relativas de los componentes mayoritarios fueron similares a las reportadas en Colombia, pero diferentes a las reportadas en Brasil.

El aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo “timol” presentó la mayor cantidad de compuestos fenólicos. Este quimiotipo mostró mayor efecto protector contra la oxidación del aceite vegetal de *Terminalia catappa*, expuesto a la luz ultravioleta, que la sustancia de referencia BHA.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Rosillo , F., Pelkmans, L.; Walter, A.;** A global overview of vegetable oil, with reference to biodiesel. Londres: *IEA Bioenergy*, 2009, pp. 3-83.
2. **Thomson, L. A.; Evans, B.;** *Terminalia catappa* (tropical Almond). *Agroforestry*. [En línea] agroforestry.net, 12 de Agosto de 2006. [Citado el: 28 de Agosto de 2013.] www.traditionaltree.org.
3. **Dos Santos, I.; De Carvalho, S.;** Studies of *Terminalia catappa* L.oil:Characterization. Maceió: *Bioresource Technology*, 2008, Vol. 99, pp. 6545-6549.
4. **Lawate, S; Lal, K.; Huang, C.;** Vegetable Oils — Structure and Performance. [aut. libro] Richard. Booser. *Tribology Data Handbook*. Ed. 1°. Florida. *CRC Press*, 1997, pp. 103-116.
5. **Yanishlieva, N.; Marinova, E.;** Kinetic evaluation of the antioxidant activity in lipid oxidation. [aut. libro] Afaf Kamal-Eldin. *Lipid Oxidation Pathways*. Ed. 1°. Uppsala : *AOAC Press*, 2003, pp. 85-110.
6. **Jung, H.; Min, D.;** Chemistry of Lipid Oxidation. [aut. libro] David B. Min y Casimir C. Akoh. *Food Lipids*. Ed. 3°. Nueva York : *CRC Press*, 2008, pp. 297-320.
7. **Kamal, A.; Pokorný, J.** Lipid Oxidation Products and Methods Used for Their Analysis. [aut. libro] Afaf Kamal y Jan Pokorný. *Analysis of Lipid Oxidation*. Ed. 1°. Praga: *AOAC Press*, 2005.

8. **Naz, S.; Ahmad, S.; Rasool, S.;** In vitro antibacterial activity of the extracts derived from *Terminalia catappa*. Karachi: *Research Journal of Microbiology*, 2007. Vol. 2. pp. 180-184.
9. **Chen, P.; Li, J.;** Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity. Taipéi : *Cancer letters*, 2000, Vol. 152, pp. 115-122.
10. **Gómez, H.; Díaz, F.; Franco, L.; Mercado, J.; Medina, J. D.; Gaitán, R.;** Folk medicine in the northern coast of Colombia: an over view. Cartagena : *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2011, Vol. 7, pp. 1-11.
11. **Chyaua, C., Tsaib, S.; Kob, P.;** Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. Taiwan : *Food Chemistry*, 2002, Vol. 78. pp. 483-488.
12. **Chyaua, C., Kob, P.; Maub, J.;** Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. Taiwan: *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2006. Vol. 39. pp. 1099-1108.
13. **Ezeokonkwo, C.; Dodson, W.;** The potencial of *Terminalia catappa* (tropical almond) seed as a source of dietary protein. Mississippi : *Journal of Food Quality*, 2002. Vol. 27. pp. 207-219.
14. **Asenjo, C.; Coyco, J.;** Puerto Rican fatty oils. IV. Expressed tropical almond (Talisay) oil. San Juan: *Journal of the American Chemical Society*, 1943, Vol. 65, pp. 1417-1418.

15. **Ajayi, I.; Oderinde, R.;** Short-term toxicological evaluation of *Terminalia catappa*, *Pentaclethra macrophylla* and *Calophyllum inophyllum* seed oils in rats. Ibadán: *Food Chemistry*, 2008, Vol. 106, pp. 458-465.
16. **Omeje, E.; Okide, G.;** Kinetics of autoxidation of an oil extract from *Terminalia catappa*. Nsukka: *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, Vol. 70, pp. 260-262.
17. **Oboh, B.; Ogunkanmi, B.; Olasan, L.;** Phenotypic Diversity in *Terminalia catappa* from South Western Nigeria. Dan Fodio Blvd: *Pakistan Journal of Biological Sciencies*, 2008. Vol. 11. pp. 135-138.
18. **Matsuo, M.; Kaneko, T.;** Lipid Peroxidation. [aut. libro] Byung Pal Yu. Methods in Aging Research. Ed. 1°. Nueva York: *CRC Press*, 1998, pp. 573-606.
19. **Zamora, R.; Hidalgo, F. J.;** Fatty Acids. Sevilla. Ed.1 : Marcel Dekker, 2004. pp. 221-274.
20. **McNair, H. M.; Miller, James M.;** Basic Gas Chromatography. Ed. 1°. Nueva York : *John Wiley & Sons*, 1997.pp 12-18
21. **Ahuja, S.;** Chromatography and separation science. Ed. 4°. San Diego: *Academic press*, 2003.pp 28-42
22. **Stashenko, E.; Martínez, J.;** GC Y GC-MS: Configuración del equipo versus aplicaciones. Bucaramanga: *Scientia Chromatographica*, 2010, Vol. 2, pp. 23-46.
23. **Christie, W.;** Gas cromatography and lipids. Ed. 2°. Dundee: *The Oily Press*, 1994.

24. **Lovelock, J.;** *Electron capture detectors*. Patente N° 3,870,888 Inglaterra, 11 de 03 de 1975.
25. **Poole, C.;** Derivatization reactions for use with the electron-capture detector. Detroit : *Journal of Chromatography A*, 2013, Vol. 1296, pp. 15-24.
26. **Scott, R.;** Electron-Capture Detector. [aut. libro] J. Cazes. *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. 3°. Nueva York: *CRC Press*, 2009. pp 389-396.
27. **Stashenko, E.; Martínez, J.;** Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. Bucaramanga: *Scientia Chromatographica.*, 2011, Vol. 3, pp. 199-221.
28. **Scott, R.;** Flame Ionization Detector for GC. [aut. libro] J. Cazes. *Encyclopedia of chromatography*. Ed. 3°. Banbury : *CRC Press*, 2009, pp. 866-867.
29. **Zenkevich, I.;** Derivatization of Analytes: General Aspects. [aut. libro] J. Cazes. *Encyclopedia od Cromatography*.Ed. 3°. San Petersburgo: *CRC Press*, 2010, pp. 562-566.
30. **Susana, C.; Beatriz, O.;** Fatty Acids. [aut. libro] Cazes Jack . *Encyclopedia of Chromatography*. Ed. 3°. Boca Raton. : *Taylor and Francis Group.*, 2009., pp. 833-845.
31. **Stashenko, E.; Martínez, J.;** . Derivatization and solid-phase microextraction. Bucaramanga : *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, Vol. 23, pp. 553-561.

32. **Zenkevich, I.**; Carbonyls: Derivatization for GC Analysis. [aut. libro] J. Cazes. Encyclopedia of Chromatography. Ed. 3°. San Petersburgo: *CRC Press*, 2010, pp. 310-315.
33. **Stashenko, E.; Puertas, M.; Martínez, J.**; SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity. Bucaramanga : *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2002, Vol. 373, pp. 70-74.
34. **Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R.**; Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. Helsinki: *Analytica Chimica Acta*, 2002. Vol. 465. pp. 39-62.
35. **Shantha, N.; Napolitano, G.**; Gas chromatography of fatty acids. Lexington: *Journal of Chromatography*, 1992. Vol. 624. pp. 37-51.
36. **Stashenko, E.; Martínez, J.; Durán, D.**; Aceites esenciales.aspectos generales. [aut. libro] E. Stashenko y J. Martínez. *Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones*. Bucaramanga : *CENIVAM*, 2012.
37. **Bandoni, A.**; Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica. Ed 1°. La Plata : *Unversidad Nacional de La Plata*, 2000. pp. 29.
38. **Stashenko, E.**; Aceites esenciales. Ed. 1° Bucaramanga: *División de publicaciones UIS*, 2009. pp. 45-49.
39. **Stashenko, E.; Martínez, J.; Ruíz, C.; Arias, G.; Dúran, C.; Cala, M.**; *Lippia organoides* chemotype differatiation based on essencial oil GC-MS and principal component analysis. Bucaramanga : *Journal of Separation Science*, 2009. Vol 33, pp. 93-103.

40. **Stashenko, E.; Ruiz, C.; Muñoz, A.; Catañeda, M.; Martínez, J.;** Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. Bucaramanga : *Natural Product Communications*, 2007, Vol. 3, pp 563-566.
41. **Becker, E.; Nissen, L.; Skibsted, L.;** Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. Frederiksberg. : *European Food Research and Technology*, 2004. Vol. 219. pp. 561-571.
42. **Halliwell, B.; Gutteridge, J.;** Free radicals in Biology and Medicine. Ed. 1°. Nueva York: *Oxford University Press Inc.*, 1988. pág. 236.
43. **Li, Y.;** Antioxidants in Biology and Medicine: Essentials, advances and clinical application. Ed 1°. Nueva York : *Nova Science Publishers*, 2011, pp. 63-78.
44. **Contreras, N.;** Tesis de maestría: Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta. Bucaramanga : *Universidad Industrial de Santander*, 2002. pp. 1-128.
45. **Yang, M.; Lin, L.; Choong, Y.;** A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. Taiwan : *Food Research International*, 2002. Vol. 35. pp. 627-633.
46. **Raß, M.; Schein, C.; Matthäus, B. ;.** Virgin sunflower oil. Ibbenbüren : *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2008. Vol. 110. pp. 618-624.

47. **Spiteller, G.**; Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases. Bayreuth : *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998. Vol. 95. pp. 105-162.
48. **Babushok, V.; Linstrom, P.; Zenkevich, I.**; Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. Maryland : *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2011. Vol. 40. pp. 1-47.
49. **Ribeiro, A.; Andrade, E.; Salimena, F.; Maia, J.**; Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. Belém: *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, Vol. 55, pp. 249-259.
50. **Teles, S.; Pereira, J.; Oliveira, L.; Malheiro, R.; Lucchese, A.; Silva, F.**; *Lippia organoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. Bahia: *Industrial Crops and Products*, 2014, Vol. 60, pp. 217-225.
51. **Acevedo, A.; Castañeda, M.; Blanco, K.; Cardenas, C.; Reyes, J.; Kouznetsov, V.; Stashenko, E.**; Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Bucaramanga: *Scientia et Technica*, 2007, Vol. 1, pp. 125-128.
52. **Yanishlieva, N.; Marinova, E.; Gordon, M.; Raneva, V.**; Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Sofia: *Food Chemistry*, 1999, Vol. 64, pp. 59-66.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, S. *Chromatography and separation science*. 4°. San Diego: Academic press, 2003.

AJAYI, I., y R. Oderinde. *Short-term toxicological evaluation of Terminalia catappa, Pentaclethra macrophylla and Calophyllum inophyllum seed oils in rats*. Vol. 106, 458-465. Ibadán: Food Chemistry, 2008.

ANNEGOWDA, H.V.; Nee, W. *Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Property of Hydrolysed Extracts of Terminalia catappa L. Leaf*. Vol. 9, 479-485. Penag: Asian Journal of Plant Sciences, 2010.

ASENJO, C. F.; Coyco, J. *Puerto Rican fatty oils. IV. Expressed tropical almond (Talisay) oil*. Vol. 65, 1417-1418. San Juan: Journal of the American Chemical Society, 1943.

BABUSHOK, V. I.; Linstrom, P. J.; Zenkevich, I. G.;. *Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils*. Vol. 40. Maryland: Journal of Physical and Chemical Reference Data, 2011.

BANDONI, A. *Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica*. 1°. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2000.

BECKER, E. M.; Nissen , L. R.; Skibsted, L. H.;. *Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects*. Vol. 219. Frederiksberg C.: European Food Research and Technology, 2004.

CHEN, P.; Li, J. *Folk medicine Terminalia catappa and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity*. Vol. 152, 115-122. Taipéi: Cancer letters, 2000.

Christie, W. W. *Gas cromatography and lipids*. 2°. Dundee: The Oily Press, 1994.

CHYAUUA, C.C., P.T. Kob, y J.L. Maub. *Antioxidant properties of aqueous extracts from*. Vol. 39. Taiwan: Swiss Society of Food Science and Technology, 2006.

CHYAUUA, C.C., S.Y. Tsaib, y P.T. Kob. *Antioxidant properties of solvent extracts from*. Vol. 78. Taiwan: Food Chemistry, 2002.

CONTRERAS, N. . *Tesis de maestria: Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta*. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2002.

DOS SANTOS, I.C.F., y S.H.V. De Carvalho. *Studies of Terminaliacatappa L.oil:Characterization*. Vol. 99, 6545-6549. Maceío: Bioresource Technology, 2008.

ESPINAL, C. F., y H. J. MARTÍNEZ. «La cadena de las oleoginosas en Colombia.» Bogotá: Agrocadenas, 2005.

EZEOKONKWO, C.A.; Dodson, W.L.;. *The potencial of Terminalia catappa (tropical almond) seed as a source of diatery protein*. Vol. 27. Mississipi: Journal of Food Quality, 2002.

GÓMEZ, H.; DÍAZ, F.; Franco, L.; MERCADO, J.; MEDINA, J. D.; GAITÁN, R. *Folk medicine in the northern coast of Colombia: an over view*. Vol. 7, 1-11. Cartagena: Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 2011.

GUILLÉN, M. D.; CABO, N.;. *Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats*. Vol. 75. Vitoria: Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997.

GUILLÉN, M.D.; CABO, N.;. *Characterization of Edible Oils and Lard by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Relationships Between Composition and Frequency of Concrete Bands in the Fingerprint Region*. Traducido por 1281-1286. Vol. 74. Vitoria: Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.;. *Free radicals in Biology and Medicine*. Nueva York: Oxford University Press Inc., 1988. International Organization for Standardization. «ISO 5509.» 2000.

JUNG, H., y D. B. MIN. «Chemistry of Lipid Oxidation.» En *Food Lipids*, de David B. Min, & Casimir C. Akoh, 297-320. Nueva York: CRC Press, 2008.

KAMAL, A.; Pokorný, J. «Lipid Oxidation Products and Methods Used for Their Analysis.» En *Analysis of Lipid Oxidation*, de Afaf Kamal, & Jan Pokorný, Capítulo 1. Praga: AOAC Press, 2005.

KNOTHE, G. «Vegetable Oils.» En *Handbook of Bioenergy Crop Plants*, de David R. Shonnard, 793-810. Florida: CRC Press, 2012.

KO, T.; WENG, Y.; Robin, Y.Y. *Squalene Content and Antioxidant Activity of Terminalia catappa Leaves and Seeds*. Vol. 50, 5343-5348. Taiwan: Journal of agricultural and food chemistry, 2002.

LAAKSO, T. S.; LAAKSO, I.; Hiltunen, R.; *Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition*. Vol. 465. Helsinki: Analytica Chimica Acta, 2002.

LAWATE, S. S.; Lal, K.; Huang, C. «Vegetable Oils — Structure and Performance.» En *Tribology Data Handbook*, de Richard. Booser, 103-116. Florida: CRC Press, 1997.

LI, Y.; *Antioxidants in Biology and Medicine: Essentials, advances and clinical application*. 1°. Nueva York: Nova Science Publishers, Inc., 2011.

LOVELOCK, J. E. Electron capture detectors. Inglaterra Patente 3,870,888. 11 de 03 de 1975.

MATSUO, M.; KANEKO, T. «Lipid Peroxidation.» En *Methods in Aging Research*, de Byung Pal Yu, 573-606. Nueva York: CRC Press, 1998.

MCNAIR, H. M.; Miller, James M. *Basic Gas Chromatography*. Ed. 1°. Nueva York: John Wiley & Sons, 1997.

MUÑOZ, A.; CASTAÑEDA, M.; Blanco, K.; Cardenas, C.; Reyes, J.; Kouznetsov, V.; Stashenko, E.; *COMPOSICIÓN Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES AROMÁTICAS Y MEDICINALES CON ALTO CONTENIDO DE TIMOL Y CARVACROL*. Vol. 1. Bucaramanga: Scientia et Technica Año XIII,, 2007.

NAZ, S.; AHMAD, S.; RASOOL, S.A.;. *In vitro antibacterial activity of the extracts derived from Terminalia catappa*. Vol. 2. Karachi: Research Journal of Microbiology, 2007.

OBOH, B.; OGUNKANMI, B.; Olasan , L.;. *Phenotypic Diversity in Terminalia catappa from South Western Nigeria*. Vol. 11. Dan Fodio Blvd: Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008.

OMEJE, E.O.; OKIDE, G.B. *Kinetics of autoxidation of an oil extract from Terminalia catappa*. Vol. 70, 260-262. Nsukka: Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008.

POOLE, C. F.;. *Derivatization reactions for use with the electron-capture detector*. Vol. 1296. Detroit: Journal of Chromatography A, 2013.

Raß, Michael ; Schein, Christian ; Matthäus, Bertrand ;. *Virgin sunflower oil*. Vol. 110. Ibbenbüren: European Journal of Lipid Science and Technology, 2008.

ROSILLO , F.; Pelkmans, L.; Walter, A. *A global overview of vegetable oil, with reference to biodiesel*. Londres: IEA Bioenergy, 2009.

SALGAR, W., E. E. Stashenko, y J. R. Martínez. «Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Labiatae Labiatae.» Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2002.

SCOTT, R. P. W. «Flame Ionization Detector for GC.» En *Encyclopedia of chromatography*, de J. Cazes, 866-867. Banbury: CRC Press, 2009.

SCOTT, R. P. W.;. «Electron-Capture Detector.» En *Encyclopedia of Chromatography*, de J. Cazes. Nueva York: CRC Press, 2009.

SHAHIDI, F., y U. N. Wanasundara. «Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils.» En *Food Lipids*, de David B. Min, & Casimir C. Akoh, 387-403. Nueva York: CRC Press, 2008.

SHANTHA, N. C.; Napolitano, G. E.;. *Gas chromatography of fatty acids*. Vol. 624. Lexington: Journal of Chromatography, 1992.

SIM, S.F.; Lee, T.Z.E.; Mohd Irwan Lu, N.A.L.; Samling, B. *Synchronized analysis of FTIR spectra and GC-MS chromatograms for evaluation of the thermally degraded vegetable oils*. Vol. 2014, 1-9. Kota Samarahan: Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2014.

SPITELLER, Gerhard . *Linoleic acid peroxidation—the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein—and its relationship to chronic diseases*. Vol. 95. Bayreuth: Chemistry and Physics of Lipids, 1998.

STASHENKO, E. E., y J. R. Martínez. *Derivatization and solid-phase microextraction*. Vol. 23, 553-561. Bucaramanga: Trends in Analytical Chemistry, 2004.

STASHENKO, E. E.; Martínez, J. R. *Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles*. Vol. 3, 199-221. Bucaramanga: Scientia Chromatographica., 2011.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J.R.; Durán, D.C.;. «Aceites esenciales.aspectos generales.» En *Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones*, de E.E. Stashenko, & J.R. Martínez. Bucaramanga: CENIVAM, 2012.

STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; Martínez, J. R. *SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity*. Vol. 373, 70-74. Bucaramanga: Analytical and bioanalytical chemistry, 2002.

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.;. *GC Y GC-MS: Configuración del equipo versus aplicaciones*. Vol. 2. Bucaramanga: Scientia Chromatographica, 2010.

STASHENKO, Elena E. *Aceites esenciales*. Bucaramanga: División de publicaciones UIS, 2009.

STASHENKO, Elena E., Carlos RUIZ, AmN}er MUÑOZ, Martha CATAÑEDA, y Jairo MARTÍNEZ. *Composition and antioxidant activity of essential oils of lippia origanoides H.B.K. grown in Colombia*. Vol. 0. Bucaramanga: Natural Product Communications, 2007.

STASHENKO, Elena E., Jairo R. MARTÍNEZ, Carlos A. RÚÍZ, Ginna ARIAS, Camilo DÚRAN, y Monica CALA. *Lippia origanoides chemotype differatiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis*. 32 vols. Bucaramanga: Journal of Separation Science, 2009.

Susana, C., y O. Beatriz. «Fatty Acids.» En *Encyclopedia of Chromatography.*, de Cazes Jack , 833-845. Boca Raton.: Taylor and Francis Group., 2009.

THOMSON, L. A., y B. Evans. *Terminalia catappa (tropical Almond)*. agroforestry.net. 12 de Agosto de 2006. www.traditionaltree.org (último acceso: 28 de Agosto de 2013).

Van de Vort, F. R.; Sedman , J.; Russin , T.:. *Spectroscopy and spetrometry of lippids- part 1**. Vol. 103. Quebec: European Journal of Lipid Science and Technology, 2001.

YANG, M.; Lin, L.; Choong, Y;. *A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats*. Vol. 35. Taiwan: Food Research International, 2002.

YANISHLIEVA, N. V., y E. M. Marinova. «Kinetic evaluation of the antioxidant activity in lipid oxidation.» En *Lipid Oxidation Pathways*, de Afaf Kamal-Eldin, 85-110. Uppsala: AOAC Press, 2003.

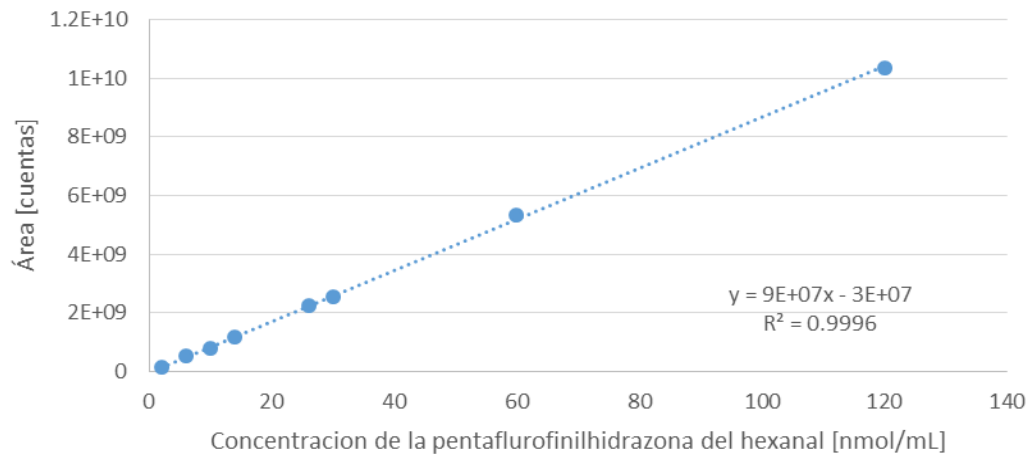
ZAMORA, R., y F. J. HIDALGO. *Fatty Acids*. Sevilla: Marcel Dekker, 2004.

ZENKEVICH, I. G. «Derivatization of Analytes: General AspectS.» En *Encyclopedia od Cromatography*, de J. Cazes, 562-566. San Petersburg: CRC Press, 2010.

ZENKEVICH, I. G. «Carbonyls: Derivatization for GC Analysis.» En *Encyclopedia of Cromatography*, de J. Cazes, 310-315. San Petersburgo: CRC Press, 2010.

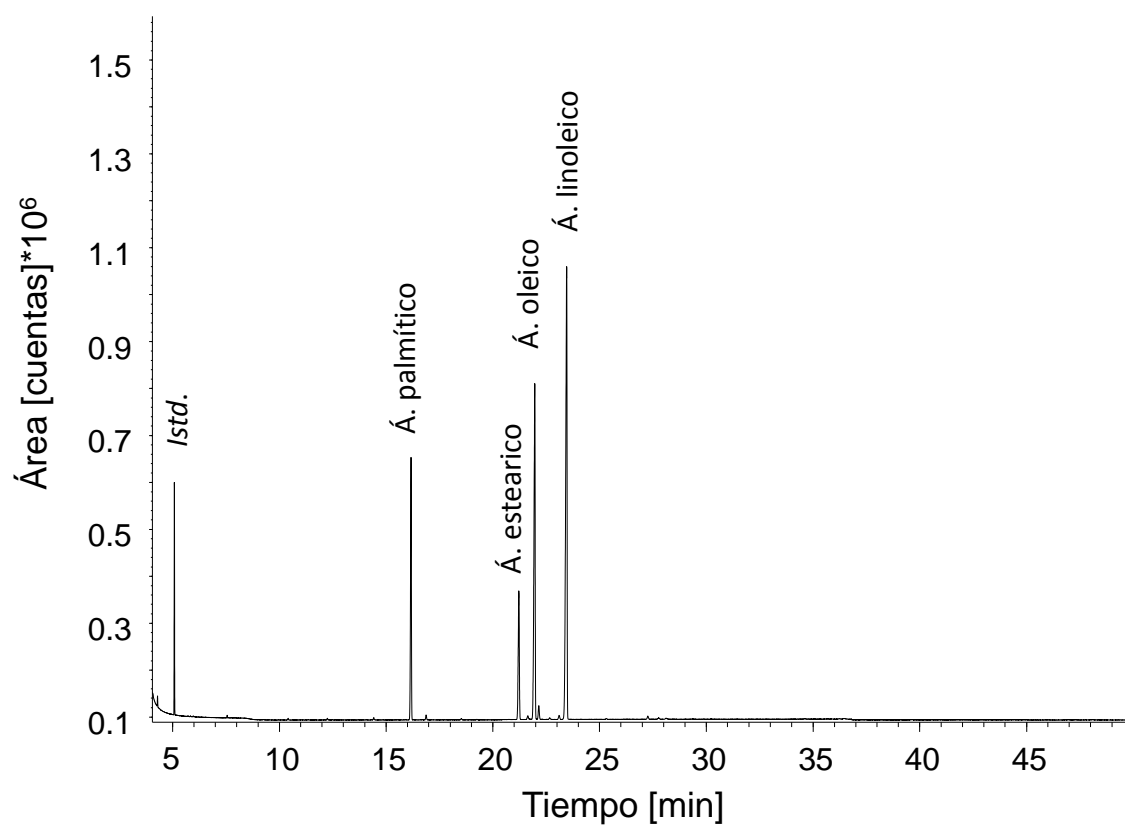
ANEXOS

Anexo A. CURVA DE CALIBRACIÓN EMPLEADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PFPH-H

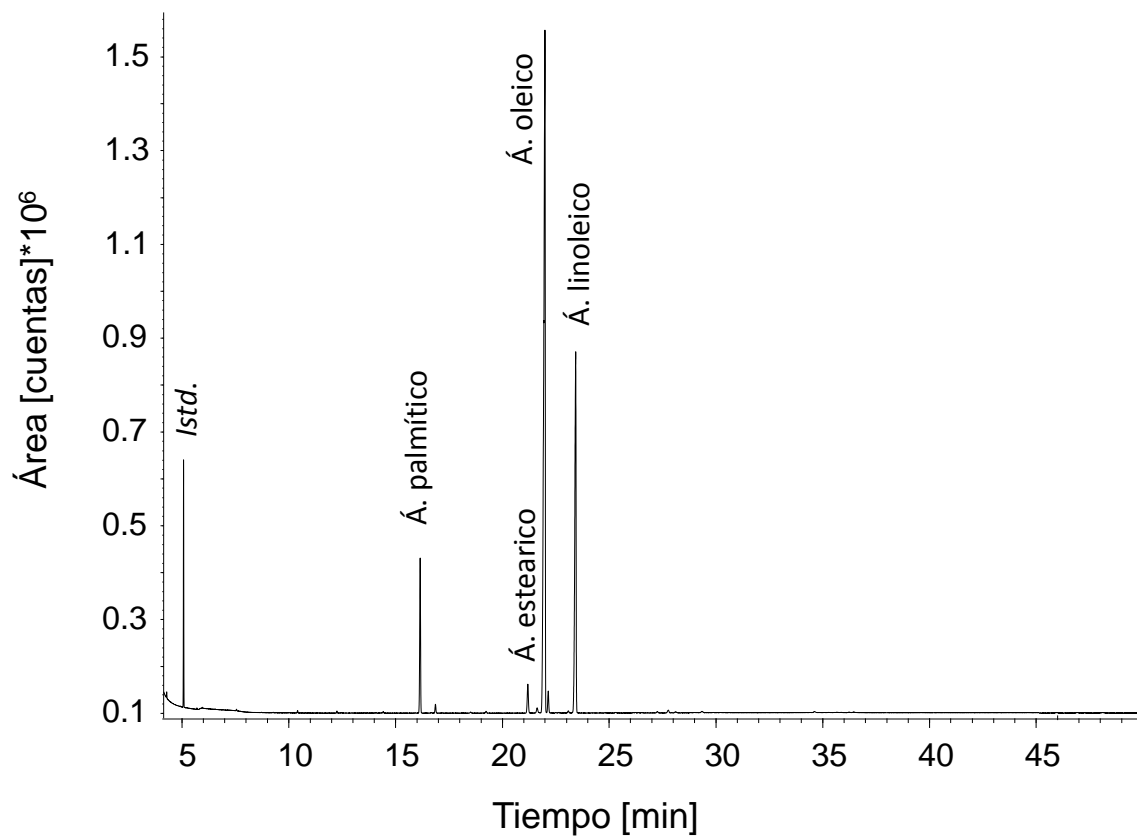


Anexo B. PERFILES LIPÍDICO DEL ACEITE DE DIVERSAS SEMILLAS

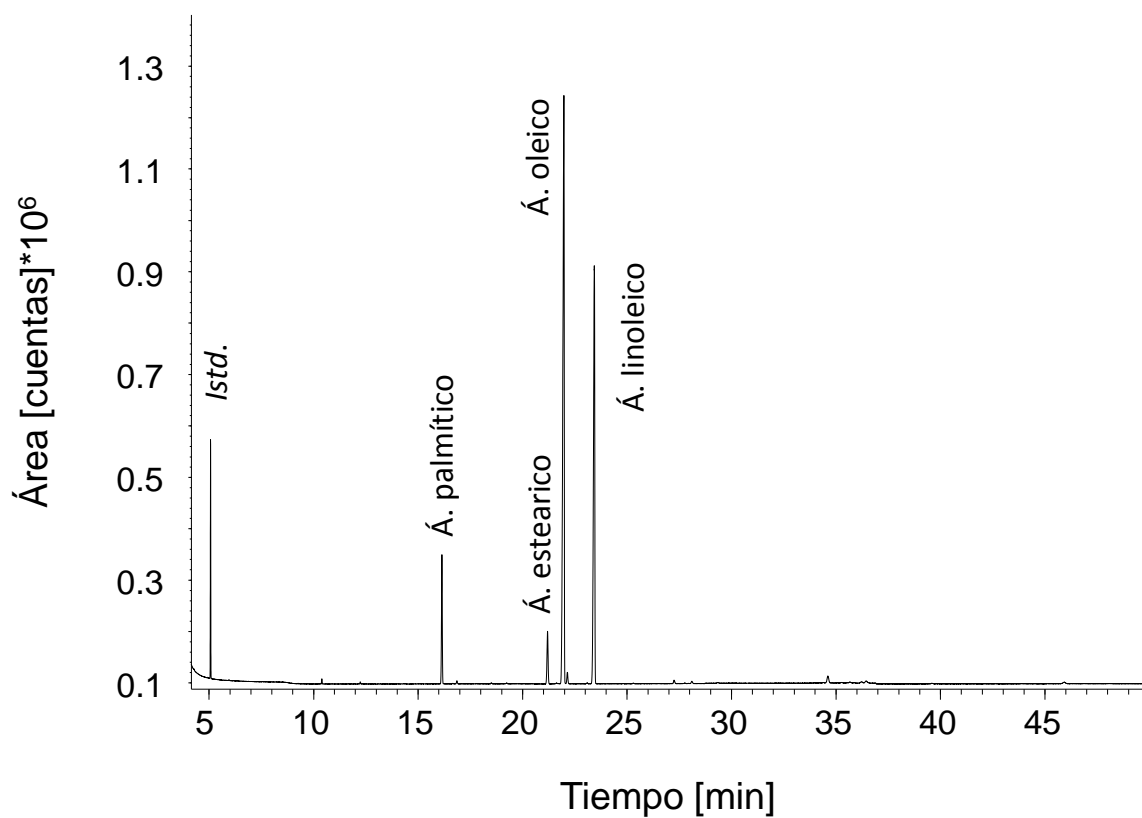
PERFIL LIPÍDICO DEL ACEITE DE SEMILLA DE *Bertholletia excelsa* (NUEZ DE BRASIL) OBTENIDO POR EXTRACCIÓN CON SOLVENTES, COLUMNA DB-23, *split* (30:1), DETECTOR FID.



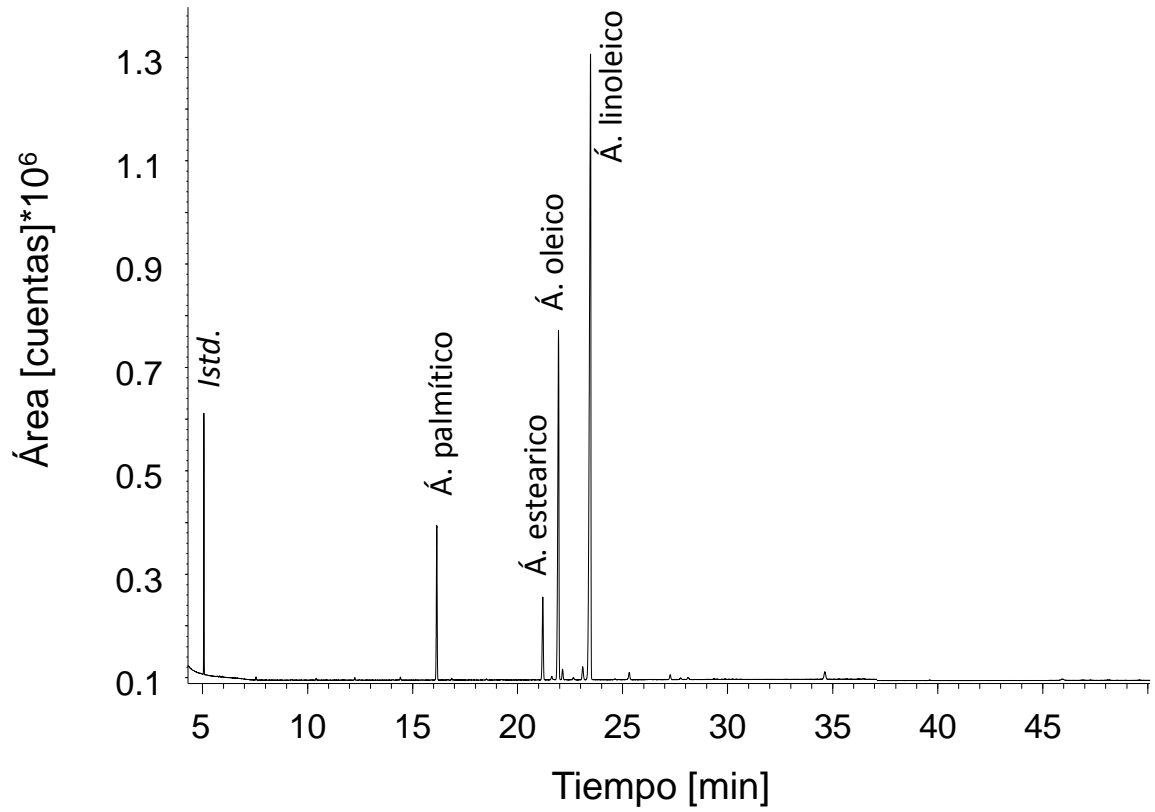
Perfil lipídico del aceite de semilla de *Prunus dulcis* (almendras) obtenido por extracción con solventes, columna DB-23, *split* (30:1), detector FID.



Perfil lipídico del aceite de semilla de *Prunus dulcis* (girasol) obtenido por extracción con solventes, columna DB-23, *split* (30:1), detector FID.

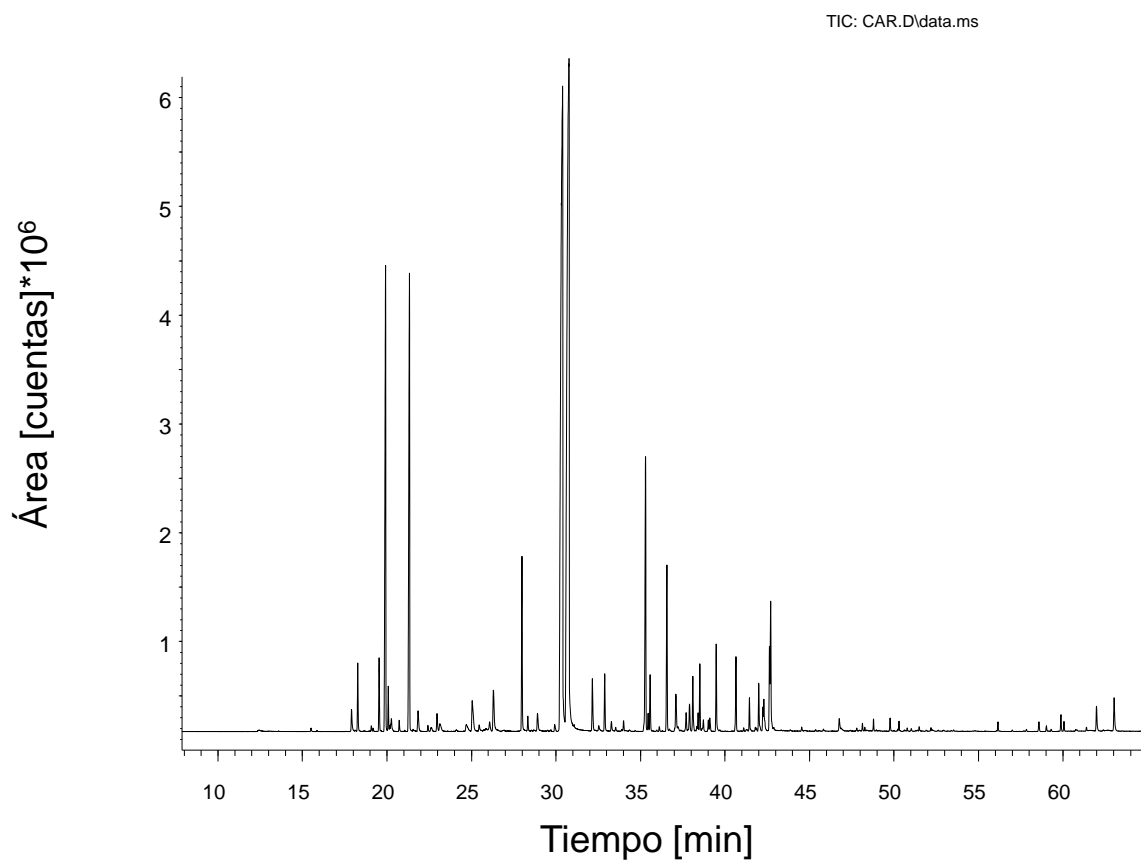


Perfil lipídico del aceite vegetal comercial Girasoli®. Obtenido por extracción con solventes, columna DB-23, *split* (30:1), detector FID.

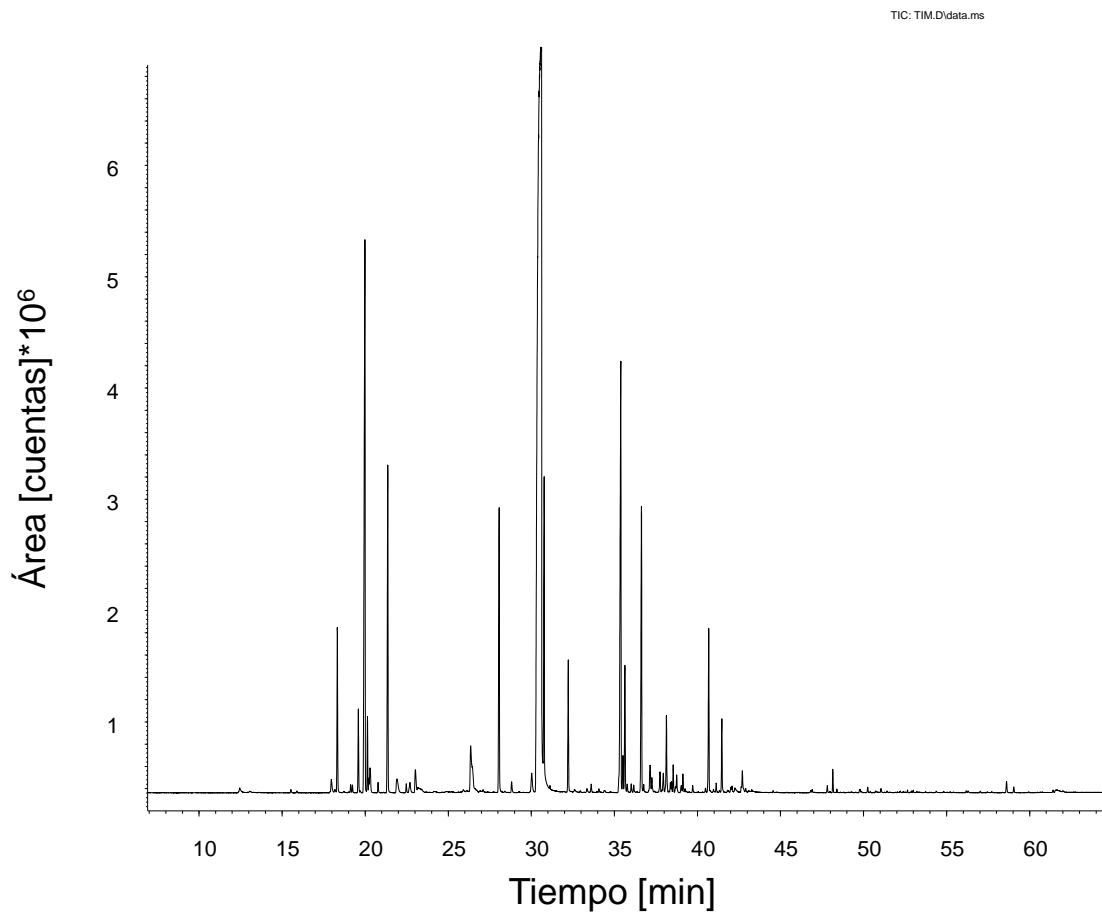


**Anexo C. PERFILES CROMATOGRÁFICO OBTENIDOS POR GC-MS DE
DIVERSOS ACEITES ESENCIALES**

**Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del aceite esencial de *Lippia
origanoides* quimiotipo “carvacrol” Columna DB-5MS, *split* (30:1).**



Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo "timol" Columna DB-5MS. *split* (30:1).



Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del aceite esencial de *Lippia origanoides* quimiotipo “felandreno” Columna DB-5MS, *split* (30:1)

