

“Madre de Dios Capital de la Biodiversidad”

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS



FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**« SEPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES, CAROTENOIDES Y
TOCOFEROLES CONTENIDOS EN ACEITE DE AGUAJE (*Mauritia
flexuosa*), MEDIANTE DESTILACIÓN DISCONTINUA A VACÍO Y
CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN COLUMNA »**

TESISTAS:

Bach. SINTHIA SANERY QUISPE LUKAÑA

Bach. ROSARIO DEL PILAR SOLORZANO CUTIPA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUERTO MALDONADO – PERU

-2015-

“Madre de Dios Capital de la Biodiversidad”

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS



FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**« SEPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES, CAROTENOIDES Y
TOCOFEROLES CONTENIDOS EN ACEITE DE AGUAJE (*Mauritia
flexuosa*), MEDIANTE DESTILACIÓN DISCONTINUA A VACÍO Y
CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN COLUMNA »**

TESISTAS:

Bach. SINTHIA SANERY QUISPE LUKAÑA

Bach. ROSARIO DEL PILAR SOLORZANO CUTIPA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUERTO MALDONADO - PERU

-2015-

“Madre de Dios Capital de la Biodiversidad”

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TITULO DE TESIS:

« SEPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES, CAROTENOIDEOS Y TOCOFEROLES CONTENIDOS EN ACEITE DE AGUAJE (*Mauritia flexuosa*), MEDIANTE DESTILACIÓN DISCONTINUA A VACÍO Y CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN COLUMNA »

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTADO POR:

**Bach. SINTHIA SANERY QUISPE LUKAÑA
Bach. ROSARIO DEL PILAR SOLORZANO CUTIPA**

PUERTO MALDONADO - PERU

-2015-

DEDICATORIA

A nuestros padres por su abnegado apoyo incondicional brindado y mostrado en todo momento, contribuyendo en nuestra formación profesional y personal. Ayudándonos a alcanzar nuestros objetivos.

A Dios por guiarnos en la vida, amarnos y perdonarnos sin mirar los errores cometidos y porque siempre está presente salvaguardando nuestra salud en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi Sentimiento de Gratitud:

A la **Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD)**, Facultad de Ingeniería, por la formación académica profesional durante los años de estudio en dicha institución.

A la **Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC)**. En especial al **Dr. Antonio Bueno** y **Mg. Julio Lechuga**, por brindarnos los ambientes de laboratorio de ingeniería química. Al **Quim. Jorge Choqueneira** por brindarnos su asesoramiento y ambiente del laboratorio de cromatografía, para la realización de las pruebas experimentales. Así como también al **Quim. Melquiades Herrera**, por su apoyo incondicional.

Ing. Jesús Manuel Flores Arizaca, por su asesoramiento permanente, consejos, por su amistad y por su apoyo brindado para la elaboración del presente trabajo de Investigación.

Quim. Lizet Rodríguez Achata, por brindarnos las facilidades del Laboratorio Ambiental para la realización de este trabajo de Investigación.

A los miembros del Jurado conformado por el **Ing. Pedro Saúl Montalván Apolaya**, **Dra. María Isabel Cajo Pinche**, **Dra. Roxana Madueño Portilla**, **Dr. Rossel Quispe Herrera**, por sus sugerencias y observaciones que ayudo al enriquecimiento del presente trabajo de Investigación.

A todas las demás personas que de alguna forma contribuyeron a la ejecución del siguiente trabajo de investigación.

Sinthia Sanery Quispe Lukaña
Rosario del Pilar Solorzano Cutipa

PRESENTACIÓN

El presente trabajo tiene por finalidad dar a conocer las condiciones de operación de los procesos de destilación discontinua a vacío y cromatografía preparativa en columna que permita una adecuada separación de los ácidos grasos libres, tocoferoles y carotenoides contenidos en el aceite de Aguaje (*Mauritia flexuosa*).

El trabajo de investigación consta de tres capítulos donde nos dará a conocer el contenido del presente trabajo de investigación.

CAPITULO I: Marco teórico, que consigna los antecedentes, la revisión Bibliográfica de sustento y la investigación bibliográfica.

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS, consigna las generalidades, materiales, Material Biológico, Materiales de Acondicionamiento del Fruto, Materiales de Laboratorio, Equipos y Reactivos. Los Métodos, las técnicas los instrumentos empleados para el presente trabajo de Investigación.

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES, consignan los cuadros y gráficos basados en los resultados que se han obtenido de la aplicación de los instrumentos de investigación así como la interpretación de los resultados.

INDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	01
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	
1.1. Antecedentes	3
1.2. Generalidades del Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	5
1.2.1. Taxonomía	6
1.2.2. Características Generales	6
1.2.3. El guaje y sus usos	8
1.2.4. Características físico – químicos del fruto de aguaje	9
1.2.5. Composición Proximal del Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	10
1.3. Aceites vegetales	10
1.3.1. Características Físicos-Químicos del Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	11
1.4. Ácidos Grasos	13
1.5. Carotenoides	15
1.5.1. Importancia de los Carotenos en la Alimentación Humana	16
1.5.2. Extracción y aislamiento de carotenos	16
1.6. Tocoferoles	19
1.6.1. Estructura Química	19
1.6.2. Actividad	20
1.6.3. Tocoferoles en Aceites Vegetales	21
1.6.4. Usos	22
1.7. Destilación	23
1.7.1. Métodos de Destilación Utilizados en el Industria de Ácido graso	23
1.7.2. Destilación Discontinua o Lote	24
1.7.3. Destilación a Presión Reducida o Vacío	25
1.7.4. Esterificación	26
1.8. Cromatografía	27
1.8.1. Tipos de Separación Cromatografía	27

1.8.2. Cromatograma	28
1.8.3. Ecuaciones Básicas en Cromatografía	29
1.8.3.1. Constante de Distribución	29
1.8.3.2. Factor de Capacidad	29
1.8.3.3. Factor de Selectividad	30
1.8.3.4. Eficiencia de una Columna	31
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	
2.1. Materiales	33
2.1.1. Material Biológico:	33
2.1.2. Materiales de Acondicionamiento del Fruto	33
2.1.3. Materiales de Laboratorio	33
2.1.4. Equipos	34
2.1.5. Reactivos	34
2.2. Método	35
2.2.1. Métodos para Análisis Físico - Químico de Aceites	35
2.2.2. Metodología	36
2.2.2.1. Descripción del Proceso de Extracción del Aceite de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	37
2.2.2.2. Descripción del Proceso de Fraccionamiento del Aceite de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	40
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES	
3.1. Caracterización Físico – Químico del Aceite de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	46
3.2. Destilación	47
3.2.1. Composición de Ácidos Grasos.	56
3.3. Separación por Cromatografía Preparativa en Columna	60
3.3.1. Elección de Fase Móvil	60
3.3.2. Análisis de tocoferoles y carotenoides del aceite de aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	61
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	78

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 01 Descripción Taxonómica de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	6
Cuadro 02 Análisis Porcentual del Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	9
Cuadro 03 Composición Físico – Químico de las Fracciones del fruto	10
Cuadro 04 Composición Proximal del Aguaje (Cascara + Pulpa)	10
Cuadro 05 Rendimientos de Extracción del Aceite de Aguaje	11
Cuadro 06 Composición de Ácidos Grasos del Aceite de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	12
Cuadro 07 Características Físico - Químicas del Aceite de Aguaje	12
Cuadro 08 Composición de Ácidos Grasos (% Total) de los Aceites de Pulpas de Cinco Frutas Amazónicas	14
Cuadro 09 Contenidos de Carotenos Presentes en el Aceite de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>).	18
Cuadro 10 Comparación de carotenoides – composición en baja y alta fase	18
Cuadro 11 Contenido de Tocoferol en el Aceite de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	22
Cuadro 12 Análisis Físico Químico del aceite de Aguaje y sus normas.	36
Cuadro 13 Análisis Físico-Químico del Aceite Crudo de Aguaje	46
Cuadro 14 Condiciones de Operación del proceso de Destilación a Vacío.	47
Cuadro 15 Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado para el Destilado	51
Cuadro 16 Coeficiente de Modelo Ajustado para el Destilado	51
Cuadro 17 Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de destilado en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.	52
Cuadro 18 Corregido para la media de las observaciones - Destilado	52
Cuadro 19 Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado para el Producto Fondo	53
Cuadro 20 Coeficiente de Modelo Ajustado para el producto fondo	53
Cuadro 21 Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de producto fondo en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.	53

Cuadro 22	Corregido para la media de las observaciones – Producto Fondo	53
Cuadro 23	Coefficiente de Modelo Ajustado para destilado	54
Cuadro 24	Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de destilado en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.	55
Cuadro 25	Coefficiente de Modelo Ajustado para producto fondo	55
Cuadro 26	Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de producto fondo en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.	56
Cuadro 27	Composición de Ácidos Grasos del Aceite Crudo de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	56
Cuadro 28	Composición de Ácidos Grasos en el Destilado del Aceite de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	58
Cuadro 29	Composición de Ácidos Grasos en el Producto Fondo del Aceite de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	59
Cuadro 30	Pruebas de Solventes en Cromatografía de Capa Fina	61
Cuadro 31	Resultados de α -Tocoferol y β -Caroteno contenido en Aceite crudo de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	62
Cuadro 32	Análisis de α -Tocoferol y β -Caroteno por HPLC de las fracciones obtenidas de cromatografía preparativa en columna a temperatura de 20°C.	64
Cuadro 33	Análisis de α -Tocoferol y β -Caroteno por HPLC de las fracciones obtenidas de cromatografía preparativa en columna a temperatura de 40°C.	67

INDICE DE FIGURA

	Pág.	
Figura 01	Planta de aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	5
Figura 02	Color de pulpa del fruto maduro de aguaje de los morfotipos amarillo (A), color (B) y shambo (C)	6
Figura 03	Derivados del fruto y aceite de aguaje	9
Figura 04	Estructuras químicas de los ácidos grasos cis-linoleico y α -linolenico	13
Figura 05	Estructura Química de un Caroteno (β -caroteno) y de una Xantofila (zeaxantina).	15
Figura 06	β - Caroteno y 13-cis- β -Caroteno, L. Onda a 450 nm, del Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	18
Figura 07	a) Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles. b) Estructura Química de los tocoferoles	19
Figura 08	Degradación del α -tocoferol	21
Figura 09	Transesterificación de aceites vegetales	27
Figura 10	Cromatograma de dos componentes indicando el t_R y t_M	28
Figura 11	Diagrama de Bloques para la Extracción del Aceite de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>).	36
Figura 12	Selección y clasificación de los frutos de <i>M. flexuosa</i>	37
Figura 13	Despulpado de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>)	37
Figura 14	Pulpa de Aguaje Húmedo	38
Figura 15	Pulpa de Aguaje seco	38
Figura 16	Módulo de prensado en frio con Cap. 500 g y Carga 20 TN	38
Figura 17	Diagrama de Bloques del Proceso de Fraccionamiento del Aceite de Aguaje (<i>Mauritia flexuosa</i>)	39
Figura 18	Proceso de Esterificado del Aceite de Aguaje (<i>M. flexuosa</i>).	40
Figura 19	Filtrado del Aceite de Aguaje Esterificado	40
Figura 20	Centrifugado del Aceite de Aguaje Esterificado	41
Figura 21	Esquema del Equipamiento de Destilación a Vacío	41
Figura 22	Módulo de Destilación Discontinua a Vacío	42
Figura 23	Destilado	42

Figura 24	Producto fondo	42
Figura 25	Cromatografía preparativa en columna a 20°C	44
Figura 26	Cromatografía preparativa en columna a 40°C	44
Figura 27	Fracciones recolectadas de la cromatografía	44
Figura 28	Cromatografía en capa fina (TLC).	44
Figura 29	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC –DAD)	45
Figura 30	Fraccionamiento de destilación a presión reducida	48
Figura 31	Resultados de productos fondos de la destilación a presión reducida	49
Figura 32	Cantidad de Destilado y Producto de Fondos como función de la variación de la Presión (mBar) y temperatura del hervidor (°C)	50
Figura 33	Volumen de destilado y productos fondos en función de la variación del tiempo (min) y presión (mBar) de operación. (Temperatura de operación de la columna, 34 °C)	54
Figura 34	Cromatograma GC – MS del Aceite crudo de Aguaje	57
Figura 35	Cromatograma GC – MS del Aceite de aguaje, Destilado	58
Figura 36	Variación del contenido de ácidos grasos del aceite de aguaje en el proceso de destilación.	60
Figura 37	Cromatograma HPLC del aceite crudo de aguaje	62
Figura 38	Separación de α -Tocoferol y β -Caroteno por TLC (Temperatura de trabajo de cromatografía en columna a 20° C)	63
Figura 39	Cromatograma por HPLC de la fracción 2 – A	64
Figura 40	Cromatograma HPLC de la fracción 4 y 5	64
Figura 41	Cromatograma HPLC de la fracción 12	65
Figura 42	Contenido de α -tocoferol y β -caroteno en Aceite de Aguaje y aceite después del proceso de separación en fracciones por cromatografía de columna. (Temperatura de trabajo, 20 °C)	66
Figura 43	Separación de α -Tocoferol y β -Caroteno por TLC (Temperatura de trabajo de cromatografía en columna a 40° C)	66
Figura 44	Cromatograma HPLC de la fracción 2 – B	67
Figura 45	Cromatograma HPLC de la fracción 6 y 7	68
Figura 46	Cromatograma HPLC de la fracción 13	68

Figura 47	Contenido de α -tocoferol y β -caroteno en aceite de aguaje y aceite después del proceso de separación en fracciones por cromatografía de columna. (Temperatura de trabajo, 40 °C)	69
Figura 48	Cosecha del Aguaje	79
Figura 49	Desgranado del Fruto	79
Figura 50	Selección del Fruto	79
Figura 51	Fruto Maduro	79
Figura 52	Despulpado	79
Figura 53	Pulpa de Aguaje	79
Figura 54	Secado de la muestra	80
Figura 55	Muestra deshidratada	80
Figura 56	Prensado	80
Figura 57	Aceite Crudo de Aguaje	80
Figura 58	Solución NaOH/ Metanol	80
Figura 59	Esterificación	80
Figura 60	Decantación	81
Figura 61	Filtración	81
Figura 62	Glicerina (Borra)	81
Figura 63	Equipo de Destilación	81
Figura 64	Destilado (AGL)	81
Figura 65	Producto Fondo (P:2 mBar)	81
Figura 66	Cromatografía de gases	82
Figura 67	Cromatograma AGL.	82
Figura 68	Estándares (α -tocoferol y β - caroteno)	82
Figura 69	Cromatografía preparativa en Columna 20°C	82
Figura 70	Cromatografía preparativa en columna 40°C	82
Figura 71	Fracciones recolectadas de cromatografía en columna	82
Figura 72	Aplicación de las fracciones a cromatografía en capa delgada	83
Figura 73	Cuba cromatográfica	83
Figura 74	Cromatografía en capa delgada (TLC)	83
Figura 75	Revelador DPPH	83
Figura 76	Resultado de aplicación de las fracciones	83
Figura 77	Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC	83

Figura 78	Cromatograma de α -Tocoferol (Estándar de Referencia)	84
Figura 79	Cromatograma de α -Tocoferol (50, 100, 200 μ g) (Estándar de Referencia)	84
Figura 80	Cromatograma de β -Caroteno (Estándar de Referencia)	85
Figura 81	Cromatograma de β -Caroteno (50, 100, 200 μ g) (Estándar de Referencia)	85

RESUMEN

La creciente demanda de productos naturales con propiedades superiores en la formulación de productos alimentarios, farmacéuticos y cosméticos, motiva el desarrollo de procesos para fraccionamiento de metabolitos secundarios; en esta perspectiva, la separación de ácidos grasos, carotenoides y tocoferoles contenidos en el aceite crudo de la pulpa de Aguaje (*Mauritia flexuosa*) por destilación discontinua en vacío seguido de cromatografía preparativa se torna de interés para la agroindustria, más aún el establecimiento de las condiciones adecuadas de operación con tal de obtener mayores concentraciones de β -caroteno, α -tocoferol y el ácido palmítico, cuyo conocimiento teórico-práctico es limitado. En este contexto, experimentalmente se ha determinado las condiciones de operación de los procesos de destilación discontinua a vacío (2-7 mBar), previa esterificación, obteniéndose destilados de ácidos grasos libres y productos fondos constituidos de tocoferoles y carotenoides; estas últimas, sometidas a una posterior separación por cromatografía preparativa en columna (Temperatura de 20 y 40°C), utilizando como fase estacionaria Sílica-Gel 60 (0.063 – 0.200mm) y fase móvil mezclas de solventes orgánicos Hexano y éter etílico (80:20 v/v). Se utilizó el método diseño de superficie de respuesta – diseño compuesto central (DCC), bajo el cual se realizó las pruebas experimentales y los resultados analizados a través del ANOVA con una confiabilidad del 95 %, así mismo se estableció los estadísticos como el coeficiente de determinación R_{Adj}^2 .

Se analizaron las muestras de aceite antes del proceso de separación, utilizando el análisis proximal, luego el aceite crudo fue esterificado con la finalidad de retirar las gomas y otros componentes que reducen el rendimiento en la destilación, procediéndose a la etapa de destilación en vacío de muestras con cantidades definidas de 100 mL, estableciéndose que el mejor resultado se logra a una presión de operación 2 mBar y tiempo de 40 min. Los volúmenes de destilado y producto de fondo obtenidos fueron de 32 y 68 mL respectivamente. La composición de los ácidos grasos se determinaron por GC-MS para el destilado y productos fondos obteniéndose como resultado mayor concentración de ácido palmítico (C16:0) 32.745 % en el destilado. El producto fondo fue llevado a cromatografía preparativa en columna (temperatura 20 y 40°C) para la separación de α -tocoferol y β -caroteno,

obteniendo 15 fracciones para cada temperatura, estos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD), teniendo como resultado mayor concentración α -tocoferol (126.32 μg) en la fracción 12 a temperatura de 20°C y mayor concentración de β -caroteno (20.123 μg .) En la fracción 2-B a temperatura de 40°C. Del análisis proximal de muestra cruda se observa un contenido de humedad de 0.10%, densidad 0.909g/mL, índice de refracción a 25°C fue de 1.4775, puntos de ebullición, congelación y humo de 355°C, -4.1°C y 381.5°C respectivamente, índice de yodo 67.975 g/100 g aceite, índice de saponificación de 196.2%, índice de peróxido de 1.07 mEqO₂/Kg, acidez 0.115% (en función al ácido oleico) y materia insaponificable de 1.055%.

PALABRA CLAVE: Aguaje, Ácidos grasos, Caroteno, Tocoferol, Destilación a vacío, Cromatografía.

ABSTRACT

The demand growing for natural products with superior properties in the formulation of food, pharmaceutical and cosmetic products, motivates the development of processes for fractionation of secondary metabolites; In this perspective, the separation of fatty acids, carotenoids and tocopherols content in the crude oil from the pulp of Aguaje (*Mauritia flexuosa*) by discontinuous vacuum distillation followed by preparative chromatography becomes of interest to agribusiness, further, the establishment of appropriate operating conditions as to obtain higher concentrations of β -carotene, α -tocopherol and palmitic acid, which theoretical and practical knowledge is limited. In this context, it has been experimentally determined operating conditions of the processes of discontinuous distillation under vacuum (2-7 mBar), previous esterification, yielding free fatty acid distillate and bottoms products consisting of tocopherols and carotenoids; the latter, subject to further separation by preparative column chromatography (temperature 20 to 40°C), using as stationary phase Silica gel 60 (0.063 - 0.200mm) and mobile phase mixtures of organic solvents hexane and ethyl ether (80:20 v/v). Central composite design (DCC), under which the experimental tests and the results analyzed by ANOVA with a reliability of 95% were realized, likewise statisticians as the coefficient was established - the design method of response surface was used determination R^2_{Adj} .

Oil samples were analyzed before the separation process, using the proximate analysis, then the crude oil was esterified in order to remove the gums and other components that reduce the yield of the distillation, proceeding to stage vacuum distillation of samples with defined amounts of 100 mL was established that the best result at a pressure of 2 mbar and operation time of 40 min is achieved. The volumes of distillate and bottom product obtained were 32 and 68 mL, respectively. The fatty acid composition was determined by GC-MS for the distillate and bottoms products obtained as a result greater concentration of palmitic acid (C16:0) 32.745% in the distillate. The bottom product was carried preparative column chromatography (temperature 20 to 40°C) for separating α -tocopherol and β -carotene, obtaining 15 fractions for each temperature; these were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), resulting in higher concentration α -tocopherol (126.32 g) in fraction 12 to 20°C and higher concentration of β -carotene (20,123 g.)

In the 2-B to 40°C. The proximal crude sample analysis moisture content of 0.10%, density 0.909g / ml, refractive index at 25°C was 1.4775, boiling point, freezing and smoke observed 355°C, -4.1°C and 381.5°C respectively, 67.975g iodine/100g oil, saponification value of 196.2%, peroxide value of 1.07 meqO₂/Kg, 0.115% acidity (based on oleic acid) and 1,055% unsaponifiable matter.

KEYWORD: Aguaje, fatty acids, Carotene, Tocopherol, vacuum distillation, chromatography.

INTRODUCCION

El Aguaje de es una palmera nativa de la región amazónica que se encuentra en los departamentos de Loreto, Madre de Dios, Ucayali, San Martín, Huánuco y Junín. De acuerdo a la información disponible, los frutos de aguaje representan una alternativa viable como potencial materia prima de aceites vegetales de alto valor nutricional, así como ácidos grasos, alto contenido de pro vitamina A (β -Caroteno), vitamina E (α -Tocoferol) y vitamina B y C. (Navarro, 2006).

La creciente demanda de aceites vegetales en la formulación de productos alimentarios, farmacéuticos y cosméticos ha motivado en el país y otros lugares del mundo la necesidad de importar materias primas oleaginosas para satisfacer las demandas del mercado, debido a que las grasas y aceites juegan un rol importante en la nutrición humana por una variedad de razones. Sin embargo la demanda de aceites vegetales ha aumentado. Así como el interés mundial en la mejora de los procesos de extracción, búsqueda de nuevas fuentes de aceites, así también en la separación de sus componentes (Li, S., 2009).

Uno de los métodos comúnmente utilizados para el fraccionamiento de aceites vegetales es la destilación, sea esta por destilación molecular, destilación fraccionada, destilación a vacío, etc. Estos métodos de separación tienen principios fundamentales en común, utilizan propiedades físicas de diferentes puntos de ebullición de las mezclas multicomponentes, para su evaporación y posterior condensación. Los enfoques de análisis y protocolos de operación de los procesos de destilación son diversos, debido sobre todo a la naturaleza físico-química de las sustancias involucradas. Mayumi Ito Vanesa, (2007).

Se tiene pocos estudios relacionados al proceso de fraccionamiento de los metabolitos presentes en el aceite de aguaje del morfotipo shambo por consiguiente es un reto realizar estudios adicionales como la extracción y fraccionamiento de los metabolitos del aceite de aguaje que sirva de insumo para productos específico de alto valor agregado.

Este trabajo tuvo como objetivo general determinar las condiciones de operación de los procesos de destilación discontinua a vacío y cromatografía preparativa en columna que permita una adecuada separación de ácidos grasos libres, tocoferoles

y carotenoides en el aceite de la pulpa de aguaje (*Mauritia flexuosa*) del morfotipo *shambo*.

Los objetivos específicos establecidos en el trabajo de tesis fueron, Obtener aceite de la pulpa de Aguaje (*Mauritia flexuosa*) mediante prensado discontinuo en frio. Determinar las propiedades físicas y el contenido de ácidos grasos libres (AGL), α -tocoferol y β -caroteno del aceite de aguaje (*Mauritia flexuosa*). Establecer las condiciones de operación del proceso de destilación discontinua a presión reducida con tal de obtener fracciones en el destilado con alto contenido AGL y producto de fondos con contenido de α -tocoferol y β -caroteno. Determinar las condiciones de operación del proceso de separación por cromatografía líquida preparativa en columna a presión atmosférica con tal de obtener fracciones con alto contenido de α -tocoferol y β -caroteno respectivamente. Establecer mediante análisis por cromatografía de gases (GC-MS) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD), el grado de fraccionamiento y purificación de los ácidos grasos libres en el proceso de destilación, α -tocoferol y β -caroteno en la separación por cromatografía de columna.

Suponemos la hipótesis general, La presión de vacío, la temperatura del hervidor y tiempo de operación en el proceso de destilación son los parámetros que influyen directamente en el grado de separación de ácidos grasos libres en el destilado y la concentración de α -tocoferoles y β -carotenoides en el producto de fondos, así como naturaleza de la mezcla de solventes y temperatura de operación en la columna cromatográfica, son los parámetros que influyen en el grado de separación de α -tocoferoles y β -caroteno contenidos en el producto de fondos de la destilación del aceite de Aguaje (*Mauritia flexuosa*).

Este trabajo considero las variables independientes como las condiciones de operación de la destilación discontinua a vacío, presión 2 - 7 mBar, temperatura del hervidor 172 – 290 °C y tiempo de destilado 40 – 60 min y las condiciones de operación del proceso de cromatografía preparativa en columna naturaleza de la fase móvil (mezcla solventes como hexano - éter etílico) y temperatura de operación (20 – 40) °C, manteniéndose como variable interviniente la naturaleza de la fase estacionaria Sílica gel 60 (0.063 – 0.200) mm.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Da cruz Rodríguez., et al, (2010). Realizaron estudios del “Perfil de ácidos grasos y tocoferoles contenidos en las frutas como aguaje (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*)”. Demostraron que las frutas amazónicas son ricas en grasas, con un perfil de ácidos grasos que pueden ser beneficiosos en relación con el riesgo de enfermedades coronarias. Las frutas amazónicas también contienen otros constituyentes potenciales cardioprotectores como tocoferoles, estos determinados por HPLC y el perfil de ácidos grasos por GC–MS, con este fin utilizaron muestras de pulpas de las frutas. Determinando que el contenido total de aceite varió de 31.0 – 41.8 %. El principal ácido graso en todas las frutas fue el ácido oléico (C18:1), a pesar de importantes niveles de ácido palmítico (C16:0). El ácido linoléico (C18:2) fue el principal de ácidos grasos poliinsaturados observado. La pulpa de *M. flexuosa* y *P. paraensis* tienen un alto contenido en α -tocoferol con 297 y 155 mg/g de materia seca, demostrando que las cinco frutas amazónicas son buenas fuentes de ácidos grasos insaturados y tocoferoles.

Batistella C.B. y Wolf Maciel M.R. (2008). Estudiaron la “Concentración de carotenoides en el aceite de palma por destilación molecular” involucrando los procesos de neutralización y transesterificación de aceite para la destilación molecular, a una presión de $9 \cdot 10^{-5}$ torr y un flujo de alimentación de 1125g/h. trabajo con rangos de temperaturas de 150°C, 160°C y 170°C en el proceso de destilación molecular, donde a 170°C obtuvo una mayor concentración de carotenoides (19500 ppm).

Mayumi Ito Vanesa, (2007). Estudio la “Concentración de tocoferoles e fitoesteroles a partir del destilado desodorizado de óleos vegetales a través del proceso de destilación molecular”. Para el proceso de destilación molecular utilizando la metodología de planeamiento de experimentos, teniendo como variables de estudio la temperatura del evaporador y el flujo

de alimentación. Fue observado que ocurre una mayor desacidificación de AGL a altas temperaturas del evaporador y bajas flujos de alimentación. En relación a los tocoferoles se obtuvo un comportamiento opuesto. La investigación tuvo como finalidad de obtener concentraciones para ser aplicadas en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Fueron realizados diversos experimentos variando la razón de alimentación entre 5 y 15 g/min y temperatura del evaporador entre 140°C y 240°C. La temperatura de la alimentación fue a 50°C, la temperatura del condensador fue mantenida en 45°C. La presión en el destilador molecular fue mantenida entre 100 – 190 mtorr.

Pramparo M., et al., (2005). Estudio la "Purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización". La tecnología utilizada para la purificación incluyó esterificación, destilación molecular de dos etapas y cristalización. Se realizaron pruebas de separación por destilación molecular con y sin esterificación previa de los ácidos grasos libres. En todos los ensayos de esterificación condujo a una mayor eficiencia de separación de la primera etapa de destilación molecular, la segunda etapa de destilación molecular permitió aumentar la concentración de tocoferoles y esteroides. La cristalización de la corriente final de destilado (segunda etapa de destilación molecular) permitió separar más del 40% de los esteroides, en un producto altamente concentrado en los mismos (más de 92% en peso). La concentración final en tocoferoles de dos muestras de destilado de desodorización de aceite de girasol ensayadas fue de 33,94 y 20,60 % respectivamente y una muestra de destilado de desodorización de aceite de soya condujo a un valor de 56,49%.

Santos L. M. P., (2005). Realizo estudios sobre la "Actividad de la vitamina A del aguaje (*Mauritia vinifera*)". Los resultados exhiben un rendimiento alto de aceite de la pulpa, de 9-19%. A pesar de una cifra, contiene una considerable cantidad de ácidos grasos insaturados (aproximadamente el 75% de ácido oleico), el aceite de aguaje muestra una gran estabilidad a la oxidación, debido a la presencia de fotoquímicos, particularmente tocoferoles y fitoesteroides, es valioso para uso cosmético y farmacéutico.

Chu B.S, et al., (2003). Estudiaron la “Separación de tocoferoles y tocotrienoles de la palma y destilación de ácidos grasos usando hidrolisis – neutralización – método de adsorción cromatografica”. La vitamina E de la palma a partir del destilado de los ácidos grasos mediante la eliminación de los ácidos grasos y acilglicerol. Los ácidos grasos liberados se retiraron por neutralización previa hidrolisis donde se concentró la vitamina E a partir de la cantidad inicial de 0.37 a 4.32% la hidrolisis fue un paso importante ya que sin ella la neutralización solo podía concentrarse vitamina E al 1.80%. El aceite palma extraído se hidroliza y neutraliza para posteriormente sometido a una fase normal cromatografica de adsorción. La columna se eluyo primero con hexano seguido por isopropanol. Se retiró una gran cantidad de acilglicerol durante la primera elución, mientras que la vitamina E se desorbe por isopropanol con una recuperación de > 90%. La concentración de vitamina E después de la hidrolisis, neutralización y adsorción cromatografica fue de 15.2%. Método descrito en este estudio ofrece una alternativa para los métodos de separación existentes. Se puede aplicar como una serie de pasos en la producción de alta pureza de vitamina E.

1.2. Generalidades del Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

El Aguaje es una de las palmeras más abundantes en Sudamérica, se distribuye en el occidente por Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia y hacia el oriente a través de las cuencas del Amazonas y del Orinoco por Venezuela, las Guyanas, Trinidad y los estados brasileños de Bahía, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais y Sao Paulo. En la selva Peruana, se cultiva y explotan poblaciones naturales en los Departamentos de Loreto, Ucayali, Huánuco, Madre de Dios y San Martín. (IIAP 2006).



Figura 01. Planta de aguaje

Fuente: IIAP, (2006).

1.2.1. Taxonomía

Cuadro 01: Descripción Taxonómica de Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

División:	Fanerógamas
Clase:	Monocotiledonia
Subclase:	Liliopsida
Orden:	Arecales
Familia:	Arecaceae
Sub-familia:	Calamaoideae
Tribu:	Lepidocaryeae
Género:	Mauritia
Especie:	Flexuosa
Nombre científico:	<i>Mauritia flexuosa</i>

Fuente: Navarro B. (2006).

Nombre común: Aguaje (Perú), Buriti, Mriti (Brasil), Moriti (Colombia)

1.2.2. Características Generales

- Variedades o cultivares: Existen variedades fenotípicamente diferentes, tanto en fruta como en planta. Se puede diferenciar tres variedades de fruta por su color: el Amarillo o Posheco, cuando todo el mesocarpio es amarillo, el Colorado cuando la parte externa del mesocarpio es de color rojo y el resto es amarillo, el Shambo cuando todo el mesocarpio es de color rojo y el Shambo Azul, que en realidad solo son frutos pintones del Shambo. (Castillo D., 2006).

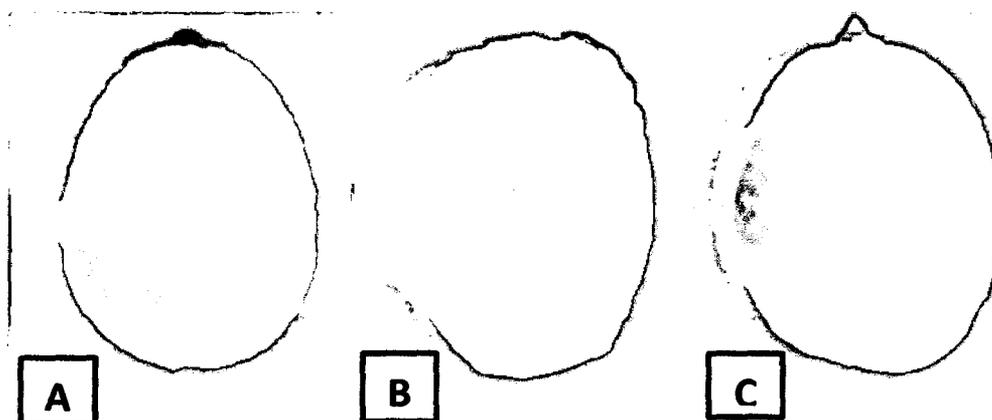


Figura 02. Color de pulpa del fruto maduro de aguaje de los morfotipos amarillo (A), color (B) y shambo (C).

Fuente: Castillo, (2006).

- El rendimiento por hectárea: En promedio en Madre de Dios el rendimiento por palmera es de 225 kg. Estas palmeras se las encuentra en los llamados aguajales que cubren un área de 163,240 ha. Según la información de inventario exploratorio y censos realizados por Pro-Naturaleza, se ha estimado que los rendimientos en producción regional en aguajales es de 5.3 TM/ha, la cual está por debajo de los rendimientos de Iquitos y Ucayali. Debido a que la zona ámbito del proyecto tiene pocos aguajales, y utilizando los resultados de los inventarios es de 225 kg de fruto por palmera y 102 Kg/ha. (Panduro M., 2010).
- Color y tamaño del fruto: Es una drupa suave de color rojo vino o rojo oscuro, el epicarpio y la pulpa son de color amarillo. Esta última representa sólo el 12 o 13% del peso seco del fruto. Diámetro (4 cm a 5 cm), Peso (40 g a 45 g por fruto) y Altura de la palmera (9 m a 35 m). (Castillo D., 2006).
- Épocas: El florecimiento se da en los meses de febrero, marzo o de agosto a diciembre (dependen del sitio de producción). La época de fructificación se inicia ocho años después de la plantación, cuando alcanzan una altura de 6 m a 7 m aproximadamente. El fructificación aparentemente ocurre todo el año, con mayores concentraciones entre los meses de febrero y agosto, y relativa escasez entre los meses de septiembre y noviembre. El momento óptimo de cosecha del racimo es cuando los frutos adquieren una coloración marrón más intensa y se desgajan fácilmente. (Trevejo C. E. 2003).
- Cosecha de aguaje: La producción del aguajal es estacional y cubre casi todo el año. La época de cosecha depende de la ubicación del mismo sin embargo, se considera que los periodos estimados de cosecha son de octubre a marzo. (Panduro M., 2010).
- Densidad: En Madre de Dios las densidades por hectárea varían siendo un promedio de 5M. Las proporciones según datos de censo de Pro-Naturaleza se estiman en 44% hembras, 32% juveniles y 24% machos. (Panduro M., 2010).

1.2.3. El Aguaje y sus usos

Esta palmera tiene múltiples usos, que cubren necesidades desde la alimentación humana hasta la industria.

- La pulpa de su fruto es uno de los alimentos más nutritivos del trópico (su contenido de vitamina A es 5 veces mayor que el de la zanahoria), además con la masa que se obtiene de la pulpa se puede obtener diferentes productos como harina, helados, refrescos (Aguajina), etc. Uno de los usos probables de industrialización específicamente es la harina de pulpa de Aguaje ya que es un producto que preserva las características nutricionales y puede ser utilizada como sustituto de otras harinas, como saborizante e ingrediente de alimentos instantáneos. Así también para la extracción del aceite para uso cosmético. (Navarro 2006).
- Las semillas inmaduras son comestibles. De los peciolos se fabrican esteras. Asimismo, dentro de la médula del tallo se desarrollan los "suris". Los suris se comen fritos o guisados y es una fuente alta de proteínas y muy agradable al paladar. La semilla se utiliza en una serie de artesanías como pipas, botones, figuras, dados, perinolas, trompos, etc. (Avalos 2006).
- La savia del tronco es utilizada como vino por los indígenas. La recogen haciendo huecos con un tronco cortado o en el tocón. Una sola palma puede producir de 8 a 10 litros en un día, y contiene principalmente agua y sucrosa. (Castillo 2006).
- La raíz se utiliza para el crecimiento del pelo. Para ello, esta se prepara en infusión y se aplica sobre la cabeza. (Castillo 2006).
- Los botones jóvenes de las inflorescencias pueden ser cortados y exudados para obtener savia, cuyo contenido de azúcar es más o menos de 50%. La savia puede ser bebida directamente, fermentada para producir vino de palma o reducida por cocción a azúcar. (Avalos 2006).

- Las hojas, se obtienen fibras para uso doméstico y para la elaboración de objetos de artesanía; también se utilizan para el techado de viviendas rústicas, y del peciolo se obtiene la pulpa para elaborar papel (Navarro 2006).
- En el Brasil se comercializan varios productos de aceite de aguaje, todos para la piel y se produce hidratante de aguaje en gran escala, con gran aceptación en ese mercado. También se están produciendo aceite de aguaje en varias presentaciones que se promocionan para las siguientes aplicaciones: Productos solares y anti-solares, productos infantiles para escaldaduras, fortalecedores capilares, productos para cabellos teñidos y dañados. (Rojas 2001).



Figura 03. Derivados del fruto y aceite de aguaje (*Mauritia flexuosa*)

Fuente: Navarro, (2006).

1.2.4. Características físico – químicas del fruto de aguaje (*Mauritia flexuosa*)

Cuadro 02. Análisis Porcentual del Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

Fracción	1. G. Ingunza (2009)	2. Rojas Ruiz (2000)
Cascara (%)	19.7782	18.29
Pulpa (%)	19.7313	33.67
Endocarpio (%)	7.78	-
Semilla (%)	52.7105	48.08

Fuente: Gerardo Ingunza (2009) y Rojas (2000).

Cuadro 03. Composición Físico – Químico de las Fracciones del Fruto – Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

Componentes	Cascara	Pulpa	Semilla
Humedad (%)	52.12	52.12	49.60
Proteínas (%)	7.10	8.20	7.75
Grasa (%)	7.96	32.60	5.30
β-caroteno (mg /100)	265.33	429.01	-
Ca(mg/100)	-	8.83	-
Fe (mg/100)	-	58.86	-

Fuente: Rojas (2001).

1.2.5. Composición Proximal del Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

Cuadro 04. Composición Proximal del Aguaje (Cascara + Pulpa)

Composición proximal	Aguaje (cascara + pulpa)	
	Verde	Maduro
Humedad (%)	48.46 ± 1.051	54.38 ± 0.937
Fibra (%)	12.30 ± 0.016	10.12 ± 0.488
Grasa (%)	15.56 ± 0.190	18.10 ± 0.930
Ceniza (%)	1.26 ± 0.013	1.18 ± 0.024
Proteína (%)	2.96 ± 0.085	2.32 ± 0.052
Carbohidratos (%)	19.46 ± 1.28	13.90 ± 0.973

Fuente: Gloria Pascual Chagman– UNALM (2009).

1.3. Aceites vegetales

Los aceites vegetales, además de consumidos directamente en la alimentación, constituyen una importante materia prima para la industria química, farmacéutica y cosmética. Sin embargo, la demanda aceites vegetales con fines energéticos ha aumentado el interés mundial en la mejora de los procesos de extracción. (Li, S. 2009).

En ese sentido, los países que presentan una biodiversidad de recursos genéticos inician programas de investigación hacia el aprovechamiento de fuentes nativas tales como los esfuerzos que realizan los investigadores en Brasil con sus oleaginosas nativas. De acuerdo a la información disponible,

los frutos de aguaje representan una alternativa viable como potencial materia prima de aceites vegetales de alto valor nutricional. (G. Pascual Ch., 2009).

Muchos aceites vegetales contienen carotenoides, fitoesteroides, tocoferoles y compuestos fenólicos, conocidos como la materia insaponificable. Las propiedades antioxidantes y los beneficios para la salud derivados para la utilización de la materia insaponificable y sus derivados en los alimentos y suplementos para la salud han planteado una inmensa cantidad de interés en la industria. (Gunstone, padley, 1997; Rodríguez Amaya, 2001; Gunstone 2002).

Cuadro 05. Rendimientos de Extracción del Aceite de Aguaje

Insumo	Aguaje
Parte Útil	Pulpa
Proceso de Extracción	Prensado
Rendimiento Teórico (% Fruto)	3.0 %
Rendimiento Extracción de aceite (% Fruto)	0.84 %
Rendimiento Extracción (Obtenido vs. teórico)	28.07 %
Acidez del aceite (g NaOH / litro aceite)	10
Rendimiento Biodiesel vs. Aceite	81.02 %

Fuente: José Luis Calle Maraví (UNALM), Javier Coello Guevara (ITDG) y Paula Castro Pareja (UNALM) Universidad Nacional Agraria La Molina (2004).

1.3.1. Características Físicos-Químicos del Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

El aceite de Aguaje presenta características físicas de densidad, color, fluidez, olor y brillo propios del fruto de aguaje. Los ácidos grasos presentes en el aceite están constituidos principalmente por el ácido oleico y el palmítico. El aceite virgen, extraído del mesocarpio de los frutos maduros del aguaje es muy rico en ácido oleico y es equivalente en términos de composición a los ácidos grasos de los aceites de semilla oleaginosas tradicionales, por tanto de óptima calidad alimenticia y de alto valor nutricional, los ácidos laúricos y mirísticos están también presentes en el aguaje, sobre todo en el fruto verde resulta preciosos para la industria química y farmacéutica. Se puede separar por destilación fraccionada. (Da Silva F., 2006).

Cuadro 06. Composición de Ácidos Grasos del Aceite de Aguaje.

ACIDOS GRASOS	PORCENTAJE (%)			
	1	2	3	4
Ácidos grasos saturado:				
Ácido Mirístico	0.08	---	0.1	---
Ácido Palmítico	16.78	16.3	17.34 - 19.2	18.00
Ácido Estearico	1.77	1.3	2.0	0.20
Ácidos grasos insaturado:				
Ácido Palmitoleico	0.32	0.4	---	0.10
Ácido Oleico	74.06	79.2	73.3 - 78.73	78.30
Ácido Linoleico	1.04	1.4	2.4 - 3.93	2.70
Ácido Linolénico	1.04	1.3	2.2	0.70

Fuente: Ceriani R¹. (2009); Da Silva F². (2006); Albuquerque, Marcos L³. et. Al (2005); ONERN⁴ (1977).

Cuadro 07: Características Físico - Químicas del Aceite de Aguaje

Análisis	1		2
	Aceite Crudo	Aceite Refinado	Aceite Crudo
Humedad (%)	0.06±0.014	0.01±0.006	-
Índice de acidez (mg KOH/g.)	5.11±0.109	0.16±0.0	-
% Ácidos grasos libres	2.60±0.055	0.08±0.0	3.12 ± 0.01
Índice de peróxido (meq.O ₂ /Kg.)	4.8±0.341	0.94±0.019	14.2 ± 0.1
Índice de saponificación (%)	191.83±0.152	192.72±1.664	192.88 ±19.53
Índice de yodo (wijs)	95.30±1.499	93.25±1.300	74.64 ± 0.9
Mat. Insaponificable (%)	0.5±0.010	0.45±0.07	0.5 ±0.0
Color (Coordenadas CIELAB)	L*=18.34 A*=5.23 B*=2.17	L*=29.85 A*=18.66 B*=21.11	-
Índice de refracción (25 °C)	1.465	1.475	1.4610 ± 0.0
Densidad (25 °C) g/ml	0.9121±0.0	0.9105±0.0	0.909 ± 0.0
Punto frio	Afirmativo	Afirmativo	-
Punto Humo (°C)	124.66±1.527	187.66±3.785	-

Fuente: Ingunza, G¹. (2009), Ceriani R². (2009).

1.4. Ácidos Grasos

Los ácidos grasos representan 90-96% del peso molecular de los triglicéridos. Los ácidos grasos existentes en la naturaleza sustancias puras o como parte de moléculas más complejas conocidas como lípidos. Los ácidos grasos libres se componen de un grupo carboxilo y una cadena de hidrocarburo(R), siendo representado por R-COOH. (Martin et al., 2006).

Los ácidos grasos individuales se distinguen entre sí por la naturaleza de la cadena de hidrocarburo, es decir, número de carbono y la presencia de insaturaciones. Esta cadena puede variar en longitud desde 4 a 24 átomos de carbono y pueden ser saturados, monoinsaturados (un doble enlace) o poliinsaturados (dos o más dobles enlaces). Estos incluyen, por ejemplo, ácido esteárico (ácido graso saturado de 18 carbonos), ácido oléico (ácido graso monoinsaturado de 18 carbonos) y los ácidos linolénico y linoléico (ambos ácidos que contienen 18 carbonos dos y tres enlaces dobles, respectivamente). Algunos de los ácidos grasos insaturados producen efectos especiales en el organismo vivo y son denominados ácidos grasos esenciales. Estos ácidos grasos no pueden ser sintetizados por el organismo humano y de esta forma, deben ser obtenidos por la dieta. Existen dos tipos de ácidos grasos esenciales, la serie de los ácidos grasos n-6, derivada del ácido cis-linoléico (C 18:2), y la serie de los n-3, derivada del ácido α -linolénico (C18:3). Las estructuras químicas de los ácidos grasos n-6 y n-3 se presentan en la Figura 04. (Martin et al., 2006).

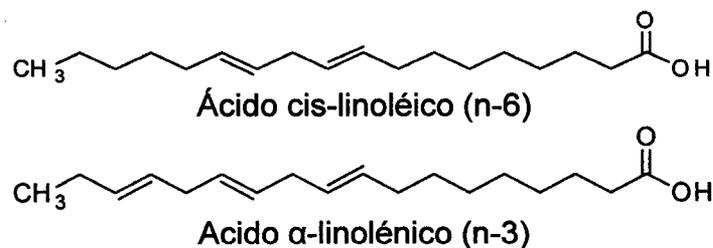


Figura 04. Estructuras químicas de los ácidos grasos cis-linoleico y α -linolenico

Fuente: Martin et al., (2006).

Según, Rodríguez et al. (2010), el perfil de ácidos grasos en frutos amazónicos, determinados por cromatografía de gases con columna capilar. Se presenta en la Tabla 10, donde los ácidos grasos monoinsaturados en las

frutas amazónicas fue el ácido oleico (C18:1), el ácido linoléico (C18:2) fue el principal ácido graso poliinsaturado presente, seguido por el ácido linolénico (C18:3). El aguaje (*M. flexuosa*) tiene alto contenido de ácido oleico (75.5 % de grasa total), en comparación con otras frutas amazónicas, que tenían un contenido de ácido oleico de 45%.

Las propiedades físico-químicos del aceite de aguaje se caracterizaron por medios de pérdidas dieléctricas y calorimetría diferencial de barrido measurements. El análisis de su espectro de adsorción infrarroja y la asignación de las bandas observadas entre 650 y 4000 cm^{-1} han sido recientemente reportadas. El espectro es muy similar a la de trioleína, un triglicérido de ácido oleico. Este resultado sugiere que el aceite de aguaje es un candidato potencial para prevenir el colesterol LDL y su uso para mejorar biodiesel.

Cuadro 08. Composición de Ácidos Grasos (% Total) de los Aceites de Pulpas de Cinco Frutas Amazónicas

		Aguaje	Tucuma	Patawa	Inaja	Mari
12:0		0.1	ND	ND	3.07	ND
14:0		0.1	0.1	0.1	7.60	ND
15:0		ND	ND	0.30	ND	ND
16:0		18.75	24.60	13.30	20.10	20.80
16:1		0.25	0.10	0.70	0.10	0.30
17:0		0.05	0.10	0.10	ND	0.10
18:0		1.35	3.00	4.10	3.50	6.40
18:1		75.50	65.10	76.70	52.40	67.60
18:2		2.15	2.60	3.90	8.90	3.40
18:3		0.10	0.20	0.10	0.20	0.10
20:0		1.65	4.10	0.60	3.20	1.10
22:0		ND	0.10	ND	ND	ND

Fuente: Rodríguez et al. (2010).

1.5. Carotenoides

Químicamente los carotenoides son clasificados en dos clases: carotenoides hidrocarbonados, colectivamente denominados de carotenos y los carotenoides que poseen por lo menos una molécula de oxígeno en su estructura, genéricamente conocidos como xantofilas (Meléndez Martínez, Vicario y Heredia, 2004).

En la figura 05. Están representadas las estructuras químicas de un caroteno (β -caroteno) y de una xantofila (zeaxantina). Algunos carotenoides son capaces de ser convertidos en vitamina A y como tal desempeñan un importante papel nutricional. De los más de 600 carotenoides conocidos cerca de 50 son precursores de la vitamina A. El β -caroteno es una pro-vitamina A más importante, tanto en términos de actividad biológica, como por su gran incidencia (Rodríguez- Amaya, 2002).

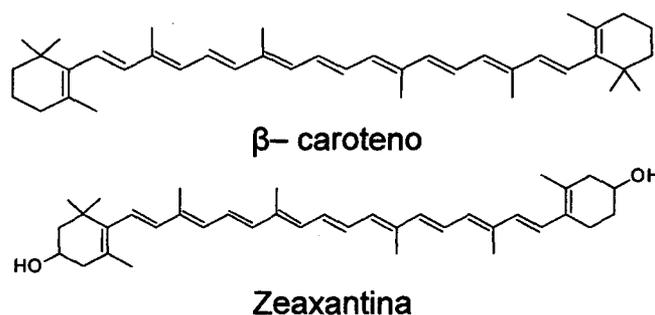


Figura 05. Estructura Química de un Caroteno (β -caroteno) y de una Xantofila (zeaxantina).

Fuente: Packer L. et al. (2005).

La función de los carotenoides en los alimentos es la de colorante, siendo responsables por el color amarillo o anaranjado de la mayoría de los aceites vegetales. La habilidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y consecuentemente representar color se debe al sistema de dos ligaciones conjugadas que sirven como cromoforo. Por lo menos siete dobles enlaces conjugada son necesarias para que un carotenoide presente coloración. Los principales carotenos encontrados en los aceites vegetales son el β -caroteno, habitualmente mayoritario, α -caroteno, γ -caroteno, licopeno y fitoeno. La zeaxantina y la luteína son las xantofilas comúnmente presente en los lípidos vegetales. (Rodríguez- Amaya, 2002).

1.5.1. Importancia de los Carotenos en la Alimentación Humana

Los pigmentos carotenoides juegan un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas como arterioesclerosis, cáncer, envejecimiento, cataratas, degeneración ocular relacionada con la edad, etc. El papel protector para las células humanas frente a la radiación ultravioleta de diversos antioxidantes como β -caroteno, α -tocoferol y ácido ascórbico ha sido evaluado, llegándose a la conclusión de que el primero es el más eficiente, probablemente debido a su localización en la membrana celular. Luteína y zeaxantina, dos de los carotenoides mayoritarios en el suero humano, se localizan en cantidades apreciables en la retina, protegiéndola debido a sus propiedades antioxidantes (Carranco Jáuregui et al. 2011).

1.5.2. Extracción y aislamiento de carotenos

Los carotenoides debido a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo isomerismo cis y trans) es un factor a considerar al momento de realizar su extracción. El calor también favorece reacciones térmicas de degradación. El aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros. (Britton, G., 2004).

Por estas razones la extracción de carotenoides se debe preferiblemente realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente y en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Además se debe realizar lo más rápido posible y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos.

Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo entre otros y que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua la cual dificulta una extracción eficiente, es conveniente eliminar dicho agua. Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración. El tejido deshidratado se puede entonces extraer con un solvente apolar. Una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual

resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire. Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de KOH 60% alcohólico. Esta mezcla se deja en la oscuridad durante la noche, con atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente y con agitación magnética, con lo cual los carotenoides son liberados. Si se desea un proceso más rápido, es aconsejable la ebullición durante 5-10 minutos. (Martinez, A., 2003).

Las mezclas de carotenos, xantofilas y dihidroxiladas pueden separarse agitando una solución en éter de petróleo con un volumen de metanol al 90%. Las xantofilas dihidroxiladas quedan en la fase metanólica, las monohidroxiladas y los carotenos quedan en la fase etérea. Repitiendo este proceso con la fase etérea se separan en la fase metanólica las xantofilas monohidroxiladas, y en la fase etérea quedan los carotenos. Las xantofilas separadas en las fases metanólicas pueden recuperarse extrayéndolas con éter etílico. (Burns, J., Fraser, P. D., Bramley, P. M., 2003).

Debido a que los extractos de carotenoides generalmente están impurificados por otras sustancias como los esteroides, estos se pueden eliminar dejando el extracto concentrado en solución de éter etílico, tapado y a -10°C durante la noche. De esta manera los esteroides se precipitan y pueden ser retirados por centrifugación o filtración. Una vez obtenido los extractos de carotenoides, estos se pueden separar y analizar por cromatografía en capa fina, o en columna. El método más usado es la cromatografía en capa fina con varias clases de fases estacionarias que incluyen óxido de magnesio activado, sílica gel, hidróxido de calcio y fosfato de magnesio entre otros.

Más recientemente y gracias al avance de los métodos cromatográficos instrumentales es posible el aislamiento rápido de carotenoides puros. En este sentido, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es muy utilizada, debido a que se puede trabajar a bajas temperaturas, en ausencia de luz y aire, es muy sensible por los grupos dienos conjugados abundantes en las estructuras de los pigmentos carotenoides. Aunque se han utilizado columnas de fase normal, son más utilizadas las de fase reversa,

especialmente las de octadecilsilano (columnas C18). (Burns, J., Fraser, P. D., Bramley, P. M., 2003).

Cuadro 09. Contenidos de Carotenos Presentes en el Aceite de Aguaje.

Sustancia	Cantidad (ppm)	Sustancia	Cantidad (ppm)
<i>trans</i> - β -caroteno	672 \pm 10	α -caroteno	61 \pm 7
13 - <i>cis</i> - β - caroteno	359 \pm 27	Mutachrome	45 \pm 1
9- <i>cis</i> - β -caroteno	150 \pm 18	ζ -caroteno	39 \pm 3
Phytoflueno	150 \pm 8	β -zeacaroteno	38 \pm 1
Zeaxantina	98 \pm 4	γ -caroteno	13 \pm 1
β -10- <i>apo</i> - caroteno	70 \pm 3	δ - caroteno	11 \pm 1

Fuente: Albuquerque et al (2005).

Cuadro 10. Comparación de carotenoides – composición en baja y alta fase

Carotenoides	% En Baja Fase	% En Alta Fase
β - caroteno	1904.1 \pm 10.2	157.9 \pm 0.7
α -caroteno	237.1 \pm 2.5	19.2 \pm 0.2
γ -caroteno	99.4 \pm 2.5	2.2 \pm 0.2
Apocarotenoides	24.7 \pm 1.8	22.0 \pm 2.6
Otros	282.9 \pm 10.2	18.9 \pm 0.4
Total (ppm)	2549 \pm 30	220.3 \pm 7

Fuente: Albuquerque, et al., (2005).

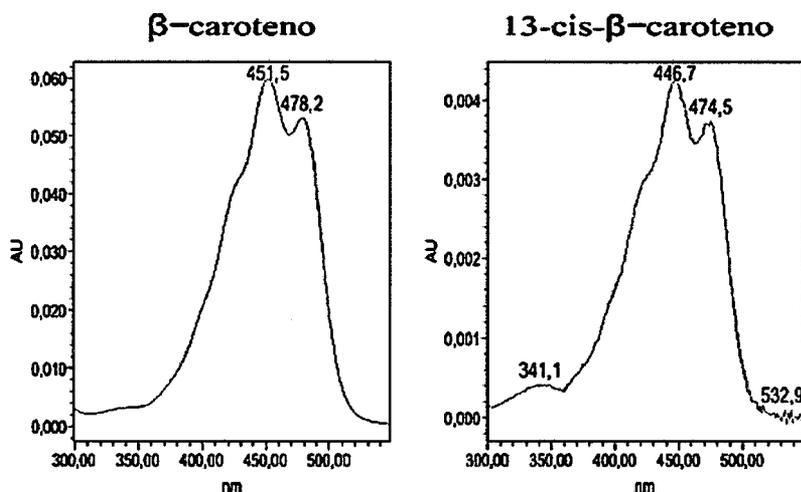


Figura 06. β - Caroteno y 13-*cis*- β -Caroteno, L. Onda a 450 nm, del Aguaje

Fuente: Dos Santos Lima, Luís (2009).

1.6. Tocoferoles

La vitamina E es el término general para compuesto de grasas hidroxicromanol soluble que exhibe actividad biológica de tocoferol. El término tocoferol viene del griego *pherein* (manifestar o poner a la luz) y *tokos* (nacimiento), El sufijo ol se añadió para indicar la naturaleza alcohólica de la sustancia El término general vitamina E se utiliza para designar a un grupo de ocho especies naturales de tocoferoles y tocotrienoles ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). Junto con las vitaminas A, D y K constituyen el grupo de las vitaminas liposolubles, caracterizadas por ser derivados del núcleo isoprenoide, solubles en lípidos y disolventes orgánicos. Son compuestos esenciales, puesto que el organismo no puede sintetizarlas, por lo que su aporte se realiza a través de la dieta en pequeñas cantidades. Para una eficiente absorción por el organismo requieren de la presencia de ácidos grasos, de la bilis, de enzimas lipolíticas del páncreas y de la mucosa intestinal. (Mahan L. K., 2002).

1.6.1. Estructura Química

La vitamina E está formada por un grupo de 8 vitámeros. Su estructura consta de 2 partes primarias: Un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral, Estos 8 vitámeros se dividen en 2 grupos fundamentales: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral; los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces en los carbonos 3, 7 y 11 (Figura a). Dentro de cada grupo, los vitámeros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como $\alpha, \beta, \gamma, \delta$, Fig. b).

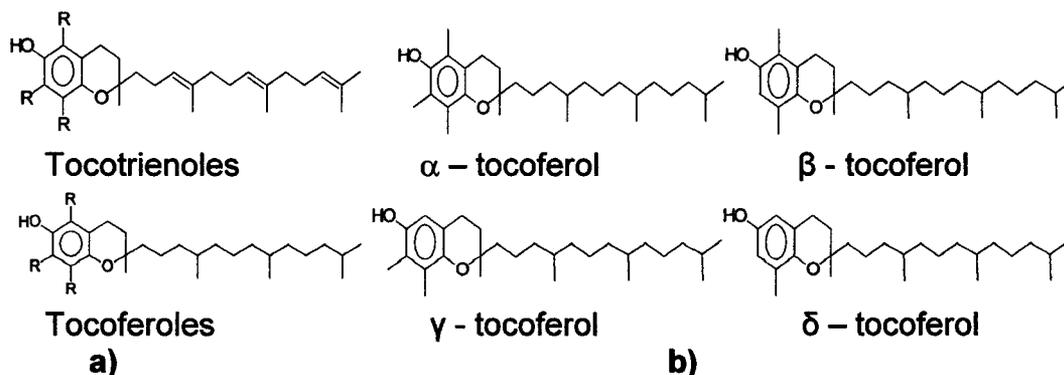


Figura 07. a) Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles. b) Estructura Química de los tocoferoles.

Fuente: A. Sayago. (2007).

1.6.2. Actividad

Existen varias teorías acerca de la función de la vitamina E en el organismo, siendo la más aceptada la vitamina E que actúa coordinada con otras moléculas y enzimas para la defensa de las células (especialmente glóbulos rojos, células musculares y células nerviosas) frente a los efectos nocivos producidos por los radicales libres, considerándose actualmente un importante antioxidante que aporta sustanciales beneficios al organismo. Esta actividad antioxidante radica en su capacidad de protección de las membranas celulares, acción que realiza impidiendo la oxidación de las mismas por los radicales libres. Dicha oxidación llevaría a una degradación del organismo, especialmente a la aparición de enfermedades cardíacas o posibles cánceres. Esta vitamina, junto con las vitamina A y C, forma el grupo de las vitaminas antioxidantes (Núñez P.R., 2007).

El mecanismo de acción antioxidante, Consiste en la interrupción de las etapas de propagación y descomposición del proceso de autoxidación y en la reacción con el oxígeno en el proceso de fotoxidación.

En la autoxidación los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical peróxilo originando un radical ariloxilo y un hidroperóxido (Reacción I). Los radicales ariloxilo resultantes se estabilizan por deslocalización electrónica de la estructura fenólica, reaccionando fácilmente con otros radicales peroxilo para formar productos estables (Reacción II), resultando poco probable que abstraigan átomos de hidrógeno de moléculas lipídicas intactas. Los múltiples productos de oxidación de los tocoferoles, que pueden formarse a partir de los radicales ariloxilo mediante una complicada gama de reacciones, incluyendo reacciones biomoleculares de radicales ariloxilo para formar dímeros (Reacción III), constituyen un tema de estudio complejo de gran importancia debido a que no se conoce claramente su contribución al efecto antioxidante (Packer L. et al, 2005).



Otros productos de oxidación

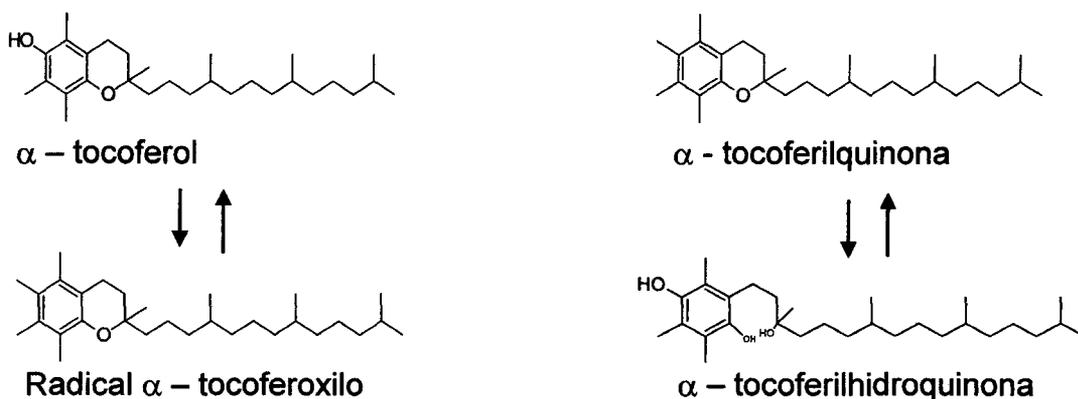


Figura 08. Degradación del α -tocoferol.

Fuente: Packer L. et al, (2005).

1.6.3. Tocoferoles en Aceites Vegetales

La vitamina E se encuentra principalmente en los aceites vegetales (soja, maíz, algodón y girasol), granos, plantas y en el tejido adiposo de los animales. Se localiza principalmente en las hojas y partes verdes de las plantas, que contienen más α -tocoferol que las partes amarillas, mientras que el γ -tocoferol se encuentra en bajas concentraciones. También se encuentran en las algas marrones, verdes y rojas, en algunas levaduras y hongos, pero no en las bacterias (Núñez P.R., 2007).

La distribución de los tocoferoles en aceites vegetales es diferente a la de los tocotrienoles. Durante el procesado (Desodorización) y almacenamiento de los aceites y a lo largo de la preparación de los alimentos, ocurre pérdidas considerables en el contenido de vitamina E que causan su desestabilización, siendo los procesos de fritura, asado o cocción a fuego lento aquellos en los que se producen las mayores pérdidas de esta vitamina, al existir un mayor contacto con el calor y el oxígeno (Oliveras, 2005),

Los aceites derivados de palma y girasol, presentan un mayor contenido en tocotrienoles que el resto de los aceites vegetales citados, en los que el contenido en estos compuestos es prácticamente imperceptible o se encuentra en niveles traza. El aceite de germen de trigo destaca por su elevado contenido en tocoferoles, principalmente en el isómero α -tocoferol, lo que lo convierte en un aceite con un elevado poder antioxidante muy empleado dentro del campo de la cosmética. (Núñez P.R., 2007).

En relación con las propiedades antioxidantes, se ha estudiado la rancidez y la estabilidad oxidativa de distintos aceites vegetales evaluándose el efecto de la concentración de tocoferoles, junto con otros factores, sobre la estabilidad de los aceites. Por otra parte se ha demostrado que los isómeros γ - δ tocoferol son más estables frente al proceso oxidativo, y que los tocoferoles tienen potencial antioxidante mayor a los tocotrienoles. (O' Brien. 2004.)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas más empleadas para la separación de las diferentes formas del tocoferol, debido a que no requiere una etapa compleja de preparación de la muestra, sino que en la mayoría de los casos basta con una dilución de la muestra con un disolvente compatible con la fase móvil. Entre las variantes que puede presentar esta técnica, frecuentemente los investigadores optan por HPLC en fase reversa y fase normal acoplado a detectores ópticos como UV-VIS, detectores de fluorescencia o bien acoplado a detectores de tipo electroquímico. (Núñez P.R., 2007).

Cuadro 11. Contenido de Tocoferol en el Aceite de Aguaje (*M. flexuosa*)

Sustancia	Cantidad (mg/Kg)
α - tocoferol	614 \pm 5
β - tocoferol	687 \pm 8
γ - tocoferol	50 \pm 2
γ - tocotrienol	12 \pm 1
δ - tocoferol	136 \pm 0
δ - tocotrienol	18 \pm 1
Total Tocoferol	1517 \pm 13

Fuente: Silva M. Simone; Sampaio A.; Taham T.; Rocco A.; Ceriani R. Meirelles A. (2009).

1.6.4. Usos

En la industria cosmética, los tocoferoles son usados en fluidos condicionantes para cabellos, shampoos, cremas para peinar y otros productos; en la industria farmacéutica, son usados en la manufactura de tabletas vitamínicas y en productos alimenticios que son empleados como suplemento de vitamina E, más la principal aplicación de los tocoferoles es

como antioxidante en la industria alimenticia (alimento deshidratado, aceites vegetales, pescados, entre otros). Los tocoferoles son sensibles a la luz, calor, alcalisis y metales contaminantes; por esta razón ellos son fácilmente oxidados a tocoquinonas, que no posee propiedades antioxidantes (Mahan L. K., 2002).

1.7. Destilación

El proceso de destilación puede ser realizado en forma continua o discontinua (en lote). En el primer caso, la alimentación de la muestra a ser separada. Así como la remoción de los productos destilados de la columna y hecha de manera continua. Pasado el estado transitorio en el comienzo de la operación de la columna. El flujo de las dos corrientes de líquido y vapor relacionadas con el proceso. Así como las composiciones de estas corrientes permanecen sin cambios con el tiempo. La destilación continúa es emplea normalmente cuando grandes cantidades de la mezcla a separar están disponibles a una velocidad y composición bastante uniforme. (Ito Vanessa, 2007).

El proceso en lote requiere considerablemente más trabajo y atención que el proceso continuo. En general es necesario parar, drenar y limpiar la columna cada vez que una nueva muestra debe ser destilada, puede resultar en un aumento substancial del tiempo total del proceso.

De este modo la destilación en lote es normalmente utilizada cuando un producto debe ser fabricado solamente en determinados periodos y donde un número de muestras diferentes deben ser separadas en diferentes periodos por la misma columna. Como gran ventaja del proceso discontinuo, se destaca el hecho de que una única columna en lote puede separar una muestra de N componentes en sus componentes puros, en cuanto en un proceso continuo serían necesarios N-1 columnas para realizar la misma separación. Una simple columna puede procesar una grande tira de composiciones de alimentación, un número variado de componentes y diferentes grados de dificultades de separación. (Ito Vanessa, 2007).

1.7.1. Métodos de Destilación Utilizados en el Industria de Ácido graso

La purificación de ácidos grasos por destilación se ha practicado por más de cien años y sigue siendo el medio más común y más eficientes para producir

ácidos grasos de alta pureza. La destilación elimina tanto las impurezas de punto de ebullición bajo y alto, así como sustancias de olor. La destilación de ácidos grasos puede ser por lotes o un proceso continuo, a presión atmosférica o bajo presión reducida. Puede ser destilación simple que implica la purificación de ácidos grasos mixtos o destilación fraccionada que consisten tanto de purificación y separación de los ácidos grasos de acuerdo con la longitud de la cadena. (Pramparo M., S. Prizzon y M.A. Martinello, 2005).

Debido a la sensibilidad inherente de los ácidos grasos hacia la calor, los métodos de destilación empleado debe ser Llevado a cabo en una temperatura tan baja como prácticamente y económicamente factible mientras se mantiene el tiempo de residencia más corto del ácido graso en la unidad de destilación. Unidades de destilación modernas de hoy en día se basan en alto vacío, calefacción eficaz, los tiempos de contacto cortos, la transferencia de masa efectiva entre el vapor y condensado (Lausberg, N., 2008).

1.7.2. Destilación Discontinua o Lote

Debido a que muchas sustancias, que se desean separar por destilación, no pueden calentarse ni siquiera a temperaturas próximas a sus puntos normales de ebullición (presión atmosférica), porque se descompondrían químicamente, otras sustancias con puntos de ebullición muy elevados demandarían gran cantidad de energía para su destilación a la presión ordinaria, se emplea el método de destilación al vacío o a presión reducida. El cual consiste en reducir la presión de operación para obtener la ebullición a temperaturas bajas ya que un líquido empieza a hervir cuando su presión de vapor iguala la presión de operación.

En la operación de destilación discontinua implica la separación de una mezcla inicialmente colocado en un recipiente y el fraccionamiento se realiza hasta una cierta cantidad del producto obtenido. La composición de la parte superior varía durante el funcionamiento y un cierto número de extracciones (cortes) de productos. Algunos de estos cortes serán los productos deseados, otros cortes intermedio estará fuera de especificación que puede ser almacenado o reciclado para separaciones futuras, esto es mezclados

con una nueva carga de proceso y separados. La fracción del fondo residual se puede recuperar o no como el producto final. (Pramparo M., 2005).

La columna de destilación discontinua, está compuesta de los siguientes equipamientos.

- Refervedor, envase donde la mezcla líquida a ser destilada es colocada y también donde será expuesto al calor necesario para la separación.
- Una columna de rectificación colocada sobre el refervedor. Esta columna puede ser de platos o de relleno.
- Acoplado la columna a un condensador, total o parcial.*
- Varios tanques para recibir los productos especificados, bien como los cortes intermediarios (fuera de especificación).

1.7.3. Destilación a Presión Reducida o Vacío

Es un proceso de separación, se opera a presiones y temperaturas correspondientemente bajas. La destilación a presión reducida es útil en la separación y purificación, con materiales de alto peso molecular así como aquel térmicamente sensible. Las Vitaminas en procesos convencionales se degradan antes ser separado debido a las altas temperaturas empleadas en estos procesos. También se puede utilizar en la caracterización de fracciones de aceite pesado, que son de alto peso molecular y alto punto de ebullición. (Batistella C.B. y Wolf Maciel M.R. 2008).

En la destilación convencional, la fase líquida tiene una gran turbulencia que la difusión de moléculas volátiles a la superficie es rápida en comparación con la tasa de evaporación. Este comportamiento no ocurre en la destilación molecular, donde se comportó y el flujo de líquido destilado convección debido a ebullición prácticamente inexistente. La alta viscosidad y pesos moleculares elevados obstaculizan la difusión, (Ito, Vanessa; 2007).

La destilación a presión reducida, es conocida por ser un método seguro para separar y purificar los compuestos térmicamente sensibles y sustancias con baja volatilidad.

Este método se caracteriza por un líquido de exposición a corto destilación a temperaturas elevadas, de alto vacío en el interior de la retorta y una

distancia pequeña entre el evaporador y el condensador. Durante el proceso de destilación a presión reducida, la destilación de los compuestos térmicamente sensibles se acompaña de una descomposición térmica insignificante. El tiempo de residencia de moléculas pequeñas en el evaporador, el orden segundo, está garantizada por la distribución uniforme del líquido en la forma de una película delgada. (Pramparo M., 2005).

1.7.4. Esterificación

Varios procesos han sido patentados para la purificación de los destilados desodorizados. Entre los métodos presentados se encuentran extracción líquida, destilación, intercambio iónico, saponificación, esterificación, hidrogenación. Sin embargo sólo los procesos de esterificación, seguidos de destilación de alto vacío, han sido desarrollados en escala comercial para la concentración de tocoferoles (Rohr y Trujillo-Quijano, 2002).

La esterificación permite la reacción del grupo carboxilo de los ácidos grasos libres contenidos en el destilado desodorizado con la cadena carbonada de un alcohol inferior. La esterificación se lleva a cabo para disminuir el punto de ebullición de los ácidos grasos. Para que esta reacción se lleve a cabo se debe utilizar un catalizador (comúnmente un ácido mineral, ya que un álcali puede atacar los tocoferoles). Esta reacción es reversible y alcanza el equilibrio cuando aún quedan cantidades apreciables de reactivos, hecho que ocasiona la necesidad de trabajar con un exceso de alcohol primario para llevar a cabo la reacción en una extensión adecuada.

Dicha reacción se realiza para disminuir el valor de acidez desde 13 a 1%, con el fin de evitar la formación de jabón y emulsiones que disminuyen el rendimiento de la reacción de transesterificación. El método más simple y más empleado en la obtención de ésteres, es la reacción de un alcohol con un ácido carboxílico, llamada esterificación de Fisher (ver figura), empleando un ácido Brønsted como catalizador, el más utilizado es el ácido sulfúrico (H_2SO_4). El principal problema es la formación de desechos altamente ácidos, que generan un serio problema ambiental. (Gunstone F.D., 2007).

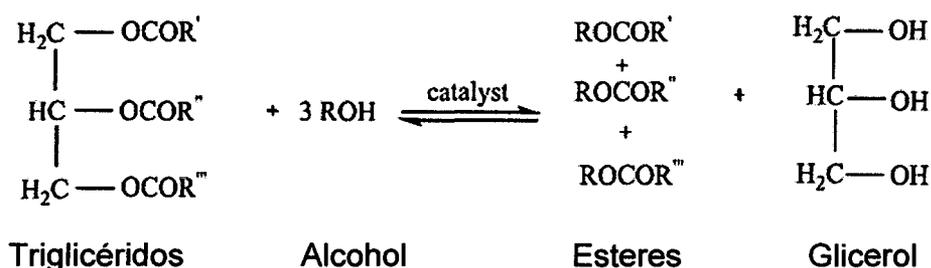


Figura 09. Transesterificación de aceites vegetales

Fuente: Gunstone F.D. (2007).

En la industria se utilizan catalizadores para disminuir la temperatura de la reacción. Los catalizadores más usados son los metales alcalinos y sus derivados, siendo el metóxido de sodio el más empleado, debido a sus ventajas de costo, manipulación y temperatura de reacción, que puede ser reducida al rango de 30-90°C (García D. y Sandoval J.,2008).

1.8. Cromatografía

La cromatografía es un método de separación de diferentes componentes de una muestra, este método logra la separación de los mismos a través del paso de una muestra por una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil, cada componente de la muestra tiene propiedades particulares que permitirá su interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular y si el caudal, las características de la fase estacionaria, móvil y la longitud de la columna son las adecuadas se lograra la separación completa de todos los componentes de la muestra. El objetivo principal de un estudio cromatografía es lograr la separación de todos los componentes en una muestra. (Rubinson, 2001).

1.8.1. Tipos de Separación Cromatografía

Hay diferentes tipos de cromatografía, clasificados de acuerdo a la naturaleza de las fases móvil y estacionaria, la escala de las operaciones y modos de operación.

a. Naturaleza de la Fase Móvil y Estacionaria

Hay dos clases principales de cromatografía en función de la naturaleza de las fases móvil y estacionaria: cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida (LC). En la cromatografía de gas, la fase móvil es

normalmente un gas. La fase estacionaria puede ser un adsorbente sólido o líquido distribuido sobre la superficie de la columna. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria consiste en pequeñas partículas que son generalmente porosas. (Abidi, S., 2000).

b. Escala de Operación

Dependiendo de la escala de operación, la cromatografía líquida se puede dividir en escala ultra abajo, analítica, a escala de laboratorio y cromatografía de proceso. En escala ultra establecen los volúmenes que están en μg de rango y puede ser utilizado temprano en el desarrollo del proceso. En la escala de análisis, los volúmenes se encuentran en un μg de rango y el objetivo es identificar los componentes de la muestra. La escala de laboratorio o cromatografía preparativa se encuentra en la escala, que se utiliza para fines analíticos y de producción, dependiendo del proceso. Por último, en la cromatografía de producción o proceso, los volúmenes se encuentran en el rango de kg el objetivo consiste en purificar el componente de destino con el fin de fabricar un fármaco. (Abidi, S., 2000).

1.8.2. Cromatograma

Es la representación gráfica de la señal en función del tiempo una vez que la muestra es inyectada a un sistema cromatográfico. Para obtener este Cromatograma a la salida de la columna se coloca un sistema de detección y registro, que permite responder a una propiedad de la solución que contiene el analito o del propio analito en función del tiempo, (figura 10). (Rubinson, 2001).

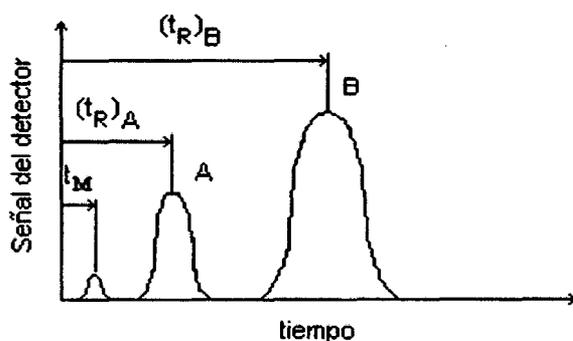


Figura 10. Cromatograma de dos componentes indicando el t_R y t_M .

Fuente: Rubinson, (2001)

⌘ Tiempo de Retención

El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector se denomina tiempo de retención (t_R). (Figura 10)

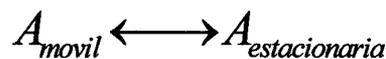
⌘ Tiempo Muerto

Es el tiempo t_M para que la especie no retenida alcance el detector. (Figura 10.)

1.8.3. Ecuaciones Básicas en Cromatografía

1.8.3.1. Constante de Distribución

Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones simples que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil. Así para una especie A.



La constante de este equilibrio se denomina, constante de distribución y se define como:

$$k = \frac{C_S}{C_M}$$

Donde:

K = Es la constante de distribución

C_S = Es la concentración molar de analito en la fase estacionaria

C_M = Es la concentración molar de analito en la fase móvil.

1.8.3.2. Factor de Capacidad

Es un parámetro (k') que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna.

$$K'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

Donde:

K'_A = Factor de capacidad

K_A = Es la constante de distribución

V_S = Es el volumen de la fase estacionaria

V_M = Es el volumen de la fase móvil.

También puede ser descrito en términos experimentales los cuales pueden ser tomados de un cromatograma:

$$K'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$$

Donde:

$(t_R)_A$ = Es el tiempo de retención del componente A

t_M = Es el tiempo muerto obtenido para una especie no retenida

1.8.3.3. Factor de Selectividad

El factor de capacidad α de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aun así no se lograría la separación de los mismos. Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A}$$

Donde:

K'_B = Es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido

K'_A = Es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

Con esta definición α siempre es mayor que la unidad. En términos tomados a partir de un cromatograma α se puede calcular como sigue:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

1.8.3.4. Eficiencia de una Columna

Como se dijo anteriormente, si no se toma en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatográfica no se podría lograr una buena separación aun cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna particular.

Es decir que mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiente. La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil. Se utilizan dos términos afines con frecuencia como medida cuantitativa de la eficacia de una columna cromatográfica: 1) La altura equivalente de plato teórico o H ; 2) el número de platos teóricos N . Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H}$$

Donde:

N = Numero de platos teóricos.

H = Altura equivalente de plato teórico.

L = Es la longitud (*Normalmente en centímetros*) del relleno de la columna.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato. La evaluación experimental de H y N se puede realizar a partir de las siguientes ecuaciones:

$$H = \frac{L W^2}{16 (t_R^2)}$$

Donde:

L = Es la longitud de la columna

W = Es el ancho del pico a considerar

t_R = Es su tiempo de retención.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Para tener una mejor idea de cómo afectan las diferentes variables cromatográficas el ancho de un pico que a su vez, se traduce en la modificación de la eficacia de una columna, VAN DEEMTER presentó la siguiente ecuación:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

En esta ecuación se evalúan varios términos que pueden contribuir al ensanchamiento de una banda los cuales se pueden interpretar como sigue: **El término A**, igual a $2\lambda d_p$ y Atribuido a la difusión en remolino, representa el efecto de trayecto múltiple de la fase móvil a través de una columna empacada.

Donde:

λ = Incorpora la densidad del empaque

d_p = Promedio del diámetro de partícula

Para las columnas capilares sin relleno este término es cero. **La difusión longitudinal (B/u)**, es una causa del ensanchamiento de banda por las que los analitos difunden desde la zona más concentrada del centro de la banda hacia las regiones más diluidas por delante y por detrás del centro de la banda, es decir, en el mismo sentido y en el sentido opuesto a la dirección del flujo. **El término B** es igual a $2\gamma D_M$, Expresa la tortuosidad de los canales en la columna empacada y el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase móvil. **El término C**, está dado por:

$$\left(\frac{8}{\pi^2} \right) [k(1+k^2)] \left(\frac{2d_f^2}{D_E} \right)$$

Refleja la resistencia a la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria.

Donde:

k = Es el factor de capacidad

d_f = Es el espesor de la película de la fase estacionaria

D_E = Es el coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material Biológico:

En el presente estudio se utilizó como materia prima los frutos de Aguaje (*Mauritia flexuosa*), del morfotipo "shambo", procedentes de la provincia Tambopata, distrito las Piedras, del centro poblado San Francisco de Asís a 30 Km de la carretera Puerto Maldonado – Iberia.

2.1.2. Materiales de Acondicionamiento del Fruto

- ↻ 01 Balanza tipo Reloj marca "ROMA" (Cap. Máx. 10 kg.)
- ↻ 01 cocina
- ↻ 2 Cuchillos de acero Inox.
- ↻ 3 Baldes plásticos de 20 L
- ↻ 3 Ollas
- ↻ Coladores

2.1.3. Materiales de Laboratorio

- ↻ Algodón
- ↻ Balón 1000 mL
- ↻ Bureta de 25 mL
- ↻ Columna cromatografía: Pírex (15mm de diámetro y 450mm de longitud)
- ↻ TLC silica gel 60 F₂₅₄. MERCK, U.S.A.
- ↻ Cuba para TLC
- ↻ Embudo Buhner
- ↻ Espátula
- ↻ Fiolas de 10, 100, 500, 1000 mL
- ↻ Frascos ámbar de 5 mL, 10 mL
- ↻ Frascos herméticos de 1000 mL
- ↻ Luna de reloj
- ↻ Matraces Erlenmeyer 50, 125, 250, 500 mL
- ↻ Matraz kitazato de 1000 mL
- ↻ Micro-pipetas de: 50 - 100 μ L, 100-200 μ L
- ↻ Papel filtro Whatman N° 4

- ↵ Peras decantadoras
- ↵ Pinzas
- ↵ Pipetas de 5 y 10 mL
- ↵ Puntas plásticas para micropipetas
- ↵ Termómetro de mercurio y digital
- ↵ Tubos de centrifuga de 10 mL
- ↵ Vasos precipitados Pyrex de 20, 50, 100 y 250mL

2.1.4. Equipos

- ↵ Agitador magnético: Marca Cimarec, S131125-Brasil, Rango de agitación: (30 a 120 rpm).
- ↵ Agitador de tubos (Vortex), rango de 50 – 60 CY.
- ↵ Balanza digital: Marca: Mettler Toledo, MT-SICS.
- ↵ Balanza analítica: Serie HR - 200, Cap. 210000 x 0.1 mg
- ↵ Bomba de vacío :Modelo RV3, (1 Hp)
- ↵ Baño termostático con temperatura de trabajo hasta 100°C
- ↵ Campana extractora E L.
- ↵ Centrifuga: Marca Hettich, rango de 1800 – 4200 r.p.m.
- ↵ Cronometro digital
- ↵ Cromatografía Líquido HPLC–DAD Agilent 1200, fase reversa, con detector UV.
- ↵ Cromatografía de gases Agilent 6890N, acoplado con un espectrómetro de masas 5075B.
- ↵ Estufa eléctrica: Marca Thomos, ODHG-905A-Brasil, T°:0-200°C.
- ↵ Prensa hidráulica: Marca APEX (Presión max. 20tn, Capacidad: 500g.)
- ↵ Equipo de destilación, B/R Instrument corporation D1160 ASTM, acoplado con una bomba de vacío marca Edwards.

2.1.5. Reactivos:

- ↵ Éter de etílico
- ↵ Etanol grado analítico, P.A. SIGMA-ALDRICH, U.S.A.
- ↵ Estándar de referencia: (\pm) α -Tocoferol \geq 96% (HPLC), SIGMA-ALDRICH, U.S.A.
- ↵ Estándar de referencia β -Caroteno \geq 96% (HPLC), SIGMA-ALDRICH, U.S.A.

- ☞ Fenolftaleína al 1%
- ☞ Hexano grado analítico Q.P., Marca SIGMA-ALDRICH, U.S.A.
- ☞ Hidróxido de sodio 80%
- ☞ Metanol grado analítico, P.A., Marca SIGMA-ALDRICH, U.S.A.
- ☞ Sílica gel 60 (0.063-0.200mm), para columna cromatografía, MERCK KGA. U.S.A.
- ☞ Isopropanol Q.P., MERCK, Alemania.

2.2. Método

2.2.1. Métodos para Análisis Físico - Químico del Aceite de aguaje

Para los análisis físico químicos del aceite crudo de aguaje (*Mauritia flexuosa*) del morfotipo shambo, fue realizado en el laboratorio de Análisis Químico de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco – UNSAAC. Los análisis y sus normas se Muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Análisis Físico Químico del aceite de Aguaje del morfotipo shambo y sus respectivas normas.

ANALISIS	NORMA
Acidez	Método AOAC – 1998, 940.28
Densidad	Método AOAC – 1998, 920.212
Humedad	Método AOAC – 1990, 695.12
Índice de Peróxidos	Método AOAC – 1998, 965.33
Índice de Refracción	Método AOAC – 1998, 921.08
Índice de Yodo	Método AOAC – 1998, 993.20
Materia Insaponificable,	Método AOAC – 1998, 920.160
Punto de Congelación	Winton A. Alimentos
Punto de Ebullición	ASTM D-86
Punto Frio	NTP Itintec 209.009
Punto Humo	ASTM D-1322
Cuantificación de los Ácidos Grasos Libres por cromatografía de gas (CG).	AOCS – Método Oficial 1-62 (Firestone, 1998),
Cuantificación de Caroteno y Tocoferol por HPLC – DAD	

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico de la UNSAAC, (2015).

2.2.2. Metodología

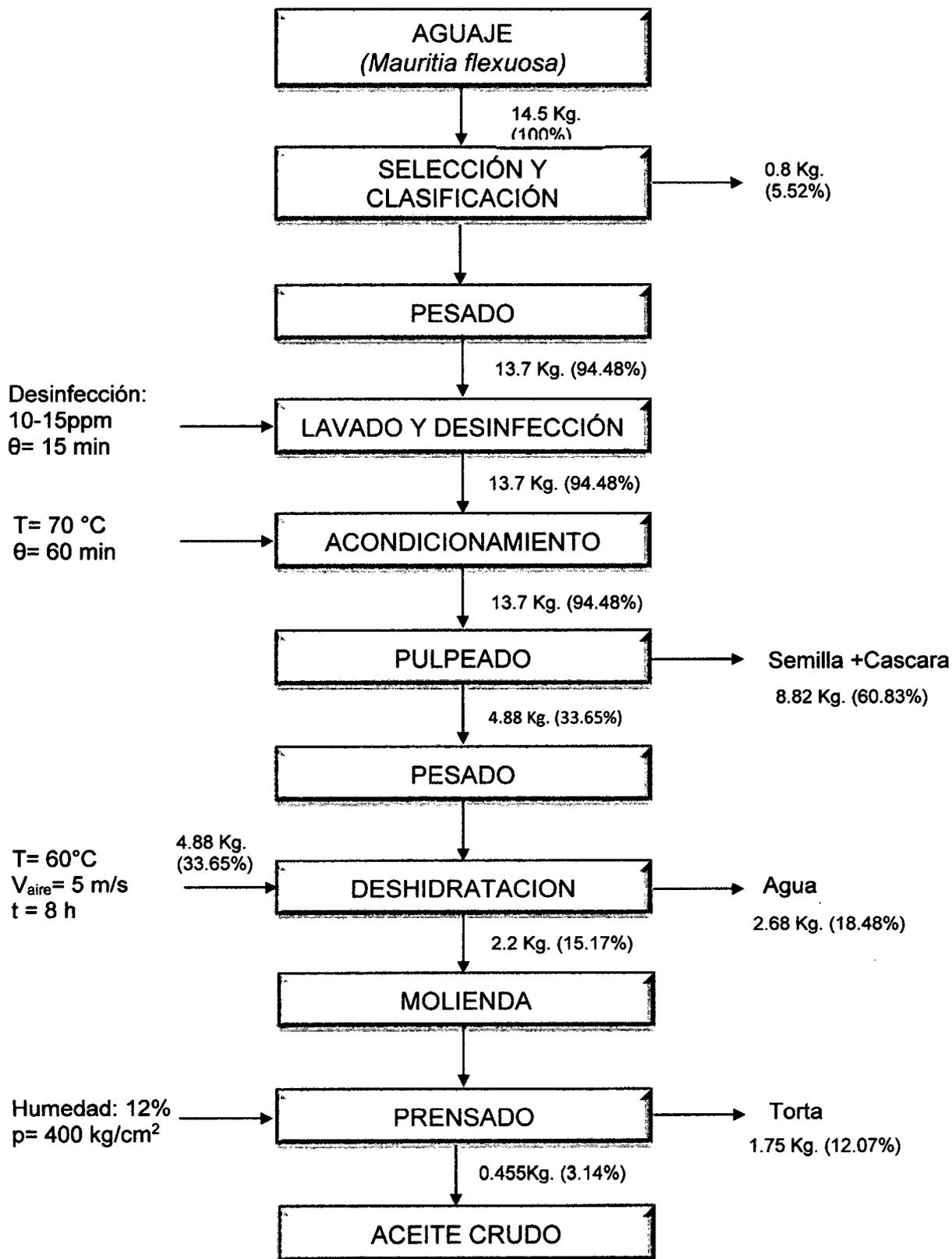


Figura 11. Diagrama de Bloques para la Extracción del Aceite de Aguaje (*Mauritia flexuosa*).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

2.2.2.1. Descripción del Proceso de Extracción del Aceite de Aguaje

- ✘ **Selección y clasificación:** Los frutos fueron recolectados y trasladados hasta el Laboratorio de Procesos Agroindustriales de la UNAMAD, se procedieron a seleccionar y clasificar para su posterior proceso.



Figura 12. Selección y clasificación de los frutos de *M. flexuosa*.

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

- ✘ **Pesado:** Los frutos de aguaje se pesaron en una balanza de plataforma para conocer la cantidad inicial de materia prima con la que se inicia el proceso.
- ✘ **Lavado y desinfección:** Los frutos una vez pesados se lavaron con agua potable para eliminar la tierra luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio a 15 ppm durante 15 minutos después fueron enjuagados para eliminar todo residuo de hipoclorito de sodio.
- ✘ **Acondicionamiento:** Una vez lavados y desinfectados los frutos estos se procedieron a acondicionar bajo una inmersión en agua a 70°C / 15 min, con la finalidad de producir un ablandamiento en la textura del fruto. Se llegó a este parámetro tras pruebas preliminares.
- ✘ **Pulpeado:** Los frutos fueron pulpeados de manera manual separando la semilla y cascara de la pulpa.



Figura 13. Despulpado de Aguaje (*M. flexuosa*).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

- ✘ **Pesado:** Se pesó la cantidad de pulpa luego de finalizar el pulpeado.
- ✘ **Deshidratado:** La fracción de pulpa se sometió a un deshidratado, esto se realizó en una estufa eléctrica a una temperatura de 60°C/ 8h y una velocidad de aire de 5 m/s hasta conseguir humedad de 12%.



Figura 14. Pulpa de Aguaje Húmedo

Fuente: Elaboración Propia, (2015).



Figura 15. Pulpa de Aguaje Seco

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

- ✘ **Molienda:** Se realizó esta operación de manera manual con el fin de reducir el tamaño de la partícula y facilitar la salida del aceite durante el prensado.
- ✘ **Prensado:** Esta operación se realizó utilizando una prensa mecánica con capacidad de 500 gramos, Para cada ensayo de extracción se empleó 450 gramos de muestra por triplicado, se trabajó a una presión de 400 Kg/cm² a humedad de 12% a temperatura de 60°C el aceite extraído se recogió en una probeta graduada con el fin de controlar el rendimiento del aceite.

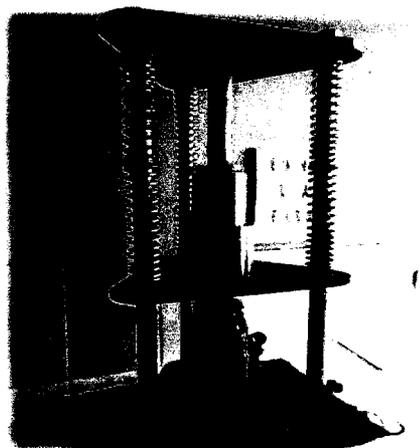


Figura 16. Módulo de prensado en frío con Cap. 500 g y Carga 20 TN.

Fuente: Laboratorio de Procesos Agroindustriales UNAMAD, (2015).

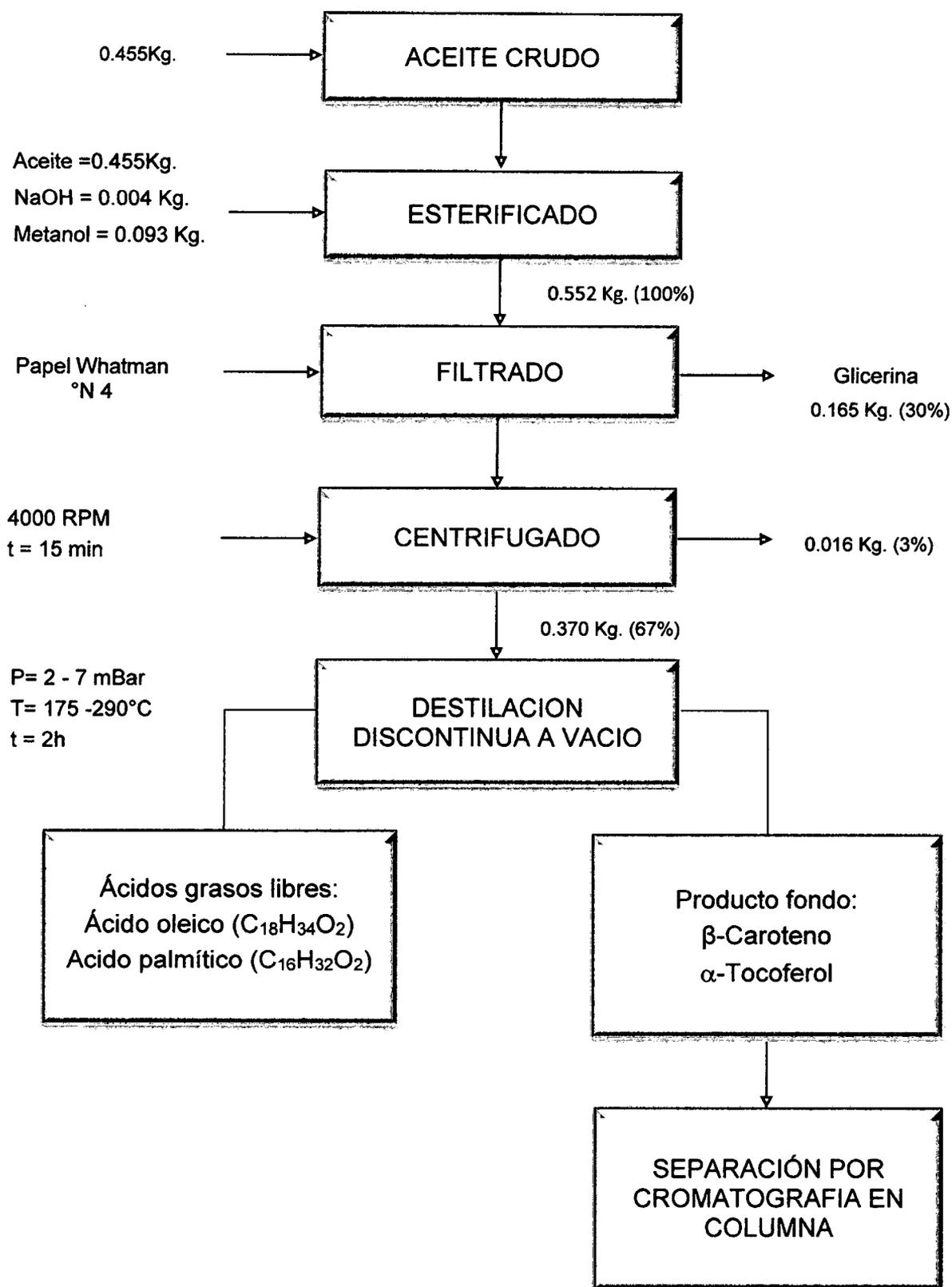


Figura 17. Diagrama de bloques del proceso de fraccionamiento del Aceite de Aguaje (*Mauritia flexuosa*).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

2.2.2.2. Descripción del Proceso de Fraccionamiento del Aceite de Aguaje (*Mauritia flexuosa*)

- ✎ **Esterificado:** Se realizó la esterificación por catálisis básica homogénea. El cual se utilizó el metanol y como catalizador el hidróxido de sodio (NaOH). Una vez preparada la solución es sometida a agitación magnética por 15 min. La mezcla resultante de la reacción da formación del metóxido de sodio en metanol, se agrega la muestra de aceite a la solución, con agitación constante por 15 min. Esto fue realizado a presión atmosférica y temperatura de 35°C, la mezcla es trasvasada a una pera de decantación para facilitar la separación del aceite esterificado de la borra (glicerina).



Figura 18. Proceso de Esterificado del Aceite de Aguaje (*M. flexuosa*).

Fuente: Laboratorio de Procesos Agroindustriales UNAMAD, (2015).

- ✎ **Filtrado:** Se efectuó la filtración al vacío con el fin de eliminar restos de borra que quedó suspendida en el aceite.



Figura 19: Filtrado del Aceite de Aguaje Esterificado

Fuente: Laboratorio de Procesos Agroindustriales UNAMAD, (2015).

- ✎ **Centrifugado:** Se efectuó una centrifugación a 4000 RPM por 15 minutos.

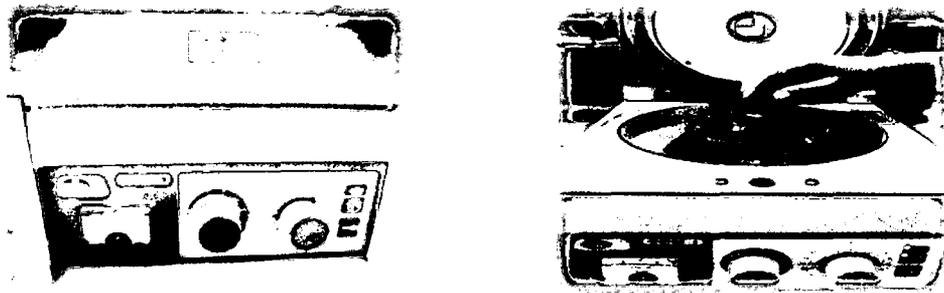


Figura 20. Centrifugado del Aceite de Aguaje Esterificado

Fuente: Laboratorio de Procesos Agroindustriales UNAMAD, (2015).

Destilación Discontinua a Vacío

La destilación a vacío se llevó a cabo en un equipo D1160 ASTM operado manualmente con Dimensiones 91.5cm X 94cmX 53cm (Alto x Ancho x Largo) y Potencia (solo unidad de destilación), 10 Amperios 220 VAC. Consta de una película descendente, superficie de evaporación, superficie de condensación. El destilador está equipado con un Frasco de ebullición, manto de calefacción, columna de destilación según las especificaciones de la ASTM, receptor/medición de volumen, baño de circulación programable, operación de vacío accionamiento manual de la válvula de control (rango opcional de 760-100 mmHg (MKS), y 1 - 0,1 mmHg (MKS), consta de una válvula de control (MKS) y bomba de Vacío (Edwards), trampa fría (enfriamiento por hielo seco) y control digital de temperatura. El esquema de este equipo se muestra en la figura.

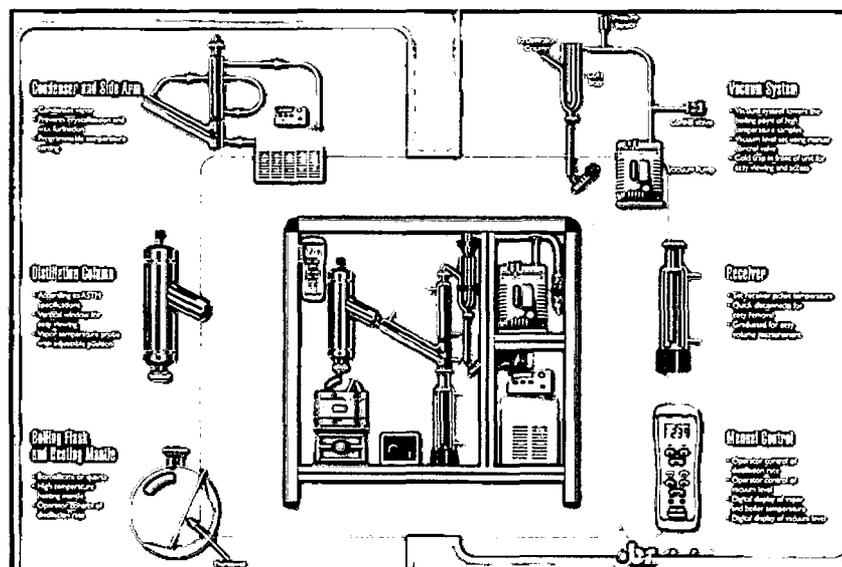


Figura 21. Esquema del Equipamiento de Destilación a Vacío

Fuente: Laboratorio de Ingeniería Química UNSAAC- CUSCO, (2015).

El desarrollo experimental se ha basado fundamentalmente en la determinación de variables óptimas, como la presión a vacío, temperatura del hervidor y tiempo de destilado. Por tratarse de parámetros que poseen mayor influencia en la separación.

Se trabajó con 100 mL de aceite esterificado el cual fue sometido al módulo de destilación a vacío, la temperatura de alimentación fue constante (70°C). Para determinar la presión óptima, se efectuaron pruebas a diferentes presiones de trabajo (7, 6, 4.5, 3 y 2) mBar, a presiones de 6 y 7 no llegaron a destilar. Cuando inicia la ebullición de la muestra, se toma el tiempo de operación y se colecta el destilado por cada experimento. Mediante el análisis del residuo (rico en tocoferol) y el destilado rico (ácido grasos) se obtuvo la presión óptima de trabajo. Obteniendo el destilado este fue sometido a análisis de cromatografía de gas (CG), para determinar la concentración de ácidos grasos libres presentes.

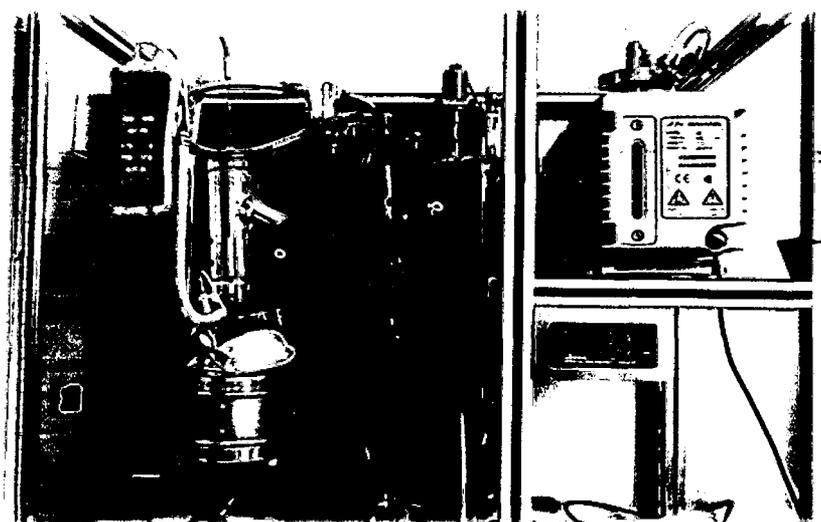


Figura 22. Módulo de Destilación Discontinua a Vacío

Fuente: Laboratorio de Ingeniería Química UNSAAC- CUSCO, (2015).



Figura 23. Destilado

Fuente: Laboratorio de Ingeniería Química UNSAAC- CUSCO, (2015).



Figura 24. Producto fondo

- **Análisis por Cromatografía de Gases (CG)**

Para el análisis de cromatografía de ácidos grasos se utilizó un cromatografo a gases marca Agilent, modelo 6890N, equipado a un espectrómetro de masas Agilent 5975B. Los compuestos fueron separados en columna DB – 23, de 60m, con diámetro interno de 0.250 mm y espesor de la película 0.15µm.

La programación de la temperatura del horno fue de 50°C, la temperatura de la columna fue calentada a 5°C/min hasta 230°C y mantenida en isoterma durante 35 minutos. La temperatura inicial utilizada en el inyector fue de 225°C. El gas de arrastre fue Helio con velocidad de 0.8ml/min Las muestras fueron inyectadas en volumen de 0.2µL,

Los ácidos grasos fueron identificados por la comparación de los tiempos de retención y la cuantificación hecha por normalización de área (%). la identificación se basó en la comparación de las señales de espectro de masas de cada componente con los datos compilados en la librería FAME23 y NISTO11 a.L. (Wiley).

- ✎ **Cromatografía Preparativa en Columna**

La cromatografía preparativa en columna se llevó a cabo en una columna (1.5 cm de diámetro, 45 cm de largo) enchaquetada, con 10g de sílica gel (Tamaño de partícula 0.063 – 0.200 mm).

Una bola de lana de algodón se introduce en la parte inferior de la columna se humedece con 5 mL de hexano, la sílica gel se vierte en la columna y con hexano se limpia los bordes de la columna quedando la sílica gel en suspensión. A continuación se introduce una bola de lana de algodón el hexano se drena hasta el nivel de la lana de algodón en la parte superior.

La temperatura de la columna fue de 20°C y 40°C, para mantener la temperatura a 40°C se usó agua en circulación a partir de un baño maría equipado con una bomba (thermomix ME, B. Braun Biotec Corp., Melsungen, Alemania). Se trabajó con 2.5 mL de aceite obtenido

después de la destilación (producto fondo) se introdujo en la columna hasta drenar debajo del nivel del algodón. Se utilizó como fase móvil hexano: éter etílico (80:20 v/v), se procedieron a recoger las fracciones con un caudal de 2 mL/min.

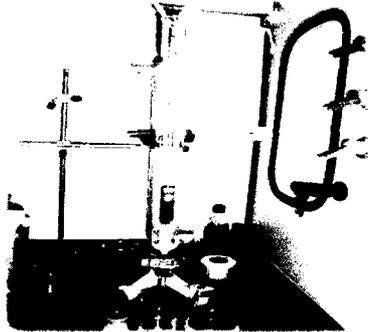


Figura 25. Cromatografía preparativa en columna a 20°C.



Figura 26. Cromatografía preparativa en columna a 40°C.

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

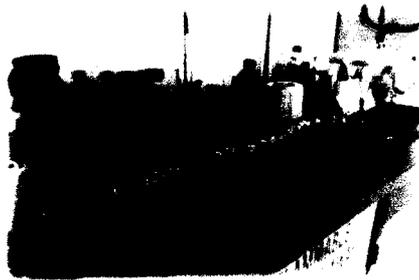


Figura 27. Fracciones recolectadas de la cromatografía

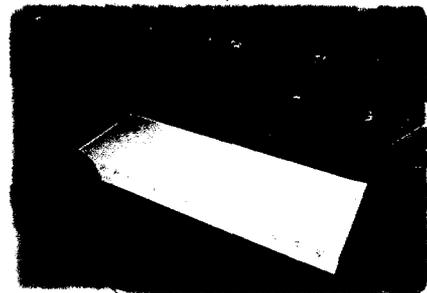


Figura 28. Cromatografía en capa fina (TLC).

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

De la separación por cromatografía preparativa en columna de 20 y 40°C, se obtuvieron 15 fracciones respectivamente de los cuales se llevaron a cromatografía en capa fina (TLC), tamaño de placa 7x3cm, utilizando como fase móvil Hexano - Éter etílico (8:2 v/v), primero se aplicó los estándares de α -tocoferol y β -caroteno, para identificar la presencia de dichos compuestos en cada fracción mediante el revelador DPPH (antioxidante), del cual se seleccionaron 3 fracciones de las temperaturas de 20 y 40°C para cada una de las fracciones, para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Realizados en Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

- **Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)**

Los tocoferoles y carotenoides fueron separados y cuantificados por cromatografía líquida de alta eficiencia.

Para análisis cromatográfico se utilizó un cromatografo de alta eficiencia HPLC–DAD Agilent 1200. Equipado con detector de UV. Los compuestos fueron separados en columna zorbax eclipse XDB.C18 4.6 x250mm, 5 μ m y una pre-columna zorbax eclipse XDB-C18 4.6dx12.5 mm x 5 μ m. la separación cromatografica fue realizada por elución isocrática de fase móvil constituida de n-propanol con flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones del detector fueron longitudes de onda de 280nm para α -tocoferol y 450nm para β -caroteno.

El α -tocoferol y el β -caroteno fueron identificados por comparación como el tiempo de retención de los patrones puros analizados en las mismas condiciones de las muestras. La cuantificación de cada isómero fue realizada estandarización externa con base en las áreas de los picos, utilizando patrones de α - tocoferol y β -caroteno. Con grado de pureza de 96%. Para el análisis de carotenos todo el procedimiento fue realizado en el menor tiempo posible, evitando al máximo la exposición al oxígeno, luz y temperatura elevada seguida de las recomendaciones de Rodríguez- Amaya (1999), para evitar la degradación de los carotenoides durante los análisis.

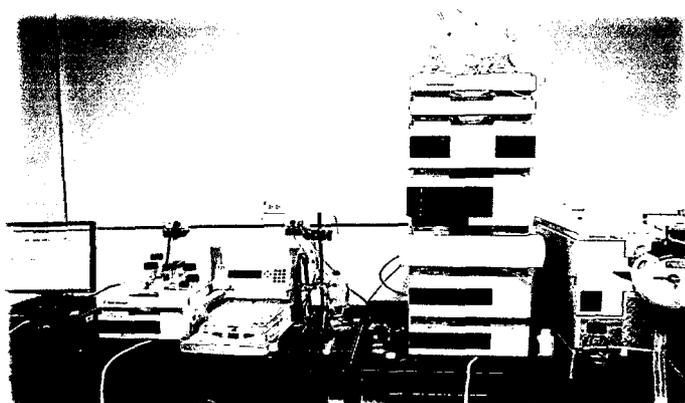


Figura 29. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC –DAD)

Fuente: Laboratorio de cromatografía de ciencias químicas y farmacia - UNSAAC, (2015).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización Físico – Químico del Aceite de Aguaje (*M. flexuosa*)

En el cuadro 13, se muestran los resultados de los análisis Físico-Químico del Aceite crudo de Aguaje (*Mauritia flexuosa*) del morfotipo shambo, donde el resultado de la media aritmética corresponde a tres replicas.

Cuadro 13. Análisis Físico-Químico del Aceite Crudo de Aguaje

Análisis	Resultados
Humedad (%)	0.11 ± 0.01
Densidad (g/ml) 25°C	0.907 ± 0.002
Índice de Refracción (25°C)	1.47735 ± 0.00015
Punto de Ebullición (°C)	355.0
Punto de Congelación (°C)	-4.0
Punto Humo (°C)	381.5 ± 0.5
Índice de Yodo (g I/100g aceite)	67.975 ± 0.025
Índice de Saponificación (%)	196.2 ± 0.2
Índice de Peróxido (meqO ₂ /Kg)	1.07 ± 0.19
Acidez (%) Ac. Oleico	2.31 ± 0.025
Materia Insaponificable (%)	1.055 ± 0.045

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico de la UNSAAC, (2015).

El porcentaje de ácidos grasos libres reporta valores de 2.31 ± 0.025% expresados en ácido oleico por tratarse del ácido relevante en el aceite de aguaje. Lo cual es similar a los resultados obtenidos por Ingunza G. (2009), que indica 2.60 ± 0.055% de acidez (Ac. Oleico).

Según Ceriani R. (2009), menciona en su reporte de análisis físico químico del aceite de aguaje, índice de yodo (74,64g/100g de aceite), el índice de refracción (1,4610) y el índice de saponificación (192,88 mg de KOH/g de aceite), los cuales indican que los resultados obtenidos son similares a su reporte. Así también estos están dentro del rango que el de aceite de oliva O'Brien RD (2004).

El índice de peróxido, reportado es 1.07 ± 0.19 meqO₂/Kg, valor muy bajo en comparación con los resultados obtenidos por Ingunza G. (2009), que indica un valor de 4.61 meqO₂/Kg, a pesar de ser un aceite crudo de elevada instauración los valores reportados se encuentran por debajo de los considerados como requisito de calidad según la norma de Codex Alimentario Codex Stan 19-1992.

Los peróxidos son los primeros y menos estables productos de oxidación y se descomponen fácilmente a los productos secundarios más estables. Por lo tanto, peróxidos están presentes en los aceites en la etapa inicial de oxidación. (verleyen T., 2005).

3.2. Destilación

En el cuadro 14, se presenta las condiciones de operación del proceso de destilación a vacío, considerando como factor importante la presión (mBar), temperatura del hervidor (°C) y tiempo(min) para lograr la separación de los componentes como los ácidos grasos, β -caroteno y α -tocoferol.

Cuadro 14. Condiciones de Operación del proceso de Destilación a Vacío.

P. (mBar)	t. (min)	Temperatura (°C)		Cantidad (mL)		Características	
		Her.	Dest.	Dest.	PF	Producto Fondo	Destilado
2	40	172	34	32	68	Color rojo oscuro característico al aceite crudo	Líquido oleoso Incoloro
2.5	45	196	34	27	72	Color rojo oscuro característico al aceite crudo	Líquido oleoso Incoloro
3	50	220	34.5	20	80	Color amarillo rojizo, olor a quemado	Líquido oleoso incoloro
4	53	240	35	17	82	Color marrón claro, olor a quemado	Líquido oleoso Incoloro
4.5	55	260	35	15	85	Color marrón claro, olor a quemado	Líquido oleoso Incoloro
6	50	280	35	-	-	-	ND
7	40	290	ND	-	-	-	ND

P.(Presión a vacío), t(tiempo), ND(no destilo), Her.(Hervidor), Dest.(Destilado), PF(Producto fondo)

Fuente: Elaboración Propia (2015).

El desarrollo experimental se ha basado fundamentalmente en determinar las condiciones óptimas del proceso de destilación discontinua a vacío, determinando así los parámetros que poseen más influencia en la separación de ácidos grasos libres (AGL).

Se realizaron pruebas de destilación a vacío con muestra de aceite esterificado, para disminuir el punto de ebullición de los ácidos graso, (Pramparo M., 2005).

A distintas presiones, temperaturas y tiempos de destilado, donde se puede mencionar a presión (2mBar), temperatura del hervidor (172°C), temperatura de condensación (34°C) y periodo de destilación 40 min, se logra separar los ácidos grasos libres de característica liquido oleoso incoloro, (ver fig. 30), Esto se debe a que a esa temperatura se produce una mayor transferencia de calor, ocasionando una mayor evaporación de sustancia de alto punto de ebullición. La cantidad de ácidos grasos libres que se evapora ocasiona un aumento en la concentración de tocoferoles en el residuo, lo cual es deseable para obtener un producto de mayor pureza final, (Pramparo M. 2005). Determinando así estas condiciones óptimas de separación, mediante el análisis del residuo (rico en tocoferoles) y el destilado (rico en ácidos grasos).

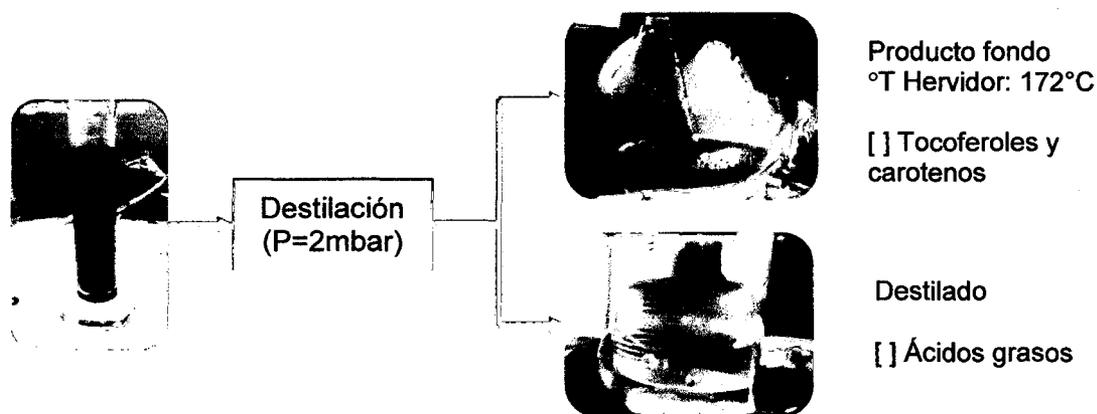


Figura 30. Fraccionamiento de Destilación a Presión Reducida

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Según Pramparo M., Prizzon S., Martinello M.A. (2005), Menciona que la temperatura optima de destilación molecular es 170 °C a presión de 10^{-2} mBar y que a temperaturas mayores de 190°C se observa cambios en el producto

debido al deterioro de algunos componentes en el aceite de soya, Lo que indica que la temperatura del hervidor de 172°C a presión de 2 mBar, está dentro de las condiciones óptimas de separación de ácidos grasos.

En la figura 31, Se aprecia las imágenes correspondientes a los Productos Fondos (residuos) obtenidos de la destilación a diferentes presiones, temperatura y tiempo. A presiones de 3 y 4.5 mBar y altas temperaturas de 220°C y 260°C respectivamente se logra destilar los compuestos más volátiles pero en el Producto Fondo se observa que presenta cambios físicos y químicos, lo cual muestra degradación los carotenoides y tocoferoles no logrando a estas condiciones una buena separación. En cuanto a presiones de 6 y 7 mBar a temperaturas de 280°C y 290°C, no se logra destilar los compuestos volátiles ya que tiende a quemarse la muestra, produciendo así la desnaturalización de sus compuestos.

Obteniendo el destilado a condiciones óptimas, este fue analizado por cromatografía de gases (GC) Agilent 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas (MS), columna de DB-23, 60m x I.D o.250 x 0.15 μm film., flujo 0.8 ml/min y volumen de inyección 0.2 μL . como se puede observar en el cuadro 28, los resultados del contenido de ácidos grasos en el destilado.

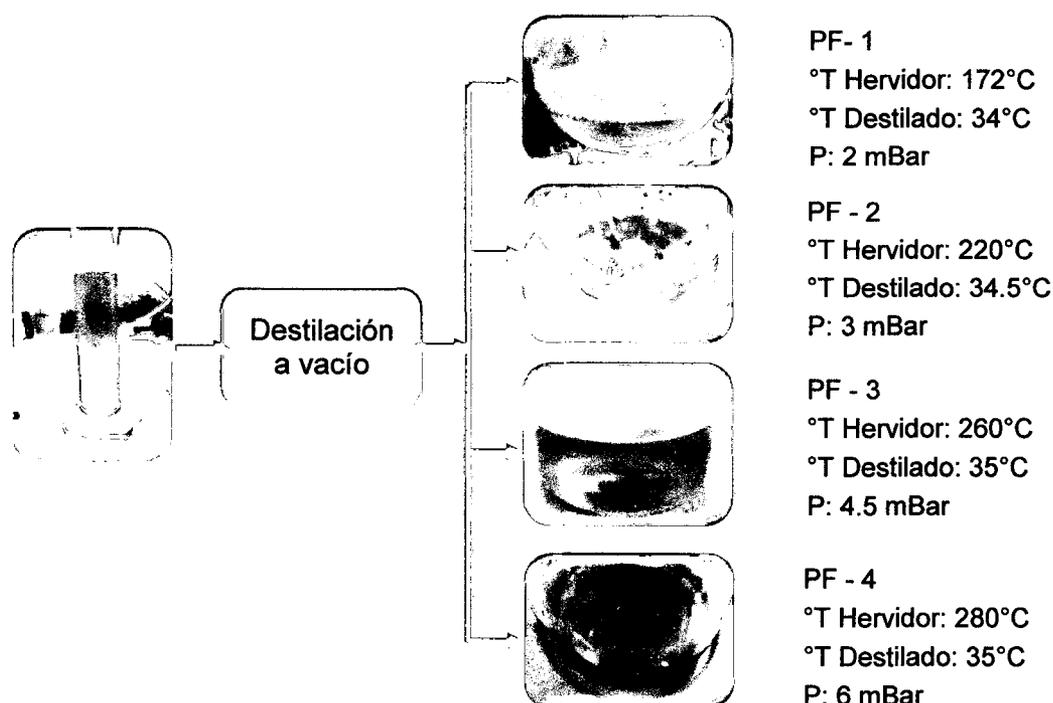


Figura 31. Resultados de productos fondos de la destilación a presión reducida

Fuente: Elaboración Propia (2015).

Según Batistella C.B. y Wolf Maciel M.R. (2008). Menciona en su reporte que una presión de 9.10^{-5} torr y un flujo de alimentación de 1125g/h. trabajo con rangos de temperaturas de 150°C, 160°C y 170°C en el proceso de destilación molecular, donde a 170°C obtuvo una mayor concentración de carotenoides (19500 ppm) y tocoferoles en aceite de palma. Que a altas temperaturas el porcentaje de descomposición es mayor. Según nuestros resultados podemos constatar que la temperatura del hervidor 172°C, presión de 2mBar, temperatura de destilado 34°C son los parámetros óptimos de separación de los compuestos de ácidos grasos en el destilado como tocoferoles y carotenoides en el producto fondo.

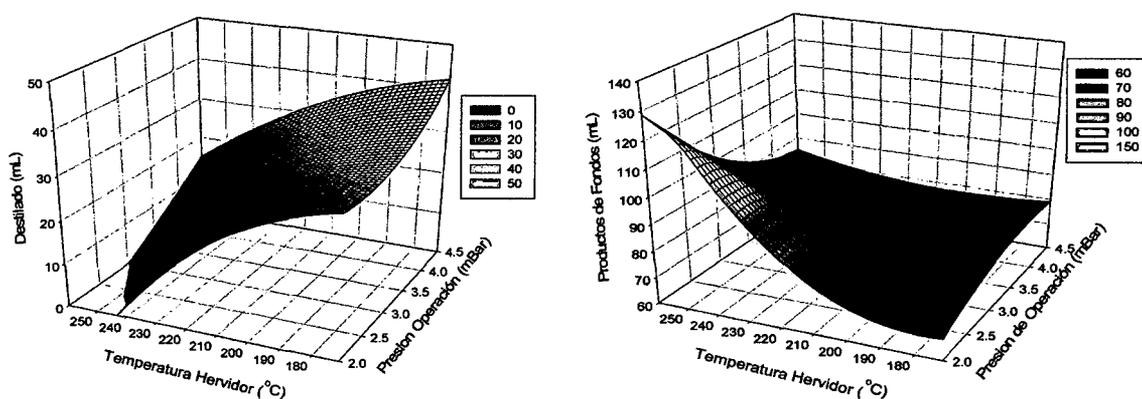


Figura 32. Cantidad de Destilado y Producto de Fondos como función de la variación de la Presión (mBar) y temperatura del hervidor (°C).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

De las superficies respuesta y de contorno, podemos indicar que a presiones bajas (2, 2.5, 3 mBar) y temperatura del hervidor (172, 196 y 220°C) menores de su punto de ebullición de los ácidos grasos, se obtiene 32% de destilados y 68% de productos fondos. A presiones altas (4, 4.5, 6 Y 7 mBar) y temperaturas mayores a 240°C, se degradan los metabolitos presentes en el producto fondo del destilado. Figura 32, se observa la superficie respuesta a las condiciones óptimas según el modelo matemático de la Ec. 3.2 y 3.3.

Los estadísticos del modelo establecidos en el Cuadro 15, indican que el modelo matemático de primer orden incluyendo la interacción de la presión de operación (X_1) y temperatura del hervidor (X_2) ajusta adecuadamente, siendo el coeficiente de determinación de ajuste 98.2 %, que nos indica que el 1.8 %

de los datos se alejan de la superficie del modelo, con un error estándar de 2.46 %. Así mismo, los coeficientes del modelo se indican en el cuadro 16, donde el coeficiente independiente tiene un valor de 85.9539 mL, los coeficientes $b_1 = 10.922 \text{ mL/mBar}$, $b_2 = -0.4193 \text{ mL/}^\circ\text{C}$ y $b_3 = -0.0097 \text{ mL/(mBar }^\circ\text{C)}$. Para cada uno de estos coeficientes el test-t, nos indica que representan con mínimo error. El modelo matemático se presenta en la ecuación (3.2).

$$Z = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_1 * X_2 \quad (3.1)$$

Donde:

Z , Cantidad de destilado obtenido, en mL.

X_1 , Presión de operación, (mBar)

X_2 , Temperatura en el hervidor, ($^\circ\text{C}$)

b_0, b_1, b_2 y b_3 , Coeficientes del modelo

$$z = 85.9539 + 10.9223 * X_1 - 0.4193 * X_2 - 0.0097 * X_1 * X_2 \quad (3.2)$$

Cuadro 15. Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado para el Destilado

Desviación estándar	R ²	Coeficiente de determinación de ajuste	Estimación de estándar de error
0.9977	0.9953	0.9812	0.9754

Fuente: Elaboración Propia (2015).

Cuadro 16. Coeficiente de Modelo Ajustado para el Destilado

	Coeficiente	Error estándar	T	P
b_0	85.9539	15.3655	5.5940	0.1126
b_1	10.9223	25.6960	0.4251	0.7441
b_2	-0.4193	0.1328	-3.1565	0.1953
b_3	-0.0097	0.0670	-0.1449	0.9084

F(Test de Fisher), P(Valor de Probabilidad)

Fuente: Elaboración Propia (2015).

El estadístico ANOVA, presentado en el Cuadro 17. Un valor de F-value de 70.7156 implica que el modelo matemático ajustado es significativo. Para un

nivel de significancia del 95 % (0.050), los términos del modelo son significativos, corroborados con el valor de $P = 0.0871$, para la regresión en el cuadro 18.

Cuadro 17. Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de destilado en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados
Regresión	4	2666.0485	666.5121
Residual	1	0.9515	0.9515
Total	5	2667.0000	533.4000

Fuente: Elaboración Propia (2015).

Cuadro 18. Corregido para la media de las observaciones - Destilado

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Regresión	3	201.8485	67.2828	70.7156	0.0871
Residual	1	0.9515	0.9515		
Total	4	202.8000	50.7000		

F (Test de Fisher), P (Valor de Probabilidad)

Fuente: Elaboración Propia (2015).

Los estadísticos del modelo establecidos en el Cuadro 19, indican que el modelo matemático de primer orden incluyendo la interacción de la presión de operación (X_1) y temperatura del hervidor (X_2) ajusta adecuadamente, siendo el coeficiente de determinación de ajuste 97.6 %, que nos indica que el 2.4 % de los datos se alejan de la superficie del modelo, con un error estándar de 2.52%. Así mismo, los coeficientes del modelo se indican en el cuadro 20, donde el coeficiente independiente tiene un valor de 28.6420 mL, los coeficientes, y $b_1 = -37.8398 \text{ mL/mBar}$, $b_2 = 0.5015 \text{ mL/}^\circ\text{C}$ y $b_3 = 0.0825 \text{ mL/(mBar}^\circ\text{C)}$. Para cada uno de estos coeficientes el test-t, nos indica que representan con mínimo error. El modelo matemático se presenta en la ecuación:

$$z = 28.652 - 37.8398 * X_1 + 0.5015 * X_2 - 0.0825 * X_1 * X_2 \quad (3.3)$$

Cuadro 19. Coeficiente de Determinación del Modelo Ajustado

Desviación estándar	R ²	R ² Adj	Estimación de estándar de error
0.9969	0.9939	0.9755	0.9748

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Cuadro 20. Coeficiente de Modelo Ajustado para el producto fondo

	Coeficiente	Error Estándar	T	P
b_0	28.6420	17.5605	1.6310	0.3501
b_1	-37.8398	29.3668	-1.2885	0.4202
b_2	0.5015	0.1518	3.3036	0.1871
b_3	0.0825	0.0766	1.0776	0.4762

F(Test de Fisher), *P*(Valor de Probabilidad)

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

El estadístico ANOVA, presentado en el Cuadro 21. Un valor de F-value de 54.1708 implica que el modelo matemático ajustado es significativo. Para un nivel de significancia del 95% (0.050), los términos del modelo son significativos, corroborados con el valor de $P = 0.0995$, para la regresión en el cuadro 22.

Cuadro 21. Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de producto fondo en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados
Regresión	4	30155.7573	7538.9393
Residual	1	1.2427	1.2427
Total	5	30157.0000	6031.4000

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Cuadro 22. Corregido para la media de las observaciones – Producto Fondo

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P
Regresión	3	201.9573	67.3191	54.1708	0.0995
Residual	1	1.2427	1.2427		
Total	4	203.2000	50.8000		

F(Test -Fisher), *P*(Prueba de Probabilidad).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

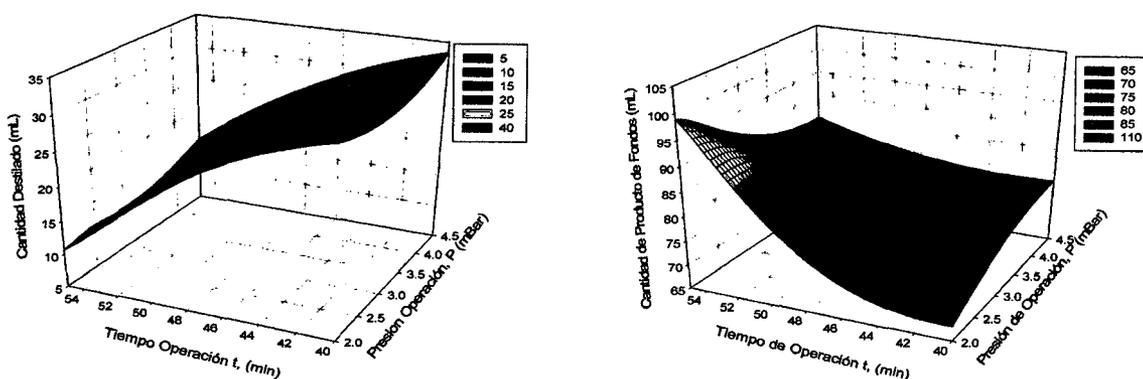


Figura 33. Volumen de destilado y productos fondos en función de la variación del tiempo (min) y presión (mBar) de operación.

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

La cantidad de destilado y producto fondo obtenidos como función de la variación del tiempo de operación (min) y la presión de trabajo de la columna (mBar), tiene una variación lineal tal como se puede apreciar en la Fig. 33. Esto está corroborado con el ajuste de los datos al modelo matemático, cuyo análisis estadístico establece que el coeficiente de determinación del modelo ajustado es de 98.4346 %, indicando que sólo el 1.5 % de los datos están dispersos a la superficie del modelo planteado. El ajuste realizado para un nivel de significancia del 95 %, se tiene un error absoluto promedio de 0.349206 y un error estándar de 0.890871, así mismo, a través de la evaluación del test de Fisher para 4 y 1 grados de libertad se tiene un valor de 0.002.

Por tanto el modelo planteado a través de la Ecuación 3.4, con los valores de los coeficientes del modelo ajusta satisfactoriamente los datos del comportamiento de destilación correspondiente. (P=presión y T=temperatura)

$$\text{Destilado (mL)} = 70.0159 + 12.0317 \times P - 1.19048 \times T - 0.1778 \times P \times T \quad (3.4)$$

Cuadro 23. Coeficiente de Modelo Ajustado para destilado

Parámetro	Estimación	Error estándar	Confianza interior	Interval superior 95.0%
b_0	70.0159	28.1724	-287.948	427.98
b_1	12.0317	23.9072	-291.738	315.802
b_2	-1.19048	0.349927	-5.63672	3.25577
b_3	-0.177778	0.375624	-4.95053	4.59498

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Cuadro 24. Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de destilado en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Test
Model	2666.21	4	666.552	0.002
Residual	0.793651	1	0.793651	
Total	2667.0	5		
Total (Corr.)	202.8	4		

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal para describir la relación entre Fondos y 2 variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Fondos} = 63,5873 - 39,8254 * P + 0,852381 * T + 0,622222 * P * T \quad (3.5)$$

Dónde: P, presión de operación (mBar) y T, tiempo de operación (min).

El ajuste realizado fue con el método de Marquardt, el proceso de estimación terminada después de 6 iteraciones, momento en el que los coeficientes estimados parecían converger a las estimaciones actuales.

El estadístico R^2 indica que el modelo equipado como explica 99.75% de la variabilidad en los Fondos. El ajustado estadística R^2 , que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 99,0001%. El error estándar de la estimación muestra la desviación estándar de los residuales para ser 0.712697. El error absoluto medio (MAE) de 0,279365 es el valor promedio de los residuos.

Cuadro 25. Coeficiente de Modelo Ajustado para producto fondo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Confianza interior	Interval superior 95.0%
b_0	63.5873	22.5379	-222.784	349.958
b_1	-39.8254	19.1258	-282.841	203.19
b_2	0.852381	0.279942	-2.70462	4.40938
b_3	0.622222	0.300499	-3.19598	4.44043

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Cuadro 26. Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de producto fondo en aceite de Aguaje para el modelo de superficie respuesta.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados
Modelo	30156.5	4	7539.12
Residual	0.507937	1	0.507937
Total	30157.0	5	
Total (Corr.)	203.2	4	

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

3.2.1. Composición de Ácidos Grasos.

En el cuadro 27, se muestra los ácidos grasos encontrados en el aceite crudo de aguaje, determinados por cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS), observándose que el mayor constituyente es el ácido oleico 71.86% y el ácido palmítico 21.65%, con tiempos de retención de 21.157min y 17.276min respectivamente, indicativo que el ácido palmítico es el de menor peso molecular y que posee un menor punto de evaporación. Siendo el ácido Palmitoleico un ácido graso monoinsaturado, el punto de ebullición es menor al ácido graso correspondiente del mismo peso molecular. En la figura 34. Se puede apreciar el cromatograma correspondiente.

Cuadro 27. Composición de Ácidos Grasos del Aceite Crudo de Aguaje

Ácidos grasos	Tiempo de Retención (min)	Contenido Relativo (%)
Ácido Palmítico (C16:0)	17.276	21.651
Ácido Pamitoleico (C16:1)	17.784	0.522
Ácido Estearico (C18:0)	20.649	2.183
Ácido Oleico (C18:1)	21.157	71.864
Ácido Elaidico	21.215	2.506
No encontrado	21.856	0.574
No encontrado	22.825	0.7
No encontrado	24.164	0.41

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia –UNSAAC, (2015).

Los ácidos grasos insaturados en el aceite de aguaje son el palmitoleico (0.522 %), oleico (71.864 %), Mientras que los ácidos grasos saturados contenidos fueron: palmítico (21.651 %) y esteárico (2.183 %). Comparados con los resultados son similares a los reportados por Ceriani R. (2009). En la Fig. 34, se presenta el cromatograma del aceite crudo, observándose que el ácido oleico, palmítico son los ácidos grasos más abundantes en el aceite de aguaje. La composición de ácidos grasos del aceite de aguaje puede considerarse similar al aceite de oliva O'Brien RD (2004).

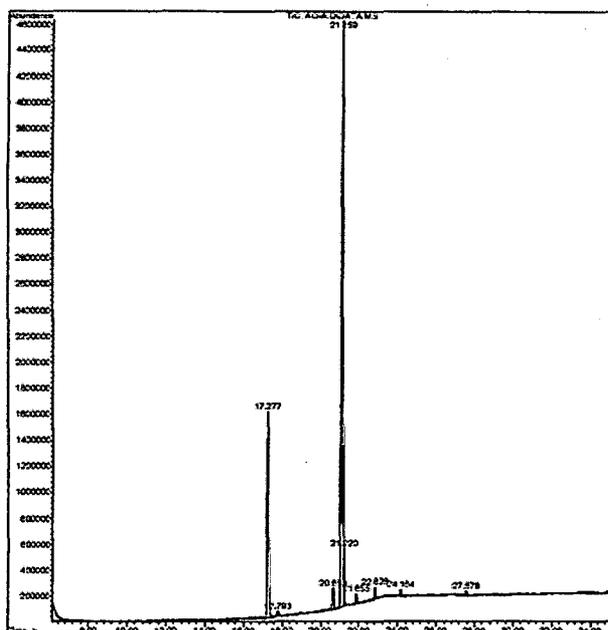


Figura 34. Cromatograma GC – MS del Aceite crudo de Aguaje

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia –UNSAAC, (2015).

En el cuadro 28. Se observa la composición de ácidos grasos presentes en el destilado del aceite de aguaje. El ácido oleico es el componente mayoritario 61.64 % y el ácido palmítico 32.745%, observándose en el cromatograma para un tiempo de retención de 21.157 min y 17.292 min respectivamente. También presentes el ácido elaidico (18:1 ω -9) trans 2.31%, ácido esteárico (18:0) 1.77 % y ácido palmitoleico (16:0) 0.83%.

En la figura 35, se observa el cromatograma del destilado (Azul) y producto fondo (Rojo). La identificación de los picos cromatográficos se basa en la comparación de sus tiempos de retención, es decir, el tiempo transcurrido desde la inyección hasta que la parte más alta del pico que indica la concentración de los ácidos grasos.

Realizando una comparación en la composición entre el producto fondo y el destilado obtenido a las condiciones indicadas en el Cuadro 14, podemos indicar que el ácido palmítico se ha incrementado sustancialmente en el destilado y reducido en el producto fondo. Así como al ácido oleico presenta mayor concentración en el producto fondo que en el destilado. Esta variación es coherente, puesto que el ácido palmítico es más volátil que el ácido oleico.

Cuadro 28. Composición de Ácidos Grasos en el Destilado del Aceite de Aguaje

Ácidos grasos	Tiempo de Retención (min)	Contenido Relativo (%)
Ácido Palmítico (C16:0)	17.292	32.745
Ácido Palmitoleico (C16:1)	17.784	0.844
Ácido Estearico (C18:0)	20.649	1.668
Ácido Oleico (C18:1)	21.157	61.64
Ácido Elaidico	21.215	1.917
No encontrado	21.851	0.624
No encontrado	22.82	0.662

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

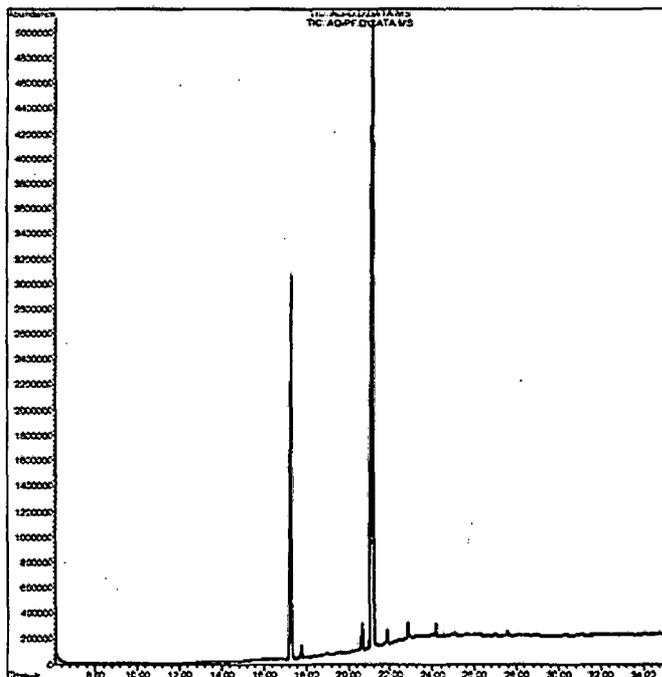


Figura 35. Cromatograma GC – MS del Aceite de aguaje, Destilado

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia –UNSAAC, (2015).

En el Cuadro 29, Se observa la composición de los ácidos grasos presentes en el producto fondo del proceso de destilación del aceite de aguaje (*Mauritia flexuosa*), determinados por cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS), observándose que el mayor constituyente en el producto fondo es el ácido oleico 78.237% y el ácido palmítico 14.462% con tiempos de retención de 21.168min y 17.249min respectivamente.

Cuadro 29. Composición de Ácidos Grasos en el Producto Fondo

Ácidos grasos	Tiempo de Retención (min)	Contenido Relativo (%)
Ácido Palmítico (C16:0)	17.249	14.462
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0.00	0.00
Ácido Estearico (C18:0)	20.649	2.573
Ácido Oleico (C18:1)	21.168	78.237
Ácido Elaidico	21.221	2.609
No encontrado	21.846	0.768
No encontrado	22.820	0.815

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

En la figura 36. Se observa la variación del contenido de ácidos grasos del aceite de aguaje crudo en el proceso de destilación (productos fondos y destilados).

El ácido oleico y palmítico son los ácidos de mayor contenido en aceite de aguaje. Se observa que en el destilado hay mayor concentración de ácido palmítico (C16:0) 32.745%, a comparación de los otros ácidos grasos libres, quedando con menor concentración en el producto fondo 14.462 %. Esto se debe al bajo punto de ebullición del ácido palmítico, en comparación con otros ácidos grasos.

En comparación con el ácido oleico (C18:1) este se encuentra en mayor concentración en el producto fondo 78.237% y menor concentración en el destilado 61.64%. Esto se debe al punto de ebullición que tiene el ácido oleico.

En cuanto al ácido palmítico (C16:1) contenido en el aceite crudo de aguaje, se puede observar que se logró concentrar en el destilado 0.844%, quedando en productos fondo 0% de este ácido graso.

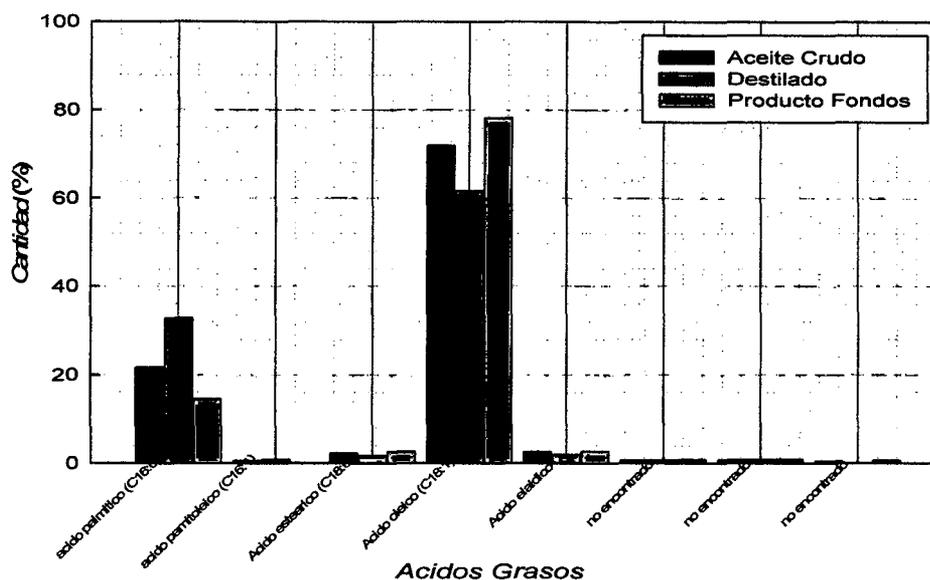


Figura 36. Variación del contenido de ácidos grasos del aceite de aguaje en el proceso de destilación.

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

3.3. Separación por Cromatografía Preparativa en Columna

3.3.1. Elección de Fase Móvil

Se ha evaluado las fases móviles constituidos de: 1) Cloroformo: Isopropanol (1:3 v/v); 2) Hexano: Isopropanol (1:3 v/v); 3) Cloroformo: Hexano (v/v) y 4) Hexano: Éter etílico (8:2 v/v), para la separación por cromatografía en capa delgada, utilizando fase estacionaria a la Sílica Gel 60. Debido a propiedades termodinámicas de solubilidad y polaridad de estos solventes y su interacción con α -tocoferol y β -caroteno, a través de pruebas por cromatografía en capa delgada, se ha establecido que la fase móvil donde se separan estos metabolitos, son el hexano: éter etílico (8:2 v/v), tal como se puede observar en el cuadro 30. Para poder observar al tocoferol se usó el revelador DPPH (antioxidante) ya q a simple vista no es visible el tocoferol.

Según Chu B.S., Baharin B.S, Quek S.Y. y Che Man Y.B. (2003). Mencionan en su reporte la separación de tocoferoles y tocotrienoles del aceite de palma usando el método de destilación y cromatografía. Eluyó primero con hexano

seguido por isopropanol, donde indica que se retiró una gran cantidad de acilgliceroles durante la primera elución, mientras que la vitamina E se desorbe por isopropanol, con una recuperación de >90%.

Cuadro 30. Pruebas de Solventes con Cromatografía en Capa Fina

	1	2	3	4
TLC				
Fase móvil	Cloroformo : Isopropanol	Hexano : Isopropanol	Cloroformo : Hexano	Hexano : Éter etílico
Proporciones	1:3 (ml)	1:3 (ml)	50 µl: 4.95 ml	8:2 (ml)
Observaciones	No separa a los caroteno y tocoferoles	No separa, caroteno y tocoferol suben iguales	Separa a caroteno hasta la mitad de la placa, tocoferoles no se observa	Separa a los tocoferoles y caroteno

P (Estándar de referencia de alfa tocoferol y beta caroteno); M₁ (Aceite crudo); M₂ (Aceite esterificado); M₃ (producto fondo).

3.3.2. Análisis de tocoferoles y carotenoides del aceite de aguaje (*M. flexuosa*)

Los análisis de α – tocoferol y β – caroteno, se realizaron por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5 μ m y pre columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5 μ m con volumen de inyección 1.0 μ L, flujo de 0.5 ml/min, fase móvil n-Propanol.

Previo análisis de las muestras se procede a cuantificar la curva de calibración de los estándares de α -Tocoferol y β -Caroteno. Para la detección del α -tocoferol y β -caroteno la absorción del ultravioleta fueron 280 y 450 nm respectivamente.

Los tocoferoles (α -tocoferol) y carotenoides (β -caroteno) están expresados en microgramos (μ g).

➤ **Análisis del Aceite crudo de Aguaje (*Mauritia flexuosa*)**

En el cuadro 31, y la fig. 37, se muestran los resultados obtenidos por análisis de HPLC del Aceite Crudo de Aguaje, teniendo como resultado 167.46000µg de α -Tocoferol y 127.7621µg de β -Caroteno.

El resultado de α -Tocoferol son similares al reportado por Da cruz Rodríguez A. (2010), (196.8 \pm 28.8 µg) de α -tocoferol en el aceite de aguaje, que es considerado una de las buenas fuentes de vitamina E con concentraciones superiores a cereales, leguminosas y equivalente a muchas nueces.

Chaves y Pecnik (1949), citado por rojas (2000), el contenido de β -Caroteno en el aceite de aguaje es 300,000 µg. El Aguaje por el contenido de β -Caroteno constituye el fruto comestible con mayor reserva de estos componentes.

Cuadro 31. Resultados de α -Tocoferol y β -Caroteno contenido en Aceite crudo de Aguaje (*M. flexuosa*)

Muestra 100 µl	Alfa Tocoferol (µg)	Beta Caroteno (µg)
Aceite Puro	167.46000	127.7621

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

En la Figura 37 se puede apreciar el Cromatograma de α -tocoferol y β -Caroteno en el aceite crudo de aguaje.

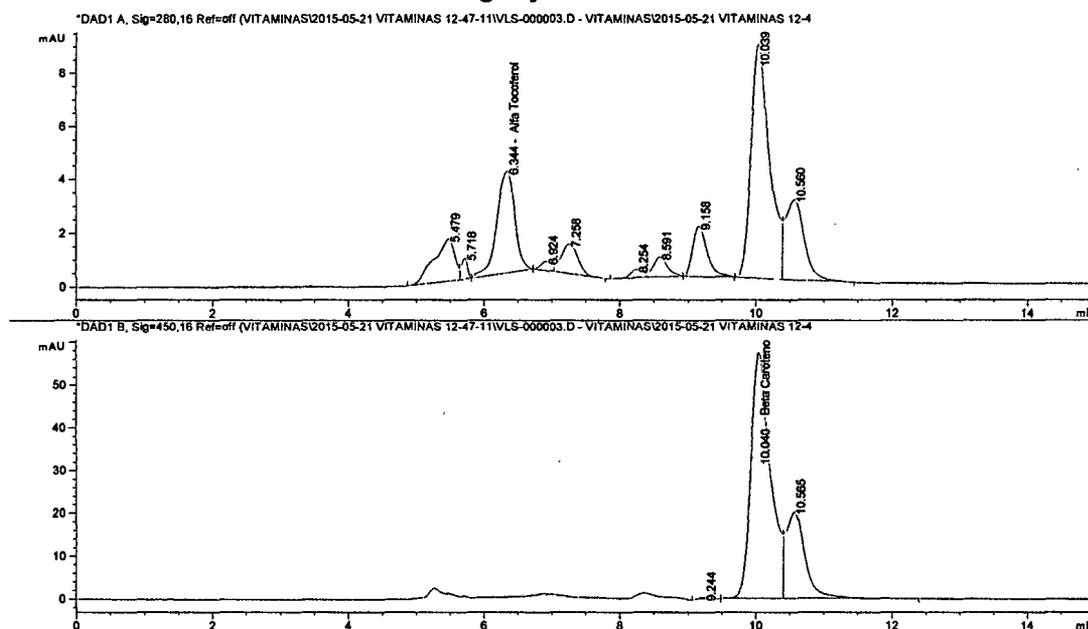


Figura 37. Cromatograma HPLC del aceite crudo de aguaje

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

Previo a los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las fracciones obtenidas por cromatografía en columna a temperatura ambiente (20°C), fueron aplicadas a una placa cromatografía (TLC) para poder identificar la presencia del α -tocoferol y β -caroteno, como se puede apreciar en la figura 38, en la parte superior se observa unas manchas de color amarillo que indica la presencia del β -caroteno y en la parte inferior casi en el centro de la placa se muestra unas manchas blancas identificadas como el α -tocoferol, todas las fracciones comparados con los estándares de referencia de α -tocoferol y β -caroteno.

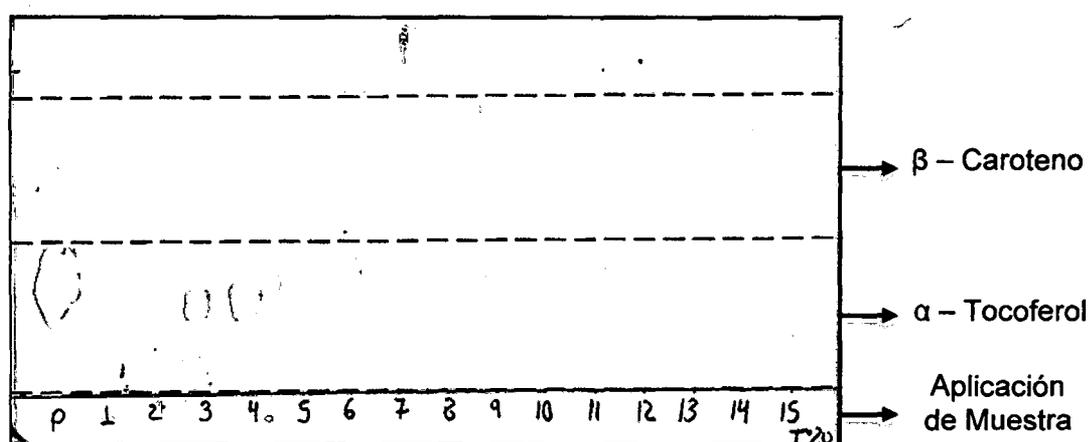


Figura 38. Separación de α -Tocoferol y β -Caroteno por TLC (Temperatura de trabajo de cromatografía en columna a 20° C).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Dónde: P (Estándar de referencia de α -tocoferol y β - caroteno); 1 al 15 (fracciones obtenidas de cromatografía de columna a 20°C).

Como se puede apreciar en el cuadro 32, las fracciones seleccionadas para el análisis de HPLC fueron: fracción 2-A, fracción 4 y 5 punto medio, y fracción 12. Los resultados obtenidos son comparados con el aceite crudo de Aguaje, en la fracción 2-A se encuentra un mayor contenido de β -caroteno de 17.51417 μg , en la fracción 12 hay una mayor concentración de α -tocoferol de 126.32275 μg y en la fracción 4 y 5 se encuentra presencia de α -tocoferol (34.02314 μg) y β -caroteno (13.56725 μg). En la figuras 39, 40 y 41, se puede apreciar los Cromatograma respectivas de cada una de las fracciones analizadas por HPLC.

Cuadro 32. Análisis de α -Tocoferol y β -Caroteno por HPLC de las fracciones obtenidas de cromatografía preparativa en columna a temperatura de 20°C.

Muestra 100 μ L	α -Tocoferol (μ g)	β -Caroteno (μ g)
2 – A	6.88120	17.51417
4 y 5	34.02314	13.56725
12	126.32275	9.35631

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

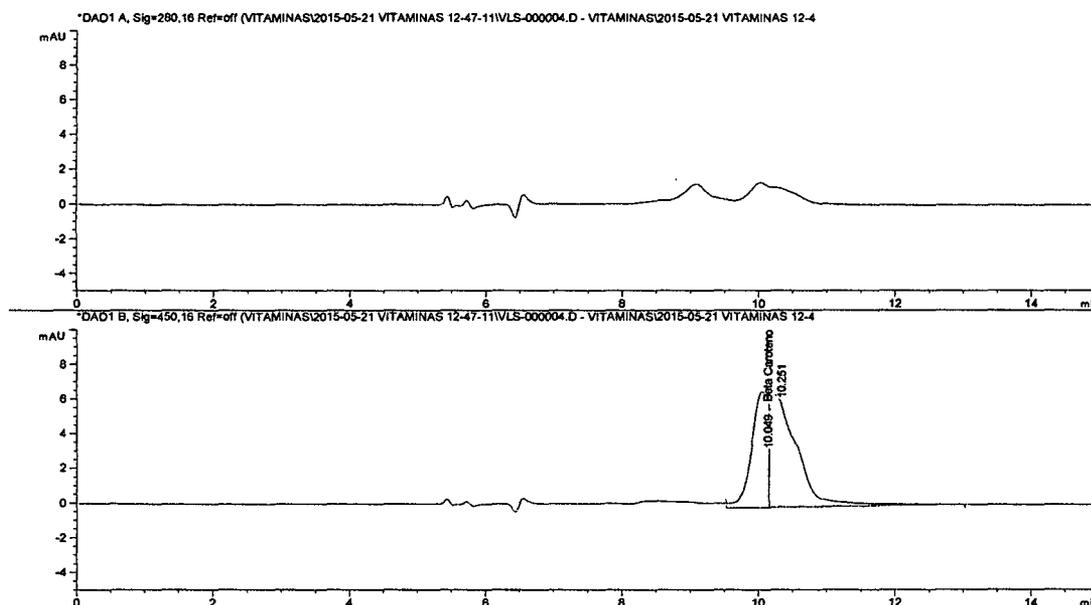


Figura 39. Cromatograma por HPLC de la fracción 2 – A

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

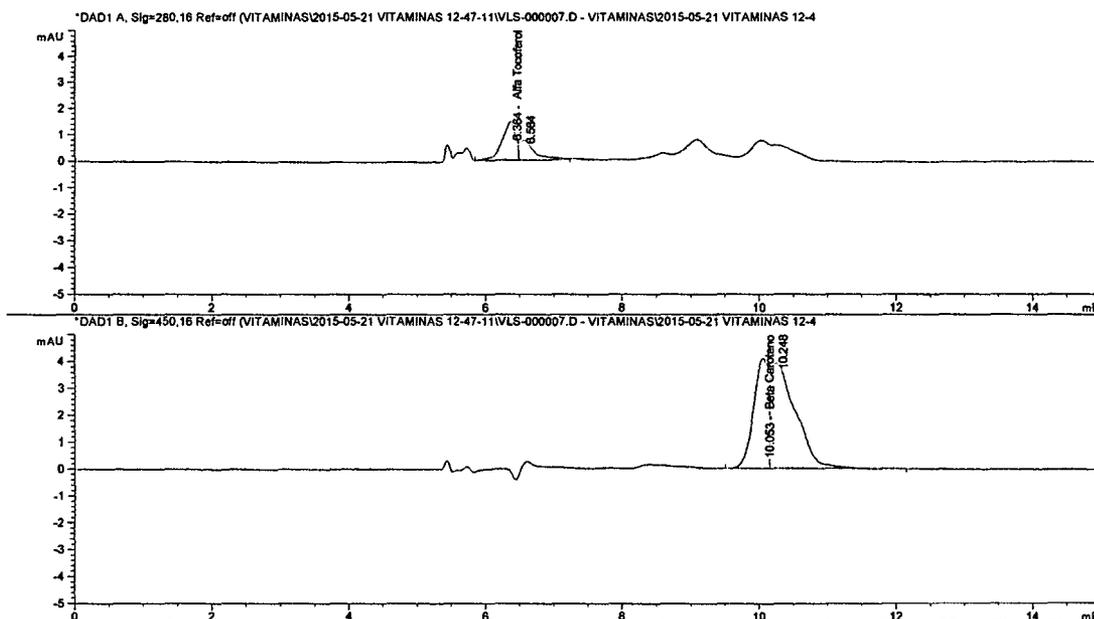


Figura 40. Cromatograma HPLC de la fracción 4 y 5

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

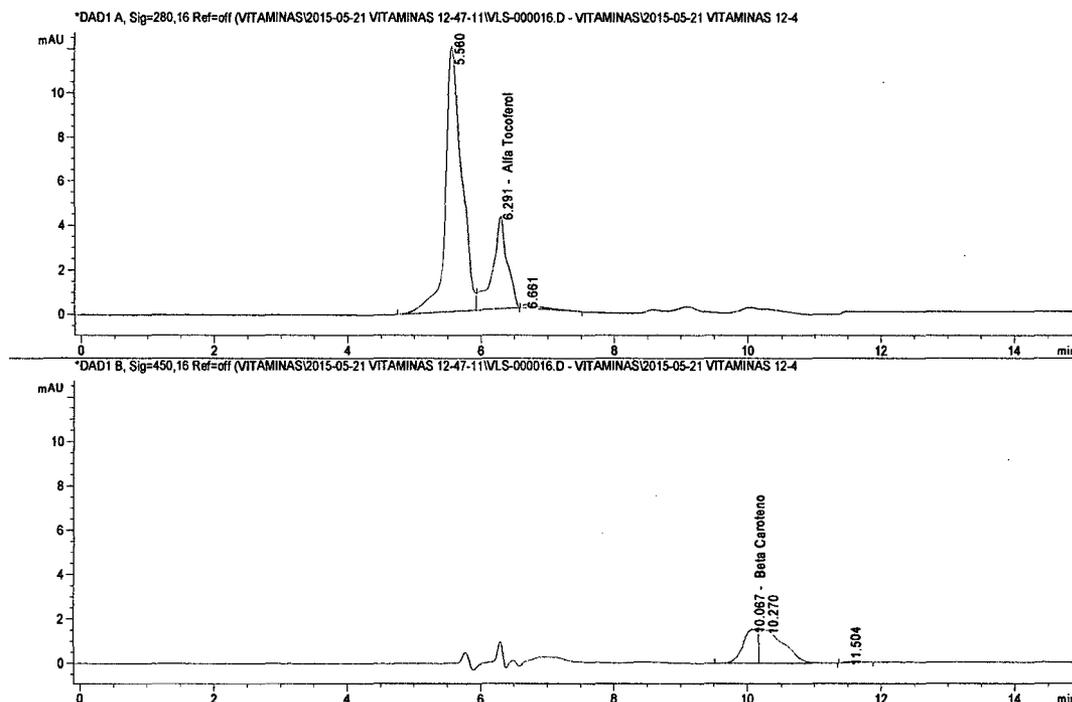


Figura 41. Cromatograma HPLC de la fracción 12

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

El aceite de aguaje sometido a destilación a vacío y posterior al fraccionamiento por cromatografía en columna se obtuvo 15 fracciones de las cuales se seleccionaron 3 fracciones más representativas según las pruebas preliminares por cromatografía de capa delgada.

Se cogieron las fracciones 2-A, 4 y 5, 12 porque se observaron a simple vista mayores concentraciones de α -Tocoferol y β -Caroteno. Del análisis realizados a estas fracciones se obtuvo como resultado por cromatografía de alta eficiencia (HPLC), en la fracción 2-A una mayor concentración de β -caroteno 17.51417 μg y menor concentración de α -tocoferol, se tomó como punto medio las fracciones 4 y 5 el cual se mezclaron en una sola fracción obteniéndose así una moderada cantidad de α -tocoferol (34.02314 μg) y β -caroteno (13.56725 μg), en la fracción 12 se observa una alta concentración alfa tocoferol 126.32275 μg y una baja concentración de beta caroteno, de la fracción 2-A y fracción 12 se logró separar β -caroteno y α -tocoferol como se muestra en la figura 42.

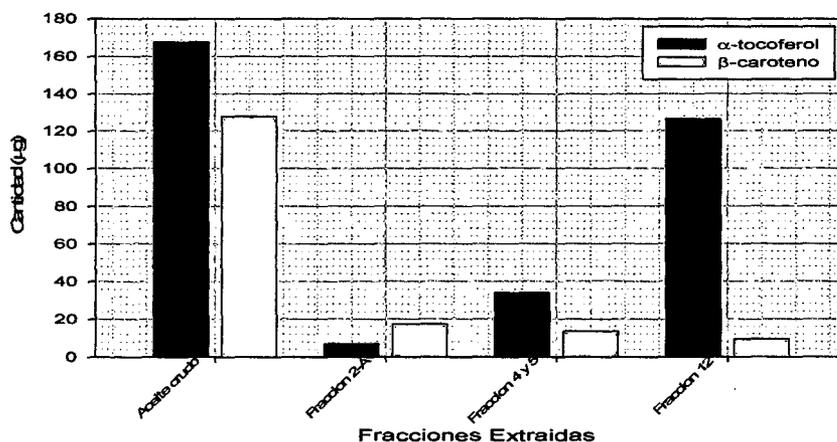


Figura 42. Contenido de α -tocoferol y β -caroteno en Aceite de Aguaje y aceite después del proceso de separación en fracciones por cromatografía de columna. (Temperatura de trabajo, 20 °C).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Previo a los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las 15 fracciones obtenidas por cromatografía en columna a temperatura ambiente (40°C), fueron aplicadas a una placa cromatografía (TLC) para poder observar la presencia y concentración de α -tocoferol y β -caroteno, como se puede apreciar en la figura 43. En la parte superior se observa unas manchas de color amarillo que indica la presencia del β -caroteno y en la parte inferior casi en el centro de la placa se muestra unas manchas blancas identificadas como el α -tocoferol, todas las fracciones comparados con los estándares de referencia de α -tocoferol y β -caroteno.

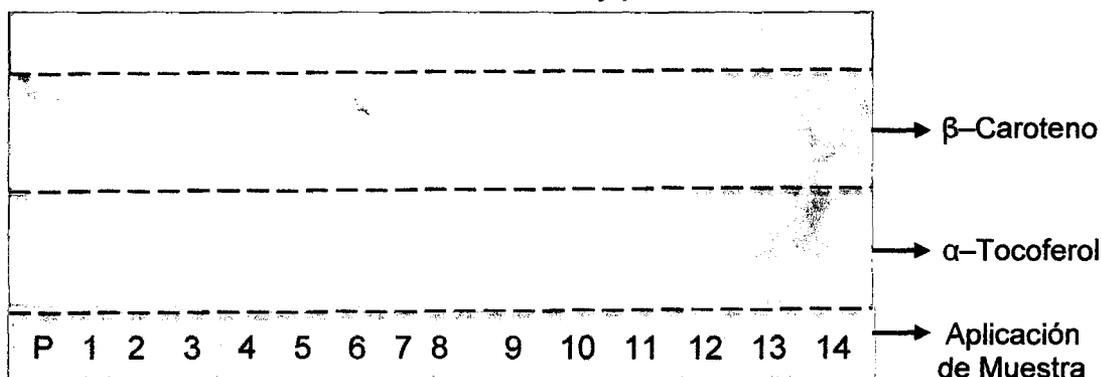


Figura 43: Separación de α -Tocoferol y β -Caroteno por TLC (Temperatura de trabajo de cromatografía en columna a 40° C).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

Dónde: P (Estándar de referencia de alfa tocoferol y beta caroteno); 1 al 15 (fracciones obtenidas de cromatografía de columna a 40°C)

Como se puede apreciar en el cuadro 33, las fracciones seleccionadas para el análisis de HPLC fueron: fracción 2-B, fracción 6 y 7 punto medio, y fracción 13. Los resultados obtenidos son comparados con el aceite crudo de aguaje, en la fracción 2-B se encuentra un mayor contenido de β -caroteno de 20.12350 μ g, en la fracción 13 hay una mayor concentración de α -tocoferol de 93.19943 μ g y en la fracción 6 y 7 se encuentra presencia de α -tocoferol 32.84384 μ g y β -caroteno 9.82095 μ g.

Cuadro 33. Análisis de α -Tocoferol y β -Caroteno por HPLC de las fracciones obtenidas de cromatografía preparativa en columna a temperatura de 40°C.

Muestra 100uL	Alfa Tocoferol μ g	Beta Caroteno μ g
2 – B	4.75364	20.12350
5 y 6	32.84384	9.82095
13	93.19943	7.45029

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

En las figuras 44, 45 y 46 se puede apreciar los cromatogramas respectivos de cada una de las fracciones seleccionadas analizadas por HPLC.

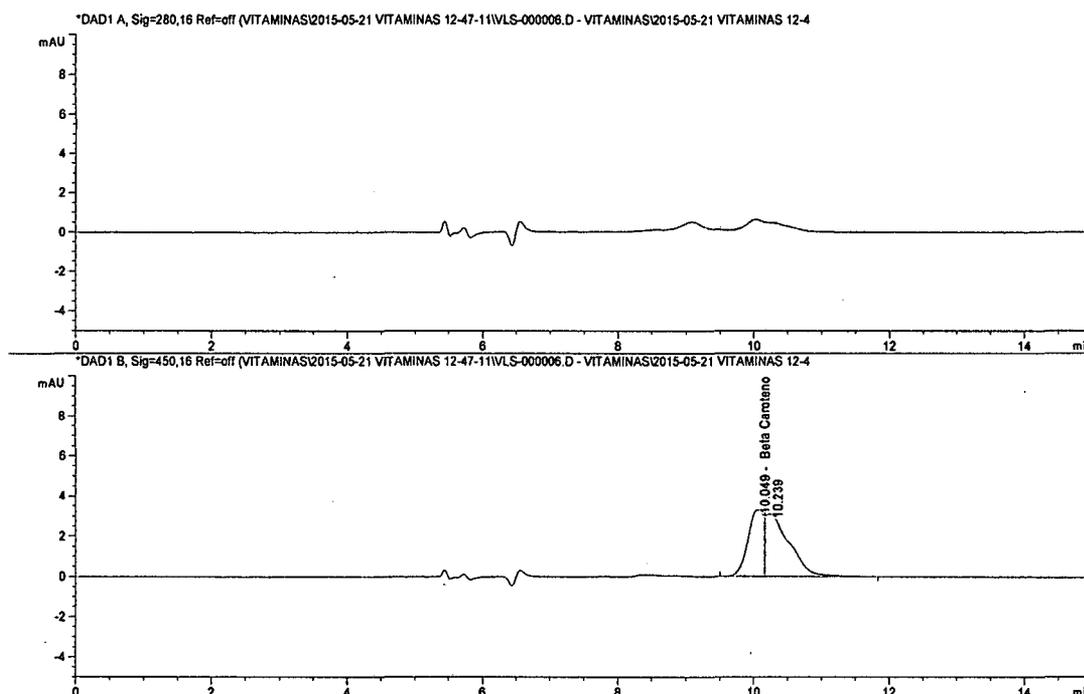


Figura 44. Cromatograma HPLC de la fracción 2 – B

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

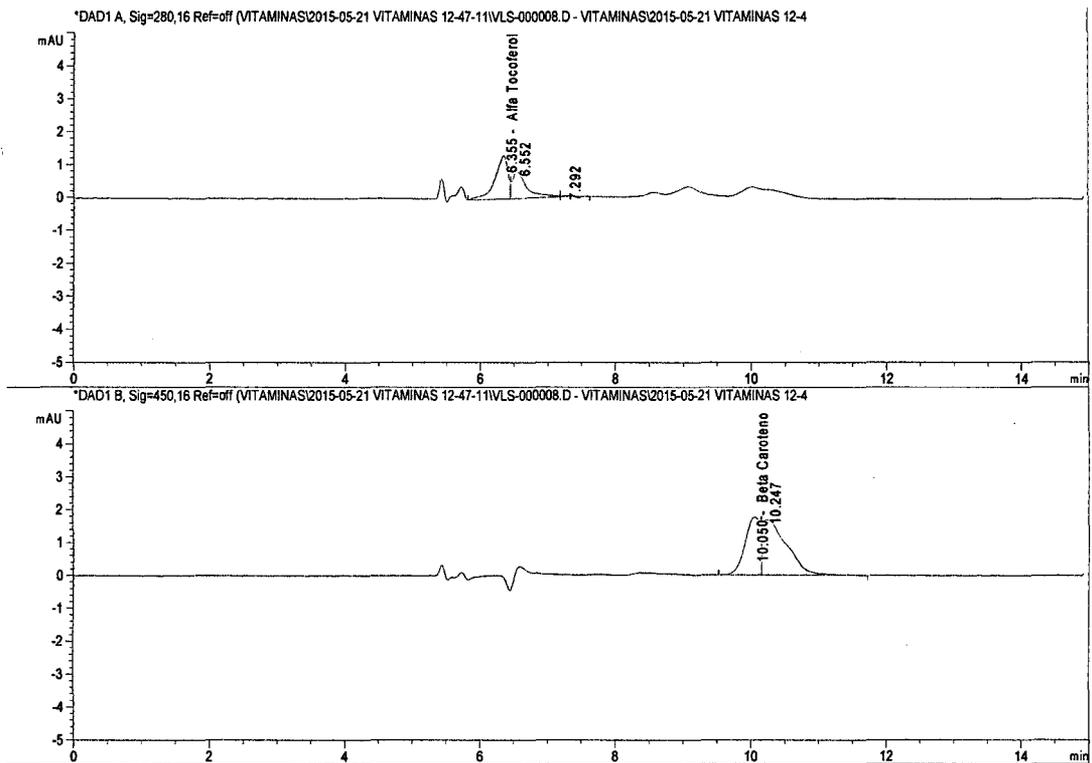


Figura 45. Cromatograma HPLC de la fracción 6 y 7

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

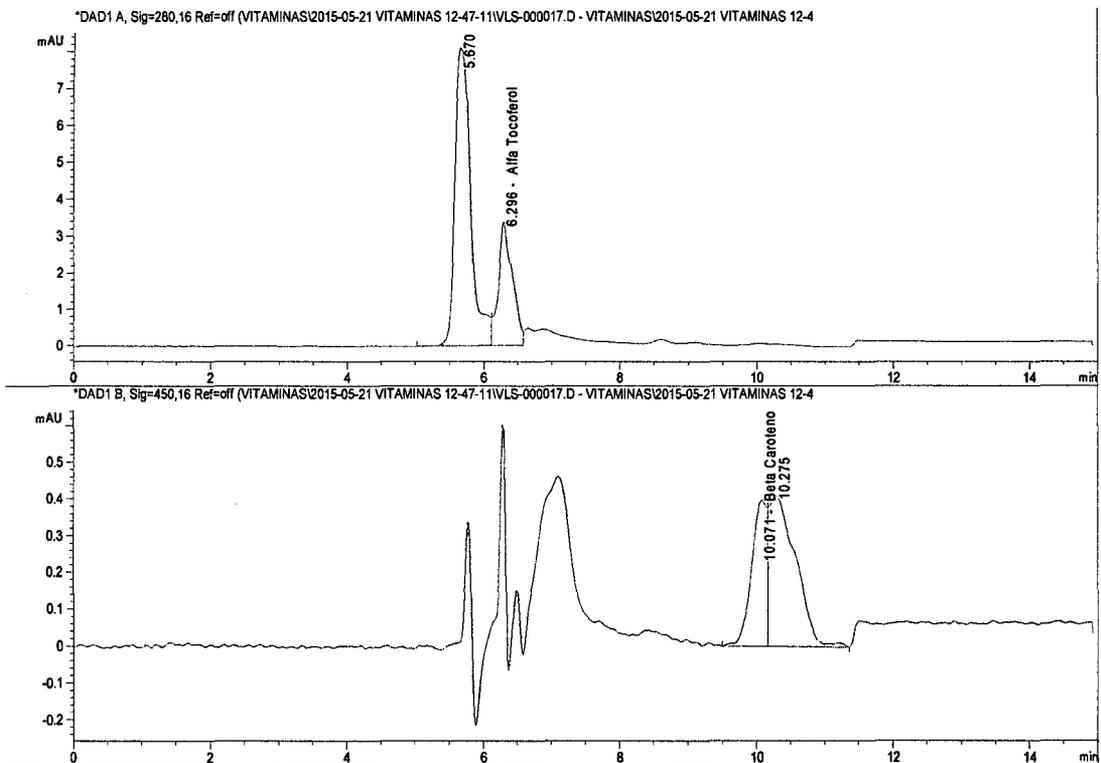


Figura 46. Cromatograma HPLC de la fracción 13.

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia–UNSAAC, (2015).

En la figura 47, se observa el resultado de la cromatografía de alta eficiencia (HPLC) a temperatura de 40°C, en comparación del aceite de aguaje crudo y aceite de aguaje del producto fondo obtenido de la destilación. En la fracción 2-B, se encuentra una mayor concentración de β -caroteno 20.1235 μg , en la fracción 13 se obtuvo mayor concentración de α -tocoferol 93.19943 μg , la fracción 5 y 6 no se obtuvo mucha diferencia en la concentración de β -caroteno y α -tocoferol, del cual podemos decir que en las fracciones 2-B y 13 se ha separado mayores concentraciones β -caroteno y α -tocoferol respectivamente.

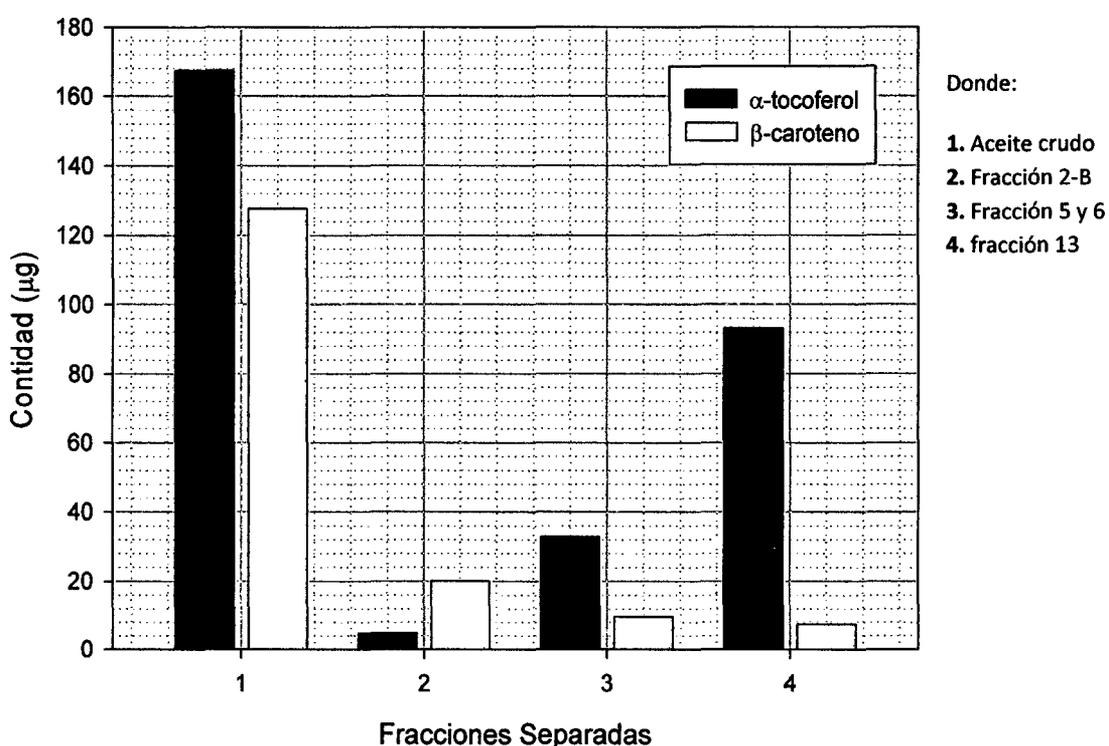


Figura 47. Contenido de α -tocoferol y β -caroteno en aceite de aguaje y aceite después del proceso de separación en fracciones por cromatografía de columna. (Temperatura de trabajo, 40 °C).

Fuente: Elaboración Propia, (2015).

CONCLUSIONES

- ↪ La composición de ácidos grasos en aceite de aguaje, analizados por cromatografía de gases (GC-MS), en mayor proporción fueron: ácido oleico 71.864 %, seguido de Ácido palmítico 21.651 % y en menor proporción en Ácido elaidico 2.506 % y Ácido esteárico 2.183 %. También se analizaron por HPLC, el contenido de β -caroteno 127.7621 μg y α -tocoferol 167.46000 μg .
- ↪ Se estableció las condiciones óptimas de operación del proceso de destilación discontinua a presión reducida de 2 mBar y temperatura del hervidor 172 °C, con un tiempo de destilación de 40 min logrando separar los ácidos grasos libres en el destilado y el producto fondo contenido de α -tocoferol y β -caroteno.
- ↪ El comportamiento fenomenológico en el proceso de destilación establecido a través de ecuaciones matemáticas de superficie respuesta, para una confiabilidad del 95 %, ajustan adecuadamente, corroborados a través de los estadísticos como el coeficiente de determinación del modelo ajustado, siendo los modelos, Para cada uno de estos coeficientes el test-t, nos indica que representan con mínimo error. El modelo matemático se presenta en la ecuación: $z = 28.652 - 37.8398 * X_1 + 0.5015 * X_2 - 0.0825 * X_1 * X_2$

$$\text{Destilado}(mL) = 70.0159 + 12.0317 \times P - 1.19048 \times T - 0.1778 \times P \times T$$

$$\text{Fondos}(mL) = 63,5873 - 39,8254 * P + 0,852381 * T + 0,622222 * P * T$$
- ↪ Las condiciones de operación del proceso de separación por cromatografía preparativa en columna, se ha establecido que la mezcla de hexano: éter etílico (8:2 v/v), muestra una mejor habilidad para separar β -caroteno y α -tocoferol.
- ↪ Se realizó el análisis por cromatografía de gases (GC –MS), del destilado del aceite de aguaje obteniéndose mayor concentración el ácido palmítico 32.745% y en cuanto el grado de fraccionamiento y purificación del producto fondo, los tocoferoles y carotenoides se fraccionaron por cromatografía preparativa en columna (temperatura de 20°C y 40°C). Donde se realizó el análisis por HPLC – UV- VIS. A temperatura de 20°C en la fracción 12 se logró separar mayor concentración de α -tocoferol 126.32275 μg y a temperatura de 40°C en la fracción 2-B, se logró obtener mayor concentración de β -caroteno 20.12350 μg .

RECOMENDACIONES

- ↪ Determinar el tiempo de vida en anaquel del aceite de aguaje como un producto final para el mercado.
- ↪ Evaluar el efecto de esterificación en la composición de ácidos grasos libres, tocoferoles y carotenos presentes en el aceite de aguaje.
- ↪ Evaluar la eficiencia de otros solventes orgánicos como hexano: acetona (v/v), para la separación de carotenos y tocoferoles por cromatografía preparativa en columna.
- ↪ Realizar estudios sobre el efecto de la degradación de los carotenos en el proceso de destilación a vacío en aceites vegetales de acuerdo a la temperatura y presión de vacío.

BIBLIOGRAFÍA

1. A.O.A.C. Manual of Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists'. Five tenth editions. USA; 1998, Vol. 2.
2. Abidi, S. L. (2000); "Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants". Journal of Chromatography A. 881, 192 – 216.
3. Albuquerque Marcos I. S., Ildeguedes, Petrus Alcantara Jr., Sanclayton g. C. Moreira, Newton m. Barbosa neto, c Daniel s. Correa and Sergio c. Zilio, (2005); "Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa L.*) Oil by Absorption and Emission Spectroscopies". Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará – Brasil.
4. Avalos C. sd. (2006). "Aguaje Árbol de salud y misticismo". Iquitos- Perú.
5. Batistella C.B. y Wolf Maciel M.R. (2008). "Recovery of carotenoids from palm oil by molecular distillation". Separation process development laboratory. Faculty of chemical engineering, state university of campinas, (UNICAMP). Campinas - SP, Brazil. Batistella C.B. y Wolf Maciel M.R. (2008).
6. Britton G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, A. Z. Mercadante, E. S. (2004). "Carotenoids and Colour in Fruit and Vegetables", Oxford – U.S.A.
7. Burns, J., Fraser, P. D., Bramley, P. M. (2003), "Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables" – California.
8. Carranco Jáuregui, María Elena; Ma. de la Concepción Calvo Carrillo, Fernando Pérez-Gil Romo (2011). "Carotenoides y su función antioxidante", Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. México, D.F., México.
9. Castillo d. (2006). "La Maravillosa Palmera de la Amazonia". Perú.
10. Ceriani R, Silva M. Simone, Sampaio A. Klicia, Taham T., Rocco A., Meirelles A. J. A. (2009). "Characterization of oil Extracted from Buriti Fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the brazilian amazon region". Food Engineering

Department, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo – Brasil.

11. Chu B.S., Baharin B.S, Quek S.Y. y Che Man Y.B. (2003). "Separation of tocopherols and tocotrienols from palm fatty acid destillate using hidrolisis – neutralization – adsorption chromatography method". Departamento of food technology, departamento of food science. Faculty of food science and biotecnology, universiti putra malaysia. Selangor D.E., Malaysia.
12. Codex Alimentarius, (1992). Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. CODEX STAN 19-1992 (Rev. 2–1999).
13. Da cruz Rodríguez Antonio M., Sylvain Darnetand Luiza h. Meller da silva; (2010). "Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits". Instituto de Ciencias Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belem – Brasil.

Departamento de Física, Universidade Federal do Para, Campus do Guama, 66715 -110 Belem – PA, Brazil.

14. Dos Santos Lima, Luís; dos Santos Cople LIMA, Keila; Joppert Coelho, Maysa; Michele SILVA, Jaqueline; Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Sidney Pacheco, (2009). "Avaliação dos Efeitos da Radiação Gama nos Teores de Carotenóides, Ácido Ascórbico e Açúcares do Fruto Buriti do Brejo (*Mauritia flexuosa L.*)", Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Cromatografia Líquida, Ciência e Tecnologia de Alimentos – Brasil.
15. García de Sotero Dora, Sandoval del Águila Jorge, Saldaña Ramírez Robinson, Cárdenas de Reátegui Gladys, Soplín Ríos José Antonio, Sotero Solís Víctor, Pavan Torres Rosángela y Mancini Filho Jorge. (2008), "Fraccionamiento e interesterificacion del aceite de palma (*Elaeis guineensis*) cultivado en la amazonia peruana", Perú.
16. Gunstone, F. D. (2002); "Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses", Blackwell Publishing: Oxford – U.S.A.

17. Gunstone, F. D. E Padley, F. B. (1997). "Lipid technology and applications". Ed. Marcel Dekker Inc., New York – U.S.A.
18. Gunstone, F.D., Harwood, J.L., & Dijkstra, A.J. (Eds.) (2007). "Nonfood uses of oils and fats". *Third Edition*, Boca Raton, Florida – U.S.A.
19. IIAP. Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (2006). "La Maravillosa Palmera de la Amazonia". Yurimaguas – Perú.
20. Ingunza Reyes G. (2009). "Extracción caracterización y refinación de aceite de pulpa y cascara del Aguaje (*M. flexuosa*)". tesis de ingeniero de industrias alimentarias. Facultad de industria alimentaria, Universidad nacional agraria la Molina. Lima – Perú.
21. José Luis Calle Maraví (UNALM), Javier Coello Guevara (ITDG) Y Paula Castro Pareja (UNALM), (2004); "Identificación del nivel de desarrollo del aguaje (*M.flexuosa*) en valor agregado". Facultad de industria alimentaria, Universidad nacional agrarian la Molina. Lima – Perú.
22. Lausberg, N., Josten, H., Fieg, G., Kapala, T., Christoph, R., Suessenbach, A., Heidbreder, A., Mrozek, I., & Schwerin, A. (2008). "Process for obtaining fatty acids with improved odor, color and heat stability". U.S. Patent 7,449,088.
23. LI, S.; Wang, Y.; Dong, S.; Chen, Y.; Cao, F.; Chai, F.; Wang, X. (2009); "Biodiesel production from Eruca Sativa Gars vegetable oil and motor, emissions properties". Renewable Energy, Oxford .U.S.A.
24. M. Pramparo, S. Prizzon y M.A. Martinello (2005). "Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización". Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Río Cuarto, Cordoba – Argentina.
25. Maguire, L., O'sullivan, S., Galvin, K., O'connor, T. y O'Brien. 2004. "Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnut, almonds, peanuts, hazelnuts and macadamia nut". International Journal of Food Science and Nutrition. 55(3): 171-178.

26. Mahan L. K.; Escott-Stump, S. (2002). Krause. "Alimentos, Nutricion & Dietoterapia" 10ª ed., Sao Paulo – Brasil.
27. Martin, C.A.et al. (2006). "Ácidos graxos poliinsaturados omega 3 e omega-6 importancia e ocorrencia em alimentos". Revista de nutricao, campinas. São Paulo – Brasil.
28. Martinez A. (2003). "Carotenoides". Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Colombia. 10p.
29. Mayumi Ito Vanessa, (2007). "Concentracion de tocoferoles e fitoesteroles a partir del destilado desodorizado de óleos vegetales a través del proceso de destilacion molecular". Teses do doutorado em engenharia de alimentos. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo – Brasil.
30. Melendez Martinez, A. J. Vicario, I. M. Heredia, f j. (2004). "Importancia Nutricional de los Pigmentos Carotenoides". *Archivos latinoamericanos de nutrición*, Caracas, v. 54, n. 2, p.:149- 155.
31. Navarro, B. (2006). "Estudio de las cadenas productivas de Aguaje y Tagua", Reserva Nacional Pacaya Samiria. Perú. 103 pág.
32. Packer L., Kraemer K., Obermüller-Jevic U., and Sies H. (2005). "Carotenoids and Retinoids: Molecular Aspects and Health Issues, AOCS Press". California.
33. Panduro, Melina K. (2010). "Plan de negocio para una planta procesadora de aguaje en Puerto Maldonado - Madre de Dios" Pro-Naturaleza, fondo de las américas, USAID. Madre de Dios – Perú.
34. Pascual Chagman, Gloria J. (2009). "Caracterización de aceites especiales extraídos de frutos de unguahui (*Jessenia polycarpa*) y aguaje (*Mauritia flexuosa*) de la Comunidad Nativa de Nuevo Canan del Distrito de Balsa Puerto – Loreto" Facultad de Industria Alimentaria, Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima – Perú.

35. Robeiro, B.D.Rafaella Ferreira Nascimento, Daniel Weingart Barreto⁴, Maria Alice Zarur Coelho, Suely Pereira Freitas. (2008). "Uso de etanol comercial para extracción y fraccionamiento simultaneo de carotenoides de Buriti (*Mauritia flexuosa*)", Universidad Federal de Rio de Janeiro – Brasil.
36. Rodriguez - Amaya, Delia B. (2001). "A guide to carotenoid analysis in food". Washington – U.S.A.
37. Rodriguez Amaya, D.B. (2002). "A bounty of carotenoid sources". Sight and life Newsletter, Basel, n. 4 p. 3-9.
38. Rohr R, Trujillo-Quijano JA. "Process for Extraction and Concentration of Liposoluble Vitamins", Growth Factors and Animal and Vegetable Hormones from Residues and By-products of Industrialized Animal and Vegetable Products. U.S. Patent No 6,344,573.
39. Rojas R, Salazar J, Llerena CH, Rengifo S, Ojanama J, Muñoz V. (2001). "Industrialización primaria del Aguaje (*Mauritia Flexuosa L.f.*)" Iquitos Perú.
40. Rojas R.R. (2000), "Estado del conocimiento sobre el Aguaje en Iquitos". Perú.
41. Rubinson (2001), "Análisis Instrumental" Editorial Pretice Hall. 2008. Análisis Químico Cuantitativo Daniel Harris 3era edición 2007 Editorial Reverté Universidad Central De Venezuela, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, instrumental Analítico. – Venezuela.
42. Santos L.M.P (2005). "Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia". The American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v.49, p.849-853, 1989.
43. Sayago, M.I. Marín, R. Aparicio, y M.T. Morales. (2007). "Vitamina E y Aceites Vegetales". Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla - España.
44. Silva M. Simone, Rocco A. Silvana, Sampaio Araujo Klicia, Meller da Silva Luiza H., Ceriani Roberta, Meirelles A. J. Antonio. (2011). "Validation of a method for simultaneous quantification of total carotenes and tocopherols in

vegetable oils by HPLC". Department of Food Engineering, School of Food Engineering, UNICAMP, Campinas, SP- Brazil

45. Sylvain Darnetand, Luiza h. Meller da silva; Da cruz Rodríguez Antonio M., Roseana Telles Lins (2011). "Composição centesimal, em ácidos graxos das polpas amazônicas de buriti (*Mauritia flexuosa*) e de patawa (*Oenocarpus bataua*)". Instituto de Ciências Biológicas / ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Pará, (UFP), Belem – PA. Brasil.
46. Trevejo C. E. (2003). "Avances de la investigación en frutos oleaginosos de la Amazonia Peruana". Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONCYTEC – Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Perú.
47. Verleyen, T.; Van Dyck, S.; Adams, C. A. (2005); Accelerated Stability Tests: "*Analysis of Lipid Oxidation*", 5th ed.; AOCS Press: Champaign – U.S.A.

ANEXOS



Figura 48. Cosecha del Aguaje
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 49. Desgranado del Fruto
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 50. Selección del Fruto
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

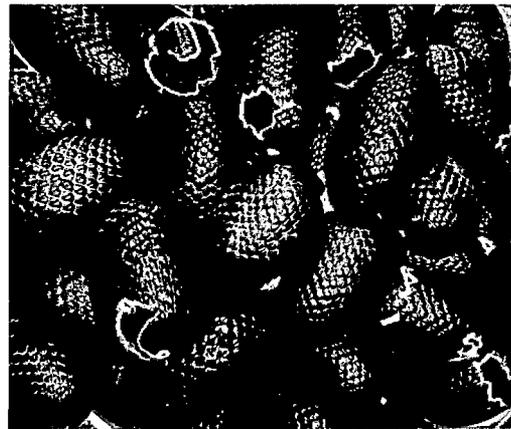


Figura 51. Fruto Maduro
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

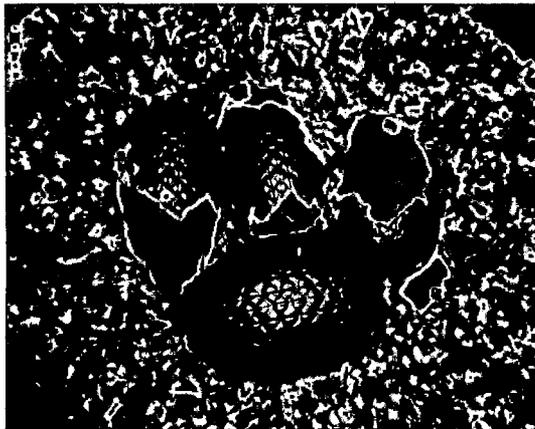


Figura 52. Despulpado
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 53. Pulpa de Aguaje
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

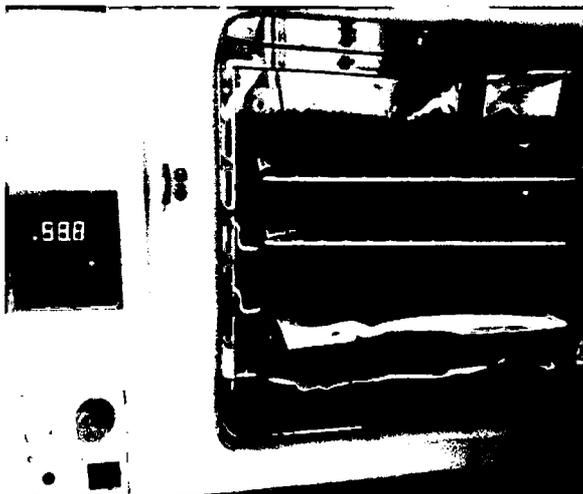


Figura 54. Secado de la muestra
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

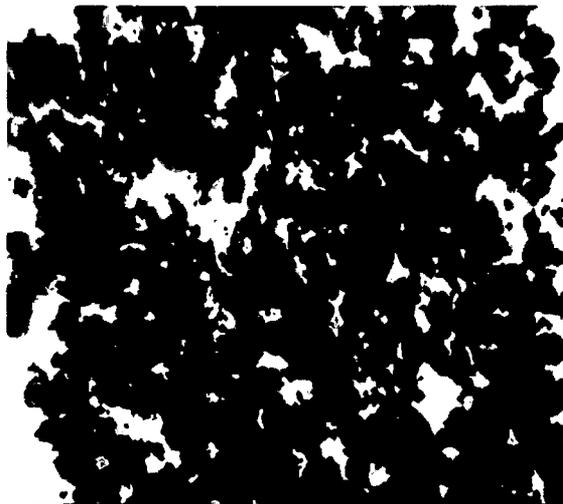


Figura 55. Muestra deshidratada
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 56. Prensado
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 57. Aceite Crudo de Aguaje
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 58. Solución NaOH/ Metanol
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 59. Esterificación
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 60. Decantación
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 61. Filtración
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

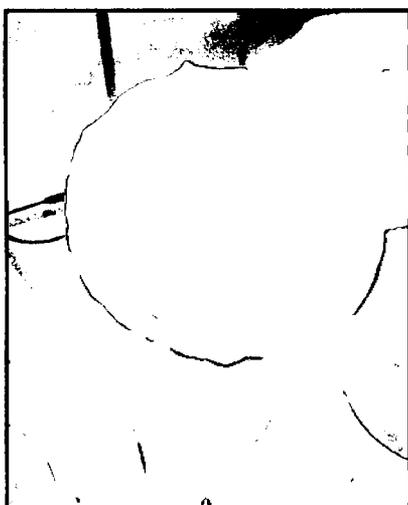


Figura 62. Glicerina (Borra)
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 63. Equipo de Destilación
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 64. Destilado (AGL)
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 65. Producto Fondo (P:2 mBar)
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 66. Cromatografía de gases

Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

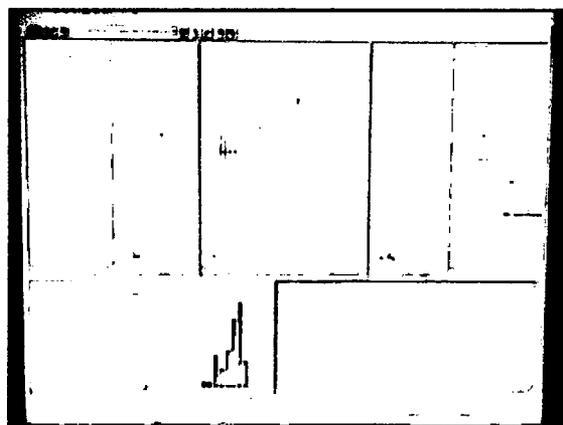


Figura 67. Cromatograma AGL.

Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

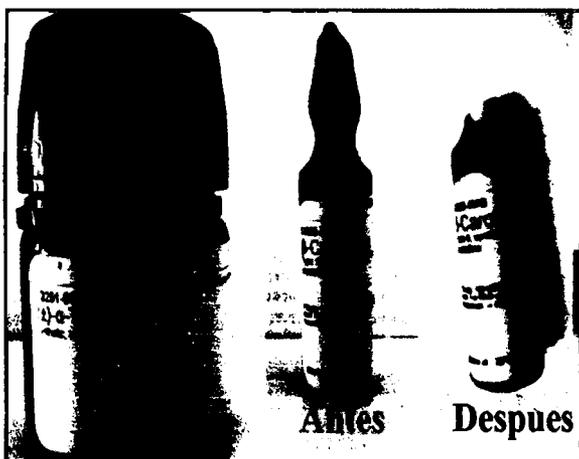


Figura 68. Estándares (α -tocoferol y β -caroteno)

Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

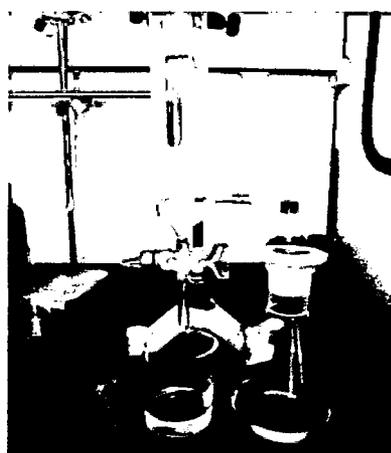


Figura 69. Cromatografía preparativa en Columna 20°C

Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 70. Cromatografía preparativa en columna 40°C

Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

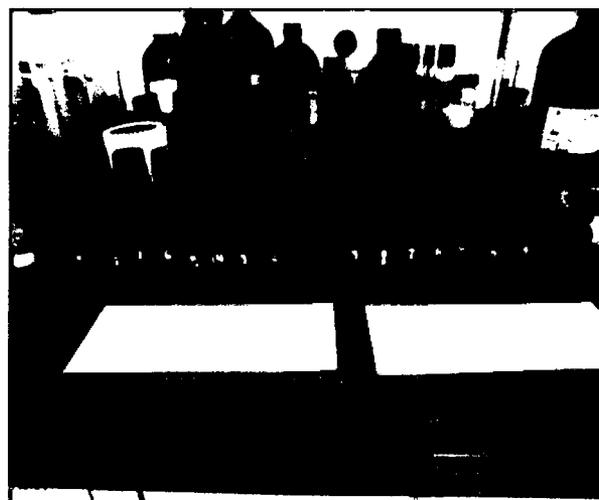


Figura 71. Fracciones recolectadas de cromatografía en columna

Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 72. Aplicación de las fracciones a cromatografía en capa delgada.
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 73. Cuba cromatografica
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 74. Cromatografía en capa delgada (TLC).
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 75. Revelador DPPH
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).



Figura 76. Resultado de aplicación de las fracciones
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

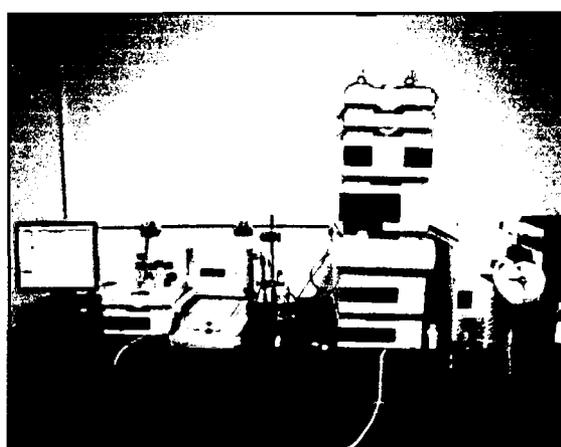


Figura 77. Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC
Fuente: Elaboracion Propia, (2015).

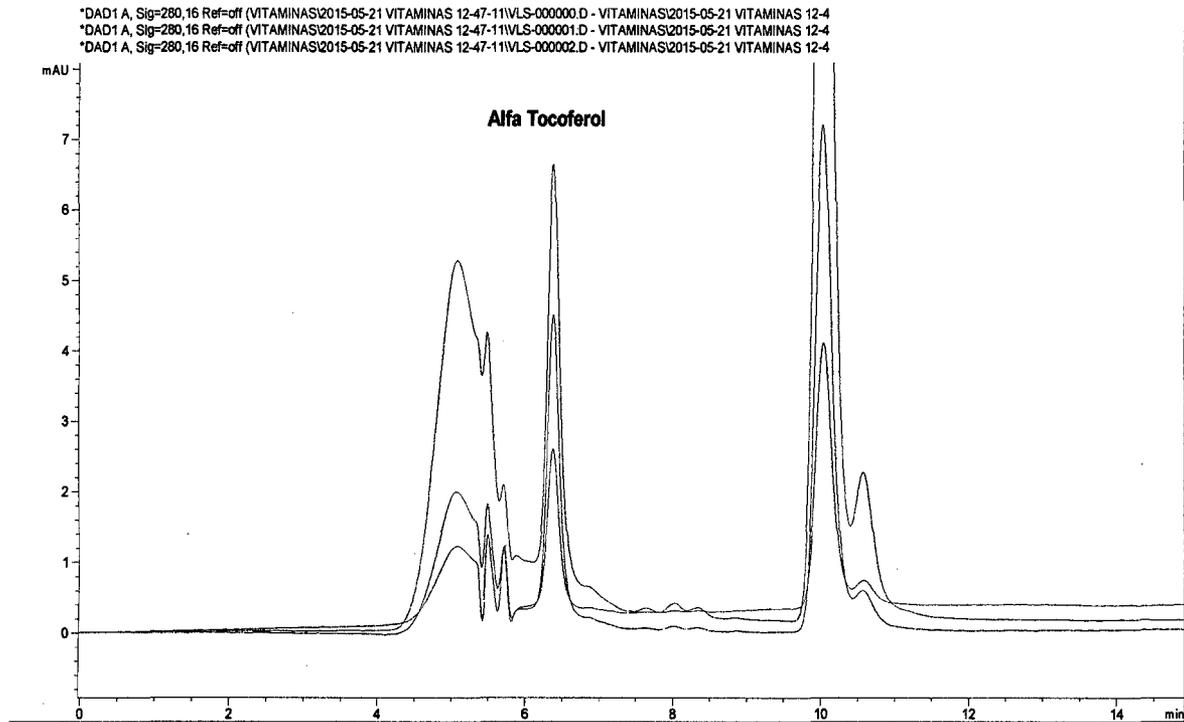


Figura 78: Cromatograma de α -Tocoferol (Estándar de Referencia)

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

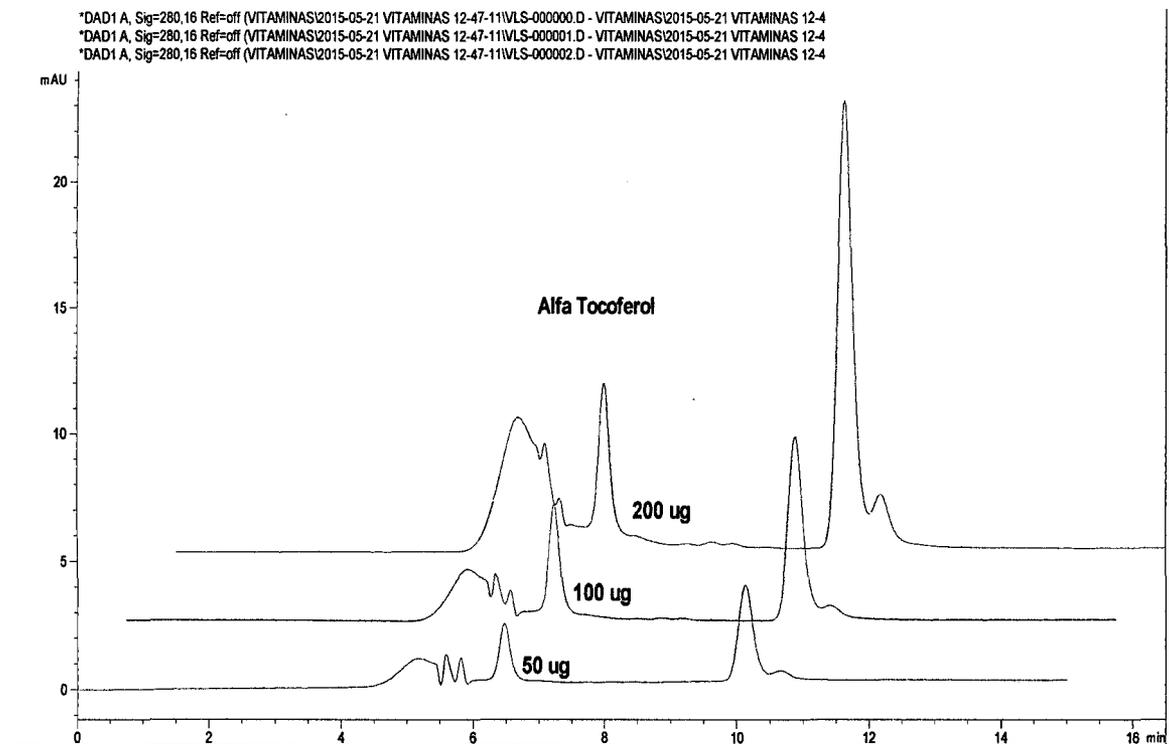


Figura 79: Cromatograma de α -Tocoferol (50, 100, 200 μ g) (Estándar de Referencia)

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

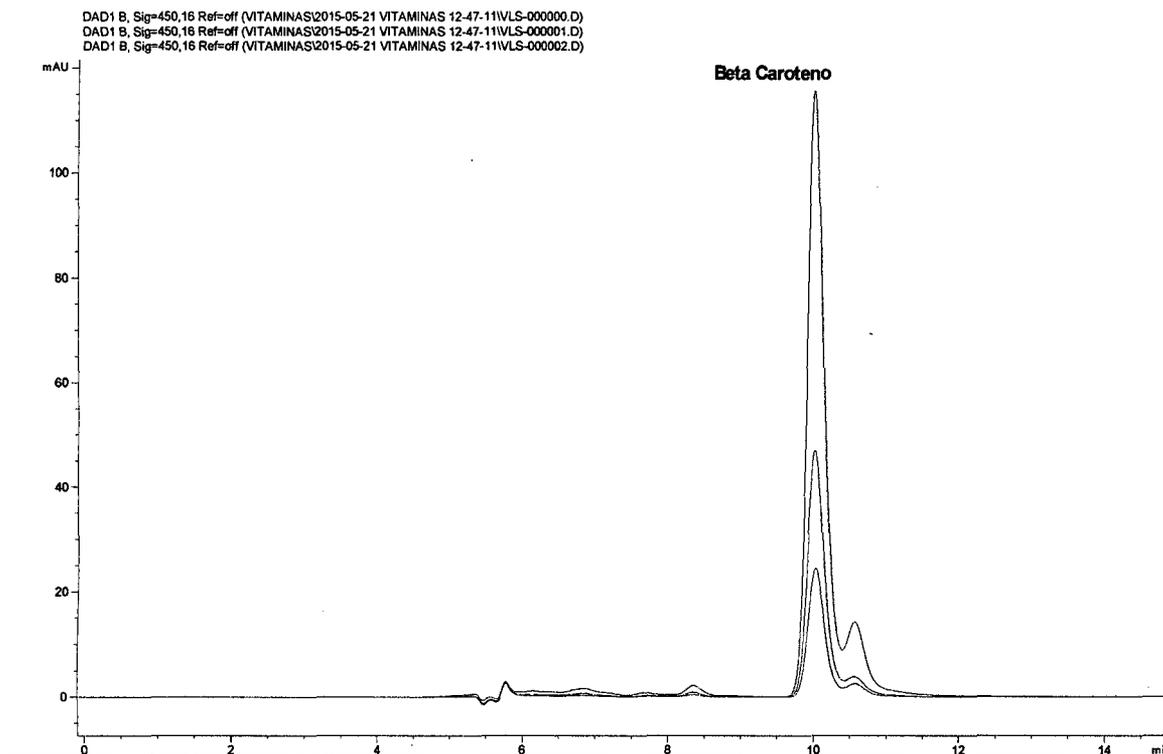


Figura 80: Cromatograma de β -Caroteno (Estándar de Referencia)

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).

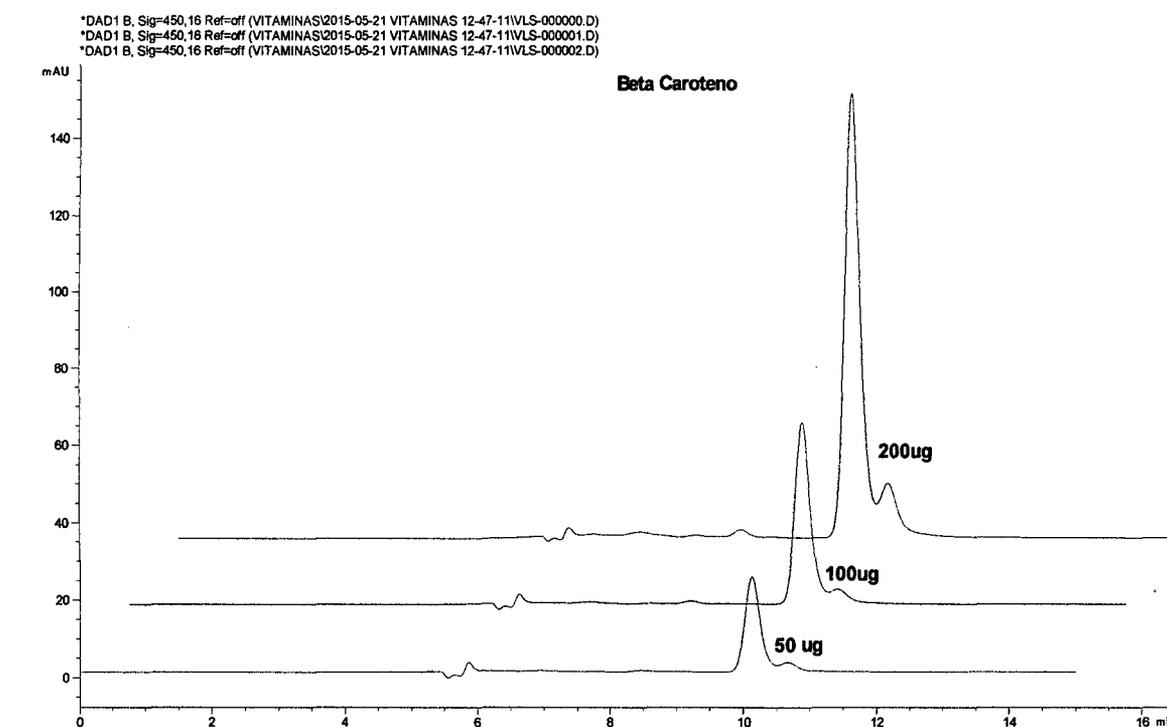


Figura 81: Cromatograma de β -Caroteno (50, 100, 200 μ g) (Estándar de Referencia)

Fuente: Laboratorio de Cromatografía de Ciencias Químicas y Farmacia – UNSAAC, (2015).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Av. de la Cultura 722
 Pabellón C - Of. 106

Apartado Postal 921 - Cusco Perú
 Teléfono - fax - modem: 224831

UNIDAD DE PRESTACIONES DE SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE QUIMICA
INFORME DE ANALISIS

Nº0657-14-LAQ

SOLICITANTE: ROSARIO SOLORZANO CUTIPA

SINTHIA SANERY QUISPE LUKANA

MUESTRA : ACEITE DE AGUAJES (*Mauritia flexuosa*)

FECHA : 0/29/10/2014

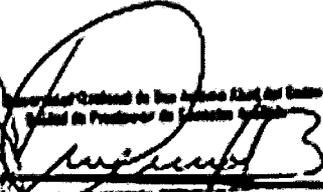
RESULTADO ANALISIS FISICOQUIMICO:

=====

Humedad %	0.12
Densidad g/cc 25°C	0.909
I.RI 25°C	1.4775
Punto Ebullición °C	355
Punto congelamiento °C	- 4
Punto Suro °C	382
I.I.	68
I.Saponificación	196.4
I.Peroxidos	1.26
Acidez % (Ac.Oleico)	0.14
Materia Insaponificable %	1.10

=====

Cusco, 07 de Noviembre 2014


 Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
 Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas
 Departamento Académico de Química
 Laboratorio de Análisis Químico
 Calle de la Cultura 722 - Cusco Perú



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855 - 944045605

CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, analista responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que las Srtas Sinthia Sanery Quispe Lukaña y Rosario del Pilar Solorzano Cutipa Bachilleres de la Escuela Académico profesional Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, han presentado al laboratorio 7 muestras de aceites de Aguaje para su cuantificación de carotenoides y tocoferoles como parte de su proyecto de investigación titulado: " Separación de Ácidos grasos libres, carotenoides y tocoferoles contenidos en el aceite de aguaje (*Mauritia flexuosa*) mediante destilación discontinua a vacío y cromatografía preparativa en columna". La cuantificación se realizo utilizando el Cromatógrafo liquido HPLC-DAD Agilent 1200, la identificación se basó en la comparación de las señales de la muestra con las señales del estándar de carotenoides y tocoferoles con los siguientes resultados:

Condiciones de Análisis Vitaminas Liposolubles por HPLC-DAD

Columna: Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5um
Pre-columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5um
Volumen de Inyección:	1.0 µl
Flujo de Columna:	0.5 ml/min.
Solvente A:	n-Propanol
Sistema de Análisis:	Isocrático
Longitud de Onda:	280 y 450 nm
Temperatura del Horno:	45.0°C
Tiempo de Análisis:	15 min.

Quím. Jorge Choquenaira Parí
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
 Av. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855 - 944045605

Resultados

Muestra 100uL	Alfa Tocoferol ug	Beta Caroteno ug
Aceite Puro	167.46000	127.7621
Fracción Vit A Puro	6.88120	17.51417
Fracción 2	4.75364	20.12350
Fracción 4 y 5	34.02314	13.56725
Fracción 6 y 7	32.84384	9.82095
Fracción 12	126.32275	9.35631
Fracción 13	93.19943	7.45029

Se expide la siguiente constancia a solicitud de las interesadas para los fines que
 viera por conveniente.

Cusco, 23 de Mayo del 2015

Arre

Quim. Jorge Choquenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRÍA - Pabellón de Control de Calidad
 Av. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855 - 944045605

CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, analista responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que las Srtas Synthia Sanery Quispe Lukaña y Rosario del Pilar Solorzano Cutipa Bachilleres de la Escuela Académico profesional Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, han presentado al laboratorio 2 muestras de aceites de Aguaje para su caracterización e identificación de Ácidos grasos como parte de su proyecto de investigación titulado: " Separación de Ácidos grasos libres, carotenoides y tocoferoles contenidos en el aceite de aguaje (*Mauritia flexuosa*) mediante destilación discontinua a vacío y cromatografía preparativa en columna". Dicho material ha sido caracterizado utilizando el Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N, acoplado a un Espectrómetro de Masas Agilent 6890N. La identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de cada componente con los datos compilados en la librería FAME23 y NIST011a.L. (Wiley), con los siguientes resultados:

Condiciones de Análisis de Ácidos Grasos

Cromatógrafo: **Agilent 6890N**
 Detector de Masas Agilent: **5975B**.
 Modo **Full scan**, Ionización **Impacto electrónico 70eV**
 Inyector Automático: **7683B**
 Columna: **DB-23, 60m x I.D 0.250 x 0.15um Film.**

Condiciones del cromatografo.

Temperatura del Horno inicial **50°C**
 Rampa:

Pasos	°C/min	temp °C	Final time
Inic.	0	140	
1	0	140	5.00
2	5.00	230	12.00

Tiempo de Corrida: **35.00 min**

Puerto de Inyección

Modo: **Split**
 Relación de Split: **1:1**
 Temp. Inicial: **225 °C**
 Tipo de Gas: **Helio**
 Flujo: **0.8 mL/min**
 Volumen de Inyección: **0.2uL**

Quim. Jorge Choquenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría - UNSAAC.
 COP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA - Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855 - 944045605

Resultados

Muestra AG-A

Pico	R.T. # min	Nombre	total %
1	17.276	Acido Palmitico C 16:0	21.6518
2	17.784	Acido Palmitoleico C 16:1	0.5228
3	20.649	Acido Estearico C 18:0	2.1838
4	21.157	Acido Oleico C 18:1(cis - 9) (omega 9)	71.8648
5	21.215	Acido Elaidico C 18:1 (trans-9)(omega9)	2.5068
6	21.856	No encontrado	0.5748
7	22.825	No encontrado	0.7008

Muestra AG-D

Pico	R.T. # min	Nombre	total %
1	17.292	Acido Palmitico C 16:0	32.7458
2	17.784	Acido Palmitoleico Palmitoleico C 16:1	0.8448
3	20.649	Acido Estearico C 18:0	1.5688
4	21.157	Acido Oléico C 18:1(cis - 9) (omega 9)	61.6408
5	21.215	Acido Elaidico C18:1 (trans-9)(omega9)	1.9178
6	21.851	No encontrado	0.6248
7	22.820	No encontrado	0.6628

Muestra AG-Aguaje-PF

Pico	R.T. # min	Nombre	total %
1	17.249	Acido Palmitico C 16:0	14.4628
2	20.649	Acido Estearico C 18:0	2.5738
3	21.168	Acido Oléico C 18:1(cis - 9) (omega 9)	78.2378
4	21.221	Acido Elaidico C18:1 (trans-9)(omega9)	2.6098
5	21.846	No encontrado	0.7688
6	22.820	No encontrado	0.8158
7	24.154	No encontrado	0.5378

Se expide la siguiente constancia a solicitud de las interesadas para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 23 de Mayo del 2015

Arre

.....
 Quim. Jorge Choquenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría - UNSAAC.
 CQP - 914

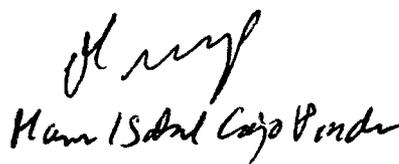
ACTA DE SUSTENTACIÓN PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

En el Anfiteatro N° 02 de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, siendo las 18:28 horas del día 21 de OCTUBRE del 2015, dando cumplimiento a la Resolución N° 160-2015-UNAMAD-DFI, de fecha 02 de octubre del 2015, se reunieron los *Miembros del Jurado para la sustentación del trabajo de tesis intitulado "SEPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES, CAROTENOIDES Y TOCOFEROLES CONTENIDOS EN EL ACEITE DE AGUAJE (Mauritia flexuosa) MEDIANTE DESTILACIÓN DISCONTINUA A VACIO Y CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN COLUMNA"*, presentado por las *Bachilleres: Rosario del Pilar Solórzano Cutipa y Sinthia Sanery Quispe Lukaña*, integrado por los siguientes docentes:

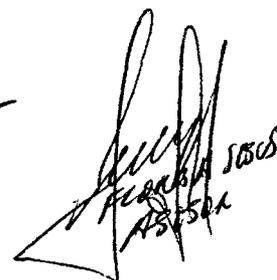
- | | |
|-------------------------------------|-------------|
| • Ing. Pedro Saúl Montalván Apolaya | Presidente |
| • Dra. María Isabel Cajo Pinche | Secretario |
| • Dra. Roxana Madueño portilla | Vocal |
| • Mgt. Rosel Quispe Herrera | Accesitario |

Con la finalidad de evaluar el trabajo de tesis intitulado antes mencionado. Acto seguido se procedió con la exposición del trabajo de tesis por parte de las sustentantes, el jurado procede con la fase de preguntas respectivas y luego el sustento de las tesis. Acto seguido el jurado procede a deliberar de forma reservada y libremente, declarando el trabajo expuesto con el calificativo de MUY BUENO y una nota de dieciséis, previo a esto las graduadas deberán de realizar el levantamiento a las observaciones entregadas por el jurado calificador

En fe de lo cual firmamos la presente acta, siendo las 19:20 horas del día 21 de OCTUBRE del 2015, se dio por culminado el presente acto de sustentación.



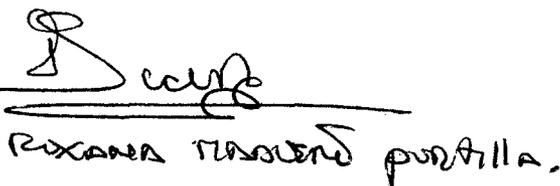
María Isabel Cajo Pinche



Roxana Madueño portilla



Sinthia Sanery Quispe Lukaña



Roxana Madueño portilla



Rosario del Pilar Solórzano Cutipa



**INFORME DE CONFORMIDAD DE LEVANTAMIENTO DE
OBSERVACIONES**

Puerto Maldonado, 07 de Diciembre del 2015

Mediante el presente, los Docentes:

- Ing. Pedro Saúl Montalván Apolaya
- Dra. María Isabel cajo pinche
- Dra. Roxana Madueño Portilla
- Mgt. Rosel Quispe Herrera

Presidente
Secretario
Vocal
Accesitario

Miembros del Jurado Calificador de la Tesis intitulada:

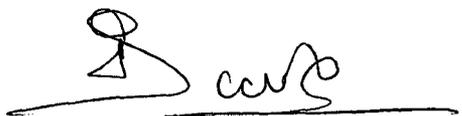
“SEPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES, CAROTENOIDES Y TOCOFEROLES CONTENIDOS EN EL ACEITE DE AGUAJE (*Mauritia flexuosa*) MEDIANTE DESTILACIÓN DESCONTINUA A VACÍO Y CROMATOGRFÍA PREPARATIVA EN COLUMNA”, sustentada (o) por las Bachilleres: Rosario del Pilar Solorzano Cutipa y Sinthia Sanery Quispe Lukaña, el día 21 de octubre del 2015, en la Ciudad Universitaria de la UNAMAD, emitimos el presente **INFORME DE CONFORMIDAD DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES**, con lo cual las Señoritas Tesistas ha cumplido con realizar las modificaciones a las observaciones realizadas durante la sustentación de la Tesis.

Es todo cuanto informamos a Usted Señor Decano, para los fines correspondientes.

Atentamente;


Dra. María Isabel cajo pinche


Ing. Pedro S. Montalván Apolaya


DRA. ROXANA MADUEÑO P.