

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL HIDROLATO DE
CALÉNDULA (*Caléndula Officinales L.*) Y SU APLICACIÓN COMO
BIOCONSERVANTE EN FILETES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

ANGELICA MARIA SIERRA BENITEZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS TECNOLOGIA E INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS**

DUITAMA

2019

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL HIDROLATO DE
CALÉNDULA (*Caléndula Officinales L*) Y SU APLICACIÓN COMO
BIOCONSERVANTE EN FILETES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

ANGELICA MARIA SIERRA BENITEZ

TRA BAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para obtener el título de
Ingeniera de alimentos**

Director:

GOLDA MEYER TORRES VARGAS

Q.A. Esp Biotecnología agraria.

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS TECNOLOGIA E INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS**

DUITAMA

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

JURADO

JURADO

Duitama _____ de 2019.

Dedicatoria

Primeramente a Dios por permitirme culminar satisfactoriamente este proyecto, a mi mamá Eugenia & amigas Edith, Erika por las palabras de aliento que fueron de gran ayuda.

A mi novio Iván por el apoyo incondicional en los momentos difíciles y no dejarme rendir en ningún momento.

A mi directora de Tesis Golda Meyer Torres por sus excelentes orientaciones y disponibilidad para el desarrollo de este trabajo de manera grata.

A todas y cada una de las personas que de una u otra manera me apoyaron deseándome lo mejor.

Esto es posible gracias a cada uno de ustedes...

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	10
INDICE DE FIGURAS.....	12
INDICE DE ANEXOS	14
INTRODUCCIÓN.....	16
OBJETIVOS.....	17
PLANTEAMIENTO	18
1. MARCO TEORICO	19
1.1 Trucha Arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	19
1.1.2 Etapas del cultivo	20
1.1.3 Propiedades nutricionales de la trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	21
1.2 Control de calidad en productos pesqueros.....	28
1.2.1 Degradación de productos pesqueros.....	28
1.2.2 Efecto de la ingestión de lípidos oxidados sobre la calidad de la carne de peces.	30
1.2.3 Rancidez oxidativa.	31
1.2.3.1 Oxidación Enzimática	31
1.2.3.2 Oxidación Química.....	33
1.2.4 Indicadores de la Capacidad Oxidativa.	36
1.2.4.1 Oxidación Primaria e Indicadores:	36

1.2.4.2 Oxidación Secundaria e Indicadores:.....	41
1.3 Radicales libres.....	44
1.3.1 Especies reactivas de oxígeno (EROS)	45
1.3.2 Anión superóxido	46
1.3.3 Peróxido de hidrógeno	47
1.3.4 Radical hidroxilo	47
1.3.5 Oxígeno singulete	48
1.3.6 Óxido nítrico	48
1.3.7 Peroxinitrito.....	49
1.4 Antioxidantes	49
1.4.1 Definición	49
1.4.2 Sinergismo.....	51
1.4.2.1 Mezcla de Aceptores de Radicales Libres	51
1.4.2.2 Agentes Quelantes de Metales.....	52
1.4.3 Antioxidantes Sintéticos.....	52
1.4.4 Antioxidantes Naturales	55
1.4.5 Evaluación de la capacidad antioxidante	56
1.4.5.1 Método Captación de radicales libres por la técnica del radical DPPH (1,1-difenil2-picril-hidroziilo)	56
1.4.5.2 Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)	58

1.4.5.3 Actividad antioxidante total (TAA) método colorimétrico Folin-ciocalteu:.	59
1.5 Caléndula	61
3. METODOLOGIA	65
3.1 Materiales.....	65
3.1.1 Material biológico.....	65
3.1.1.2 Hidrolato de Caléndula.....	66
3.2 Métodos	66
3.3 Fases de la investigación	67
3.3.1 Fase I: Métodos para la caracterización de la materia prima	67
3.1.2 Fase II: Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>)	70
3.1.3 Fase III: Métodos para la determinación de la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	72
4. ANALISIS ESTADISTICO.....	78
4.1 Fase I: Caracterización de la materia prima	78
4.2 Fase II: Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	78
4.3 Fase III: bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>): indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria.	80
4.3.1 Hipótesis	82
4.3.1.1. Hipótesis de Investigación	82

4.3.1.2 Hipótesis estadísticas.....	82
4.4 Variables	84
5. RESULTADOS.....	85
5.1 Fase I: Caracterización de la materia prima	85
5.1.1 Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	85
5.1.2 Caracterización material vegetal: hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	85
5.2 Fase II: Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>):	86
5.3 Fase III: bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) - indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria.	88
6. ANALISIS DE RESULTADOS	93
6.1 Fase I: Caracterización de la materia prima	93
6.1.1 Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	93
6.1.2 Caracterización material vegetal: hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	97
6.2 Fase II: Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	98

6.3 Fase III: bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>):	
indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria.	101
6.4 Marcha Fitoquímica.....	114
6.5 Evaluación Sensorial.....	114
7. CONCLUSIONES.....	116
8.RECOMENDACIONES.....	118
BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXOS.....	131

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Aporte nutricional de la trucha	18
- Tabla 2. Composición en ácidos grasos trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	20
- Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	21
- Tabla 4. Efecto de las condiciones de empaque sobre la duración en almacén del producto enfriado y de productos cárnicos	25
- Tabla 5. Productos alimenticios con valores aproximados de acidez.....	31
- Tabla 6. Tratamientos y tipos de almacenamiento.....	67
- Tabla 7. Tratamiento y replicas para la determinación de la capacidad oxidativa del hidrolato de caléndula sobre los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	71
- Tabla 8. Caracterización material biológico de la trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	75
- Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	75
- Tabla 10. Marcha fitoquímica del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>)	76
- Tabla 11. Actividad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>) y del BHT - Butilhidroxitolueno	76
- Tabla 12. Variación en el contenido de pH, durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	78

- Tabla 13. Variación en el contenido de ácidos grasos libres (AGL%) durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el extracto acuoso de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).....79
- Tabla 14. Variación en el contenido de peróxidos PV durante la bioconservación de filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el extracto acuoso de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).....79
- Tabla 15. Variación en el contenido de MDA expresados en TBA (mg MDA/Kg): durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris en el extracto acuoso de caléndula.....80

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Reacción de lipólisis en el enlace Ester.....	27
- Figura 2. Acción en la enzima lipooxidasas 1	28
- Figura 3. Acción de la enzima lipooxidasas 2.....	28
- Figura 4. Oxidación química.....	29
- Figura 5. Fase de iniciación de la oxidación lipídica.....	29
- Figura 6. Fases de propagación de la oxidación lipídica.....	30
- Figura 7. Reacción TBA.....	35
- Figura 8. Paso a paso esquemático de la formación de MDA a partir de ácidos grasos poliinsaturados.....	37
- Figura 9. Antioxidantes más comunes.....	46
- Figura 10. Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	56
- Figura 11. Proceso de extracción del aceite esencial de caléndula (<i>Caléndula officinalis</i> L.) por OAH.....	57
- Figura 12. Metodología para la caracterización del material biológico.....	58
- Figura 13. Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	59
- Figura 14. Metodológica para la evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis</i> L.).....	61
- Figura 15. Bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	63
- Figura 16. Tratamientos para la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	65

- Figura 17. Sistema de empaçado e identificación de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) por tratamientos.....	68
- Figura 18. Correlación entre valor TEAC (DPPH) Vs contenido de fenoles.....	77
- Figura 19. Evolución de los atributos sensoriales de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	82
- Figura 20. Medida de pH en los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) conservados con el hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	92
- Figura 21. Contenido de ácidos grasos libres (AGL%) de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	94
- Figura 22. Contenido de peróxidos (meq-O ₂ /kg) de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) conservados en el hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>).....	97
- Figura 23. Contenido de malonaldehído (MDA) por el índice del ácido- 2-tiobarbitúrico (TBA) de los filetes de trucha arcoíris conservados en el hidrolato de caléndula (<i>Caléndula Officinalis L.</i>).....	99

INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).....126
- Anexo 2. Caracterización material vegetal hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).....137
- Anexo 3. Ficha técnica Butilhidroxitolueno BHT, antioxidante comercial.....144
- Anexo 4. Técnicas capacidad antioxidante antioxidante.....145
- Anexo 5. Métodos para la determinación de la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).....148
- Anexo 6. Datos según número de réplicas, caracterización filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).....160
- Anexo 7. Medidas de tendencia central caracterización filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).....160
- Anexo 8. Características sensoriales de frescura de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC 1443.....162
- Anexo 9. Datos según número de réplicas caracterización hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).....165
- Anexo 10. Medidas de tendencia central caracterización hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).....166
- Anexo 11. Resultados curva patrón contenido de fenoles totales.....166
- Anexo 12. Marcha fitoquímica del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).....167

- Anexo 13. Datos según número de réplicas para la determinación del valor TEAC (DPPH) [$\mu\text{moles/L}$]	168
- Anexo 14. Análisis estadístico de varianza de la actividad antioxidante del hidrolato de caléndula (<i>Caléndula officinalis L.</i>) y del BHT	168
- Anexo 15. Estadística del coeficiente de correlación entre el contenido de fenoles totales [$\text{mg}/100\text{g}$] y valor TEAC (DPPH) [$\mu\text{moles/g}$]	170
- Anexo 16. Indicadores de la capacidad oxidativa de los filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	171
- Anexo 17. Análisis de varianza ANOVA para indicadores de la capacidad oxidativa	174
- Anexo 18. Contenido de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (índice de TBARS) expresado en mg MDA/kg	184
- Anexo 19. Evaluación sensoria filetes de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	185

INTRODUCCIÓN

Los peces de agua dulce como la trucha arcoíris poseen un elevado contenido de ácidos grasos omega -3, EPA, DHA y fosfolípidos altamente insaturados, que una vez capturados y sometidos a proceso de adecuación, procesamiento, empaclado y almacenado, exhiben reacciones de oxidación de lípidos, lo que hace que se pierdan las propiedades funcionales que estos lípidos representan para la salud del consumidor. El hidrolato se considera un subproducto derivado de la extracción del aceite esencial de caléndula, que puede también contener una importante composición química con función antioxidante.

Esta propuesta de investigación se basó en la evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato obtenido de la extracción del aceite esencial de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) para ser empleado como conservante (antioxidante) en filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En la evaluación de la capacidad antioxidante se emplearon técnicas analíticas como el contenido total de fenoles (TAA) para determinar la cantidad de estructuras fenólicas presentes en el extracto, mediante la técnica del radical DPPH se determinó la capacidad del hidrolato para transferir electrones a radicales libres o especies reactivas de oxígenos (EROS) en los filetes de trucha arcoíris. También se evaluó la capacidad oxidativa al determinar el contenido de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), ácidos grasos libres e índice de peróxidos. Esta propuesta contribuye a la conservación de las propiedades funcionales que ofrece el consumo de trucha arcoíris y al empleo de los subproductos que genera la extracción de aceites esenciales; de esta manera se aporta al diseño de nuevos productos con actividad funcional y un a la seguridad alimentaria.

Palabras claves: *antioxidante, hidrolato, DPPH, TBARS, fenoles, caléndula, capacidad antioxidante, filetes de trucha arcoíris.*

OBJETIVOS

General: Evaluar la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*) y su aplicación como bioconservante en filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Específicos:

1. Caracterizar física y químicamente los filetes de trucha arcoíris en relación al contenido de: Porcentaje de humedad, porcentaje de grasa, porcentaje de cenizas, pH, acidez, Proteína.
2. Caracterizar químicamente el hidrolato de caléndula proveniente de la extracción del aceite de las flores frescas de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*) en relación al contenido de: porcentaje de acidez, pH, contenido de fenoles y marcha fotoquímica cualitativa.
3. Evaluar la capacidad antioxidante del hidrolato proveniente de la extracción del aceite de las flores frescas de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*), mediante técnicas analíticas como reducción radicales DPPH y determinación de fenoles totales.
4. Analizar y determinar diferencias significativas en los resultados de la capacidad antioxidante del hidrolato proveniente de la extracción del aceite de las flores frescas de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*).
5. Evaluar la capacidad oxidativa de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en relación a los indicadores de la oxidación primaria como: porcentaje ácidos grasos libres (%AGL), índice de peróxidos (PV(meq-O₂/Kg)) y pH.
6. Evaluación de la oxidación secundaria de lípidos poliinsaturados (contenido de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico TBARS:(mg malonaldehído/kg).
7. Determinar y evaluar diferencias significativas en los resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad oxidativa los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
8. Evaluación sensorial de 3 muestras de filete de trucha, con BHT (Butilhidroxitolueno), hidrolato de caléndula y sin ningún aditivo.

PLANTEAMIENTO

En esta propuesta de investigación se propone los siguientes planteamientos:

- ¿EL hidrolato proveniente de la extracción del aceite esencial de las flores de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*) registra un alto contenido de fenoles y una alta capacidad antioxidante para ser usando como bioconservante en filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)?
- EL hidrolato proveniente de la extracción del aceite esencial de las flores de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*) posee capacidad antioxidante para evitar o inhibir la producción de sustancias propias de la oxidación primaria y secundaria de los ácido grasos poliinsaturados presente en los filetes de trucha filetes de trucha arcoíris(*Oncorhynchus mykiss*) cuando es almacenada a temperaturas de refrigeración (4.4 °C) por un trascurso de 20 días?

1. MARCO TEORICO

1.1 Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

La acuicultura en Colombia se inició a finales de los años 30 del siglo pasado, cuando fue introducida la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con el fin de repoblar las lagunas de aguas frías de la región Andina con una especie íctica de mayor valor económico que las nativas. (FAO, 2013)

Posteriormente, a finales de los 70 se introdujeron las tilapias *Oreochromis sp* y a principios de los años 80 se iniciaron trabajos con algunas especies nativas, principalmente con las cachamas blanca *Piaractus brachypomus* y negra *Colossoma macropomum*, con el fin de fomentar actividades encaminadas a diversificar las fuentes de ingreso de los pequeños productores campesinos. (FAO, 2013)

Estos esfuerzos se realizaron inicialmente por la Federación Nacional de Cafeteros y más tarde, por el Programa de Desarrollo Rural Integrado - DRI. Pero sólo a mediados de la década de los 80 se iniciaron procesos encaminados a formar empresas acuícolas, primero en el cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* y un poco más tarde en la piscicultura comercial con especies foráneas como las tilapias, la trucha arco iris y la carpa común *Cyprinus carpio* y con nativas como las cachamas. (FAO, 2013)

La truchicultura es un sector extenso que abarca los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Tolima, Huila, Santander, Norte de Santander, Boyacá, Cauca, Nariño y Quindío. Es un sector en crecimiento y juega un importante papel en los empleos del sector rurales ya que según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural este sector consolida más de 11.244 empleos por año (CCI -Corporación Colombia internacional, 2009).

1.1.2 Etapas del cultivo

1.1.2.1 Alevinaje

Este proceso va desde los 2 cm hasta los 7 - 9 cm de longitud de los peces, utilizándose piletas de cemento o fibras de vidrio, circulares o rectangulares. La biomasa a mantener es de 7- 8 kg/m³ máximo, según el tamaño de los alevinos. En esta etapa se requieren entre 5 y 70 l/min de agua para 10.000 alevinos cantidad que depende del tamaño de los peces la densidad de siembra utilizada y la temperatura. El alimento debe contener 5° % de proteína y ser suministrado en una proporción diaria del 6% de la biomasa al principio y 4% al final, repartido en 12 comidas por día.

Se deben seleccionar los peces por tamaños con el fin de evitar el canibalismo y altos porcentajes de cabezas y colas. La manipulación de alevinos tiene que hacerse antes de alimentar y sin radiación solar fuerte.

1.1.2.2 Engorde

El engorde se inicia cuando los alevitos tienen 7 -9 cm y finaliza cuando alcanzan talla comercial, con pesos entre los 200-500 gr, en un tiempo entre 7 y 15 meses dependiendo de la calidad de la semilla, la temperatura del agua, la densidad de siembra y la alimentación.

Esta etapa puede realizarse en estanques (rectangulares o circulares) o en jaulas. Los tanques rectangulares tienen la ventaja que ocupan menos espacio, pero son menos eficientes, especialmente en lo relacionado con el aseo, pues es necesario limpiarlos adecuada y periódicamente para eliminar los sedimentos y restos de alimento; los tanques circulares ocupan mayor espacio, pero son más eficientes por cuanto se auto limpian. Los estanques construidos en concreto son más costosos que los de tierra, pero ofrecen mayores ventajas. Como son una vida útil larga, bajos gastos de mantenimiento, resistencia a los grandes flujos de agua, mejores

condiciones sanitarias, fácil manejo y mayor capacidad de carga. Las jaulas se emplean en lagos, lagunas, embalse o grandes reservorios, con buena calidad de agua y profundidad mayores 3-4 m.

En el engorde de truchas es indispensable la toma de los parámetros físico químicos del agua en los estanques, principalmente oxígeno disuelto, temperatura y pH, de tal manera que se mantenga en los rangos adecuados para garantizar el buen estado de los peces y un desarrollo óptimo del cultivo.

Puesto que las truchas son muy exigentes en la calidad del agua, la misma debe ser filtrada con el fin de evitar que llegue cualquier tipo de material que pueda afectar el cultivo. La cantidad de agua necesaria depende de la producción esperada, calculándose que en engorde se requiere entre 14 y 16 lt/seg por tonelada; el recambio de agua en los tanques debe ser como mínimo el suficiente para que en cada uno se renueve el agua completamente cada hora. Adecuados sistemas de manejo, limpieza, alimentación y selección por tallas contribuirán a obtener mejores resultados.

1.1.2.3 Coloración

Dorso oscuro, verdoso a castaño, moteado de negro al igual que los flancos y aletas dorsal, caudal y anal. Una franja longitudinal rosada o roja en cada flanco desde el ojo hasta la aleta caudal, muy notable en los peces maduros y especialmente en los machos durante la época de reproducción. El moteado del cuerpo es muy variable, registrándose ejemplares desde profusamente moteados hasta casi sin motas ("plateadas"); una gradación similar se observa en el tono de la banda rojiza. (ECURED domingo, 27 de agosto de 2017).

1.1.3 Propiedades nutricionales de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Se trata de un pescado delicioso con el siguiente aporte nutricional por 100 g:

Tabla 1: Aporte nutricional trucha arcoíris García et al. (2004)

Energía	90 kcal
Proteínas	15 g
Hidratos de carbono	0,1g
Grasas totales	3 g
Vitaminas	
Vitamina B1	0,1 mg
Vitamina B2	0,1 mg
Vitamina B3	5 mcg
Vitamina A	14 mcg
Minerales	
Zinc	0,8 mg
Fosforo	250 mg
Potasio	250 mg
Magnesio	29 mg

García et al. (2004) determinaron la composición química del filete fresco de truchas arcoíris con pesos entre 301,9 y 479,5 g. En dicha investigación estos autores estimaron valores de $75,24 \pm 0,26\%$ de humedad; $20,88 \pm 0,19\%$ de proteína; $2,57 \pm 0,21\%$ de grasa y $1,22 \pm 0,01\%$ de cenizas, valores bastante cercanos a los encontrados en el presente estudio para CMS. Las diferencias respecto al mayor valor de proteína y un menor valor de extracto etéreo podrían deberse a que en el estudio citado se analizaron filetes, los cuales tienden a ser más magros que el resto de la carne del cuerpo del animal. Al igual que lo encontrado en el caso de tilapia, la CMS de trucha presenta el menor contenido de cenizas, Ca, P, extracto etéreo y energía bruta en comparación con los demás recursos analizados. (A. Osorio, 5 de septiembre de 2013).

La composición química de los peces es muy variable, no solo entre las especies sino también dentro de las especies debido a varios factores. Algunos de estos factores son la edad y el tamaño del pez, el sexo, la estación del año, la calidad del agua, la dieta y el sistema de alimentación (González et al., 2006; Gökçe, Taşbozan, Çelik, y Tabakoğlu, 2004). En lo que respecta a la calidad nutricional, recientemente se ha desarrollado un interés especial en la composición de lípidos de pescado porque sus efectos beneficiosos para la salud humana dependen de su perfil de ácidos

grasos. Además de las cantidades óptimas de ácidos grasos esenciales, los ácidos grasos poliinsaturados / saturados (PUFA / SFA) y los índices de PUFA n- 6 / n -3 se consideran buenos índices de calidad nutritiva (Steffens & Wirth, 2005)

.1.3.1 Perfil de ácidos grasos.

Se tiene conocimiento que los peces de agua dulce como el salmón y la trucha son considerados como la mayor fuente de ácidos grasos insaturados tipo omega- 3 y omega-6. De acuerdo con las investigaciones de Sabetian et al (2012), los ácidos grasos de la carne y pate comestible de la trucha arcoíris se agrupan en ácidos grasos saturados (SFA), en donde el ácido mirístico, palmítico y el ácido esteárico, son los componentes predominantes.

También se puede encontrar ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), dentro de estos, es el ácido linoleico, linolénico, ácido eicosapentanoico (EPA, 6,98%), ácido docosahexanoico (DHA, 9.10%). Entre los MUFA, son representativos el ácido oleico (65%) y palmítico (25%); estos resultado concuerda con lo expuesto por Perea, et al (2008), en donde esta especie registró una alta concentración de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, de estos últimos, relacionan que la trucha registra un alto contenido de DHA (240-480 mg/100g de filete) aun cuando su concentración de EPA es mínima (10-20 mg/100g de filete).

Tabla 2: Composición en ácidos grasos trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) Perea, et al (2008).

ÁCIDO GRASO	Tipo de ácido graso	Mg/100g de filete
MIRÍSTICO	Saturado C:14	100-300
PALMÍTICO	Saturado C:16	900-1800
ESTEÁRICO	Saturado C:18	200-500
OLEICO	Saturado C:18,Δ 9	1000-2200
A-LINOLÉNICO	Saturado C:18Δ9, 12, 15	10-20
EPA	Saturado C:20 Δ 5, 8, 11, 14,17	10-20
DHA	Saturado C:22 Δ 4,7,10,13,16,19	240-480
LINOLÉNICO	Saturado C:18 Δ 9,12,15	600-1300

En los reportes de Burgos, et al (2008); las muestras de trucha arcoíris registraron un alto contenido de ácidos grasos saturados como el palmítico e insaturados como el ácido oleico (18.3%), ácidos grasos esenciales de las series de los meoga-3 y omega (1.1% para el ácido linoleico y 7.3 % para el ácido linolénico).

Tabla 3. Porcentaje de ácidos grasos Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Burgos, et al (2008).

Ácido graso	Porcentaje aproximado
Palmítico	14.878
Oleico	18.301
Linolénico	1.057
Linoleico	7.272

En los estudios de Burgos, et al (2008) hacen un relevante aporte al aprovechamiento de subproductos generados del manejo pos captura de la trucha y es entregar el perfil de ácidos grasos de la visera en donde se registran mayores contenidos de ácidos grasos polinsaturados que en la parte comestible del músculo, se registró un contenido promedio de 26.8% de ácido linoleico y dentro de éste, un alto contenido de DHA, el ácido oleico es alto (25.5%). De acuerdo con Perea,

et al (2008), relacionan que una porción de trucha de 250 g/día cubre el requerimiento en ácidos grasos de la serie omega-3 que corresponde a 1,3-1,5 g/día.

Se acepta que el consumo de pescado tiene beneficios nutricionales y de salud para los humanos (Burger & Gochfeld, 2009). La carne de pescado se considera una buena fuente de proteínas de alto valor biológico, ácidos grasos poliinsaturados n- 3 (AGPI n- 3), minerales y vitaminas. En numerosos estudios (Kris-Etherton, Harris y Apple, 2002; Mayneris-Perxachs, Bondia-Pons, Serra-Majem y Castellote, 2010) se informaron efectos preventivos de los PUFA n- 3 sobre la aterosclerosis, la trombosis o la hipertensión. Además, se ha sugerido que los PUFA n- 3 pueden tener una influencia favorable en enfermedades como el asma, el accidente cerebrovascular, el cáncer o la diabetes (Steffens y Wirth, 2005).

Estudios previos (Caballero et al., 2002; Çelik et al., 2008) informaron datos sobre la composición química, y particularmente sobre la composición de ácidos grasos, de la trucha arcoíris. Otros informes se han centrado en los efectos de diversos métodos de procesamiento o cocción sobre la composición química de diversas especies de peces, incluida la trucha arcoíris (Gokoglu, Yerlikaya y Cengiz, 2004; Unusan, 2007). Sin embargo, no se dispone de suficiente información sobre las composiciones químicas diferenciales de los filetes de trucha arcoíris cuando se comen con o sin la piel puesta.

En Colombia las enfermedades cardiovasculares (ECV) se han convertido en la primera causa de mortalidad, superando a la muerte violenta y al cáncer. Entre los factores que explican la epidemia de ECV se han propuesto como fundamentales los cambios en los hábitos nutricionales que han llevado a un aumento en el consumo de alimentos de preparación rápida, desplazando aquellos que contienen nutrientes cardio protectores en los que se incluyen: frutas, vegetales y pescado. El pescado tiene un efecto cardiovascular protector asociado con un menor riesgo de

mortalidad por enfermedad coronaria en razón a que es la principal fuente natural de ácidos grasos n-3.

Existen evidencias sólidas que señalan que los ácidos grasos n-3, no solamente son nutrientes esenciales, sino que también modulan favorablemente varias enfermedades entre las que se incluyen: la aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad inflamatoria, desórdenes autoinmunes, desarrollo del feto en mujeres embarazadas, desarrollo cognitivo y de aprendizaje en los niños, diabetes tipo 1 y 2, síndrome metabólico, obesidad, desarrollo de la demencia y otros desórdenes. Estos datos y el extenso conocimiento del efecto del consumo de pescado en el organismo, muestran la necesidad de promover el incremento en la ingesta de este alimento, en todas las poblaciones, especialmente en aquellas de mayor riesgo de morbilidad no solo por ECV, sino por otros procesos patológicos.

En este contexto es necesario partir del conocimiento de las características nutricionales, especialmente del contenido de ácidos grasos n-3, de la trucha arcoíris. Como patrón de referencia para los ácidos grasos n-3, por ser la especie conocida a nivel internacional con mayor contenido de estos nutrientes.

En la actualidad no se cuenta en el país con datos disponibles del perfil completo de ácidos grasos y micronutrientes de estas especies, pese al incremento en la producción pesquera a nivel nacional y de la región, El objetivo de este estudio fue determinar algunas características nutricionales de las especies mencionadas, con énfasis en el perfil de ácidos grasos. (SciELO, 2008)

Los ácidos grasos omega 3 son ácidos grasos polinsaturados que se encuentran en tres principales formas en los alimentos: ácido eicosapentaenoico (20:5 omega 3, EPA), ácido docosahexanoico (22:6 omega 3, DHA) y alfa linolénico (18:3 omega 3, a-ALA). Las formas EPA

y DHA se pueden encontrar en los aceites de pescados que viven principalmente en aguas frías como el salmón, atún, sardinas, entre otras variedades. En países orientales, que tienen un alto consumo de algas, son otra fuente importante de altas cantidades de DHA y EPA. En cuanto a la forma ALA, se puede encontrar en algunos aceites vegetales, chía, nueces, cacahuates y aceitunas. (Scielo, 2015)

Los EPA, DHA y ALA son ácidos grasos esenciales, es decir, se requieren ingerir por la dieta, ya que el organismo no los sintetiza. Debido a su amplia distribución en diferentes alimentos su consumo ha demostrado tener una amplia variedad de efectos benéficos a la salud humana. Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones en humanos son las variedades EPA y DHA las que han demostrado tener mayores efectos en comparación con la forma ALA (vegetal) ; en esta última también se han visto efectos benéficos en algunas condiciones metabólicas, sus resultados no han sido concluyentes. No obstante, cabe destacar que su ingesta ha demostrado que es de gran importancia para la salud. (Scielo, 2015)

La trucha arco iris, que es rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, 50%) y PUFA (26%), tiene una alta sensibilidad a la oxidación de los lípidos (Mexis, Chouliara y Kontominas, 2009). Los ácidos grasos se convierten en hidroperóxidos, que son los principales productos de la oxidación de los lípidos (Alishahi y Aider, 2012; Mexis et al., 2009). Como los compuestos de peróxido son insípidos e inodoros, no pueden ser detectados por los consumidores; aunque se pueden medir como PV (Bremner, 2002).

Las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA), en particular ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6n-3) y ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5n-3), que tienen beneficios potenciales para la salud humana son encontrado en los tejidos de peces. En ausencia

de una protección antioxidante adecuada , debido al alto grado de instauración, los AGPI n-3 de cadena larga son propensos a la peroxidación lipídica in vivo dentro de los tejidos de los peces que conducen a patologías, incluida la distrofia muscular. También en los alimentos, estos ácidos grasos son fácilmente susceptibles a la autooxidación cuando se exponen al oxígeno atmosférico y si no se toman los cuidados adecuados en la preparación y almacenamiento de alimentos, el valor nutricional positivo de los AGPI n-3 de cadena larga derivados de aceites de pescado y las comidas pueden convertirse en un factor negativo para los peces.

1 .2 Control de calidad en productos pesqueros

1.2.1 Degradación de productos pesqueros.

El pescado es un producto muy delicado, debido a que si no se toman las medidas necesarias para su conservación y manipulación, los procesos de degradación que se producen en él son más acelerados, disminuyendo la calidad del producto. Por lo expuesto anteriormente es importante conocer la calidad microbiológica de los en estado fresco; porque un pescado que origina problemas sanitarios no se lo puede considerar nunca como un alimento de óptima seguridad para el consumidor. Una de las principales causas de deterioro que sufre el pescado es el ataque bacteriano, originado por las bacterias provenientes del medio, y de las malas o inadecuadas prácticas de manufactura; es por eso que se requiere tener una guía de consulta. Un pescado microbiológicamente seguro no debe contener patógenos en cantidades peligrosas que produzcan daños a la salud, y su contenido en microorganismos totales no debe exceder niveles predeterminados de manera que aseguren su inocuidad. (ALBÁN, 2001).

Todo producto pesquero, dada su alta tasa de degradación química y microbiana, luego de la faenas de captura, limita la conservación a temperaturas de refrigeración, por eso deben ser aplicadas temperaturas de congelación que pueden ir desde 0° C hasta los -38°C.

En el análisis de Rea, V. (2011), se indica que el pescado como todos los productos de origen marino y de agua dulce se alteran por reacciones de autólisis, oxidación y actividad bacteriana. Los factores que influyen en el tipo y velocidad de las alteraciones se relacionan con el tipo de pescado (se resalta el contenido y tipo de grasa), condiciones de captura (modificaciones en el descenso del pH y contenido de O₂), contaminación bacteriana y la temperatura aplicada.

Dependiendo del pH del tejido comestible del pescado, se puede determinar el tiempo de almacenamiento en hielo, pescados con pHs ligeramente básicos pueden presentar reacciones deteriorativas en menor tiempo por el desarrollo de bacterias que se desarrollan en estos rangos de pH, pero a pHs ligeramente ácidos, la conservación en hielo se puede prolongar, esto mismo es descrito en Medina, et al 2014; estos mismos autores indican que el tiempo máximo de conservación de pescados puede estar entre 20 y 30 días es el límite máximo de almacenamiento. Si se manejan temperaturas entre -10°C y -18°C, el tiempo de vida aumenta considerablemente hasta 12 meses.

El tiempo de almacenamiento y el efecto del tipo de empaque sobre el pescado fresco cuando se aplican temperaturas de refrigeración es muy corto y éste no está condicionado por el tipo de empaque; El envasado al vacío (EV) y el envasado en atmósfera modificada, EAM, con altos niveles de CO₂ (25 - 100 por ciento), prolongan la duración en almacén de los productos pesqueros por algunas semanas:

Tabla 4. Efecto de las condiciones de empaque sobre la duración en almacén del pescado enfriado y de productos cárnicos. Huss. H. (2009).

Tipo de producto	Temperatura de almacenamiento (°C)	Duración en almacén (semanas)		
		Aire	EV ^a	EAM ^b
Carne de res, puerco y aves	1.0 - 4.4	1 - 3	1 - 12	3 - 21
Pescado magro bacalao, pollock, chancharro	0.0 - 4.0	1 - 2	1 - 2	1 - 3
Pescado graso arenque, salmón, trucha	0.0 - 4.0	1 - 2	1 - 2	1 - 3
Mariscos cangrejo, vieiras	0.0 - 4.0	½ - 2	-	½ - 3
Pescado de aguas cálidas vieja, pez espada, tilapia	2.0 - 4.0	½ - 2	-	2-4

- a) EV: empaque al vacío
- b) EAM: envasado en atmosferas modificadas (altas concentraciones de CO₂, 25-100%)

1.2.2 Efecto de la ingestión de lípidos oxidados sobre la calidad de la carne de peces.

La alimentación de los peces juega un papel importante en muchos factores de calidad de su carne, según (Keong, 2005) el aceite de palma es una buen opción de alimento para los peces, este aceite presenta una baja concentración de ácido grasos poliinsaturados (AGPI) por esta razón obtiene una excepcional resistencia a la oxidación. Junto con los efectos protectores de potentes antioxidantes naturales (carotenoides y vitamina E) en el aceite de palma la incidencia de rancidez se reduce sustancialmente cuando se usa en la alimentación acuícola.

Otro estudio que nos habla sobre esta temática es (more, 2018) donde se realizó una investigación sobre la ingestión del ajo en la dieta de los peces la cual arrojo que el ajo si ejerce un actividad antioxidante sobre la carne de los peces, de igual forma al mirar el porcentaje de TBARS de los peces que habían consumido en su dieta ajo y los que no lo habían consumido que realmente el ajo ayudo a reducir este porcentaje de (malonaldehido) en las muestras de filete de trucha.

Existen a parte de los estudios anteriormente mencionados más estudios sobre la influencia que tiene lo que consumen los peces con la calidad misma de la carne, en la trucha arcoíris es de vital importancia tener presente esta parte, ya que este es un alimento muy propenso a su

descomposición por su alta cantidad de omegas los cuales si no se tiene un adecuado manejo después de su muerte y si no se mantiene bajo unas condiciones adecuadas de temperatura se puede ver muy afectado este alimento.

1.2.3 Rancidez oxidativa.

La rancidez oxidativa, conocida como auto oxidación, es la principal causa de deterioro de aceites y grasas, la que puede controlarse mediante el empleo de antioxidantes incrementando la estabilidad oxidativa y vida en anaquel. (Villanueva, Eudes, 2017)

1.2.3.1 Oxidación Enzimática

La oxidación enzimática se produce por la acción de dos enzimas en particular las lipasas y las lipooxidasas las cuales están presentes en el pescado, y por esta razón este producto es susceptible a este tipo de oxidación.

- **Lipolisis**

La lipolisis es una reacción que es catalizada por lipasas y en ciertas condiciones, por las altas temperaturas en presencia de agua (en el freído), en la que se hidroliza el enlace éster de los triacilglicéridos y de los fosfolípidos, y se liberan ácidos grasos. La lipólisis no sólo ocurre en las oleaginosas, sino también en los lácteos y en muchos otros alimentos, incluso en la carne y el pescado.

En el caso de aceites vegetales (soya, cacahuate, maíz, etcétera), los ácidos libres son de más de 16 carbonos, poco volátiles, sin olor y su presencia sólo se advierte mediante el índice de acidez; por otra parte, los de la leche, son de cadena corta (butírico, caproico, caprílico y laurico), más volátiles, con olores peculiares y responsables del deterioro percibido olfativamente; la lipasa se asocia con las miscelas de caseína y en la homogeneización se pone en contacto con los glóbulos

de grasa, de manera que si no se pasteuriza o esteriliza inmediatamente, se favorece su acción. (Badui, 2006).

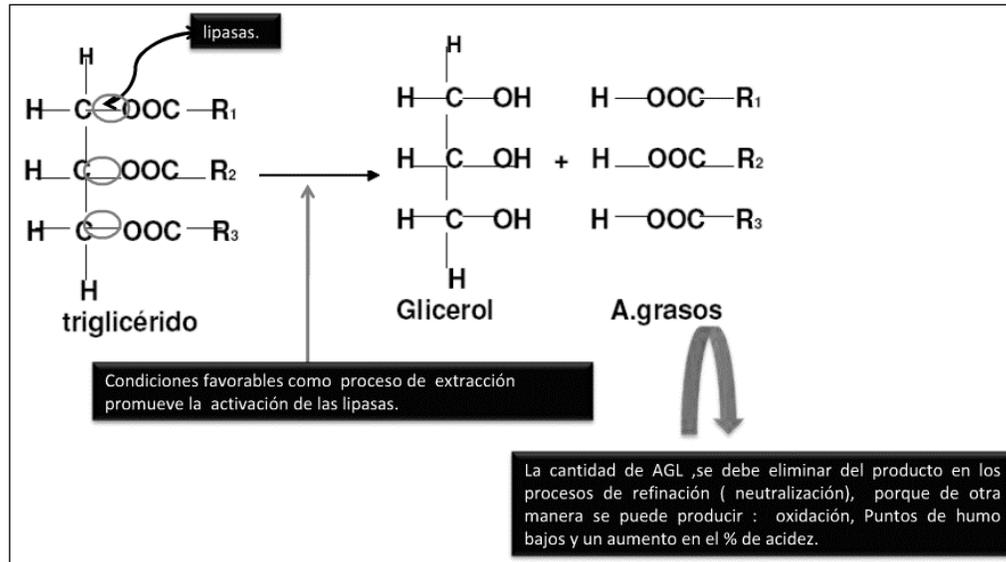


Figura1: Reacción de lipólisis en el enlace éster (Vargas)

- **Lipooxidación**

La lipooxidación es otro mecanismo de oxidación enzimática, es este sistema en donde hay acción de la enzima lipooxidasa a cual cataliza la oxigenación de los AG insaturados en un sistema Cis-cis- (1,4)-pentandieno, de este sistema de oxidación se van a generar dos productos de la oxidación primaria los cuales son los peróxido e hidroperóxidos.

Cuando un ácido graso poliinsaturado contiene en alguna parte de su molécula carbonada el sistema Cis-cis-(1,4)-pentanodieno, este es el sitio de especificidad de la lipooxigenasa.

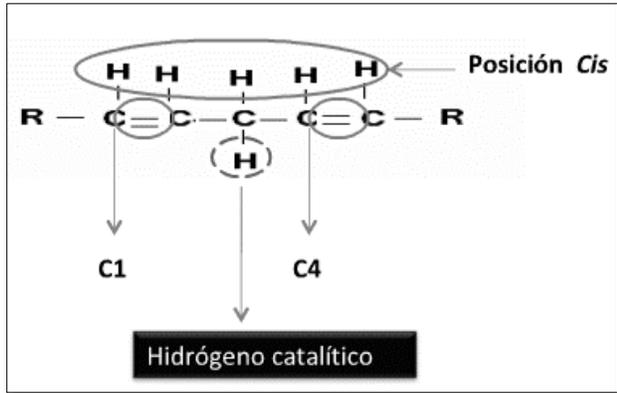


Figura 2: acción de la enzima lipooxidasas (Vargas)

Cuando un ácido graso poliinsaturado contiene en alguna parte de su molécula carbonada el sistema *Cis-cis*-(1,4)-pentanodieno, este es el sitio de especificidad de la lipooxigenasa.

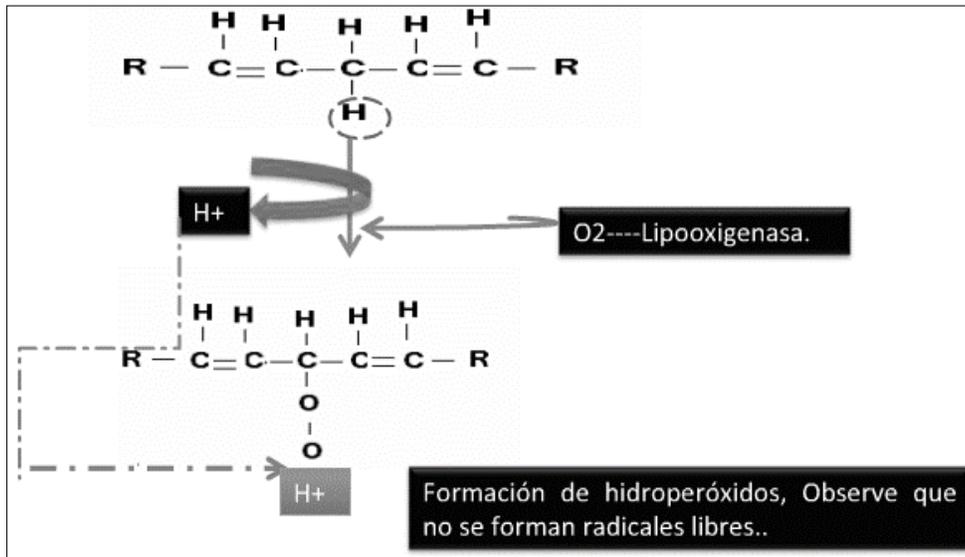


Figura 3: Acción de la enzima lipooxidasas (Vargas)

1.2.3.2 Oxidación Química

La oxidación química también conocida como autooxidación, este tipo de oxidación se desarrolla rápido en presencia de oxígeno y catalizadores como luz, temperatura y metales,

de igual forma cataliza la formación de radicales libres, como resultado de esta oxidación se producen peróxidos e hidroperóxidos indicadores de la oxidación primaria. 635652

Este tipo de reacción, también recae al igual que la oxidación enzimática sobre un sistema de ácido graso poliinsaturado que contiene Cis-cis-(1,4)-pentanodieno.

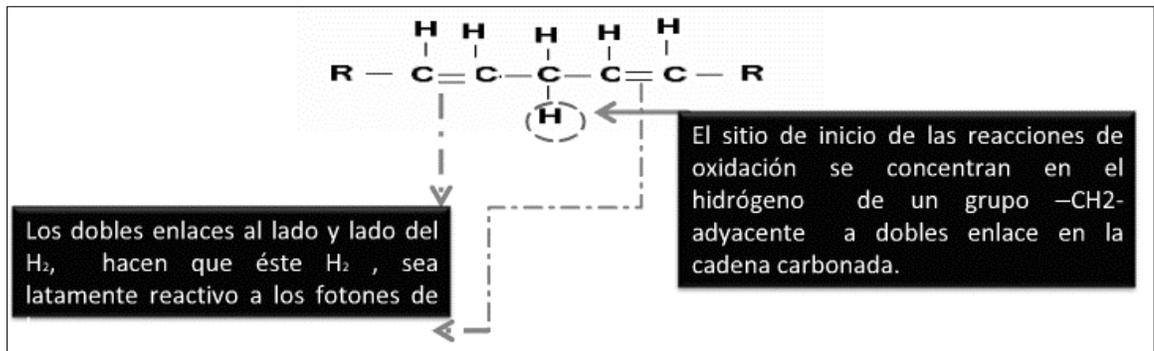


Figura 4. Oxidación química (Vargas)

De igual en forma la oxidación química encontramos 3 etapas las cuales son iniciación, propagación y terminación.

- **Iniciación** En esta primera etapa se forman los radicales libres por acción de los catalizadores como la luz y la temperatura.

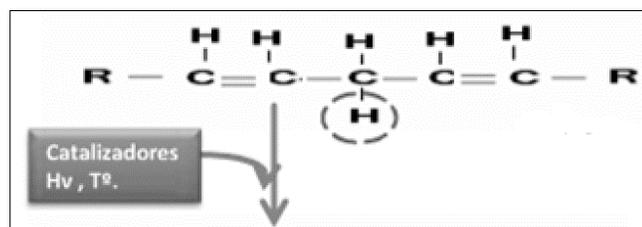
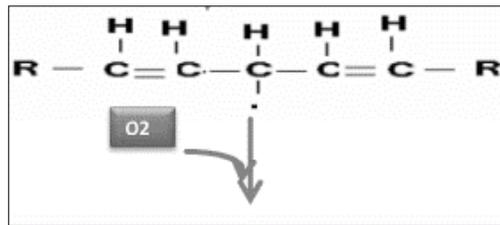


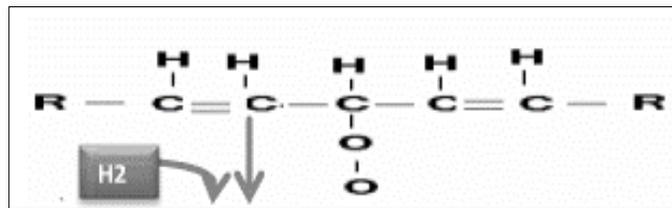
Figura 5: Fase de iniciación de la oxidación lipídica. (Vargas)

- **Propagación**

En esta segunda etapa de la oxidación química se produce una absorción de oxígeno la cual exige la intervención de radicales libres. La propagación está constituida por una cadena de dos reacciones. Consta de la propagación o de reacción de los radicales libres entre sí.



Siguiendo con la reacción encontramos la formación de radicales de peróxido



Y la formación de los hidropéroxidos

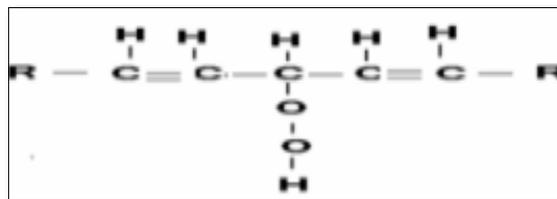
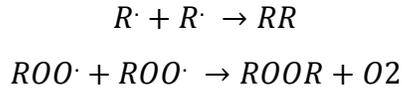


Figura 6. Fase de propagación de la oxidación lipídica (Vargas)

Las reacciones expuestas anteriormente con rápidas, porque los radicales libres portadores de un electrón no apareado son muy reactivos y continuamente reaccionan con el oxígeno.

- **Terminación**

En esta última etapa la propagación termina con la formación de estos productos.



1.2.4 Indicadores de la Capacidad Oxidativa.

El término capacidad oxidativa se refiere a la facilidad de la oxidación de los lípidos contenidos en un alimento cuando toman contacto con el aire, el cual altera considerablemente sus características organolépticas.

1.2.4.1 Oxidación Primaria e Indicadores:

La oxidación primaria se caracteriza por la formación de radicales libres mediante el consumo de energía, que suele proceder de diversos agentes prooxidantes; energía calorífica radiaciones de la luz, iones metálicos, etc.

Estos son los indicadores de la oxidación primaria.

- **Acidez**

La acidez es el contenido de ácidos grasos libres, es el número de miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1 gramo de grasa, cuando se determina el índice de acidez se expresa en miligramos por gramo.

Principio: la muestra se disuelve en una mezcla de solventes adecuada, y los ácidos presentes se titulan con una solución etanòlica o metanòlica de hidróxido de potasio o de sodio. (NTC218, 2011).

Tabla 5. Productos alimenticios con valores aproximados de acidez (NTC218, 2011)

Grupos de Productos (ejemplos)	Valor ácido aproximado
Aceites vegetales refinados Grasas animales	0 a 1
Aceites vegetales crudos Grasas animales con grado técnico	1 a 4 4 a 15
Ácidos grasos madre para jabón	15 a 75
Ácidos grasos técnicos (destilados)	>75

Cálculo

El valor ácido W_{AV} o el contenido de ácidos grasos libres, W_{FFA} , se reportan de la siguiente manera:

- Hasta dos cifras decimales para valores entre 0 hasta 1 inclusive;
- Hasta una cifra decimal para valores entre 1 hasta 100 inclusive;
- Como número entero para valores > 100 .

Además de los siguientes cálculos, el contenido aproximado de ácidos grasos libres (acidez) se calcula a partir de:

$$W_{FFA} = 0,5 \times W_{AV}$$

Valor Acido

El valor ácido, W_{AV} , expresado como la fracción de masa es igual a:

$$W_{AV} = \frac{56,1 \times cV}{m}$$

En donde:

c es la concentración exacta, en moles por litro, de la solución normalizada volumétrica de hidróxido de sodio o de potasio utilizada;

V es el volumen, en mililitros de la solución normalizada volumétrica de hidróxido de sodio o de potasio utilizada;

m es la masa, en gramos de la porción de ensayo. (Incontec, 2011)

- **pH**

Las mediciones de pH se realizan potencio métricamente con un sistema que incluye un electrodo de vidrio sensible a los iones hidrógeno. La conductividad electrolítica es medida colocando una celda generalmente rígida en una solución electrolítica de constante de celda dada. La trazabilidad de estos instrumentos de medición solo es posible garantizarla realizando la calibración y verificación del conjunto medidor-electrodo ó medidor-celda con Materiales de Referencia Certificados. (Valdes, 2009).

Este análisis se toma por duplicado o triplicado, introduciendo el electrodo de potenciómetro previamente calibrado, la diferencia máxima permisible en el resultado de las pruebas realizadas por duplicado no debe exceder de 0.1 unidades de pH en caso de lo contrario realizar nuevamente la toma.

- **Índice Peróxidos**

Esta técnica se emplea en el laboratorio para determinar la cantidad de peróxidos e hidroperóxidos formados en las primeras etapas de la oxidación química o enzimática cuanto la enzima es la lipooxigenasa. Una de las formas para su determinación se pasa en la capacidad que tienen estos compuestos de liberar I_2 cuando reaccionan con el yoduro de potasio. En la técnica los lípidos se disuelven en un solvente orgánico apropiado adicionándose un exceso de KI.

Principio: la muestra de ensayo se disuelve en isooctano (o cloroformo) y ácido acético glacial, se añade yoduro de potasio. El yodo liberado por los peróxidos se determina yodometricamente con un indicador de almidón y una solución normalizada de tiosulfato de sodio. El punto final de la titulación se determina visualmente. (NTC236, 2011).

Cálculos

Para el cálculo del valor de peróxido (conocido comúnmente en la industria como “VP”) en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(v - v_0) \cdot c_{thio} \cdot F \cdot 1000}{m}$$

En donde

V es el volumen de la solución de tiosulfato de sodio utilizada para la determinación, en mililitros;

V₀ es el volumen de la solución normal de tiosulfato de sodio utilizada para el ensayo en blanco, en mililitros;

F es el factor de la solución de tiosulfato de sodio 0,01 N determinando;

C_{thio} es la concentración de la solución de tiosulfato de sodio, en moles por litro;

m es la masa de la porción de ensayo, en gramos. (Icontec, 2011)

- **Índice de yodo**

Determinación del grado de instauración de una grasa, expresado como el número de gramos de yodo absorbidos por 100 g de muestra. Esta técnica es importante porque a mayor número de instauraciones mayor probabilidad de encontrar en la cadena del ácido

graso sistema de insaturaciones no conjugado cis-cis-1,4-pentadieno, $-\text{CH}=\text{C}-\text{H}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$.

Principio: Dilución de la porción de ensayo en un solvente y adición del reactivo de Wijs. Después de un tiempo específico, se adiciona yoduro de potasio y agua y se titula la liberación de yoduro con una solución de tiosulfato sódico. (NTC283, 2012).

Cálculo:

El índice de yodo, VI, expresado en gramos por 100 g de grasa, está dado por la ecuación:

$$\frac{12,69 c (V_1 - V_2)}{m}$$

En donde:

c: Es la concentración de la solución del tiosulfato de sodio, en moles por litro.

V₁: Es el volumen, en mililitros, de la solución de tiosulfato de sodio empleado en el banco.

V₂: es el volumen, en mililitros de tiosulfato de sodio usado para la determinación.

m: es la masa de la porción de ensayo, en gramos. (Icontec, Grasas y Aceites Vegetales y animales. Determinación de índice de yodo NTC 283, 2012)

El resultado se redondea según se indica en la tabla redondeo de los resultados:

VI _{WI} g/100 g	Redondear a
WI < 20	0,1
20 ≤ WI ≤ 60	0,5
WI ≥ 60	1

1.2.4.2 Oxidación Secundaria e Indicadores:

En la oxidación secundaria se ve la formación de especies reactivas más fuertes que los peróxidos, en esto encontramos el malonaldehído que es un compuesto resultante de esta oxidación.

- **TBARS (especies reactivas con el Ácido Tiobarbitúrico)**

La prueba de TBARS sirve para determinar el grado de formación de compuestos carbonílicos derivados de la degradación oxidativa de los lípidos. Esta técnica da positiva en aquellas sustancias que sea reactivas con el ácido tiobarbitúrico. A continuación en la figura 7, se muestra la reacción del malonaldehído con TBA (ácido tiobarbitúrico), la que genera un compuesto de condensación coloreado que absorbe a 530 nm. (Manrique, 2015).

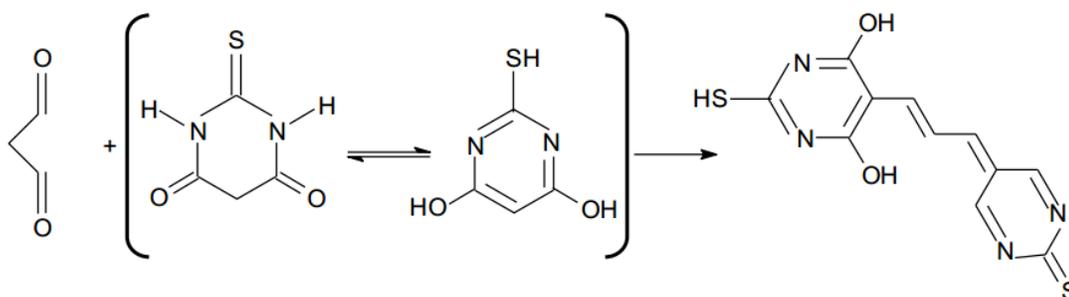


Figura 7: Reacción TBA, (Manrique, 2015)

El índice TBA permite la determinación directa, sin necesidad de aislar previamente los productos de oxidación secundaria. Es aplicable a grasas y aceites vegetales y animales, ácidos grasos y ésteres, no a fosfolípidos o muestras que contengan carbohidratos o proteínas, en las que es necesario la separación previa de la fracción lipídica. (Manrique, 2015)

De igual forma el índice TBA tiene varias limitantes; no siempre se forma el dialdehído, ya que solo proviene de los ácidos poliinsaturados; el TBA produce compuestos amarillo con otros aldehídos; la presencia de la sacarosa interfiere; el dialdehido reacciona con proteínas y reduce su concentración para su determinación. (Badui, 2006)

De igual forma al realizar esta prueba de TBARS se obtiene la cantidad de malondialdehído (MDA) es un aldehído de bajo peso molecular y tres carbonos que puede producirse por diferentes mecanismos Una ruta de formación del MDA se describe en la figura 8, el objetivo de las especies reactivas es el doble enlace carbono-carbono de los ácidos grasos poliinsaturados (I). Este doble enlace debilita el enlace carbono-hidrógeno, permitiendo la fácil abstracción del hidrógeno por un radical libre. Entonces, un radical libre puede abstraer el átomo de hidrógeno y se forma un radical libre de lípidos (II), que sufre oxidación generando un radical peroxilo (III). El radical peroxilo puede reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados, extraer un electrón y producir un hidroperóxido de lípidos (IV) y otro radical libre de lípidos. Este proceso como se puede observar en la Figura 8, puede propagarse continuamente en una reacción en cadena. El hidroperóxido de lípidos es inestable y su fragmentación produce productos tales como malondialdehído (V) y 4-hidroxi-2-nonenal. (Grotto, 2009)

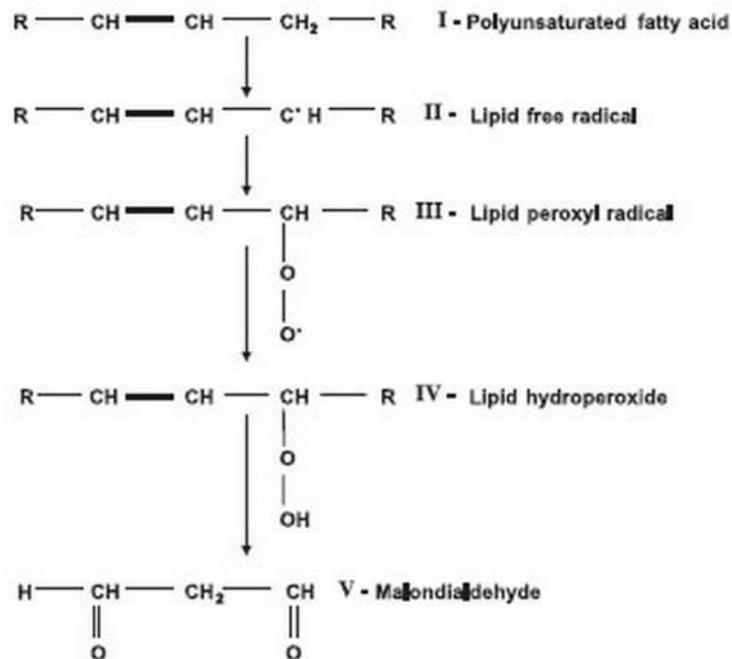


Figura 8: Paso a paso esquemático de la formación de MDA a partir de ácidos grasos poliinsaturados. (Grotto, 2009)

Los estudios han demostrado que una cantidad considerable de MDA puede derivarse de las siguientes fuentes: ácidos grasos con menos de tres enlaces dobles. En este caso, la producción de MDA se debe parcialmente a la oxidación secundaria de compuestos carboxílicos primarios; endoperóxidos implicados en la síntesis de prostaglandinas, degradación oxidativa dependiente del hierro de aminoácidos, carbohidratos, pentosas y hexosas y de productos de radicales libres producidos por irradiación gamma. En los últimos 20 años, la MDA ha sido reconocida como un importante indicador de peroxidación lipídica, ya que los sujetos afectados por varias enfermedades tienen los niveles de MDA aumentados. (Grotto, 2009)

La participación de la peroxidación lipídica en el cáncer es un buen ejemplo; el cáncer es el resultado de la acumulación de múltiples mutaciones en los genes reguladores del crecimiento clave. Estos cambios genéticos son una consecuencia de la inestabilidad de los errores de

replicación de ADN y ADN que resultan de la exposición a genotoxinas exógenas y especies reactivas de oxígeno. La MDA es un contribuyente potencialmente importante para el daño y la mutación del ADN que se produce endógenamente a través de la peroxidación lipídica. Sugieren que el estrés oxidativo aumenta en tumores cerebrales malignos con niveles más altos de MDA en suero y tejido en comparación con controles sanos. Por lo tanto, MDA se puede utilizar como uno de los marcadores para el diagnóstico y el seguimiento de tumores malignos. (Grotto, 2009)

1.3 Radicales libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. (Mario, 2006)

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos, los que producen

distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo. El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuye al aumento de los radicales libres. (Mario, 2006)

1.3.1 Especies reactivas de oxígeno (EROS)

Se considera radical libre (RL) o especie reactiva de oxígeno (ERO) aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad. En la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas:

- O₂ Anión súper óxido.
- H₂O₂ Peróxido de Hidrógeno.
- HO radical hidróxido.
- 1 O₂ Oxígeno singulete.

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular. Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida.

Todos los seres vivos que utilizan O₂ para la liberación de energía generan RL. Existen varias fuentes capaces de producirlos, dentro de ellas las mitocondrias constituyen las más importantes aunque existen otras como los peroxisomas (Organelos del citosol muy ricas en oxidasa), los leucocitos polimorfonucleares (cuando se activan por diversas proteínas que actúan sobre ellos, ejemplo complemento, interleukinas, etc., particularmente durante los procesos inflamatorios) y la enzima xantina deshidronasa, que se encuentran en los endotelios.

(Gerschman, 1954) Sugirió por primera vez que las ERO eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos:

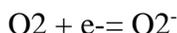
1. Los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.

2. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos

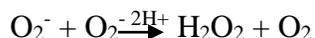
3. La producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.(Oxilia, 2010)

1.3.2 Anión superóxido

El anión superóxido (O_2^-) es creado por la adición de un electrón a la molécula de oxígeno, resultando en una especie altamente reactiva capaz de provocar oxidación lipídica, peroxidación y daño al ADN:



Las moléculas de O_2 pueden sufrir un proceso de dismutación (óxido-reducción) en presencia de iones de H^+ determinando la formación de oxígeno y H_2O_2 :



La coexistencia de O_2^- y H_2O_2 determina la formación del radical hidroxilo (OH) a través de la denominada reacción de Haber Weiss:



El O_2^- posee una carga negativa, y comparado con otros FR tiene una vida media relativamente mayor, lo que le permite difundir dentro de la célula e incrementar el número de potenciales dianas oxidativas. Además, algunas moléculas de O_2^- pueden proceder directamente de la reacción del oxígeno con compuestos como las catecolaminas, o a través de las reacciones inmunitarias de

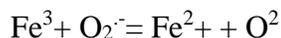
fagocitosis. La siguiente ecuación muestra la formación de $O_2^{\cdot-}$ durante la activación fagocítica: (Fernández, 2009)



1.3.3 Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 es un compuesto no radical perteneciente al grupo de las ROS debido a que puede generar fácilmente otros FR e inducir reacciones oxidativas en cadena. En reacciones catalizadas por metales, como la reacción de Fenton, el H_2O_2 se descompone en un ion OH^- , que es inofensivo, y un radical OH^{\cdot} , el más reactivo y tóxico de las ROS, capaz de atacar estructuras orgánicas estables como los fosfolípidos de membrana, colesterol y proteínas. (Fernández, 2009)

Reacción de Fenton:



1.3.4 Radical hidroxilo

El OH^{\cdot} , aunque no tiene la capacidad de difundir a través de las membranas celulares, posee un alto poder oxidante capaz de provocar peroxidación lipídica y daño oxidativo a las proteínas. Debido a su alta reactividad ocasiona daño molecular en el propio sitio donde se genera. (Fernández, 2009)

1.3.5 Oxígeno singulete

El oxígeno singulete ($1O_2$) es una forma no radical que, a pesar de su corta vida media, tiene la capacidad de difundir a través de la membrana y participar en diferentes reacciones en las que actúa con el oxígeno molecular. La dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en agua puede producir también O_2 . Este compuesto es potencialmente oxidante para los lípidos de membrana, pero aún no se ha demostrado que la contracción muscular durante el ejercicio físico incremente su producción. (Fernández, 2009)

1.3.6 Óxido nítrico

El NO es sintetizado por un grupo de enzimas específicas denominadas óxido nítrico sintetasas (NOS) a partir del aminoácido L-arginina. Las NOS convierten la L-arginina en NO y L-citrulina utilizando NADPH. Esta familia de enzimas se expresa de forma diferencial en múltiples tejidos y pueden clasificarse en: a) neuronal (NOS1), principalmente en células neuronales, pero también en otros tejidos; b) inducible (NOS2) predominante en condiciones inflamatorias y c) endotelial (NOS3) expresada en células del endotelio vascular. En el NO tiene un papel fundamental la célula por su habilidad para activar la enzima guanil ciclasa, resultando en la formación de cGMP. Desde un punto de vista redox, la síntesis excesiva de NO se asocia a estrés nitrosativo y a condiciones inflamatorias y neurodegenerativas (desmielinización, daño neuronal y pérdida oligodendrítica) a causa de su capacidad para reaccionar rápidamente con el $O_2^{\bullet-}$ y producir $ONOO^-$ y con el oxígeno para formar NO_2 . Sin embargo, este potencial nitrosativo que deriva de su capacidad para formar RNS, ha sido contrastado por diferentes estudios que muestran al NO como un compuesto antioxidante y neuroprotector. En este sentido el S-nitrosoglutatión (GSNO) constituye una importante pero limitada fuente de NO, cuya función principal es la de actuar como un segundo

mensajero, que regula a través de la S-nitrosilación la expresión y/o actividad de ciertas proteínas como NF-kappa. Además, una cantidad limitada de NO promueve la vasodilatación y atenúa el daño endotelial bajo condiciones de isquemia. (Fernández, 2009)

1.3.7 Peroxinitrito

La reacción del NO con el $O_2^{\cdot-}$ para producir ONOO- ocurre aproximadamente tres veces más rápido que la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ para producir H_2O_2



ONOO- es un agente altamente oxidante, capaz de provocar daños al ADN y la nitración de las proteínas²⁴. Además, una formación excesiva de este compuesto conduce no sólo a la depleción de grupos tioles, sino también a una reducción en la biodisponibilidad del NO. (Fernández, 2009)

1.4 Antioxidantes

1.4.1 Definición

Un antioxidante puede ser definido como un átomo o molécula que evita o bloquea las especies reactivas y el daño oxidativo, ya sea al interactuar directamente con el oxidante formando un radical menos activo, o al interferir en la cadena de reacciones oxidativas que conducen al daño de los sustratos, tales como lípidos, proteínas, carbohidratos. Una definición más amplia incluye también aquellas moléculas encargadas de reparar el daño oxidativo provocado por las especies reactivas. (Fernández, 2009)

- Antioxidantes grupo primero

Los antioxidantes (AH) de este grupo son aquellos que inhiben, o retardan la oxidación de los ácidos grasos insaturados al interferir, unas veces con la propagación de la cadena de radicales libres, con las etapas de iniciación al facilitar la donación de átomos de hidrogeno a los radicales libres con una neutralización de sus efectos, según el tipo de reacciones.

Dentro de este tipo de antioxidantes resultan muy eficaces los de estructura fenólica: BHA, BHT, GP y tocoferoles, por las 2 razones siguientes:

- Al producir radicales antioxidantes relativamente reactivos y estables, no propagan la cadena.
- Permitir competir por los radicales peroxilos con el sustrato lipídico RH, por lo general presente en más alta concentración.

Antioxidantes grupo segundo

Los compuestos más importantes de este grupo de antioxidantes son los inactivados de metales, capaces de ejercer tres tipos de acciones:

- Desactivar los iones metálicos.
- Promover el inicio de la degradación de los hidroperóxidos.
- Retrasar la formación de aldehídos deletéreos.

Suele funcionar unas veces mediante coordinación con los iones metálicos y modificación de su potencial al suprimir las reacciones redox que lleva a radicales alcoxilos y peroxilos y otras por bloqueo de la formación de hidroperóxidos y promover su degradación.

Antioxidantes grupo tercero

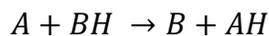
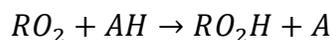
Son compuestos que inhiben la oxidación de los ácidos grasos insaturados al inducir la descomposición de los hidroperóxidos y formar compuestos estables e inactivos. Algunos de ellos como el alfa-tocoferol y el ácido o-hidroxy-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (denominado TROLOX TM por la empresa Hoffman La Roche, Inc.) solubles en agua, resultan débiles destructores de hidroperóxidos. En cambio, agentes reductores como los compuestos en cuya estructura existen fosfitos, fosfuros, azufre o selenio, son bastante más eficaces pero sus actividades tóxicas no les hace aptos para incorporarlos a los alimentos. (Gutierrez, 2000)

1.4.2 Sinergismo

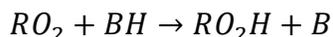
Se dice que el sinergismo se produce cuando dos o más antioxidantes presentes en un sistema muestran un efecto total superior al que se puede estimar por una simple adición de sus efectividades individuales, aunque este fenómeno es bien conocido, la mayoría de los sistemas se han estudiado sobre una base empírica. El fenómeno está asociado con dos sistemas separados: a) mezcla de aceptores de radicales libres y b), agentes quelantes de metales. (Rodriguez & Rodriguez, 1995)

1.4.2.1 Mezcla de Aceptores de Radicales Libres

Podría parecer que el efecto de la mezcla de aceptores de radicales libres es debido tanto a factores estéricos como a cambios en la energía de activación. En el sistema sinérgico que involucre a una sustancia, tal como ácido ascórbico (BH) que tiene un bajo factor estérico e hidroquinona (AH), en que no serán importantes los factores estéricos, podrían tener lugar las siguientes reacciones:



De este modo se elimina la posible desaparición de A por reacción con oxígeno, y se regenera antioxidante efectivo AH. Por sí mismo, el BH no produciría efecto alguno antioxidante significativo, pues la reacción:



1.4.2.2 Agentes Quelantes de Metales

El efecto normal de los agentes quelantes de metales es reaccionar con los iones metálicos prooxidantes y, de este modo, evitar su efecto catalítico en la reacción de oxidación normal, de reacción en cadena. Por esto, esta reacción previene que se realice la oxidación normal, sino únicamente retardar la formación del peróxido, mientras que, al mismo tiempo, prolonga el periodo de inducción. Los prooxidantes metálicos que ya están presentes como parte de las estructuras complejas orgánicas, no están afectados generalmente por agentes quelantes. La estabilidad se alcanza por reacción del metal con ácidos orgánicos del tipo ácido tartárico o cítrico o con sustancias tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA). (Rodríguez & Rodríguez, 1995).

1.4.3 Antioxidantes Sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son propiamente donadores de protones, como el butilhidroxianisol (hidroxianisol butilado, BHA), el butilhidroxitolueno (hidroxitolueno butilado, BHT), la 2,4,5-trihidroxi-*t*-butirofenona (THBP), el 4-hidroximetil-2,6-ditertbutilfenol, la tertbutilhidroquinona (butilhidroquinona terciaria, TBHQ) y los galatos, los cuales podemos observar en la figura 9, los cuales no detienen la formación de los radicales, sino que reaccionan con ellos, los estabilizan y producen radicales del antioxidante menos activos. Es decir, se consumen en la reacción y, por lo tanto, la estabilidad del lípido siempre va a depender de la cantidad residual. (Badui, 2006)

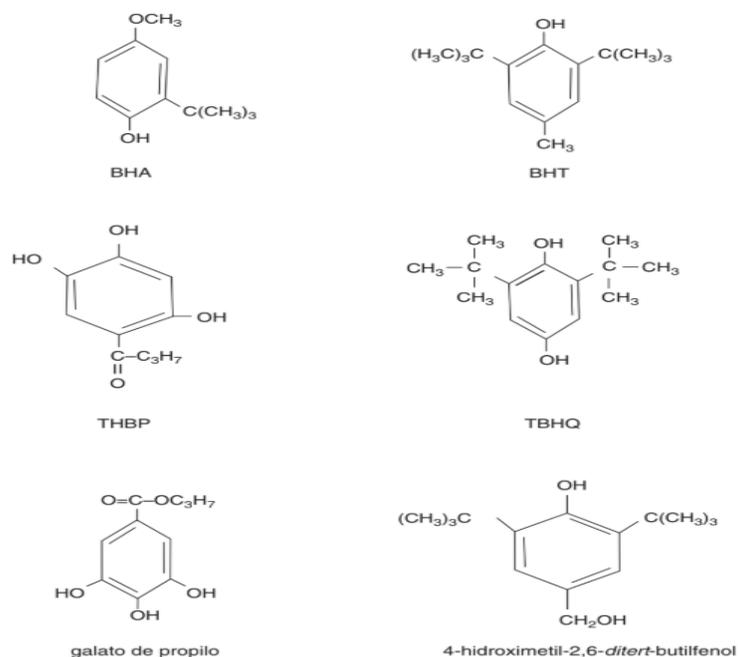


Figura 9: Antioxidantes más comunes. (Badui, 2006)

Además de los compuestos antes mencionados, los agentes secuestradores también inhiben la oxidación, pero por una ruta distinta a la de donación de protones. Los antioxidantes contienen una o más funciones hidroxilo y actúan en la iniciación y propagación de la oxidación al ceder un átomo de hidrógeno a los radicales ácido graso (R•) y a los hidroperóxidos (ROO•), restaurando el ácido (RH) y el hidroperóxido (ROOH). (Badui, 2006)

El BHA es una mezcla de dos isómeros, 2-BHA y 3-BHA, y por contener un solo hidroxilo, al igual que el BHT, es muy lipófilo, insoluble en agua y muy soluble en grasas y aceites; es muy efectivo para prevenir la oxidación de aceites esenciales y pigmentos liposolubles y a temperaturas elevadas desprende olores fenólicos. Por su parte, el BHT actúa mejor en grasas animales que en aceites vegetales. En general, estos dos antioxidantes, BHA y BHT, no son muy activos en aceites vegetales refinados. El BHA, con sodio o potasio, desarrolla un tono rosa como el observado en las mantecas inadecuadamente refinadas, que contienen NaOH y jabones de la neutralización. (Badui, 2006)

El TBHQ, por presentar dos hidroxilos, es un poco más soluble en agua que los anteriores y es el antioxidante más efectivo para los aceites insaturados (soya, canola, algodón, cártamo, etcétera) y los usados en la fritura. De los ésteres del ácido gálico, el galato de propilo es el más común y, por contener tres hidroxilos, es más hidrosoluble; el aumento del tamaño de la cadena alifática los hace más liposolubles, como sus derivados de octilo y de dodecilo. Son inestables a $> 180^{\circ}\text{C}$, por lo que no son recomendables en aceites de fritura. El de propilo, por ser el más hidrosoluble, produce una coloración azul oscura indeseable en presencia de hierro, en una reacción tan sensible que se efectúa con el Fe de la mioglobina de la carne en los embutidos; esto limita su uso en ciertos alimentos y cuando los equipos son a base de este metal. (Badui, 2006)

Los antioxidantes son preventivos y no actúan en los aceites ya oxidados. Su temperatura de volatilización se debe tomar en cuenta, ya que los aceites para freír se pueden quedar desprotegidos. Su aplicación depende de la naturaleza del alimento, pero se adicionan como polvo o líquido, por aspersion o mezclados con otros ingredientes. Su efectividad aumenta considerablemente cuando se combinan entre sí gracias a su efecto sinergista; las mezclas de dos de ellos han mostrado ser más efectivas que los antioxidantes en forma individual a la misma concentración. El uso de atmósferas de gases inertes favorece su acción, como es el caso del TBHQ con EDTA empleadas para prolongar la vida de anaquel de los aderezos y mayonesas inyectados con nitrógeno. Algunos presentan ligera actividad antimicrobiana: el BHA inhibe bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos productores de aflatoxinas. El TBHQ también tiene algo de actividad, sin embargo, por ser lipófilo su coeficiente de participación entre el lípido y las bacterias favorece al primero con lo cual pierden su actividad contra las segundas. Se usan en concentraciones de hasta 200 ppm (0.02%) del contenido de aceite de un alimento, cantidad que es suficiente para la protección, y al mismo tiempo para cumplir con la legislación mexicana. Su

identificación y cuantificación se hace con métodos colorimétricos y de cromatografía de gases. (Badui, 2006)

1.4.4 Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes naturales están presentes en la mayoría de los alimentos vegetales, bloquean el efecto perjudicial de los radicales libres. Los medios de información insisten en las virtudes de productos alimenticios enriquecidos con 40 vitaminas y sus posibles beneficios para la salud, alabando su papel en la lucha contra la "oxidación" del organismo, ante ciertas enfermedades y frente al envejecimiento. Hoy, la nutrición y la dietética no sólo se ocupan de los componentes de los alimentos que aportan beneficios nutritivos: proteínas, grasas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales. Otras sustancias, con propiedad antioxidante, ejercen también un saludable efecto en nuestro organismo. (Hernandez, 2011)

Entre algunos de los alimentos que contienen en su estructura un potencial antioxidante encontramos: Pimientos, Chiles, Ajíes, Cayena, estos alimentos contienen capsicina, el cual es un Poderoso antioxidante, investigaciones recientes han revelado que podría desnutrir las células cancerígenas antes de que éstas causen ningún tipo de problemas. Zanahoria, Tomate, Naranja, Papaya, Lechuga, espinacas estos alimentos contiene carotenoides, los alfa y beta carotenos son precursores de la vitamina A y actúan como nutrientes antioxidantes. Son los únicos carotenoides que se transforman en cantidades apreciables de vitamina A. Té verde, cacao, uvas cebolla roja, cerezas estos alimentos contienen catequinas, por ejemplo, en el té verde según las últimas investigaciones es clave por su alto contenido en catequinas y polifenoles, que actúan como antioxidantes y activadores del metabolismo. (Hernandez, 2011).

Los antioxidantes naturales comprenden a las vitaminas antioxidantes (C y E), los compuestos pro-vitamina A, como carotenos y criptoxantina, otros carotenoides como luteína, licopeno y zeaxantina, y varios compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides). Las frutas y verduras han despertado gran interés por parte de la comunidad pública y científica, puesto que se ha comprobado que promueven la salud de la población humana, reduciendo el riesgo de contraer enfermedades tales como trastornos cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, hiperlipidemia, cáncer, entre otras y porque son fuente de una gran variedad de antioxidantes naturales que pueden ser extraídos y utilizados para disminuir la oxidación de la carne y de productos cárnicos. Entre las frutas más estudiadas para este propósito destacan: ciruelas, uvas, arándano morado, arándano rojo, gayuba o uva del oso, granada, cítricos (lima, limón, naranja), manzana, pera y otras frutas exóticas. (Valenzuela & Pérez, 2016).

1.4.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres.

1.4.5.1 Método Captación de radicales libres por la técnica del radical DPPH (1,1-difenil2-picril-hidrozilo)

DPPH es el radical estándar más frecuentemente utilizado. La actividad antioxidante se expresa como una porción de los radicales reducidos a través de la reacción con antioxidantes de la muestra o en los equivalentes de los antioxidantes individuales, por ejemplo, Trolox (vitamina E comercial

soluble en agua). La actividad antioxidante para los compuestos individuales generalmente se expresa como la concentración eficiente (EC50), que es la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH. (YuliaSnegureva & HermanBudnikov, 2017)

Las reacciones de los antioxidantes con DPPH se basan en la transferencia de electrones que permite el uso de métodos electroquímicos para controlar este proceso. El número de ventajas de los métodos electroanalíticos como la simplicidad, alta sensibilidad, rentabilidad y posibilidad de miniaturización y automatización los hace muy atractivos en el análisis de antioxidantes y podría aplicarse para la evaluación de la actividad antioxidante basada en DPPH. Se han desarrollado varios enfoques electroquímicos para la evaluación de la capacidad antioxidante. Todos ellos se basan en la reacción de DPPH con antioxidantes en solución con diferentes tipos de detección que incluyen voltametría cíclica (CV) y DPV, amperometría y amperometría. La evaluación cuantitativa se basa en la disminución de las corrientes de reducción de DPPH después de la reacción con los antioxidantes.

Los resultados se interpolaron en la curva de calibrado de Trolox (1 mM) y se expresaron en μg equivalentes de Trolox por gramo de peso fresco (YuliaSnegureva & HermanBudnikov, 2017).

Tratamiento de muestra:

- Pesar 0,5 g de muestra aforar a 10 mL con Metanol 80%.
- Sonicar durante 5 minutos a una intensidad del 30%
- Usar muestra para el análisis

Procedimiento:

- Ajustar la absorbancia de la solución DPPH• (200 mg/L) con metanol.
- En una microplaca de pozos sembrar la muestra y la solución de DPPH previamente preparada.
- Adicionar la solución DPPH previamente ajustada a cada muestra y estándar

- Incubar en completa oscuridad durante 30 minutos.
- Leer la absorbancia de la solución resultante a 732 nm

Nota: Este mismo procedimiento se lleva a cabo para la construcción de la curva de calibración. Este procedimiento se le realiza a cada muestra y estándar por triplicado. Para la curva estándar se usa una solución madre de Trolox 10 mM.

Cálculos:

La determinación del porcentaje de Inhibición del ABTS se realiza con base en una curva de calibración construida a partir del % de Inhibición en la absorbancia de las soluciones de Trolox vs. La concentración en [uM].

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - ((\text{Abs M} - \text{Abs BM}) / (\text{Abs Ref}))] * 100$$

Donde:

Abs M: Absorbancia muestra

Abs BM: Absorbancia blanco muestra

Abs BRef: Absorbancia blanco referencia

1.4.5.2 Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)

El ensayo ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se utiliza para medir la capacidad que tiene una sustancia antioxidante para capturar y estabilizar químicamente radicales del tipo peroxilo (ROO•). En la práctica académica como investigativa se usa con frecuencia y como fuente de ROO• el AAPH o ABAP ([2,2'-azobis(2-amidinopropano)]), pero en algunos ensayos como el reportado por Brenelli *et al.*, (2016), emplean el α, α' -azodiisobutyramidina, generando los radicales ROO• mediante una descomposición térmica a 37°C.

Los resultados se pueden expresar por equivalentes de Trolox (TE por gramo de extracto) o μ moles de equivalentes Trolox/100 g de muestra, una vez se determine la diferencia entre AUC de la muestra y la AUC de una solución estándar o patrón (Costa *Et al.*, 2012; Brenelli *et al.*, 2016. En el estudio de la Caracterización y evaluación funcional y de seguridad de compuestos bioactivos de frutas iberoamericanas como ingrediente alimentario la AUC y el ORAC (

expresados en moles equivalentes de Trolox (ET, por litro de muestra), se calcula mediante la siguiente expresión, tanto para la muestra como para la solución patrón.

$$AUC = (0,5 + \left[\sum_{i=1}^{i=3} \frac{f_i}{f_1} \right]) * CT$$

Dónde:

I= número de ciclos

F= unidades de fluorescencia

CT= tiempo de cada ciclo en minutos.

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{trolox}} * \frac{[TROLOX]}{[AH]}$$

1.4.5.3 Actividad antioxidante total (TAA) método colorimétrico Folin-ciocalteu:

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. (Martinez & Fernandez, 2015)

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta

patrón de ácido gálico. Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción. (Martinez & Fernandez, 2015).

En esta técnica, los resultados son expresados como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de muestra. El ácido gálico es un compuesto fenólico empleado en este ensayo como estándar en la elaboración de la curva patrón, pero no es el único fenol como estándar de comparación, frecuentemente son usados otros fenoles como la catequina o los ácidos tánico, clorogénico, caféico, vanílico y ferúlico. En esta técnica, la cantidad de fenoles totales en las muestras se puede calcular por medio de la ecuación 7:

$$\text{Contenido de fenoles } (\mu\text{m de ácido tánico / g de muestra}) = \frac{V_{\text{ex}} * C_{\text{ex}}}{P_m} * 1000$$

Donde P_m es el peso de la muestra analizada, V_{ex} es el volumen del extracto utilizado y C_{ex} es la concentración encontrado en el extracto a partir del modelo matemático lineal de tipo $y = mx + b$ obtenido con la curva patrón. En la revisión de otros protocolos, (Abdelhadi *et al.*, 2015), los resultados se pueden procesar con la ecuación 8, posteriormente, se expresan en miligramos de ácido gálico o equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto seco.

$$\text{Absorbancia} = 0.01674 * \text{ácido gálico} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) + 0.05458$$

1.5 Caléndula

La flor de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) tiene propiedades funcionales importantes para la industria alimenticia derivadas de su composición química. Entre los compuestos con mayor interés se encuentran los antioxidantes (Carotenos, flavonoides y compuestos fenólicos). Los antioxidantes que encontramos en la caléndula previenen o disminuye el desarrollo de las enfermedades degenerativas y la formación de colores y olores desagradables en los alimentos, derivados de la peroxidación lipídica. Entre los antioxidantes identificados en la caléndula se encuentran flavoxantina, luteoxantina, β -caroteno, licopeno, α -caroteno, rutinósido, isorhamnetina, narcisina. Adicionalmente esta flor presenta otros compuestos de interés, como aceites esenciales, luteína, ésteres de luteína, xantofilas, alcoholes triterpénicos, ácidos fenólicos y taninos entre otros. (Marin, 2012)

Los extractos de plantas fuente de antioxidantes como lo es la caléndula, tradicionalmente se usan como aditivos en alimentos, bebidas y forrajes, ya sea en forma de extractos naturales o como compuestos puros, en reemplazo de los aditivos sintéticos y como fuente de antioxidantes en especial de β -caroteno. Los carotenoides se encuentran en las partes verdes, amarillas y colores semejantes de las plantas y frutos. En la flor de caléndula el color característico es el naranja y el amarillo, siendo un indicativo visual de la presencia de carotenoides, el componente principal responsable de la coloración en esta flor es la luteína. (Marin, 2012)

Los aceites esenciales de la caléndula evidencian actividad antibacteriana frente a la bacteria gram negativa *Escherichia coli* y anti fúngica especialmente contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y cepas de hongos patógenos y toxigénicos. Por otra parte, la caléndula presenta actividad fotoestabilizante lo que puede ser aprovechado en la estabilización del color de

alimentos. Este conjunto de propiedades puede ser utilizado en la industria alimenticia como remplazo natural de los preservantes sintéticos.



Flores de *Caléndula officinalis* L. (Sierra, 2018)

La flor de caléndula es aceptada, avalada y monitoreada por la FDA, (en español Administración de Alimentos y Medicamentos) donde se encuentra clasificada como suplemento dietario y es reconocida como ingrediente alimenticio seguro. La flor de caléndula y sus extractos cuentan con un gran potencial para ser utilizada en la industria alimenticia aprovechando sus propiedades como antioxidante, fotoestabilizante, pigmento natural, antimicrobiano y antifúngico. (Marin, 2012)

Esta flor puede constituirse en un aditivo alimenticio de origen natural que potencie la actividad antioxidante de un producto, imparta o intensifique un color específico, mejore su vida útil y remplace o reduzca parcialmente uso de agentes conservantes de origen sintético. La obtención de extractos de caléndula se puede realizar a partir de muestras vegetales secas y molidas, mediante el uso de solventes orgánicos como éter de petróleo, etanol al 96%, metanol, diclorometano, hexano, propilenglicol y mezclas hidroalcohólicas o a través de extracción con fluidos supercríticos.

La flor de caléndula contiene importantes compuestos con acción antioxidante como los carotenos, sin embargo, el contenido de este compuesto en la flor cambia entre las variedades dependiendo de la composición química, el color (naranja, amarillo) y de si los pétalos tienen manchas o no. El secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de los principios activos, por lo cual se plantea la necesidad del secado de las flores de caléndula lo más inmediato a su cosecha, con una temperatura de secado de 80°C evitando pérdidas en el contenido de carotenoides y flavonoides. (Marin, 2012)

Los aceites esenciales ofrecen un gran potencial de uso como conservantes, para Behnaz, T. & Mehdi, R. (2017), pueden reducir las reacciones oxidativas durante la manipulación, procesamiento y almacenamiento de alimentos. La innovación alimentaria gira en torno a utilizar sustancias naturales que posean actividad biopreservadora con una capacidad similar o incluso mayor que la de los conservantes químicos (Guilherme da Silva D, *et al.*, 2016; Asprea *et al.*, 2017), pero es necesario profundizar en estudios toxicológicos para garantizar con seguridad este tipo de sustancias en la elaboración de alimentos. La actividad antioxidante se basa en la composición química del aceite, por lo tanto, autores como Bouchekrit *et al.*, (2016), indican que aceites esenciales que contienen sesquiterpenos oxigenados, monoterpenos y compuestos fenólicos tienen registros mayores propiedades antioxidantes; muchos de ellos pueden ejercer su acción antioxidante como tal pero en algunas ocasiones pueden combinarse entre ellos para establecer un efecto de sinergia y potencializar el efecto antioxidante; este argumento abre nuevas expectativas para el diseño de antioxidantes y conservadores de acción conjunta que contribuyan a preservar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales en las matrices biológicas en donde pueden ser aplicados.

Del alto número de investigaciones que se encuentran en el tema, se tiene evidencia que la actividad antioxidante de los aceites esenciales está en función de la composición química del aceite esencial y que esta última depende del método de extracción empleado; en la tabla 4, se presentan algunos ejemplos de las técnicas analíticas de mayor uso para evaluar la capacidad antioxidante de aceites esenciales. Si el aceite esencial registra un alto contenido de sustancias con capacidad oxidante (agentes reductores), mayor será la capacidad de transferir electrones (ET) ó transferir átomos de hidrógeno (HAT), así lo expuso en su momento Muñoz *et al.* (2007), en donde evaluó y determinó una baja actividad antioxidante en varios aceites esenciales al usar técnicas como la hidrodestilación asistida por microondas y una destilación – extracción simultánea con solvente (SDE); los autores atribuyeron la baja capacidad antioxidante de los aceites a la ausencia de fenoles o sustancias capaces de donar hidrógeno. Dentro del mismo contexto, los trabajos realizados por Costa *Et al.*, 2012, reportan la alta capacidad antioxidante del aceite esencial de lavanda obtenido por fluidos supercríticos, la cual fue es atribuida a monoterpenos presentes en el aceite con tendencia a transferir átomos de hidrogeno - HAT pero una baja capacidad en transferir electrones (ET).

3. METODOLOGIA

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

3.1.1.1 trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

De manera comercial, en un centro de acopio en el Barrio Boyacá en la ciudad de Duitama (Boyacá), se adquirieron 3000 kg de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Cada una de las truchas fueron hembra de 250 kg con un (1) día de captura provenientes de un criadero de la Vereda de Avendaños de la misma Ciudad, fueron entregadas en estado de congelación y transportadas en nevera de icopor hasta el laboratorio. (Figura 10).



Figura 10. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes del centro de acopio.

Una vez en el laboratorio se mantuvieron en congelación convencional hasta la realización de las pruebas de las fases I, II, II

3.1.1.2 Hidrolato de Caléndula

Para la obtención del hidrolato se emplearon flores frescas de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) de 16 semanas de crecimiento y recolectadas en su máxima floración, provenientes del invernadero del SENA CEDAGRO Duitama Boyacá.

El hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) es obtenido mediante hidrodestilación asistida mediante calentamiento óhmico (OAHD) siguiendo la metodología de Sarmiento, O (2016). La extracción por OAHD se realizó de acuerdo a la United States Pharmacopoeia, USP 32 NF27. El sistema de calentamiento óhmico se llevó a 166 V, un amperaje en promedio de 1,9 A y como medio conductor se empleó NaCl al 1%. (Figura 11).

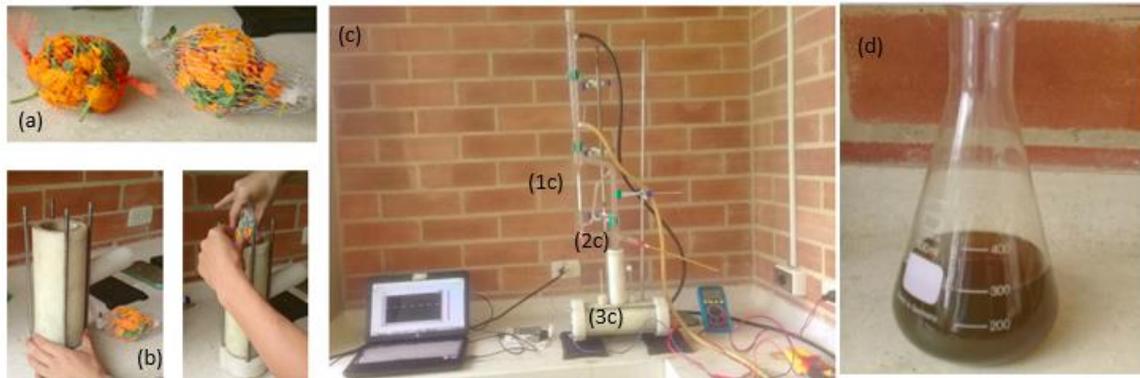


Figura 11. Proceso de extracción del aceite esencial de Caléndula por OAHD: (a): adecuación de la muestra. (b): celda óhmica. (c): equipo destilador OAHD; (1c): Trampa de Clevenger; (2c): adecuación equipo destilador a la celda óhmico; (3c): sistema de calentamiento óhmico, (d) . Hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L).

3.2 Métodos

Para la determinación de proteína de los filetes de Trucha arcoíris, las pruebas experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis físico-químicos de SENA CEDAGRO Duitama Boyacá. Se adquirieron los servicios de un laboratorio externo AOXLAB S.A.S, para la

determinación de la capacidad antioxidante (valor TEAC- DPPH). Las siguientes determinaciones se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de Química del CEAD de Duitama: pH, acidez, marcha fotoquímica, contenido de fenoles e indicadores de la capacidad oxidativa (índice de peróxido y contenido de ácido tiobarbitúrico - TBARS).

3.3 Fases de la investigación

Para desarrollo de esta investigación se llevaron a cabo las siguientes fases:

3.3.1 Fase I: Métodos para la caracterización de la materia prima

En esta fase se relaciona la caracterización del material biológico (Figura 12). Los protocolos se presentan en el **anexo 1** y **anexo 2**. El desarrollo metodológico para la caracterización de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se presentan en la figura 13.

- Caracterización material biológico: filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Se determinó las características sensoriales de frescura de la trucha arcoíris de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana - NTC 1443.

La determinación de acidez total titulable método volumétrico en porcentaje de ácido láctico se desarrolló de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013),

El potencial de hidrógeno- pH de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013). Se empleó un pH metro marca Phywe con previa calibración cada 5 determinaciones.

La determinación de humedad y materia seca se determinó siguiendo el método descrito en (AOAC, 1990) / 964.22.

Para e; porcentaje de grasa o extracto etéreo se aplicó el método extracción sohxlet de acuerdo a lo estipulado AOAC 920.39.

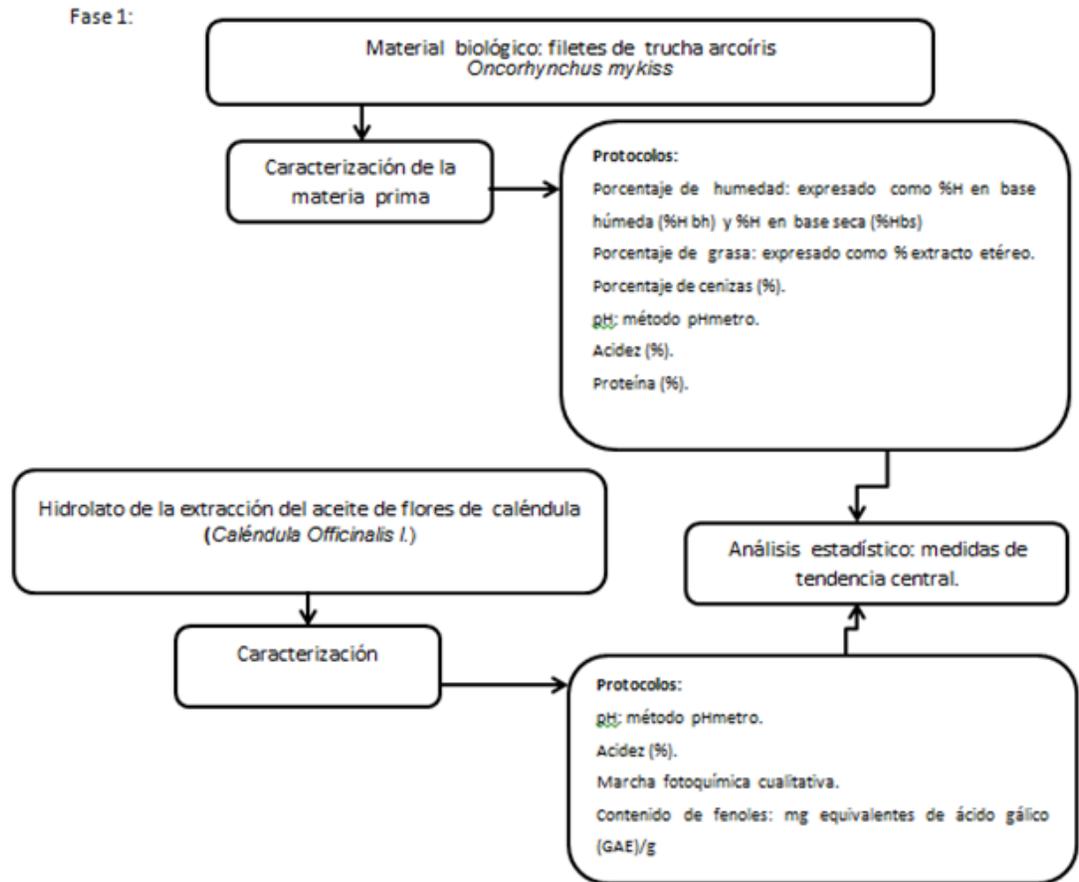


Figura 12. Metodología para la caracterización del material biológico.

- En cuanto a la determinación de proteínas (Método Kjeldahl): siguiendo el protocolo estandarizado del Manual de instructivos y protocolos de laboratorio, control de calidad de alimentos del SENA CEDEAGRO, en base a lo descrito en A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.
- Cenizas: Se determinaron cenizas totales según los métodos descritos en la NTC 1678 y en A.O.A.C., 923.03, 1990; para determinar las cenizas solubles en agua de acuerdo a AOAC 14 th Ed. 31.015; cenizas solubles en ácido clorhídrico (HCl) según lo

recomendado por el Instituto de Salud Pública de Chile (prt-711.02-009 método gravimétrico).



Figura 13. Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); (a): acidez total titulable; (b): pH; (c): humedad y materia seca;(d): grasa o extracto etéreo;(e): Proteína; (f): cenizas.

- Caracterización material vegetal: hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*): Se realizaron las siguientes determinaciones:
 - Porcentaje de acidez total titulable expresada como ácido cítrico de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013), se determinó mediante método volumétrico y se expresó como % de acidez.
 - pH: de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013), se empleó un pHmetro marca Phywe con previa calibración cada 5 determinaciones.

- Determinación de Fenoles totales: Se hizo por el método de Folin-Ciocalteu con ácido tánico como estándar para proceder a elaborar la curva de calibración. Se siguió los parámetros establecidos por (Paladino, s.f) y se hicieron algunos ajustes al método presentados en PNT N°19 (2010), y (Ainsworth, & Gillespie, 2007). Las medidas de absorbancia se hicieron a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se expresaron como contenido de fenoles totales [mg/100 g].
- Marcha fitoquímica: se realizó de forma cualitativa sobre los extractos florales la identificación de taninos, flavonoides, fenoles, quinonas, y leucoantocianidas. de acuerdo a los protocolos expuestos por Calle y Jiménez, (2002).

3.1.2 Fase II: Métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.)

En esta fase se evaluó la capacidad de captación de radicales libres del extracto acuoso siguiendo la metodología de la figura 14.

Se empleó como antioxidante comercial el Butilhidroxitolueno - BHT, el cual se adquirió de manera comercial en PROQUIMICA COLOMBIA S.A.S (**anexo 3**) el cual se empleó como blanco o referencia para evaluar la capacidad antioxidante.

En el **anexo 4** se presentan las marchas analíticas de laboratorio de cada una de las determinaciones:

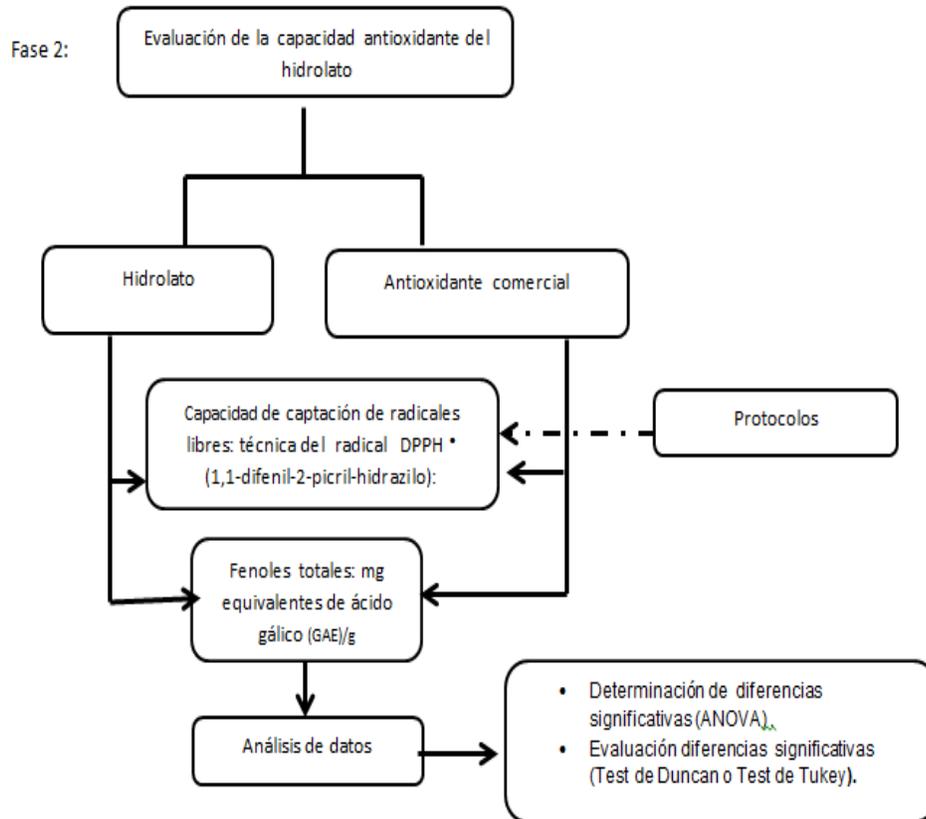


Figura 14. Metodología para la evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*)

- Capacidad de captación de radicales libres: técnica del radical DPPH • (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo): se llevó de acuerdo al protocolo estandarizados por laboratorios AOXLAB, 2017. Se preparó una solución de DPPH a 200 mg/L en metanol. Las muestras de hidrolato se prepararon a una concentración de 0.05 g/ mL en metanol al 80%. Se preparó una curva estándar de Trolox a una concentración de 10 mM. La reacción en la muestras como en el estándar con la solución de DPPH se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-22 °C), con agitación y en completa oscuridad durante 30 minutos. Las absorbancias se leyeron a 517 nm. Los resultados fueron expresados como TEAC (actividad antioxidante equivalente a trolox), la cual se expresa en unidades de $\mu\text{moles Trolox} / \text{L}$. La determinación del porcentaje

de Inhibición del DPPH se realizó con base en una curva de calibración construida a partir del % de Inhibición en la absorbancia de las soluciones de Trolox vs. la concentración de trolox en [uM].

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - ((\text{Abs M} - \text{Abs BM}) / (\text{Abs Ref}))] * 100$$

Donde:

Abs M: Absorbancia muestra

Abs BM: Absorbancia blanco muestra

Abs BRef: Absorbancia blanco referencia

- Determinación de Fenoles totales: Se hizo por el método de Folin-Ciocalteu con ácido tánico como estándar para proceder a elaborar la curva de calibración. Se siguió los parámetros establecidos por (Paladino, s.f) y se hicieron algunos ajustes al método presentados en PNT N°19 (2010) y Ainsworth, & Gillespie, (2007). Las medidas de absorbancia se hicieron a una longitud de onda de 760 nm, los resultados fueron expresados en mg equivalentes de TAE/100 gramos de hidrolato (contenido de fenoles totales [mg/100 g]).

3.1.3 Fase III: Métodos para la determinación de la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

En esta fase se evaluó la determinación de los indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) conservados en el hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) siguiendo la metodología de la figura 15 y en el **anexo 5** se presentan los protocolos de laboratorio de cada una de las siguientes marchas analíticas:

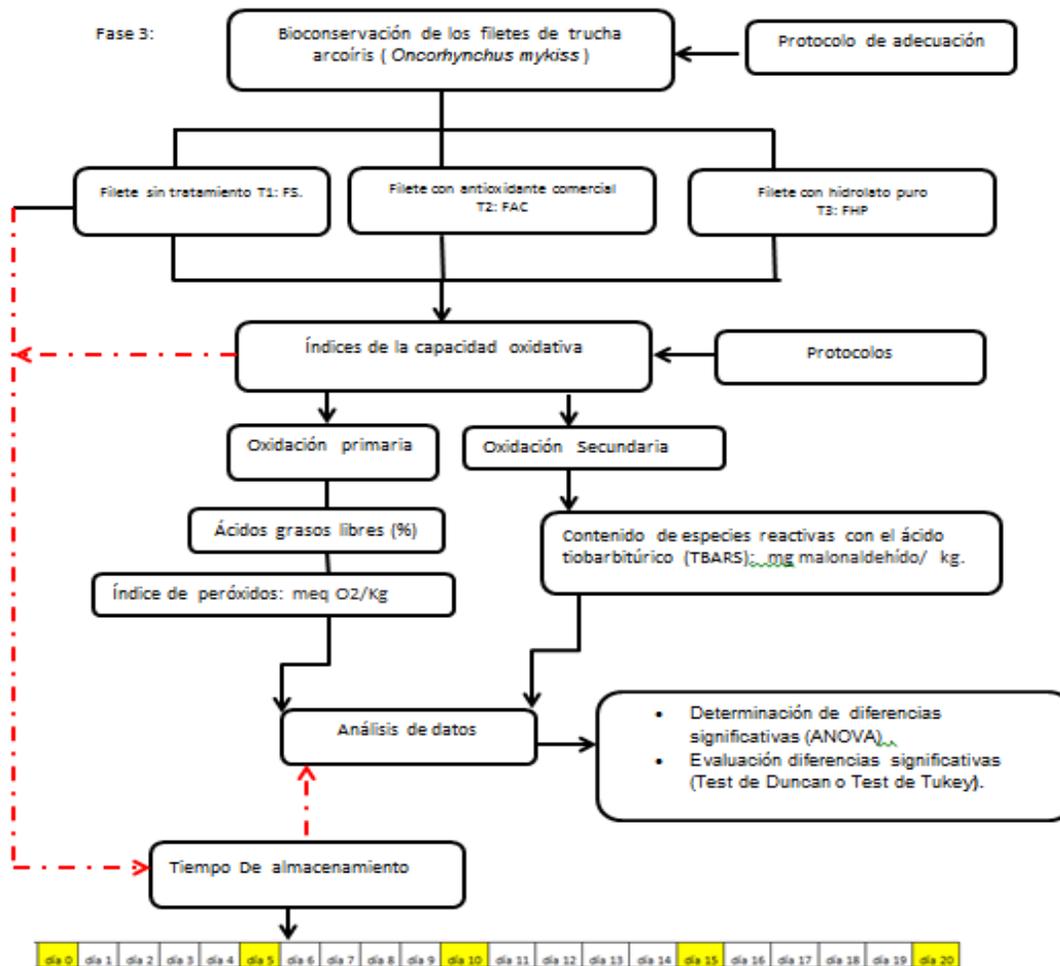


Figura 15. Bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

- Índice de peróxido: Se procedió de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC-236. Los resultados se expresaron en valor de peróxido- PV (meq-O₂/Kg).
- Índice de acidez: se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en norma mexicana NMX-F-101-SCFI-2012 en porcentaje de ácido oleico. Los cálculos se expresaron como contenido de ácidos grasos Libres (%AGL).

- Contenido de especies reactivas de ácido tiobarbiturico (índice de TBARS): fue evaluado mediante determinación colorimétrica de acuerdo con Perez, et al (2013), con algunas modificaciones como la preparación, cantidad de las muestras y el volumen de ácido tricloroacético empelado (TCA). Se elaboró una curva de calibrado con diferentes concentraciones del patrón malonaldehído a 1000 ppm, se realizaron medidas de absorbancia a 530 nm. Se construyó la curva y se determinó la ecuación de la recta para determinar a partir de ella la cantidad de μ moles de malonaldehído presentes en las muestras. Los resultados se expresaron contenido de MDA expresados en TBA (mg MDA/Kg) siguiendo la base de cálculo expuesto por López, et al (s.f), de la Universidad De Valencia.
- pH: de acuerdo Perez, et al (2013). Se empleó un pHmetro marca Phywe con previa calibración cada 5 determinaciones.

A continuación se describe la preparación de las muestras de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) según tratamientos experimentales:

A las truchas frescas y descongeladas se les realizó una limpieza con agua potable, se revisó que no existieran restos de vísceras en su interior y se realizó escamación. Se les retiró cabeza y cola obteniendo 200 gramos de parte comestible y luego se desinfectaron con una solución de ácido láctico al 2 %.

De la parte comestible se dividieron en 4 porciones quedando cada una de ellas de 50 gramos.

Los tratamientos fueron (Figura 16):

FS: Filetes de trucha arcoíris sin ninguna clase de tratamiento: se tomaron 16 porciones de trucha cada una de ellas de 50 gramos para un total de 800 gramos y se dejaron en refrigeración a 4,4 °C por 12 horas en un recipiente plástico.

FAC: Filetes de trucha arcoíris impregnadas en antioxidantes comercial –BHT: se pesaron 0.16 gramos del antioxidante BHT de acuerdo a la resolución 02310 de 1986 del INVIMA. Se pesaron 0.12 gramos de glicerina de acuerdo al Codex Alimentarius volumen 1A 1999. La emulsión se preparó mezclando el antioxidante BHT y la glicerina en 100 ml agua a una temperatura de 25 °C. Porciones de trucha cada una de ellas de 50 gramos para un total de 800 gramos fueron impregnados con esta emulsión y se dejaron en refrigeración a 4,4 °C por 12 horas en un recipiente plástico. El tratamiento FAC se tomó como tratamiento control.

FHP: Filetes de trucha arcoíris impregnadas en el hidrolato de caléndula: Porciones de trucha cada una de ellas de 50 gramos para un total de 800 gramos fueron impregnados con 900 ml de hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) y se dejaron en refrigeración a 4,4 °C por 12 horas en un recipiente plástico.



Figura 16. Tratamientos para la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris.

Pasadas las 12 horas de refrigeración (4.4°C) se procedió a empaclar las muestras en bolsas ziploc de 500 gramos y se almacenaron a esta misma temperatura por 20 días, tomando muestras para los análisis cada 5 días (Tabla 6, figura 17).

Tabla 6. Tratamientos y Tiempos de almacenamiento (4.4°C)

Día 0 (t₀)	Día 5 (t₅)	Día 10 (t₁₀)	Día 15 (t₁₅)	Día 20 (t₂₀)
FSR ₁	FSR ₁	FSR ₁	FSR ₁	FSR ₁
FSR ₂	FSR ₂	FSR ₂	FSR ₂	FSR ₂
FSR ₃	FSR ₃	FSR ₃	FSR ₃	FSR ₃
FACR ₁	FACR ₁	FACR ₁	FACR ₁	FACR ₁
FACR ₂	FACR ₂	FACR ₂	FACR ₂	FACR ₂
FACR ₃	FACR ₃	FACR ₃	FACR ₃	FACR ₃
FHPR ₁	FHPR ₁	FHPR ₁	FHPR ₁	FHPR ₁
FHPR ₂	FHPR ₂	FHPR ₂	FHPR ₂	FHPR ₂

FHPR ₃				
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

FS: Filete sin tratamiento; FAC: Filete con antioxidante comercial; FHP: Filete con hidrolato puro.

R_{1,2,3}: Replicas

- Evaluación sensorial: Se realizó un análisis sensorial descriptivo siguiendo el método expuesto por Santaella M (2012) sobre los filetes sometidos a los diferentes tratamientos para evaluar preliminarmente el nivel de impacto en el olor, color, sabor y textura del hidrolato (*Caléndula officinalis L.*) sobre el producto con un grupo de 6 panelistas no entrenados. De acuerdo con estos autores se aplicó el formato con las características a evaluar y se empleó una escala puntuada que osciló entre 10 como máxima calificación y 3 como la menor calificación; los parámetros evaluados fueron: apariencia, olor y textura. El análisis sensorial se realizó a tiempo cero (t_0) es decir el primer día en que las muestras estuvieron refrigeradas y con los respectivos tratamientos y a los 20 días de almacenamiento (t_{20}) como tiempo final. La preparación de las muestras consistió en una cocción a la plancha por 20 minutos sin adición de aderezos o saborizantes.



Figura 17. Sistema de empaqueo e identificación de los filetes de trucha por tratamientos.

4. ANALISIS ESTADISTICO

4.1 Fase I: Caracterización de la materia prima

Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación, sesgo estandarizado y curtosis.

4.2 Fase II: Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*)

Para evaluar la capacidad antioxidante del extracto acuoso se formuló un diseño a una vía de clasificación con efectos fijos por bloques. Se emplearon 2 técnicas para la determinación de

la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) y del antioxidante comercial (Butilhidroxitolueno - BHT); se obtuvieron tres replicas por técnica para un total de 9 unidades experimentales.

El modelo estadístico aplicado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es la capacidad antioxidante de acuerdo a la técnica de contenido de fenoles y DPPH; Y_{isr} es la cantidad de antioxidante producido en r-esima observación replica, cuando se aplica j-esima observación y en la y-esima tratamiento; μ =media global de antioxidante independiente del tratamiento; τ_i =efecto del tratamiento sobre la capacidad antioxidante; β_j = efecto de bloqueo (técnica aplicada sobre la concentración de antioxidantes). Montgomery, (2000).

Para la discusión de resultados los datos se tabularon y procesaron a través del programa estadístico SPSS 24 para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad de la experimentación a través del análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas entre las medias de los grupos fueron estimadas a un nivel de significancia del 95 % para establecer el efecto bioconservante del extracto acuoso de caléndula sobre los filetes de trucha arcoíris durante 20 días de almacenamiento refrigerado (4.4°C). Se realizó un análisis de correlación (R^2) entre las dos técnicas de evaluación de la actividad antioxidante para analizar el proceso oxidativo del hidrolato.

4.2.1 Hipótesis

4.2.1.1 Hipótesis de Investigación

EL hidrolato proveniente de la extracción del aceite esencial de las flores de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) registra un alto contenido de fenoles y una alta capacidad antioxidante para ser usando como bioconservante en filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

4.2.1.2 Hipótesis estadística.

H₀ : la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis .L*) no difiere de la capacidad antioxidante del Butilhidroxitolueno – BHT (no presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

H_a: la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) difiere de la capacidad antioxidante del Butilhidroxitolueno – BHT (presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

4.3 Fase III: bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria.

Para evaluar el efecto antioxidante del hidrolato de caléndula sobre los filetes de trucha arcoíris se formuló un diseño factorial de una vía de clasificación considerando el tiempo como covariable, el modelo estadístico aplicado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + T_j + \varepsilon_{ijr} \begin{cases} i = 1,2,3 \\ j = 1,2,3,4,5 \\ r = 1,2,3 \end{cases}$$

En donde: Y_{ij} es:

- Contenido de ácidos grasos libres del nivel del factor i en el tiempo j .
- Contenido de peróxidos del nivel del factor i en el tiempo j .

- Contenido de malonaldehído (Índice de TBARS) del nivel del factor *i* en el tiempo *j*.
- pH del nivel del factor *i* durante el tiempo *j*.

μ = media global.

τ_i = factor (antioxidante *i*=1, tratamiento testigo; *i*=2, BHT comercial *i*=3, Hidrolato de caléndula.)

T_j =tiempo en que se toma la medida (covariable).

r = número de réplicas.

Durante los 20 días de almacenamiento se tomaron cada 5 días las determinaciones analíticas de la fase III. Los ensayos se realizaron por triplicado para un total de 15 réplicas por método de conservación para un total de 45 unidades experimentales por indicador de la capacidad oxidativa; en total se obtuvieron 180 unidades experimentales.

Tabla 7. Tratamiento y replicas para la determinación de la capacidad oxidativa del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) sobre los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

	Tratamiento	Replica	Covariable (Tiempo)	Indicador Capacidad Oxidativa.
Métodos de Conservación.	FS: filete sin tratamiento.	R ₁	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ ,t ₂₀	% Ácidos Grasos Libres
		R ₂	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ ,t ₂₀	Índice de peróxidos PV(meq- O ₂ /Kg)
		R ₃	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ ,t ₂₀	pH
	FAC: filete con antioxidante comercial.	R ₁	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ ,t ₂₀	Contenido de malonaldehído:
		R ₂	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ ,t ₂₀	TBA (mg MDA/Kg de muestra)
		R ₃	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ ,t ₂₀	

	FHP: filete	R ₁	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ , t ₂₀	
	con hidrolato	R ₂	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ , t ₂₀	
	puro.	R ₃	t ₀ , t ₅ , t ₁₀ , t ₁₅ , t ₂₀	

Para la discusión de resultados los datos se tabularon y procesaron a través del programa estadístico SPSS 24 para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad de la experimentación a través del análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas se evaluaron a través de la prueba de Tukey para establecer el efecto bioconservante del extracto acuoso de caléndula sobre los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), durante 20 días de almacenamiento refrigerado (4.4°C).

4.3.1 Hipótesis

4.3.1.1. Hipótesis de Investigación

El hidrolato de hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) posee capacidad antioxidante para evitar o inhibir la producción de sustancias propias de la oxidación primaria y secundaria de los ácido grasos poliinsaturados presente en los filetes de trucha filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando es almacenada a temperaturas de refrigeración (4.4°C) por un tiempo 20 días.

4.3.1.2 Hipótesis estadísticas

H₀: el % de ácidos grasos libres de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

H_a: el % de ácidos grasos libres de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) difieren entre si (presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

H₀: el índice de peróxidos (meq - O₂/Kg) de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) no difieren entre si (no presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

H_a: el índice de peróxidos (meq - O₂/Kg) de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) difieren entre si (presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

H₀: el pH de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

H_a: el pH (meq - O₂/Kg) de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) difieren entre sí (presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

H₀: el Contenido de malonaldehido TBA (mg MDA/Kg de muestra) de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

H_a: el Contenido de malonaldehido TBA (mg MDA/Kg de muestra) de cada uno de los tratamientos (FS, FAC, FHP) difieren entre sí (presentan diferencias significativas):

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

4.4 Variables

4.4.1 Variables independientes: gramos de materia prima trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), cantidad de hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*), cantidad de Butilhidroxitolueno – BHT.

4.4.2 Variables dependientes o de respuesta:

Fase I: % de humedad, % de materia seca, % de grasa, % proteína, acidez, pH, cenizas, contenido de fenoles [mg/100 g].

Fase II: VALOR TEAC (DPPH) [μ moles/L], Contenido de fenoles totales [mg/100 g].

Fase III: contenido de peróxidos-PV (meq-O₂/Kg), contenido de ácidos grasos Libres (%AGL), el contenido de MDA expresados en TBA (mg MDA/Kg), pH.

4.4.3 Variables de ruido:

- forma de cultivo de caléndula, identificación taxonómica de la flor de caléndula, el tamaño de la flor y la heterogeneidad del tamaño de la flor de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).
- Condiciones del cultivo de la trucha arcoíris, genética de la especie de la trucha arcoíris.

4.4.4 Condiciones fijas:

- Proceso de obtención del extracto: calentamiento óhmico a 166 V, un amperaje en promedio de 1,9 A.
- Temperatura de refrigeración 4.4 °C.

5. RESULTADOS

5.1 Fase I: Caracterización de la materia prima

5.1.1 Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Los resultados obtenidos en la caracterización del material biológico se presentan en la tabla 8; en el **anexo 6** se presentan los datos según número de réplicas; en el **anexo 7** se presentan los resultados de las medidas de tendencia central. En el **anexo 8** se presentan las características sensoriales de frescura de la trucha arcoíris de acuerdo a la norma técnica colombiana NTC 1443.

Tabla 8. Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Parámetro						
% Humedad	%Materia Seca	% Grasa	% Proteína	%Ceniz as	% Acidez	Ph
88.7^a	11.33 ^a	4.03 ^a	24.63 ^a	4.3 ^a	1.3 ^a	6.01 ^a
(1.9)	(1.9)	(0.32)	(0.5)	(0.7)	(0.24)	(0.001)

^a media aritmética de los datos. Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar (n=3).

5.1.2 Caracterización material vegetal: hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L).

Los resultados obtenidos de la caracterización del material vegetal se presentan en la tabla 9; en el **anexo 9** se presentan los datos según número de réplicas; en el **anexo 10** se presentan los resultados de las medidas de tendencia central. Los resultados del contenido de fenoles totales en [mg/100 g] fueron procesados mediante la ecuación (1) obtenida por regresión lineal a partir de los datos de la curva patrón empleando como estándar diferentes soluciones de ácido tánico. En el **anexo 11** se presenta la curva patrón obtenida para conocer la concentración de fenoles totales.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*)

Parámetro		
% de acidez	pH	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]
0,18 ^a	5,3 ^a	454,96 ^a
(0,048)	(0,005)	(3,052)

^a media aritmética de los datos. Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar (n=3). Ecuación (1)

$$Y = 0.0158x - 0.0358$$

$$R^2 = 0.993$$

En la tabla 10 se presenta la marcha fitoquímica realizadas al extracto acuoso de caléndula (*Caléndula officinalis L.*), en el **anexo 12** se presenta los resultados y el registro fotográfico:

Tabla 10. Marcha fitoquímica del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*)

	Cloruro férrico (fenoles)	acetato de plomo (Fenoles)	Shinoda (Flavonoides)	Leucoantocianidas
Hidrolato	+	Parcialmente (+)	+	+
Patrón de comparación ácido tánico.	+	+	+	+

5.2 Fase II: Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*):

En la tabla 11 se presentan los datos experimentales de la actividad antioxidante del hidrolato y del Butilhidroxitolueno – BHT en donde en el contenido de fenoles totales [mg/100 g] fueron

procesados mediante la ecuación (1) obtenida a partir de los datos de la curva patrón empleando como estándar diferentes soluciones de ácido tánico. Para el valor TEAC (DPPH) ($\mu\text{moles/L}$) la determinación del porcentaje de Inhibición del DPPH se realizó con base en una curva de calibración construida a partir del porcentaje (%) de Inhibición en la absorbancia de las soluciones de Trolox vs. la concentración en $[\mu\text{M}]$ empleando la ecuación 2. En el **anexo 13** se presentan los datos según número de réplicas para la determinación del valor TEAC (DPPH) $[\mu\text{moles/L}]$. En el **anexo 14** se puede revisar el estadístico completo en donde se presenta la media aritmética y el análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 11. Actividad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) y del BHT

Tratamiento	Contenido de fenoles	VALOR TEAC (DPPH)
	totales $[\text{mg}/100 \text{ g}]$	$[\mu\text{moles/L}]$
Hidrolato de caléndula <i>(Caléndula officinalis L.)</i>	454,96 ^a	76,148 ^c
antioxidante (BHT)	1083,4 ^b	1051,4 ^d

^{a,b} : indica que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de significancia del 95% ($P_v= 0.001$). ^{c, d} : indica que hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estimadas al nivel de significancia del 95% ($P_v= 0.012$).

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - ((\text{Abs M} - \text{Abs BM}) / (\text{Abs Ref}))] * 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Se realizó la correlación entre las técnicas de evaluación antioxidante: en la figura 18 se representan los valores del contenido de fenoles totales $[\text{mg}/100 \text{ g}]$ Vs valor TEAC (DPPH) $[\mu\text{moles/L}]$ con un R^2 0.499994. Los estadísticos del coeficiente de correlación se presentan en el **anexo 15**.

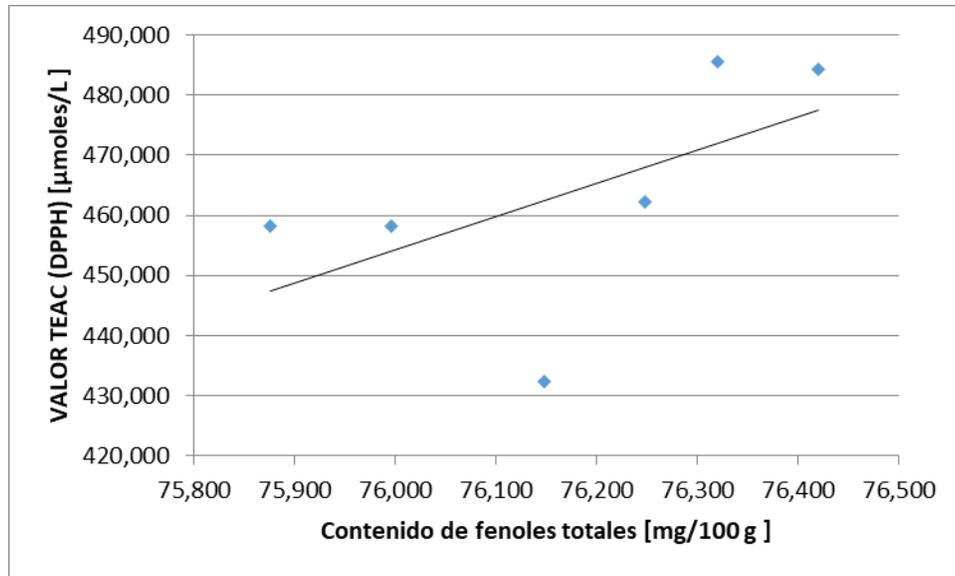


Figura 18. Correlación entre Valor TEAC (DPPH) Vs Contenido de fenoles totales [μmoles/L].

5.3 Fase III: bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) - indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria.

En esta fase se evaluó los indicadores que dan información sobre el estado de oxidación (primaria y secundaria) de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) durante 20 días de almacenamiento tomando replicas a los 0, 5, 10, 15 y 20 días de refrigeración (4.4°C); en el **anexo 16** se presentan los datos según número de réplicas; en el **anexo 17** se presenta el análisis de varianza ANOVA. En las tablas 12, 13, 14 y 15 se presentan los resultados obtenidos para pH, índice de acidez, índice de peróxidos e índice TBARS.

Tabla 12: Variación en el contenido de pH, durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris en el extracto acuoso de caléndula.

Tiempo de almacenamiento	FS	FAC	FHP
0	6,33 ^a	6,42 ^a	6,36 ^a
5	6,37 ^a	6,42 ^a	6,40 ^a
10	6,50 ^a	6,40 ^{a,b}	6,40 ^{a,b}
15	7,47 ^a	6,83 ^a	6,73 ^a
20	8,30 ^a	7,17 ^a	7,10 ^a
FS		DS*	DS*
FAC	DS*		NS**
FHP	DS*	NS**	

^a : dentro de una misma fila hay diferencia significativa entre las medias de los grupos estimadas al nivel de significancia del 95% (P_v= 0.00). ^b : dentro de una misma fila no hay diferencia significativa . DS*: La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05. NS**:
No hay significancia en el nivel 0,05.

Tabla 13 : Variación en el contenido de ácidos grasos Libres (%AGL)., durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris en el extracto acuoso de caléndula.

Tiempo de almacenamiento	FS	FAC	FHP
0	1,28 ^a	0,58 ^a	0,63 ^a
5	1,77 ^a	1,07 ^{a,b}	1,08 ^{a,b}
10	1,89 ^a	1,68 ^a	1,57 ^a
15	3,68 ^a	1,83 ^{a,b}	1,85 ^{a,b}
20	5,13 ^a	2,09 ^a	2,15 ^a
FS		DS*	DS*

FAC	DS*	NS**
FHP	DS*	NS**

^a : dentro de una misma fila hay diferencia significativa entre las medias de los grupos estimadas al nivel de significancia del 95% ($P_v= 0.00$). ^b : dentro de una misma fila no hay diferencia significativa . DS*: La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05. NS** : No hay significancia en el nivel 0,05.

Tabla 14: Variación en el contenido de peróxidos-PV (meq-O₂/Kg) durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris en el extracto acuoso de caléndula.

Tiempo de almacenamiento	FS	FAC	FHP
0	4,63 ^a	5,00 ^a	3,97 ^a
5	7,48 ^a	5,61 ^a	5,47 ^a
10	10,03 ^a	6,60 ^a	7,62 ^a
15	13,00 ^a	6,78 ^a	7,98 ^a
20	16,05 ^a	6,39 ^a	8,13 ^a
FS		DS*	DS*
FAC	DS*		NS**
FHP	DS*	NS**	

^a : dentro de una misma fila hay diferencia significativa entre las medias de los grupos estimadas al nivel de significancia del 95% ($P_v= 0.00$). DS*: La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05. NS** : No hay significancia en el nivel 0,05

Se elaboró una curva de calibración con diferentes concentraciones del patrón manolaldehído a 1000 ppm (**anexo 18**), se realizaron medidas de absorbancia a 530 nm. Se construyó la curva y se empleó la ecuación (3) para determinar los μ moles de malonaldehído presentes en las muestras. Los resultados se presentaron como contenido de MDA expresados en TBA (mg MDA/Kg):

$$y = 0,1279x + 0,0337$$

$$R^2 = 0,9927$$

Tabla 15: Variación en el contenido de MDA expresados en TBA (mg MDA/Kg): durante la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris en el extracto acuoso de caléndula.

Tiempo de almacenamiento	FS	FAC	FHP
0	0,82 ^{a,b}	0,81 ^{a,b}	0,68 ^a
5	2,58 ^a	1,23 ^{a,b}	1,22 ^{a,b}
10	4,34 ^a	1,72 ^a	1,81 ^a
15	5,80	1,91 ^a	2,46 ^a
20	7,33 ^a	2,18 ^a	2,90 ^a
FS		DS*	DS*
FAC	DS*		NS**
FHP	DS*	NS**	

^a : dentro de una misma fila hay diferencia significativa entre las medias de los grupos estimadas al nivel de significancia del 95% ($P_v = 0.00$). ^b : dentro de una misma fila no hay diferencia significativa . DS*: La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05. NS** : No hay significancia en el nivel 0,05

Los resultados correspondientes de la evaluación sensorial se presentan en la Figura 19 y en el

anexo 19 se presentan los resultados obtenidos por parte de los 6 panelistas.

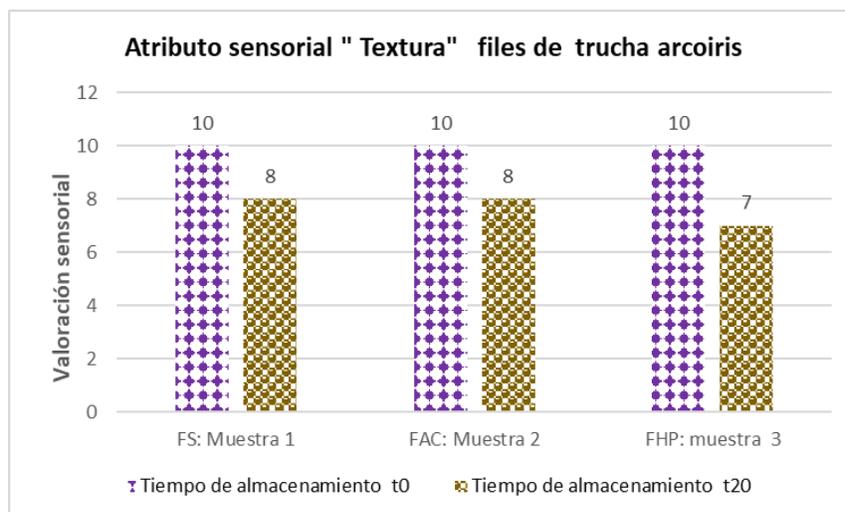
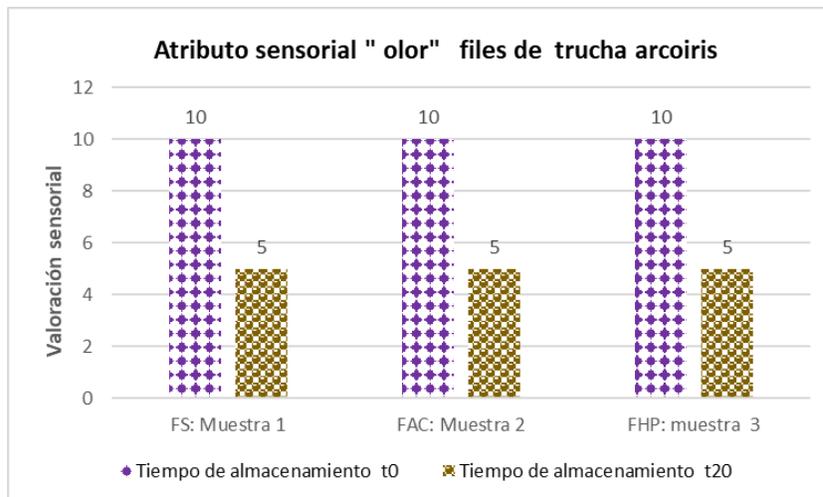
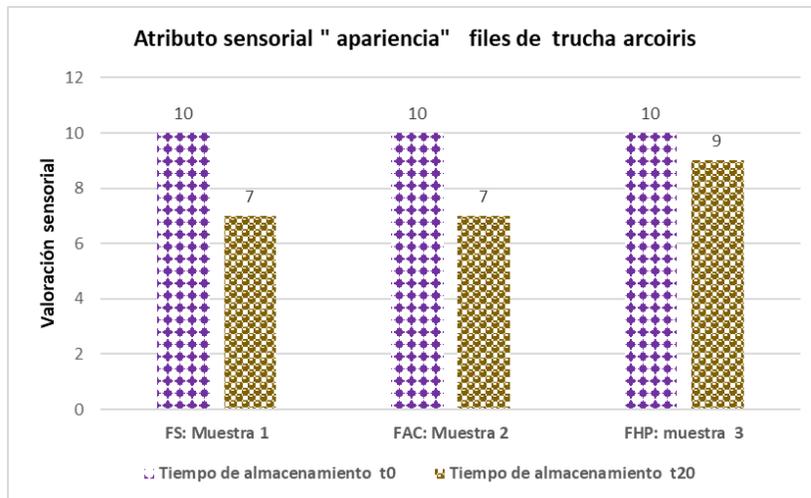


Figura 19. Evolución de los atributos sensoriales de filetes de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

6. ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 Fase I: Caracterización de la materia prima

6.1.1 Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Los resultados de la caracterización del material biológico de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se presentan en la tabla 8.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede indicar que el contenido de promedio de humedad de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 88.7 % en las condiciones establecidas y mencionadas en el capítulo de metodología, el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 1.9 puntos lo que significa que los filetes de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) arco iris pueden registra rangos de humedad entre 86.8% a 90.6%. Frente a algunas investigaciones se reportan valores menores en cuanto a la humedad del filete de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con rangos entre 68,23% y 69,65% (Osorio *et al.*, 2013; Jouki *et al.*, 2014 ; Mesarcova *et al.*, 2012; Raeisi, *et al.*, 2016; Trullas *et al.*, 2017 y Dehghani *et al.*,2018), de igual forma algunos autores presentan valores superiores 70,05-79,75% (García *et al.*,2004; García *et al.*,2006 ; Suarez *et al.*,2008 ; Perea *et al.*,2008; Joukar *et al.*, 2017 y Mamani, 2017), pero aun así siguen siendo inferiores a los reportados en la experimentación. Es importante resaltar que a mayor cantidad de agua mayor cantidad de nutrientes por porción lo que sería un indicativo que los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de esta experimentación puede registrar menor extracto seco, de igual forma algunos autores como García *et al.*,2004 relacionan el contenidos de humedad con la edad del pescado. Algunos autores consideran que un alto contenido de humedad en los filetes de pescado puede ser un factor de calidad en cuanto a la jugosidad de la carne (Suarez *et al.*,2008), pero a la vez la vida útil de los filetes puede verse

afectada durante el almacenamiento al alcanzar rangos de humedad donde el crecimiento de microorganismos es acelerado por una actividad acuosa elevada.

De acuerdo a los resultados obtenidos (tabla 8) el contenido promedio de materia seca de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 11.33 % , el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 1.9 puntos lo que significa que los filetes de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) arco íris pueden registra rangos de materia seca entre 9.43% a 13.23 % . Algunos autores registran un porcentaje de materia seca más alto al obtenido en la experimentación que abarcan rangos entre 28,50% y 31,77% (García *et al.*,2006; Mesarcova *et al.*, 2012; Jouki *et al.*, 2014 y Mamani, 2017), por lo tanto a mayor cantidad de extracto seco menor porcentaje de agua, relación que fue inversa en la experimentación, dichos resultados se atribuyen a las condiciones genéticas y de cultivo de la especie en estudio.

El contenido de promedio de Grasa de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 4.03 % , el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.32 puntos lo que significa que estos filetes de trucha pueden registra rangos de grasa entre 4.35% a 4.03%. Algunos autores registran un contenido de lípidos semejantes al obtenido en la experimentación (García *et al.*,2006; Perea *et al.*,2008; Jouki *et al.*,2014; Joukar *et al.*, 2017; Mamani, 2017 y Dehghani *et al.*,2018), algunos otros autores como Mesarcova *et al.*, 2012; Trullas *et al.*, 2017 y Osorio *et al.*, 2013 registran un contenido de lípidos más alto. El porcentaje de grasa puede estar conformado por ácidos orgánicos como mirística, palmítico, esteárico, oleico, alfa-linolénico, ácido eicosapentaenoico- EPA, ácido docosahexaenoico- DHA, linoleico y γ -linolénico, de las fracciones anteriores hay que destacar el porcentaje en mg/100 gramos de filete que representa el ácido oleico entre1000-2000 y del ácido linoleico entre 600-1300 (Perea *et al.*,2008, Osorio *et al.*, 2013), información de relevancia dado que este grupo de ácidos grasos

representa una alta susceptibilidad a la oxidación química (Raeisi *et al.*, 2016 Joukar *et al.*, 2017), el contenido graso de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en base a los resultados obtenidos esta carne se puede considerar con un alto en contenido de lípidos (García *et al.*, 2004) pero de acuerdo a la composición de ácidos grasos este contenido puede beneficiar la salud del consumidor, algunas especies como la cachama registran un contenido de lípidos de 0,56 % (Suarez *et al.*, 2008) resultado bajo frente al contenido presente en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

El contenido de promedio de proteína de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 24.63 %, el valor de la desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.5 puntos lo que significa que los filetes de trucha arcoíris pueden registrar rangos de proteína entre 24.13% a 25.13%. Algunos autores registran un contenido de proteína más bajo al obtenido en la experimentación (García *et al.*, 2004; Mesarcova *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2013; Trullas *et al.*, 2017; Mamani, 2017; Joukar *et al.*, 2017 y Dehghani *et al.*, 2018); si confrontamos el contenido de proteína con otras especies como la cachama que registra un contenido de 18,71% (Suarez *et al.*, 2008), y el bagre con un 22,11% (Perea *et al.*, 2008), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) registra valores más altos, lo que confirma que es una buena fuente de proteína porque cubre más del 20% del valor de referencia.

El contenido de promedio de cenizas de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 4.3 % , el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.7 puntos lo que significa que los filetes de trucha arcoíris pueden registrar rangos de cenizas entre 5% y 3.6 %. Algunos autores registran un valor menor al obtenido en la experimentación (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006; Suarez *et al.*, 2008; Jouki *et al.*, 2014; Raeisi *et al.*, 2016; Joukar *et al.*, 2017; Mamani, 2017) y semejantes a los reportados por Osorio *et al.*, 2013 con un

valor de 4,22%, es importante resaltar que el contenido de cenizas puede variar con factores como la nutrición, tamaño de peces, composición del agua y sexualidad.

EL contenido promedio de acidez de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 1.3 %, el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.24 puntos lo que significa que los filetes de trucha pueden registrar rangos de acidez entre 1.06 % y 1.54%. Frente a algunas investigaciones se reportan valores de acidez en carne almacenada a 4.0 °C (Perez et al., 2002) cercano al contenido de ácido láctico obtenido en la experimentación donde se obtuvo 1.3%, cabe resaltar que la producción de ácido láctico va siempre acompañada por el incremento de las poblaciones de bacterias lácticas. La cantidad de ácido láctico que genere el animal depende de la cantidad de glucógeno que se registre al momento del sacrificio (Zamora et al., 2018).

El contenido de promedio de pH de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es de 6.01, el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.001 puntos lo que significa que filetes de esta especie pueden registrar rangos de pH entre 6.009 y 6.011. Autores registran valores de pH entre 6,06% y 7,14% (García et al., 2004; García et al., 2006 y Suarez et al., 2008) rangos que se encuentran dentro de lo obtenido en esta experimentación. Un pH cercano a la neutralidad es un indicativo de la susceptibilidad del tejido cárnico a sufrir reacciones de tipo microbiano; teniendo en cuenta la Norma Técnica Colombiana -NTC 1413 el pH para pescado entero, medallones, filetes y trozos frescos esta entre 5,5 a 7,5, el resultado se ubica dentro de estos parámetros por lo tanto los filetes de trucha son sustrato para que bacterias como *Salmonella*, *Mesófilos Aerobios*, *Coliformes Fecales* los cuales propician reacciones de desanimación de las proteínas que hacen que durante el deterioro del producto se aumente el pH.

6.1.2 Caracterización material vegetal: hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L).

De acuerdo a los resultados obtenidos (tabla 9) se puede indicar que el contenido de promedio de acidez del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) es de 0.18, el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.048 puntos registrando rangos de acidez entre 0.132% y 0.228%. El hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) registro una acidez titulable de 0,18 valor que se encuentra por debajo del reportado por Vieira, 2013; el porcentaje de acidez condiciona el uso del hidrolato a nivel farmacia y alimentos, el cual debe ser entre 0,20 y 0,89, en donde el resultado obtenido se registra por debajo de este rango probablemente por la cantidad de ácidos orgánicos que contiene la flor de caléndula Anton – Slavov *et al.*, 2016. El contenido promedio de pH del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) es de 5.3, el valor de desviación estándar indica una tendencia a variar por debajo y por encima en 0.005 puntos, lo que el hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) puede registra rangos de pH entre 5.295 Y 5.305. El valor de pH fue de 5,3 semejante a los reportados en la literatura por Aguilar, 2000 y Campos - Ferreira *et al.*, 2014, considerándose extractos ligeramente ácidos.

Los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica se exponen en la tabla 10, para el extracto acuoso de caléndula se identifica la presencia de taninos, flavonoides Leucoantocianidinas, entre otros bioactivos que pueden ejercer algún poder antioxidante. Según lo expuesto por Domínguez, (2012) realizar una marcha fitoquímica ayuda a cuantificar la presencia de metabolitos presentes en el extracto acuoso los cuales pueden presentar un efecto antioxidante, como los fenoles, quinonas, carotenoides, taninos y cumarinas metabolitos propios del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.).

6.2 Fase II: Evaluación de la capacidad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*)

Los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante de las flores de caléndula (*Caléndula officinalis L*) se presentan en la tabla 11. De acuerdo al análisis de datos existe significancia estadística ($p < 0.05$) entre contenido de fenoles del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) y el antioxidante estándar (BHT), el hidrolato registra una actividad antioxidante baja frente al BHT en cual era un comportamiento esperado dado que este es un antioxidante sintético específico para retardar intencionalmente procesos de auto-oxidación de acilglicéridos.

Frente a otras investigaciones similares se reportan valores superiores al obtenido es el caso de Abudunia *et al.*, 2017 cuando se determinó fenoles en extracto acuoso de flores de caléndula variedad *Arvensis* (47.89 mg de AG/g de extracto) de igual manera lo reporto Xuan Liu *et al.*, 2012 en variedad de caléndula *Tagetes erecta L*, en este mismo sentido Rifai, 2018 reporta altos contenidos de fenoles totales a partir de diferentes solventes; en acetato de etilo (134,24 mg de AG/g de extracto) y metanol (159,27 mg de AG/g de extracto) de igual manera en los estudios de Xuan Liu *et al.*, 2012 dio evidencia de altas concentraciones de estructuras fenólicas cuando se emplearon extractos de etanol y metanol, otros autores reportan rangos que van desde 27 mg GAE/g a 90 mg GAE/g. (Guan-Lin *et al.*, 2015 , Akhtar *et al.* , 2015, Abudunia *et al.*, 2017) es de resaltar que en éstas últimas referencias emplearon métodos de extracción comunes como maceración y filtrados con agua destilada desionizada a temperaturas menores de 50°C. De acuerdo al análisis anterior se concluye que el solvente empleado, el método de extracción, la variedad genética entre otros factores pueden condicionar el contenido, tipo y concentración de sustancias antioxidantes. El uso de solventes

polares favorecen la solubilización de estructuras con sustituyentes hidroxilos que aumentan la concentración en la muestra (Faustino *et al.*, 2018), en este enfoque la composición química del extracto juega un papel preponderante en la evaluación de sustancias con capacidad antioxidante presentes en el extracto así lo expuso Xuan Liu *et al.*, 2012, Rigane *et al.*, 2013, Nicolaus *et al.*, 2017 en donde la concentración de flavonoides registra una mayor concentración sobre la cantidad de fenoles (Faustino *et al.*, 2018), la estabilidad de radicales libres puede estar ejercida por flavonoides como la quercetina, ácidos glucósidos como el ácido protocatéuico y el ácido 5- O- cafeína-quíncico, también pueden ejercer actividad antioxidante los ácidos hidroxicinámicos entre los que sobresalen el ácido 5- O- cafeínico clorogénico, dentro de los derivados fenólicos pueden estar los ácidos hidrobenczoicos, el ácido protocatecúico, el ácido jeringo, el ácido galo, gallicina, quercetina, ácido gálico, rutina, quercetin-3-orto- glucósido.

A la luz de los resultados obtenidos (454,96 mg TA /100 g) se deduce que al usar agua destilada en el proceso de obtención de extracto de las flores de caléndula (*Caléndula officinalis L*) se tienen un bajo contenido de actividad antioxidante posiblemente se tiene una menor cantidad de estructuras fenólicas y muy probablemente una alta cantidad de flavonoides, lo que conllevaría en la continuidad de la investigación al ajuste del protocolo de la evaluación de la actividad antioxidante hacia la determinación de flavonoides totales para así justificar plenamente que los bioactivos presentes en el extracto acuoso de caléndula ejercen un efecto antioxidante tal como se han reportado en otras investigaciones (Domínguez *et al.*, 2009; Vieira, 2013 y Fernandes *et al.*, 2017) como también la evaluación del efecto del método de extracción - Hidrodestilación asistida por calentamiento óhmico, que aunque es una técnica innovadora y puede registrar un alto número de bioactivos se debe mencionar

la pérdida o degradación de estos compuestos por reacciones térmicas y también por reacciones hidrolíticas, Zeng *et al.*, 2016 (libro de aceites).

El análisis de varianza -ANOVA muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre valor TEAC (DDPH) del Hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) y del antioxidante estándar (BHT) que permite concluir que el hidrolato de caléndula genera una menor reducción de compuestos cromóforos en comparación al BHT. Al comparar el resultado contenidos de la captación de radicales libres DPPH en el hidrolato de flores de caléndula y el control BHT se deduce que la actividad antioxidante del hidrolato tiene un efecto de captación de radicales libres pero no fue tan grande como el valor TEAC para BHT, estos resultados concuerdan con lo expuesto en Abudunia *et al.*, 2017; Rigane *et al.*, 2013.

El hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) obtenido tiene bajas concentraciones de antioxidantes que llevan a cabo mecanismo de transferencia de electrones-SET el cual es el avance químico de las sustancias antioxidantes sobre la estructura del radical DPPH, dentro de la revisión de la literatura recomiendan evaluar la actividad antioxidante por más de una técnica debido a que en los extractos a evaluar pueden tener un alto contenido de fenoles y flavonoides u otros metabolitos con actividad antioxidante pero si se usa una sola técnica puede sesgar el verdadero poder reductor de los extractos (Ziyatdinova *et al.*, 2017; Xuan Liu *et al.*, 2012) por lo tanto y en relación al resultado obtenido en el hidrolato de caléndula en comparación con otros estudios similares el valor es muy bajo por lo que se debe continuar con la caracterización del extracto en relación a elucidar los verdaderos mecanismos de transferencia de electrones-SET y/o transferencias átomos de hidrogeno- HAT que pueden desarrollar los bioactivos propios presentes en el hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*), complementado con

el perfil químico para establecer si en la fase hidrofílica pueden estar presentes compuestos de carácter hidrofóbico como el caso de los isoprenoides los cuales en los aceites esenciales ejercen una alta actividad antioxidante mediante mecanismo SET al estar en cantidades insignificantes en el hidrolato pueden mitigar los mecanismos de captación de radicales libres que se miden por DPPH. Serena D'Amato *et al.*, 2018.

La concentración de fenoles totales [mg/100 g] vs la actividad antioxidante ensayo DPPH-VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/L] registró una correlación lineal moderada ($r=0.499994 \approx 0.5$) indicando que los compuestos fenólicos presentes en el hidrolato registran una actividad antioxidante, pero deben desarrollar otros mecanismos de reacción diferentes a la SET, por ejemplo la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).

Al retomar las hipótesis de investigación se puede concluir que: “EL hidrolato proveniente de la extracción del aceite esencial de las flores de caléndula *officinalis L* registra un alto contenido de fenoles y una alta capacidad antioxidante para ser usado como bioconservante en filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)”: el hidrolato posee un moderado contenido de fenoles, se debe estudiar más a fondo otros componentes como los flavonoides. De acuerdo a esta investigación el hidrolato no tiene una alta capacidad antioxidante según la interpretación de la técnica de medición empleada, por lo tanto es necesario evaluar otros mecanismos químicos para evidenciar el verdadero mecanismo químico de los fenoles presentes y otras sustancias como los flavonoides y otros metabolitos activos.

6.3 Fase III: bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): indicadores de la capacidad oxidativa primaria y secundaria.

En la tabla 12 se presenta el análisis de varianza –ANOVA y en la gráfica 20 se presenta la variación del valor de pH durante 20 días de almacenamiento a un temperatura de 4.4°C. Desde el inicio de tratamiento (t=0) se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, el pH no es el mismo aunque los rangos sean muy cercanos. En los tratamientos FS, FAC y FHP a (t=0) la adición del antioxidante BHT (control) y la adición de hidrolato de caléndula modifican en cierta medida el pH inicial (6.33) el cual para el pescado fresco oscila entre (5,7-6,6) debido a la formación de ácido láctico por glucólisis anaeróbica y la liberación de fosfato inorgánico por la degradación de ATP.

En el tratamiento FS el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectaron significativamente los valores de pH registrando un aumento de 6.33 a 8.30. Al comparar los resultados de pH entre los tratamientos FAC y FHP al quinto y décimo día del tratamiento (t=5, t=10) no hay diferencias significativas en los valores de pH, las diferencias se registraron a los 15 y 20 días. En general la figura 20 evidencia que los tratamiento FAC y FHP no afectan los valores de pH de forma marcada como sí lo hace el tratamiento FS a partir del día decimo (t=10).

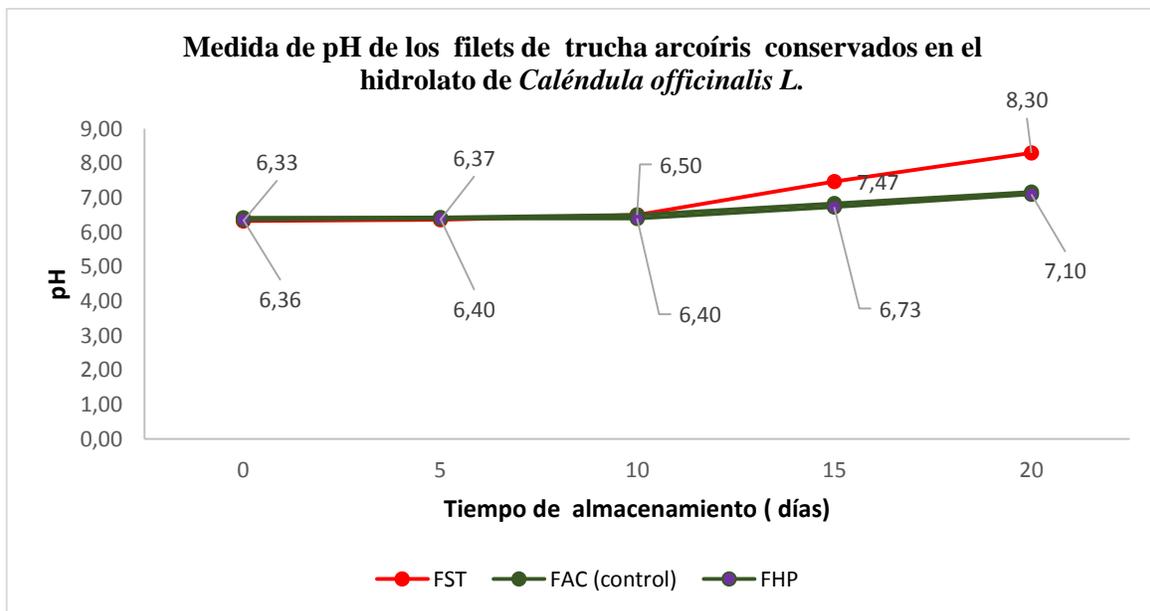


Figura 20. Medida de pH de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) conservados en el hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L).

Los resultados obtenidos de pH de los filetes de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en función del tiempo de almacenamiento y los tratamientos FS, FAC, FHP registran una tendencia hacia la basicidad datos que concuerdan con lo expuesto por Chytir *et al.*, 2004; Ozogul *et al.*, 2017; Dehghani *et al.*, 2018. Los resultados del tratamiento FS al ser comparados con investigaciones similares estos son semejantes y cercanos (Erbay *et al.*, 2017; Ozogul *et al.*, 2017; Dehghani *et al.*, 2018). El aumento de pH se debe a la formación de agentes nitrogenados básicos como el amoníaco (NH₃) y de aminas biogénicas, esto como resultado de una actividad autolítica de las enzimas endógenas provenientes de bacterias psicrófilas con actividad proteolítica que en las condiciones de la experimentación pueden tener lugar en los filetes del tratamiento FS. En situaciones similares a esta investigación se han reportado valores de pH hacia rangos ácidos es el caso del trabajo de Shadman *et al.*, 2017 en donde la conservación de los filetes difieren a pesar de mantener iguales variables como tiempo y temperatura, esto condiciona que se propicien diferentes reacciones a nivel de la proteína, por lo tanto en los resultados de estos autores se da inicio a reacciones en donde se aumenta la concentración de dióxido de carbono (CO₂) mientras que en el tratamiento FS se propician reacciones de desaminación, estas diferencias estarían en función de factores externos asociados al tipo, cantidad de carga microbiana pero también a la temperatura y tiempo de almacenamiento así se verificó al comparar los resultados obtenidos por Secci *et al.*, 2016 en donde el pH se mantuvo en un rango de 6,46 a 6,48 a una temperatura de -20°C a 90 días de almacenamiento.

Para los tratamientos FAC y FHP especialmente para este último se han encontrado comportamientos similares en Joukar *et al.*, 2017 y Erbay *et al.*, 2017; los filetes que se han

sometido a algún tipo de tratamiento antioxidante sus valores de pH han sido inferiores a sus correspondientes controles, por lo tanto se deduce que el hidrolato de las flores de caléndula tiene una marcada injerencia sobre las enzimas asociadas a la hidrolisis de proteínas para evitar reacciones de desaminación oxidativa, tal afirmación debe ser estudiada a mayor profundidad.

En la tabla 13 se presenta el análisis de varianza –ANOVA y en la figura 21 se muestran la variación del valor de ácidos grasos libres (%AGL) durante 20 días de almacenamiento a una temperatura de 4.4°C. Desde el inicio de tratamiento (t=0) se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, el porcentaje de ácidos grasos libres no es el mismo. En los tratamientos FS, FAC y FHP a (t=0) la adición del antioxidante BHT (control) y la adición de hidrolato de caléndula modifican el valor de ácidos grasos iniciales (1,28%) el cual pudo haber aumentado en las 12 horas que duró el pretratamiento de las muestras, se puede inferir que el filete del pescado en estado fresco registraba un valor alto y este fue avanzando de manera drástica hasta el final de ensayo (figura 21) , se evidencia que el hidrolato de flores de caléndula inicio a ejercer un efecto protector sobre el hidrolisis de la grasa (figura 21) . El análisis de varianza ANOVA indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos FAC y FHP, es decir, ambos tratamientos exhiben algún mecanismo de control sobre la estructura de la grasa, específicamente sobre el enlace éster de los acilglicéridos.

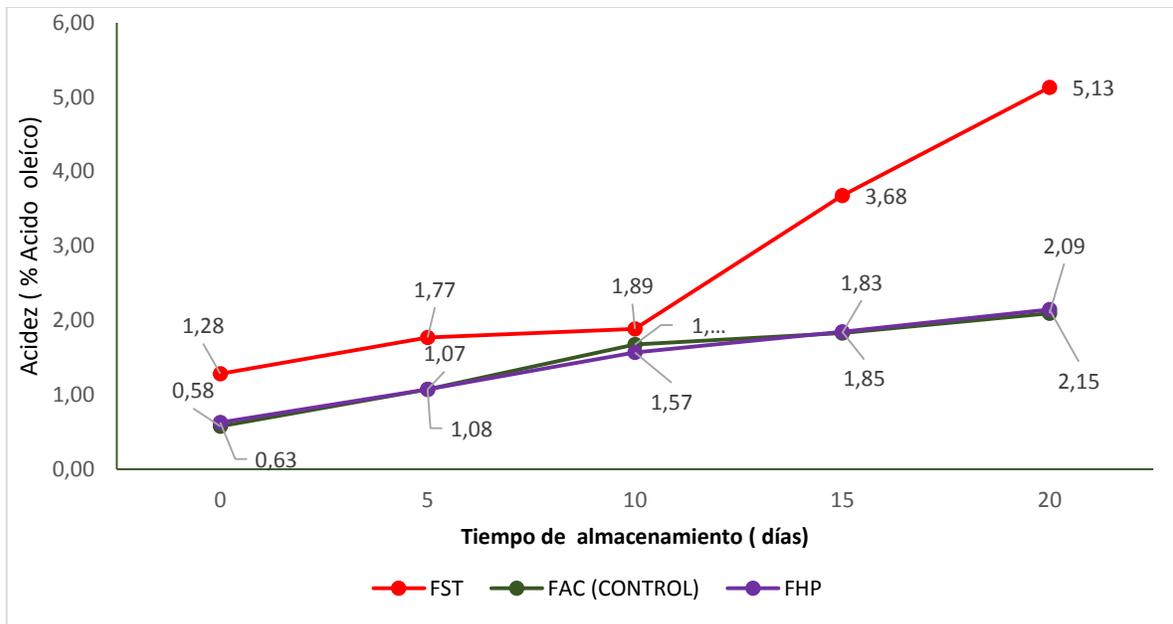


Figura 21. Contenido de ácidos grasos libres (%AGL) de los filetes de trucha arcoíris conservados en el hidrolato de caléndula.

Al comparar los resultados obtenidos entre FS, FAC y FHP se observan cambios relevantes siendo más marcada la hidrólisis de la grasa en los filetes sin tratamiento (FS) resultados que concuerda con lo expuesto por Ozogul *et al.*,2017 y Shadman *et al.*, 2017. En los estudios de Kamani *et al.*, 2017 reporta un control de la grasa superior a los hallados por FAC y FHP pero semejantes y cercanos a los obtenidos en las muestras sin ningún tratamientos. En los tratamientos FAC y FHP la hidrólisis lipídica se desarrolló a una velocidad más baja que en el tratamiento FS, se puede deducir entonces que el bioconservante podrían tener un moderado efecto protector sobre el enlace éster de triglicéridos, pero un significativo efecto antioxidante a nivel de las cadenas carbonadas insaturadas.

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es rica en ácidos grasos monoinsaturados por eso es tan fácil su degradación y oxidación por consiguiente se da origen a especies reactivas de oxidaciones primarias como los peróxidos e hidroperóxidos no son detectables por el consumidor (Kamani *et al.*, 2017). Para Raeisi *et al.*,2016 y Kamani *et al.*, 2017 la hidrólisis del enlace éster

está asociada a un cambio sustancial en los contenidos de ácidos grasos libres, estas reacciones son catalizadas principalmente por dos enzimas (lipasas y fosfolipasas) (Piedrahita *et al.*, 2014; Trullas *et al.*, 2017) generadas por el metabolismo de microorganismos como *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus* y *Geotrichum candidum*. Un relevante aumento en la concentración de los ácidos grasos libres en el producto genera cambios en el sabor, capacidad de retención de agua y destrucción de algunas vitaminas, esto también influye en la desnaturalización de las proteínas que estarían modificando el pH del medio.

Para los tratamientos FAC y FHP se consideran que un valor de 2.9% y 2.5% respectivamente para ácidos grasos libres son permisibles dado que no sobrepasan el límite permitido para el contenido de ácido grasos en pescado frescos. (Kamani *et al.*, 2017).

En la tabla 14 se presenta el análisis de varianza –ANOVA y en la figura 22 se muestran la variación del índice de peróxido durante 20 días de almacenamiento a una temperatura de 4.4°C. Desde el inicio de tratamiento (t=0) se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, el valor en el contenido de peróxidos PV (meq-O₂/Kg) no es el mismo para todos los tratamientos. El almacenamiento y la temperatura afectó significativamente los valores de índices de peróxidos para el tratamiento FS, indicando un desarrollo oxidativo y superando los valores permisibles (<10 meq-O₂/Kg) desde el día diez (t=10) hasta el final del tratamiento (t=20), figura 22. El análisis de varianza ANOVA indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos FAC y FHP, es decir, ambos tratamientos exhiben mecanismos de control oxidativo sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de los filetes (figura 22). Al inicio del tratamiento (t=0) se observa que los filetes en el tratamiento FS registraban ya un contenido de peróxidos por lo que se atribuye al tiempo de pretratamiento de las muestras, para el tratamiento FAC en el mismo tiempo (t=0) puede existir una mayor facilidad de difusión de oxígeno a pesar

de la adición de BHT sobre los filetes mientras que en el tratamiento FHP durante las 12 horas que duró el tratamiento la inmersión total en el hidrolato pudo haber evitado la formación de un mayor contenido de peróxidos en la muestra.

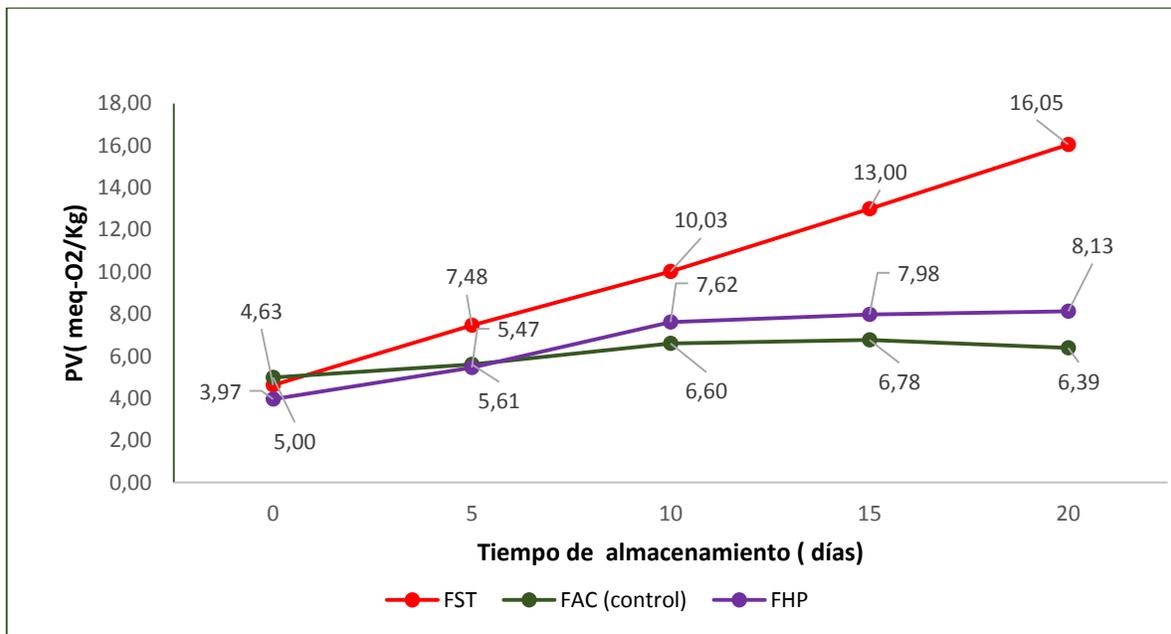


Figura 22. Contenido de peróxidos PV-(meq-O₂/Kg) de los filetes de trucha arcoíris conservados en el hidrolato de caléndula.

Los valores reportados para los tratamientos FAC y FHP registraron una disminución frente a FS situación que concuerda en estudios previos (Raeisi *et al.*, 2016; Shadmana *et al.*, 2017; Ozogul *et al.*, 2017 y Dehghani *et al.*, 2018): en estas investigaciones los resultados para PV cuando los filetes fueron sometidos a los diferentes tratamientos registran valores inferiores a los obtenidos en FHP porque se emplearon como bioconservantes recubrimientos antioxidantes a base de aceites esenciales de diferentes plantas (emulsiones de tomillo, salvia, romero, naranja, extractos etanólicos vegetales), estos autores concluyeron que este tipo de recubrimientos generan una alta capacidad antioxidante para producir una mayor captación y estabilidad de radicales libres de ácido graso al contener sustancias tipo monoterpenos y fenoles oxigenados que tiene la capacidad de

donar un átomo de hidrogeno de sus grupos hidroxilos y así retardar la oxidación primaria de lípidos. La revisión bibliográfica también da cuenta de la conservación de filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en emulsiones ricas en compuestos como el carvacrol, p -cimeno, α -terpineno y cinamaldehído (Joukar *et al.*,2017), en donde los resultados obtenidos están en rango cercanos al tratamiento FHP; se deduce que el hidrolato obtenido a partir de las flores frescas de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) pueden desarrollar un actividad antioxidante semejante a los recubrimientos antioxidantes a pesar que en los extractos florales como el hidrolato de caléndula no pueden contener en la misma cantidad y el mismo tipo sustancias fenólicas y/o terpénicas que pueden estar en los aceites esenciales, en cierta medida la composición química del hidrolato mitiga pero no controla el avance de la oxidación primaria de las muestras en estudio.

Desde el quinto (t=5) día de almacenamiento se puede ver un efecto protector-antioxidante sobre los lípidos tipo acilglicéridos de los filetes de trucha resultado semejante a lo expuesto por Piedrahita *et al.*,2014 cuando realizo la conservación de filetes de tres tipos de pescado (bocahico, cachama y tilapia), filetes de trucha arcoíris que exhiban niveles entre 5 a 10 meq-O₂/Kg presentan una rancidez inicial Ozogul *et al.*,2017, rango en el cual estarían las muestras en el tratamiento FHP a lo largo de los 20 días de almacenamiento cumpliendo así con lo establecido para el valor máximo admisible por la resolución 2154 del 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social lejos de un límite del aceptabilidad el cual está en el rango de 20 meq-O₂/Kg.

Un análisis más amplio de la figura 22 , claramente se observa que los filetes sin tratamiento (FS) llegan a un rango inadmisibles a los 15 días de almacenamiento, de igual forma se puede evidenciar que las muestras en el tratamiento FAC con el paso de los días de almacenamiento presenta un aumento paulatino pero que no llega a sobrepasar el nivel permitido por la normatividad(<10meq O₂/Kg), la muestra con el bioconservante (FHP) registra valores un poco

más altos pero aun así a los 20 días del almacenamiento el valor PV, se registra por debajo de la normatividad. Para todas las muestras a excepción de los filetes sin tratamiento (FS) están por debajo del máximo permitido lo que se puede deducir que se ha generado un bajo grado de oxidación primaria que no afecta de manera considerable a los filetes en los tratamientos FAC Y FHP durante el tiempo de conservación a 4,4 °C. Adicional al contexto que se expone debe tener en cuenta que varios factores externos entre ellos el oxígeno, la luz y la temperatura pueden causar un aumento en la producción de radicales libres que conducen a la formación de sustancias inestables como aldehídos, cetonas y alcoholes estos últimos generando una disminución de los atributos organolépticos como olor, color y sabor y la pérdida de la calidad (Kamani *et al.*, 2017).

En la tabla 15 se presenta el análisis de varianza –ANOVA y en la figura 23 se presenta la variación del índice del contenido MDA durante 20 días de almacenamiento a una temperatura de 4.4°C. Desde el inicio de tratamiento (t=0) se observaron diferencias significativas al comparar el tratamiento FHP vs FS y FAC, a partir del décimo día (t=10) el análisis estadístico indica un aumento en el contenido de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico en todos los tratamientos siendo más marcada la formación de este aldehído en el tratamiento FS (figura 23) existiendo por lo tanto significancia estadística entre este tratamiento con los demás; para los tratamientos FAC y FHP a pesar que el ANOVA indica diferencias significativas entre los datos, la diferencia de medias reporta que al conservar los filetes de trucha arcoíris en FAC y FHP se genera el mismo efecto.

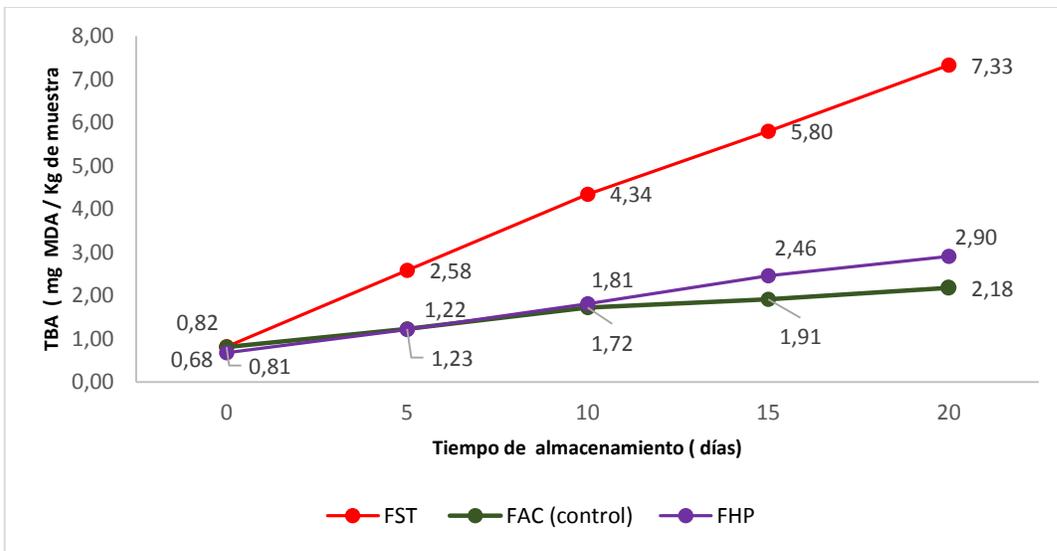


Figura 23. Contenido de malonaldehído (MDA) por el índice del ácido- 2-tiobarbitúrico (TBA) de los filetes de trucha arcoíris conservados en el hidrolato de caléndula (*Caléndula Officinalis L.*)

En la revisión de la literatura de trabajos que reportan bioconservación de filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a una temperatura de refrigeración de 4.0°C – 4.4°C y entre 15 a 20 días de almacenamiento se encuentran los realizados por Chytir *et al.*, 2004; Jouki *et al.*, 2014; Shadman *et al.*, 2017; Ozogul *et al.*, 2017 y Erbay *et al.*, 2017; al comparar los resultados obtenidos para FS y los controles respectivos son semejantes y cercanos pero para los tratamientos FAC y FHP son sustancialmente menores, los valores correspondientes al contenido de malonaldehído pueden ser favorecidos por la inestabilidad de los radicales peróxidos- hidroperóxidos formados en la oxidación primaria de FAC y FHP análisis que concuerda sí se relaciona que el contenido de estas sustancias (figura 22). Los autores citados obtuvieron una menor conversión de sustancias provenientes de la oxidación primaria hacia compuestos volátiles como el malonaldehído dado a que emplearon sistemas de recubrimiento enriquecidos con aceites esenciales (orégano, laurel, tomillo, salvia) debido a que los principios activos de estos aceites pueden generar una mayor mitigación de la oxidación secundaria, superando la actividad antioxidante de los hidrolatos

florales como la que se registró y se evidenció en el hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis* L.). Es importante mencionar que en los datos presentados por Jouki *et al.*, 2014; Ozogul *et al.*, 2017 exhiben un comportamiento ascendente pero diferente a los datos que observamos en FHP en donde se exhiben rango más amplio desde 1,22 a 2,90 (mg MDA/Kg), se puede inferir que el hidrolato contribuye a mitigar la difusión de oxígeno y a estabilizar la formación de radicales libres generando una buena barrera contra la oxidación de los lípidos insaturados presentes en el filete de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) llegando a mitigar los mecanismos químicos oxidativos de los lípidos tipo acilglicéridos que suceden en las fases de iniciación y propagación y evitar la formación de aldehídos. Varios son los reportes que indican el límite de aceptabilidad organoléptico en relación al contenido de MDA para peces está entre 1 a 2 mg MDA/Kg, en este rango se ve alterado el olor y el sabor; a la luz de los resultados obtenidos los filetes del tratamiento FHP a los 5 y 10 días de almacenamiento registraron este límite de aceptación sensorial pero no significa que a los 15 y 20 días de conservación los filetes en el tratamiento FHP no puedan ser consumidos dado que aún están en el rango del valor admisible dado por Jouki, 2014 (8 mg MDA/Kg). En otros contextos han reportado conservación de filetes de trucha arcoíris en extractos etanólicos vegetales únicamente (Raeisi *et al.*, 2016) en esta investigación el tiempo total de almacenamiento fue de 15 días en donde se registraron valores de 2,0 mg MDA/kg dato que se acerca y se encuentra en el intervalo de tiempo $t=10$ a $t=20$ para FHP indicando que el extracto acuoso de las flores de caléndula (*Caléndula officinalis* L.) se acerca a las características antioxidantes propias de los extractos vegetales en cuya composición pueden existir compuestos fenólicos y flavonoides como una de las sustancias responsables y asociadas con la capacidad de estabilizar radicales libres, cationes metálicos de quelatos y/o donar átomos de hidrogeno (Raeisi *et al.*, 2016)) generando un impacto positivo en la reducción de productos secundarios de la

oxidación de lípidos pero no en la misma magnitud que lo hacen los recubrimientos con aceites esenciales (Joukar *et al.*,2017; Dehghani *et al.*,2018).

Se podría deducir que existe una relación directa entre el contenido de peróxidos (meq-O₂/Kg) y el contenido de malonaldehído- MDA (mg MDA/Kg) que conlleve a indicar que a mayor contenido de peróxidos mayor contenido de MDA pero la literatura científica relaciona que no puede existir tal proporcionalidad dado que una vez formado el MDA dentro del tejido cárnico este puede reaccionar con otros compuestos como proteínas lo que podría alterar la concentración de este aldehído en la muestra al dar valores inferiores, por lo que varios autores consideran que el índice de especies que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico como el MDA no es un indicador preciso del grado de oxidación secundaria de los lípidos. (Trullas *et al.*, 2017) por lo tanto se deben considerar otras técnicas complementaria de mayor avance como la que se describe en Kamani *et al.*,2017 basada en el procesamiento de imágenes y modelos predictivos para evaluar la oxidación de lípidos.

Al retomar las hipótesis de investigación se puede concluir que : “El hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) posee capacidad antioxidante para evitar o inhibir la producción de sustancias propias de la oxidación primaria y secundaria de los ácido grasos poliinsaturados presente en los filetes de trucha filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando es almacenada a temperaturas de refrigeración y por un tiempo 20 días”: la capacidad antioxidante exhibida por el hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*) retarda la velocidad de formación de producto propios de la oxidación primaria medido en términos de índice de peróxidos , por lo tanto al existir en el medio una baja cantidad estos metabolitos intermedios, puede el hidrolato prevenir la formación de compuestos tipo aldehídos como el malonaldehído considerándose un indicador de una oxidación secundaria de lípidos tipo acilgliceroles .

Se observa en la figura 19 del apartado de los resultados lo obtenido en la evaluación sensorial en muestras que permanecieron a tiempo cero ($t=0$) y a tiempo final 20 ($t=20$) del tratamiento. Se evaluaron los atributos de apariencia, olor, y textura para las muestras FS: muestra 1; FAC: Muestra 2 y FHP: muestra 3 respectivamente. Como se puede evidenciar según lo establecido por los panelistas en el tiempo cero ($t=0$) todas las muestras presentan un atributo de apariencia, olor y textura de 10 que es la calificación satisfactoria, lo que indica que para ese momento todos los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se encontraban cumpliendo a cabalidad los atributos sensoriales y de aceptabilidad.

La mejor calificación dada para el atributo sensorial de apariencia en el día final del tratamiento ($t=20$) es para la muestra FHP con una valoración de 9, y las muestras FS y FAC tienen una valoración de 7, esto es debido al tratamiento de conservación a la que estuvo sometida cada muestra evaluada. Para el parámetro de olor en el día 20 ($t=20$) se puede evidenciar que se genera una calificación de 5 que corresponde al olor característico del pescado para todas las muestras sujetas a estudio; una posible explicación del porqué no se detectó olores asociados a la rancidez en las muestras FS y el aún en FAC y FHP pudo deberse al proceso de cocción a fueron sometidos las muestras en el momento de la preparación para la evaluación sensorial, este aumento de temperatura puede eliminar algunos compuestos volátiles indeseados en la carne de pescado según Ozogul *et al.*, 2017.

Para el último atributo evaluado que es la textura se evidencia una calificación semejante para todos los filetes, lo que indica que el método de conservación aplicado para cada una de las muestras no genera alteración alguna en la textura de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

En general factores externos como la temporada de captura, el tamaño de los peces, la nutrición y la variación sexual pueden llevar a cambios significativos en los atributos sensoriales y la calidad microbiológica de los filetes de pescado (Dehghani *et al.*, 2018).

6.4 Marcha Fitoquímica

Los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica se exponen en la tabla 10 para el extracto acuoso de caléndula, en donde se corrobora la presencia de taninos, flavonoides Leucoantocianidinas, entre otros bioactivos presentes con poder antioxidante. Según lo expuesto por Dominguez, (2012), realizar una marcha fitoquímica ayuda a cuantificar la presencia de metabolitos presentes en el extracto acuoso los cuales pueden presentar un efecto antioxidante, como los fenoles, quinonas, carotenoides, taninos y cuarinas metabolitos propios del hidrolato de *caléndula officinalis L.*

6.5 Evaluación Sensorial

Se observa en la figura 19 del apartado de los resultados, lo obtenido en la evaluación sensorial en muestras que permanecieron a tiempo cero ($t=0$) y a tiempo final 20 ($t=20$) del tratamiento. Se evaluaron los atributos de apariencia, olor, y textura para las muestras FS: muestra 1; FAC: Muestra 2 y FHP: muestra 3 respectivamente. Como se puede evidenciar según lo establecido por los panelistas en el tiempo cero ($t=0$) todas las muestras presentan un atributo de apariencia, olor y textura de 10 que es la calificación satisfactoria, lo que indica que para ese momento todos los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se encontraban cumpliendo a cabalidad los atributos sensoriales y de aceptabilidad.

La mejor calificación dada para el atributo sensorial de apariencia en el día final del tratamiento (t=20) es para la muestra FHP con una valoración de 9, y las muestras FS y FAC tiene una valoración de 7, esto es debido al tratamiento de conservación a la que estuvo sometida cada muestra evaluada, para el parámetro de olor en el día 20 (t=20) se puede evidenciar que se genera una calificación de 5 que corresponde al olor característico del pescado para todas las muestras sujetas a estudio; una posible explicación del porqué no se detectó olores asociados a la rancidez en las muestras FS y el aún en FAC y FHP pudo deberse al proceso de cocción a fueron sometidos las muestras en el momento de la preparación para la evaluación sensorial, este aumento de temperatura puede eliminar algunos compuestos volátiles indeseados en la carne de pescado Ozogul *et al.*,2017.

Para el ultimo atributo evaluado que es la textura se evidencia una calificación semejante para todos los filetes, lo que indica que el método de conservación aplicado para cada una de las muestras no genera alteración alguna en la textura de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

En general factores externos como la temporada de captura, el tamaño de los peces, la nutrición y la variación sexual pueden llevar a cambios significativos en los atributos sensoriales y la calidad microbiológica de los filetes de pescado (Dehghani *et al.*, 2018).

7. CONCLUSIONES

- Dado que la vida útil de los filetes de trucha arcoíris refrigerados es relativamente corta y que existe una tendencia creciente de los consumidores de pescado fresco, se requiere nuevos métodos de conservación orgánica y natural el desarrollo de nuevos métodos de conservación que permitan la extensión de vida útil del pescado fresco.
- De acuerdo al análisis y confrontación de resultados se puede deducir que las determinaciones de pH y ácidos grasos libres dan un indicativo de la frescura durante los días de tratamiento refrigerado y los resultados obtenidos del índice de peróxido y MDA son verdaderos indicadores del avance de la oxidación química de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos presentes en los filetes de trucha arcoíris.
- Los filetes bajo las condiciones de la experimentación en el tratamiento FHP pueden ser considerados sustancias con capacidad intermedia para la inhibición de la oxidación química de lípidos pero es necesario confrontar estos resultados con análisis microbiológicos para confirmar un apto consumo.
- el hidrolato de caléndula genera una gran expectativa para ser empleado como bioconservante en este tipo de productos; de acuerdo a los resultados de esta investigación se puede considerar que prolonga la vida útil de filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) durante el almacenamiento refrigerado por 4.4°C sin embargo se requieren más estudios de caracterización el hidrolato antes de considerarlo un conservante de productos cárnicos, por ejemplo, verificar la actividad antioxidante por otras técnicas por ejemplo ABTS comparada con ORAC.
- El hidrolato a partir de las flores frescas de caléndula pueden aumentar la vida útil de refrigeración de los filetes de trucha arco iris al retardar el deterioro químico, pero es

importante complementar la investigación con estudios en cuanto a la actividad microbiana del hidrolato.

- Todas las muestra de filetes de trucha arcoíris almacenada a 4,4 °C en el extracto acuoso en las flores frescas de caléndula para el valor de pH, %AGL, Peróxidos-PV (meq-O₂/Kg) y MDA (mg MDA/Kg) permanecieron por debajo del límite aceptable.
- De acuerdo a la literatura, para complementar la caracterización del extracto acuoso de caléndula (*Caléndula Oficial L.*) es necesario determinar el perfil antioxidante con más de una técnica general y específica: en la determinación antioxidante es necesario complementar el resultado de contenido de fenoles (Folin Ciocalteu) con el de flavonoides (estándar patrón de quercetina). En la evaluación de la actividad antioxidante específica varios autores recomiendan complementar el estudio de la captación de radicales libres DPPH con ABTS o en su defecto el método ORAC con el fin de evidenciar con exactitud el mecanismo de reacción de la estabilización de radicales libres o productos de la iniciación y propagación de oxidación de radicales libres de lípidos acilglicéridos.
- es importante resaltar que la caléndula puede integrarse en las formulaciones de algunas bebidas, sopas y ensaladas como un ingrediente innovador que puede llegar a aportar un importante valor nutricional e innovador.
- En la evaluación sensorial no se tuvo en cuenta el atributo del sabor, ya que no se realizaron análisis a nivel microbiológico de los filetes de trucha arcoíris ni del hidrolato de caléndula, por esta razón no se tenía asegurada la calidad microbiana del alimento.

8. RECOMENDACIONES

- El ensayo del radical DPPH da a conocer la capacidad y el mecanismo químico antioxidante del hidrolato de las flores de caléndula, se ha indicado que el mecanismo puede estar basado en la transferencia de electrones pero realmente este no alcanza arrojar a ciencia cierta el verdadero poder antioxidante del extracto acuoso por esta razón se hace necesario realizar algunas otras técnicas como FRAP y ABTS las cuales manejan el mismo mecanismo y también se puede realizar la técnica del ORAC que esta si maneja una mecanismo diferente ya que este va encaminado a la transferencia de átomos de hidrogeno y de esta manera se puede a barca de manera más amplia los posibles mecanismos para conocer la capacidad antioxidante del extracto acuoso que se encuentra en estudio.
- Ampliar las investigaciones en la aplicación de los hidrolatos en las industrialización de alimentos, pero se requiere revisar el tema de la toxicología de los hidrolatos de la carga microbiana inicial y la forma como podrían verse afectados en Iso procesos térmico de conservación (procesos de pasterización y/o esterilización) y/o congelación.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Osorio, A. W. (5 de septiembre de 2013). *caracterización de coproductos de la industria del fileteado de tilapia nilótica (oreochromis niloticus) y trucha arcoíris (oncorhynchus mykiss) en colombia*. bogotá (colombia). obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/rt/printerFriendly/42127/44066>
- Abudunia, A. (2017). Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal de Mycologie Médicale*, 27, 90-97. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523316301354>
- Aguilar, B. (2000). Extracto acuoso de *Calendula officinalis*, Estudio preliminar de sus propiedades. *Cubana Plant Med*, 5. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100008
- Aguilar, B. (2000). Extracto Acuoso de *Calendula Officinalis*. Estudio Preliminar de sus propiedades. *Cubana Plant Med*, 1-30. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/all/fase%20ii.pdf
- albán, m. e. (2001). estudio de la calidad microbiológica de los pescados frescos para exportacion. obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/708/7/tesis%20m%20castello%20cap%201%20-9%28pag%201%20-121%29.pdf>
- badui, s. (2006). *química de los alimentos* (cuarta ed.).

- Campos, J. C. (2014). Physical Properties and Antibacterial Activity of Herbal Tinctures of Calendula (*Calendula officinalis*L.) and Cashew Tree (*Anacardium occidentale*L.). Obtenido de http://revista.uepb.edu.br/index.php/pboci/article/view/2292/pdf_29
- Chen, G. L. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243-259. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615002662>
- Chytir, S., & Chouliara, I. (2004). Evaluación microbiológica, química y sensorial de la trucha arcoiris cultivada helada y fileteada. *Microbiología alimentaria*, 157-165. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0740002003000595>
- Damyeh, M. S. (2017). Ohmic hydrodistillation, an accelerated energy-saver green process in the extraction of *Pulicaria undulata* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 98, 100-107. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017300304>
- Dehghani, P. (2018). Shelf-life extension of refrigerated rainbow trout fillets using total Farsi gum-based coatings containing clove and thyme essential oils emulsions. *Food Hydrocolloids*, 677-688. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1731264X>
- Domiguez, L. E. (2009). *UTILIZACIÓN DE FLORES DE CALENDULA (Calendulae flos) EN SALSA PARA CARNES*. Bogota. Obtenido de [file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/fase%20II%20FLORES%20DE%20CALENDULA%20\(Calendulae%20flos\)%20EN%20SALSA%20PARA%20CARNES.pdf](file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/fase%20II%20FLORES%20DE%20CALENDULA%20(Calendulae%20flos)%20EN%20SALSA%20PARA%20CARNES.pdf)

- Erbay, E. A., & Busra, B. (2017). Quality improvement of rainbow trout fillets by whey protein isolate coatings containing electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanofibers with *Urtica dioica* L. extract during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 340-351. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/art%20%20III%202017.pdf
- Ercetin, T. (2012). Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 36, 203-208. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0926669011003827>
- FAO. (2013). *Diagnostico del estado de la acuicultura en Colombia*. Bogota.
- Faustino, M. (2018). *Calendula* L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. *Journal of Functional Foods*, 45, 254-267. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461830152X>
- Fernandes, L. (2017). Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38-50. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088915751730090X>
- Fernández, J. (2009). *Estrés oxidativo*, 3 ; 4. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/3233/323327657004.pdf>
- Fiume, M. Z. (2001). Final Report on the Safety Assessment of *Calendula Officinalis* Extract and *Calendula Officinalis*. *International Journal of Toxicology*. Obtenido de <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1080/10915810152902556>

García, J. A., Nuñez, F. A., & Pineda, O. (2004). Carcass and meat quality of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss richardson*, produced in the northwest of Chihuahua state. *hidrobiológica*, 19-26. obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v14n1/v14n1a3.pdf>

Gerschman, R. (1954).

Grotto, D. (2009). Importancia de los biomarcadores de peroxidación lipídica y aspectos metodológicos para la cuantificación de malondialdehído. obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0100-40422009000100032

Gutiérrez, J. B. (2000). *Ciencia Bromatológica*. obtenido de <https://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2538/lib/unadsp/reader.action?docid=3175350&query=>

Hernández, J. S. (2011). *Determinación del potencial antioxidante en doce especies diferentes*. México. obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/468/t18607%20sampa%20hernandez%2c%20juana%20%20tesis.pdf?sequence=1>

Icontec. (2011). Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de peróxido ntc 236. obtenido de http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2083/icontec_enormas_mobile/visor/html5.asp

Icontec. (2012). Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación de índice de yodo ntc 283. obtenido de http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2083/icontec_enormas_mobile/visor/html5.asp

incontec. (2011). grasas y aceites vegetales y animales. determinación del índice de acidez y de la acidez. obtenido de

http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2083/icontec_enormas_mobile/visor/html5.asp

javidi, z., & hosseini, s. f. (2016). development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. *lwt - food science and technology*, 251-260. obtenido de

[file:///c:/users/estudiante.duitama/downloads/microsoft.skypeapp_kzf8qxf38zg5c!app/all/bacteris%20%20degradacion%20iii%20201%20\(2\).pdf](file:///c:/users/estudiante.duitama/downloads/microsoft.skypeapp_kzf8qxf38zg5c!app/all/bacteris%20%20degradacion%20iii%20201%20(2).pdf)

joukar, f., & hosseini, s. m. (2017). effect of farsi gum-based antimicrobial adhesive coatings on the refrigeration shelf life of rainbow trout fillets. *lwt - food science and technology*, 1-9. obtenido de

file:///c:/users/estudiante.duitama/downloads/microsoft.skypeapp_kzf8qxf38zg5c!app/all/iii%202017.pdf

Jouki, M. (2014). Use of quince seed mucilage edible films containing natural preservatives to enhance physico-chemical quality of rainbow trout fillets during cold storage. *Food Science and Human Wellness*, 65-75. Obtenido de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453014000172>

Kamani, M. H. (2017). Using an image processing based technique and predictive models for assessing lipid oxidation in rainbow trout fillet. *Food Bioscience*, 42-48. Obtenido de

file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/fase%20I%20y%20III%202017.pdf

- Keong, W. (2005). El aceite de palma como fuente novedosa de lipidos en alimentos acuiculas. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/1134-Texto-1134-1-10-20120719.pdf
- Król, B. (2017). Harvest date as a factor affecting crop yield, oil content and fatty acid composition of the seeds of calendula (*Calendula officinalis* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products*, 97, 242-251. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016308597>
- Luptáková, O. (2012). Trend Analysis of the dead on Arrival And Condemnation Causes Of Broiler Chickens From Farm Lieskovec (The Slovak Republic) In The Years 2006—2010. *Folia Veterinaria*, 37-38. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Lubica_Piknova/publication/268799836_Molecular-biological_detection_of_soya_in_meat_products/links/5657070e08aefe619b1ecff1.pdf#page=42
- M.Turchini, G. (2018). Fatty acids and beyond: Fillet nutritional characterisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different dietary oil sources. *Aquaculture*, 391-397. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848617319944>
- Macías, J. A., & González, F. A. (2006). *Carcass and meat quality of three rainbow Oncorhynchus mykiss*(Walbaum),varieties. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/fase%20I%202006.pdf
- Mamani, M. (2017). ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA CANAL DE TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) PRODUCIDAS CON ALIMENTO FRESCO Y

- BALANCEADO EN JAULAS FLOTANTES, CHUCUITO-2014. Obtenido de <http://www.revistaepgunapuno.org/index.php/investigaciones/article/view/37>
- Manrique, D. G. (2015). CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES. Obtenido de http://www.fio.unicen.edu.ar/usuario/gmanrique/images/Grasas_y_Aceites.pdf
- Marin, L. (2012). *Efecto de la Aplicacion del extracto de Hidroalcoholico De Flores de Calendula (Calendula officinalis) en la estabilizacion del color y vida util En Pulpas de Fruta*. Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/8133/1/ladyelizabethdominguezmarin.2012.pdf>
- Mario, A. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/328/32849410.pdf>
- Marquez, G. P. (2014). Control de la oxidación lipídica en filetes de pescado utilizando recubrimientos comestibles a base de aceite de naranja. *National University of Colombia*. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/art%20%207%20%20III%202014.pdf
- Martinez, E., & Fernandez, I. (2015). *Determinación de polifenoles por el medio de Folin Ciocalteu*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>
- Mesarcova, L., & Marcincak, S. (2012). Effect of herbal extracts added to fish glaze and the method of thawing on oxidation changes in lipids in rainbow trout fillets.

more, S. (2018). Effects of garlic (*Allium sativum*) supplemented fish diet on sensory, chemical and microbiological properties of rainbow trout during storage at -18°C . Obtenido de <https://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2054/science/article/pii/S0023643818301592>

Nicolaus, C. (2017). Estudios in vitro para evaluar las propiedades curativas de las heridas de los extractos de *Calendula officinalis*. *Diario de etnofarmacología*, 196, 94 -103. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874116322863>

NTC218, N. T. (2011). Grasa y Aceites Vegetales y Animales. Determinacion del indice de acidez y de la acidez. 7.

NTC236, N. T. (2011). Grasas y Aceites Vegetales y Animales. Determinación de Índice de Peroxido.

NTC283, N. T. (2012). Grasas Aceites Vegetales y Animales. Determinacion Índice de Yodo.

Osorio, A., Wills, A., & Muñoz, A. (2013). CARACTERIZACIÓN DE COPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DEL FILETEADO DE TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) Y TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN COLOMBIA. *Med. Vet. Zoot.* Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v60n3/v60n3a04.pdf>

Oxilia, R. M. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Obtenido de <http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>

Ozogul, Y., & Yuvka, a. (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT-Food Science*

and Technology, 677-684. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0023643816306041>

Padilla, A. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of *Calendula officinalis*: Kinetic modeling and scaling up study. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130, 292-300. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089684461730133X>

Perea, A., & Gomez, E. (2008). *Caracterización nutricional de pescados de producción y consumo regional en Bucaramanga, Colombia* (Vol. 28). Bucaramanga. Obtenido de <https://www.alanrevista.org/ediciones/2008/1/art-13/>

Perez, M. (2002). Conservación de la carne fresca de cerdo por fermentación láctica: efecto sobre el color, la textura y la formación de los ácidos grasos libres. *Mexicana de Ingeniería Química*, 73-80. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/620/62010209.pdf>

Raeisi, S. (2016). Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) seed extracts in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf-life extension. *LWT - Food Science and Technology*, 112 - 121. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0023643815300815>

Rifai, A. (2018). Identification and evaluation of in-vitro antioxidant phenolic compounds from the *Calendula tripterocarpa* Rupr. *South African Journal of Botany*, 116, 238-244. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0254629918306483>

Rigane, G. (2013). Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal*.

Obtenido de

[http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20\(06\)%202013/4%20IFRJ%2020%20\(06\)%202013%20Rigane%20129.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/20%20(06)%202013/4%20IFRJ%2020%20(06)%202013%20Rigane%20129.pdf)

Rodriguez, M., & Rodriguez, D. (1995). *Cosmetologia de Harry*. Obtenido de

<https://books.google.com.co/books?id=fnQ9mGMH15oC&pg=PA794&lpg=PA794&dq=que+es+el+sinergismo+en+los+antioxidantes&source=bl&ots=3lWqHqXGIZ&sig=mcEKrj0PBk11gplXFADDSA5cpck&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiZ17zGkrjcAhVKpFkKHS0vBJsQ6AEwCHoECAgQAQ#v=onepage&q&f=fal>

Secci, G., & Borgogno, M. (2016). Effect of mechanical separation process on lipid oxidation in European aquacultured sea bass, gilthead sea bream, and rainbowtrout products. *Food Control*, 75-81. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/art%206%20III%202016.pdf

SerenaD'Amato. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, 126-137. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0956713517305157>

Shadmana, S., & Hosseini, S. E. (2017). Evaluation of the effect of a sunflower oil-based nanoemulsion with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the physicochemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during cold storage. *LWT - Food Science and Technology*, 511-517. Obtenido de https://ac.els-cdn.com/S0023643816300731/1-s2.0-S0023643816300731-main.pdf?_tid=40d40ad9-0b4b-418b-9086-d7412999ba4c&acdnat=1550853845_44b7dc808b86076ff3b0e28f8df5f038

- Suarez, H. (2008). Calidad físico-química y atributos sensoriales de filetes sajados biopreservados de cachama, empacados al vacío bajo refrigeración. *Colombiana de ciencias peciarias*. Obtenido de file:///C:/Users/estudiante.duitama/Downloads/Microsoft.SkypeApp_kzf8qxf38zg5c!App/All/Art%20fase%20III%202008.pdf
- Tornuk, F. (2011). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*(148), 30-35. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511002455?via%3Dihub>
- Trullas, C., & Tres, A. (2017). Características de calidad de los filetes de trucha arco iris alimentados con aceites de colza ácidos o reesterificados como fuentes de grasa en la dieta. *Acuicultura*, 22-31. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/science/article/pii/S0044848617305616#!>
- Valdes, S. P. (2009). *Aseguramiento Metrologico de las Mediciones de pH, y de Conductividad Electrolitica en Cuba*. Obtenido de <http://www.redalyc.org/html/2230/223015189003/index.html>
- Valenzuela, C., & Pérez, P. (2016). Actualización en el uso de antioxidantes. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/469/46946547012.pdf>
- Vargas, g. m. (s.f.). *oxidacion de lipidos* .
- vieira, p. m. (2013). *avaliação da composição química, dos compostos bioativos e da atividade antioxidante em seis espécies de flores comestíveis*. araraquara. obtenido de

<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100866/000726357.pdf?sequence=1&isallowed=y>

villanueva, eudes. (2017). *influencia de antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de chia*. peru. obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/3576/357650378002.pdf>

xuanliu, y. (2012). investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*tagetes erecta* l.) residue. *fitoterapia*, 83, 481-489. obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11003273>

yuliasnegureva, g. z., & hermanbudnikov. (2017). *novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using dpph-modified electrode*. obtenido de <https://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2054/science/article/pii/S0013468617313932>

zamora, r. (2018). calidad de la carne del ganado vacuno. *observatorio de la economía latinoamericana*. obtenido de <https://www.eumed.net/rev/oel/2018/04/calidad-carne-ecuador.html>

zeng, q. h. (2016). comparative extraction processes, volatile compounds analysis and antioxidant activities of essential oils from *circium japonicum* fisch. ex dc and *circium setosum* (willd.) m.bieb. *lwt - food science and technology*, 68, 595-605. obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816300172>

Ziyatdinova, G. (2017). Novel approach for the voltammetric evaluation of antioxidant activity using DPPH-modified electrode. *Electrochimica Acta*, 247, 97 - 106. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468617313932>

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización material biológico filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

- Características sensoriales de frescura de la trucha arcoíris de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana - NTC 1443.

Clasificación	olor	piel	Carne	ojos	Textura	Color	Branquias
5	Fresco, característico de la especie	Brillante e iridiscente escamas uniformes	Firme adherida a los huesos, elástica, no suelta jugo, vasos sanguíneos intactos.	Brillante, glóbulos oculares salientes, iris nítido, transparente sin manchas.	Con rigor mortis firme.	Característico de la especie.	Color rojo intenso, separadas, mucus escaso.
4	Leve a pescado	Brillante, iridiscencia y color	Carne adherida a los huesos pero se puede separar con	Brillante, algunas manchas de sangre frescas, ligeramente	Firme, elástica al presionar con el dedo, la	Levemente decolorado.	Color rojo pálido, o rosado, algunas fácilmente separables;

		disminuidos.	presión ligera, suelta jugos al comprimirla ; algunos vasos sanguíneos rotos.	undidos, iris, borroso.	huella desaparece		levemente decolorada, se observa mucus.
3	Algo rancio, olor leve.	Levemente brillante, escamas flojas, fáciles de remover.	Se desprende con facilidad de los huesos; suelta liquido fácilmente; pegajosa.	Ligeramente opacos.	Deformación al presionar con el dedo.	Decolorado.	Color pardusco, amarillento; seco; mucus abundante, completamente unidas, decoloradas .
2	Rancidez avanzada, olor pútrido.	Flácida, opaca.	Se separa de los huesos; se desintegra fácilmente	Opacos, no se observa la parte interna.	Pescado blando.	Levemente blanquecino, lechoso.	Muy decoloradas secas

	Ligera mente amonía cal.		al presionarla; vasos sanguíneos destruidos; suelta abundante líquido.				
1	Algo pútrido amonía cal.			Glóbulo, ocular hundido, totalmente opacos.	Excep cional- mente blando.	Blanq uecino lechoso.	Completo amente decoloradas , gran cantidad de mucus.
Únicamente los pescados clasificados como 5 y 4 se pueden utilizar para el consumo humano o animal directo o para preparación de conservas.							

- Determinación de acidez total titulable en porcentaje de ácido láctico: de acuerdo al protocolo de Pérez, et al (2013), se determinó mediante método volumétrico.

Materiales:

- Licuadora
- Matraz aforado 250 ml
- Erlenmeyer de 125 ml
- bureta
- Agua destilada
- Fenolftaleína
- Agitador

Procedimiento

1. Pesar 10 g de muestra, transferir en un vaso de licuadora, adicionar 200 mL de agua destilada y homogeneizar durante 1 min.
2. Filtrar a través de manta de cielo para eliminar el exceso de tejido conectivo, recibir el filtrado en un matraz aforado de 250 mL y aforar con agua destilada.
3. Transferir una alícuota de 25 mL del filtrado a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, añadir 75 mL de agua destilada y 2 gotas de fenolftaleína, agitar suavemente y titular con NaOH 0.1N.
4. Preparar un blanco con agua destilada.
5. Realizar esta determinación por triplicado.
6. Reportar en porcentaje de ácido láctico aplicando la siguiente fórmula:

Cálculos

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{(V - V_b) (N \text{ NaOH})(\text{meq ácido láctico}) (fd)}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

Donde:

V = volumen de NaOH gastado en la muestra

V_b = volumen de NaOH gastado en el blanco

N = normalidad del NaOH

fd = factor de dilución



- pH: de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013), se empleó un pH metro marca Phywe con previa calibración cada 5 determinaciones.

Materiales

- vaso de precipitado
- gasa
- mata de cielo
- pH-metro
- agua destilada

Procedimiento

Esta determinación se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un potenciómetro o medidor de pH.

1. Pesar 10 g de carne, transferir a un vaso de licuadora, adicionar 100 mL de agua destilada y homogeneizar durante 1 min.

2. Filtrar empleando gasa o manta de cielo para retirar el exceso de tejido conectivo.

3. Tomar la lectura de pH del filtrado por duplicado, introduciendo el electrodo del potenciómetro previamente calibrado, con las soluciones reguladoras de referencia de pH 4 y pH 7.

4. La diferencia máxima permisible en el resultado de pruebas efectuadas por duplicado, no debe exceder de 0.1 unidades de pH, en caso contrario repetir la determinación.

5. Después de obtener el valor de pH del filtrado, enjuagar el electrodo con agua destilada para eliminar cualquier residuo de material.



- **Determinación de humedad y materia seca: siguiendo el método descrito en (AOAC, 1990) / 964.22.**

Materiales: Crisoles o cápsulas de porcelana: se deben desecar a 100°C x2h, tomar con pinzas de crisol y registrar el peso vacío.

Procedimiento: Para la determinación de la humedad se pesan aproximadamente 5.0 g de muestra en una balanza de precisión dentro de una cápsula previamente tarada, desecándose a 110°C en estufa, hasta alcanzar un peso constante. La pérdida de peso se considera como el contenido de humedad y el residuo desecado del alimento se considera la materia seca. Los resultados obtenidos se expresan porcentualmente.

Cálculos

$$\%H = \left(\frac{\text{gramos de agua}}{b} \right) * 100$$

Donde b la masa (g) de la muestra tomada para el análisis

Gramos de agua= m(alimentos)inicial -m (alimentos)seco

Porcentaje de Materia Seca:

$$\%MS = m(\text{alimentos})_{\text{seco}} * 100/b$$

Porcentaje de Materia Seca:

$$\%MS = m(\text{alimentos})_{\text{seco}} * 100/b$$

- **Porcentaje de grasa o extracto etéreo: método Soxhlet de acuerdo a lo estipulado AOAC 920.39**

Materiales

- Equipo de extracción soxhlet
- N-hexano
- Papel filtro
- balanza
- horno

Procedimiento: Para la determinación de grasa, por este método, se debe usar muestras deshidratadas. El solvente orgánico, por ebullición, asciende a la parte superior del extractor del equipo soxhlet. Allí se condensa por refrigeración con agua y cae sobre la muestra, regresando posteriormente al matraz por sifón, arrastrando consigo la grasa.

- Pesar el papel filtro, pesar 5 gramos de muestra, colocarlas en el papel filtro.
- Colocar la muestra en el extractor del equipo soxhlet.
- En el balón agregar 250 ml de n-hexano, previamente se ha pesado.
- Calentar suavemente hasta 68-70°C
- El solvente se evapora y luego se condensa y cae sobre la muestra
- Cuando el extractor se llene de n-hexano, retornará al balón, es un primer ciclo o sifón.
- Realizar 4 ciclos, aproximadamente 4 horas.
- Realizar una destilación simple para separar el solvente de la muestra
- Evaporar el residuo de n-hexano en estufa y pesar el balón.

Cálculos

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso del matraz con grasa} - \text{peso del matraz vacío}}{\text{Gramos de muestra}} * 100$$

- **Determinación de proteínas (Método Kjeldahl): siguiendo el protocolo estandarizado del Manual de instructivos y protocolos de laboratorio, control de calidad de alimentos del SENA CEDEAGRO, en base a lo descrito en A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.**

Materiales

- Ácido sulfúrico concentrado.
- Sulfato de potasio o sulfato de sodio.
- Sulfato cúprico.
- Solución de hidróxido de sodio al 15 %. Disolver 150 g de NaOH y completar a 1 litro.
- Solución de ácido sulfúrico 0.1 N. Tomar 2.7 mL de H₂SO₄ conc. y completar a 1 litro, luego estandarizar con Na₂CO₃ anhidro.
- Solución de hidróxido de sodio al 30 %. Disolver 300 g de NaOH y completar a 1 litro.
- Solución indicadora de rojo de metilo al 1 % en etanol. Disolver 1 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol (95 %).
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 N. Tomar 4 g de NaOH y enrasar a 1 litro con agua recientemente hervida y enfriada. Valorar con ácido succínico.
- Ácido bórico al 3 %. Disolver 30 g de ácido bórico y completar a 1 litro.
- Indicador de Tashiro: rojo de metilo al 0.1 % y azul de metileno al 0.1 % en relación de 2:1, en alcohol etílico.
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N. Tomar 8.3 mL de HCl conc. y enrasar a 1 litro. Valorar con Na₂CO₃ anhidro.
- Mezcla de catalizador: sulfato de cobre, sulfato de potasio y selenio negro.

Procedimiento.

- Realizar la muestra en duplicado.
- Efectuar un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.
- Pesar al 0.1 mg. alrededor de 1 g de muestra homogeneizada (m) en un matraz de digestión Kjeldahl.
- Agregar 3 perlas de vidrio, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 0.5 g de sulfato cúprico y 20 mL de ácido sulfúrico conc.
- Conectar el matraz a la trampa de absorción que contiene 250 mL de hidróxido de sodio al 15 %. El disco poroso produce la división de los humos en finas burbujas con el fin de facilitar la absorción y para que tenga una duración prolongada debe ser limpiado con regularidad antes del uso. Los depósitos de sulfito sódico se eliminan con ácido clorhídrico.

Cuando la solución de hidróxido de sodio al 15 % adicionada de fenolftaleína contenida en la trampa de absorción permanece incolora debe ser cambiada (aprox. 3 análisis).

- Calentar en manta calefactora y una vez que la solución esté transparente, dejar en ebullición 15 a 20 min. más. Si la muestra tiende a formar espuma agregar ácido esteárico o gotas de silicona antiespumante y comenzar el calentamiento lentamente.
- Enfriar y agregar 200 mL de agua.
- Conectar el matraz al aparato de destilación, agregar lentamente 100 mL de NaOH al 30 % por el embudo, y cerrar la llave.
- Destilar no menos de 150 mL en un matraz que lleve sumergido el extremo del refrigerante o tubo colector en:

a) 50 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N, 4 a 5 gotas de rojo de metilo y 50 mL de agua destilada. Asegurar un exceso de H₂SO₄ para que se pueda realizar la retro titulación. Titular el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta color amarillo o

b) 50 mL de ácido bórico al 3 %. Titular con ácido clorhídrico 0.1 N hasta pH 4.6 mediante un medidor de pH calibrado con soluciones tampón pH 4 y pH 7, o en presencia del indicador de Tashiro hasta pH 4.6 Cada cierto tiempo es necesario verificar la hermeticidad del equipo de destilación usando 10 mL de una solución de sulfato de amonio 0.1 N (6.6077 g/L), 100 mL de agua destilada y 1 a 2 gotas de hidróxido de sodio al 30 % para liberar el amoníaco, así como también verificar la recuperación destruyendo la materia orgánica de 0.25 g de L(-)-Tirosina. El contenido teórico en nitrógeno de este producto es de 7.73 %. Debe recuperarse un 99.7 %.

Cálculos

$$\%N = \frac{14 \times N \times V \times 100}{m \times 1000}$$

$$\%Proteína = \frac{14 \times N \times V \times 100 \times factor}{m \times 1000}$$

Donde:

V: 50 mL H₂SO₄ 0.1 N - gasto NaOH 0.1 N o gasto de HCl 0.1 N

m: masa de la muestra, en gramos

Factor:

6.25: para carne, pescado, huevo, leguminosas y proteínas en general

5.7: para cereales y derivados de soya

6.38: leche

5.55: gelatina

5.95: arroz

- **Cenizas: Se determinaron cenizas totales según los métodos descritos en la NTC 1678 y en A.O.A.C., 923.03, 1990; para determinar las cenizas solubles en agua**

de acuerdo a AOAC 14 th Ed. 31.015; cenizas solubles en ácido clorhídrico (HCl) según lo recomendado por el Instituto de Salud Pública de Chile (prt-711.02-009 método gravimétrico).

Materiales

- Mufla
- Desecador
- Balanza analítica
- Crisoles

Procedimiento

- Se calienta el crisol por 20 min. En una mufla cuya temperatura se ha fijado a 550°C.
- Se deja enfriar el crisol en el desecador a temperatura ambiente y se pesa (m_0) en la balanza analítica con aproximación a 0.1 mg
- Se transfiere 1.5 o 2 gramos de la muestra de ensayo preparada al crisol. se esparce uniformemente y sin demora se pesa en crisol nuevamente con aproximación a 0,1 mg. (m_1)

Determinación aplicando una mufla.

- Se coloca el crisol con su contenido en la mufla fría y gradualmente se eleva la temperatura de esta durante 5 h o 6 h a 550 °C ± 25 °C y se mantiene esa temperatura hasta que la ceniza tenga un aspecto gris- blanco .
- Se retira el crisol de la mufla y se deja enfriar en el desecador a temperatura ambiente.
- Se inspecciona la ceniza.
- Si la ceniza todavía esta negra, se trata con unas gotas de peróxido de hidrogeno o agua y se repite el procedimiento.

- Si tiene una apariencia gris- blanco, se pesa el crisol con su contenido (m_2) en la balanza analítica, con aproximación a 0,1 mg.

Cálculos

Se calcula la fracción de masa de la ceniza en la muestra de ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$w_a = (m_2 - m_0) - (m_1 - m_0) \times 100 \%$$

w_a = es la fracción de la masa de la ceniza, expresada como porcentaje de la muestra de ensayo.

m_0 = es la masa, en gramos del crisol vacío.

m_1 = es la masa, en gramos del crisol con la porción de ensayo.

m_2 = es la masa, en gramos el crisol con la ceniza.

ANEXO 2.

Caracterización material vegetal hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*).

- **Porcentaje de acidez total titulable expresada como ácido cítrico de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013), se determinó mediante método volumétrico.**

Materiales

- Vaso precipitado de 250 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Mata de cielo
- Agua destilada
- fenolftaleína

Procedimiento

1. Pesar 10 g de muestra, transferir en un vaso de licuadora, adicionar 200 mL de agua destilada y homogeneizar durante 1 min.
2. Filtrar a través de manta de cielo, recibir el filtrado en un matraz aforado de 250 mL y aforar con agua destilada.
3. Transferir una alícuota de 25 mL del filtrado a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, añadir 75 mL de agua destilada y 2 gotas de fenolftaleína, agitar suavemente y titular con NaOH 0.1N.
4. Preparar un blanco con agua destilada.
5. Realizar esta determinación por triplicado.
6. Reportar en porcentaje de ácido cítrico aplicando la siguiente fórmula:

Cálculos

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{(V - V_b) (N \text{ NaOH})(\text{meq ácido cítrico}) (fd)}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

Donde:

V = volumen de NaOH gastado en la muestra

V_b = volumen de NaOH gastado en el blanco

N = normalidad del NaOH

fd = factor de dilución

- pH: de acuerdo al protocolo de Perez, et al (2013), se empleó un pH metro marca Phywe con previa calibración cada 5 determinaciones.

Materiales

- vaso de precipitado de 100 ml
- gasa
- manta de cielo
- pH-metro

- Agua destilada

Procedimiento:

Esta determinación se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un potenciómetro o medidor de pH.

1. Pesar 10 g de carne, transferir a un vaso de licuadora, adicionar 100 mL de agua destilada y homogeneizar durante 1 min.
2. Filtrar empleando gasa o manta de cielo para retirar el exceso de tejido conectivo.
3. Tomar la lectura de pH del filtrado por duplicado, introduciendo el electrodo del potenciómetro previamente calibrado, con las soluciones reguladoras de referencia de pH 4 y pH 7.
4. La diferencia máxima permisible en el resultado de pruebas efectuadas por duplicado, no debe exceder de 0.1 unidades de pH, en caso contrario repetir la determinación.
5. Después de obtener el valor de pH del filtrado, enjuagar el electrodo con agua destilada para eliminar cualquier residuo de material.

- Determinación de Fenoles totales: Se hizo por el método de Folin-Ciocateu con ácido tánico como estándar para proceder a elaborar la curva de calibración. Se siguió los parámetros establecidos por (Paladino, s.f). Y se hicieron algunos ajustes al método presentados en PNT N°19 (2010), y (Ainsworth, & Gillespie, 2007). Las medidas de absorbancia se hicieron a una longitud de onda de 760 nm.

Materiales

- Matraz aforado de 100 ml.
- Espectrofotómetro (760nm)
- Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico.
- Pipetas de 1, 5, 20 y 50 mL.
- Material usual de laboratorio.

Carbonato sódico	4	4	4	4	4	4	4	4
Correspondencia en µg/ml de fenoles	0	5	10	15	20	25	30	35

1. Tomar alícuotas de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 mL de solución de ácido gálico (1 mL = 0.1 mg de ácido Gálico)
- 1.1 Agregar en el orden de la tabla las disoluciones
- 1.2 Mezclar bien y medir el color después de 30 minutos a 760 nm contra el blanco de agua Destilada. Centrifugar.
- 1.3 Trazar absorbancia contra concentración para obtener la Curva estándar.

Muestra:

1. 0,5 mL de muestra
2. 1 mL de Reactivo Folin-Ciocalteu
3. 4 mL de Carbonato de Sodio 0,7M
4. Agitar para homogenizar
5. dejar reposar por 30 minutos.
6. Paralelamente, se prepara un blanco analítico con agua destilada.
7. La absorbancia de la muestra se mide en la oscuridad a una longitud de onda de 765 nm en espectrofotómetro.
8. La determinación de fenoles totales se debe realizar por triplicado.

Cálculos

La ecuación a obtener es del tipo: $y = ax + b$

Dónde:

y= Densidad óptica a 760 nm (Absorbancia)

a= Pendiente de la recta

x= concentración de Acido gálico (mg/L).

b= intercepto.

- Marcha fitoquímica : se realizó de forma cualitativa sobre los extractos florales la identificación de taninos, flavonoides, fenoles, quinonas, y leucoantocianidas. de acuerdo a los protocolos expuestos por Calle y Jiménez, (2002).

Cloruro férrico: se realizó es prueba para determinar la presencia de fenoles. Los taninos reaccionan con solución acuosa de tricloruro férrico al 1% dando coloración azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del ácido protocatequico), según lo establecido por Calle *et al.*,2002 , para realizar este ensayo a 0,2 ml de extracto acuoso, se agregó una gota se solución de tricloruro férrico. Se empleó acido tánico al 5% como solución patrón.

Acetato de plomo: esta prueba se realizó con el fin de identificar fenoles. Los taninos reaccionan con solución de acetato de plomo produciendo turbidez o precipitado blanco Calle *et al.*,2002. para realizar este ensayo a 1.0 ml de extracto acuoso se adiciono 1 mL de solución de acetato de plomo al 10% y se registraron resultados.

- Shinoda (flavonoides): esta prueba se realizó para reconocer la presencia de flavonoides, los cuales son anillos de gama benzopirona que reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio Calle *et al.*,2002 para realizar este ensayo a 1 ml de extracto acuoso en un tubo de ensayo se agregó magnesio en polvo y gotas de ácido clorhídrico, se empleó acido tánico al 5% como solución patrón y se compararon resultados.

- Leucoantocianidinas: se tomó 2 ml de extracto acuoso en un tubo de ensayo y se adiciono 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, se calentó a baño maría durante 15 minutos, la aparición de coloraciones rojas es purbe de presunta presencia de leucoantocianidinas en la muestra, se empleó acido tánico al 5% como solución patrón y se compararon resultados.

ANEXO 3. Ficha técnica Butilhidroxitolueno- BHT, antioxidante comercial.

	FICHA TÉCNICA	Código: GT-F-40
	Versión: 02	Fecha: 27/09/2014
		Página: 1 de 1
Número de Revisión:001		Declaración de Fecha de Revisión: 10/11/2018
TÍTULO: BHT ANTIOXIDANTE FOOD GRADE		

1. DESCRIPCIÓN GENERAL

Nombre químico: 2,6-di-terc-butil-p-cresol
Otros nombres: Hidroxitolueno butilado, Butil Hidroxi Tolueno.
Fórmula Química o Componentes: $C_6H_4(OH)(CH_3)(C(CH_3)_3)_2$
CAS: 128-37-0 **UN:** 3077 **Calidad:** FG (Food Grade)
Descripción: Polvo cristalino blanco óleo- soluble.
Vencimiento: 2 años.

2. APLICACIONES GENERALES

Es un antioxidante altamente eficaz que no se decolora y no es tóxico. Protege muchos compuestos orgánicos de ser oxidados por el oxígeno. Ampliamente usado en la industria de elastómeros, látex, propelentes, adhesivos, pinturas, tintas de impresión, éteres alifáticos y cíclicos, aceites vegetales y plásticos.

3. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

Sustancias incompatibles: Cloruros de ácido, anhídridos de ácidos, agentes oxidantes, bases, latón, cobre.

Información adicional: Evitar el calentamiento fuerte y la formación y dispersión de polvo.

Parámetro	Unidad	Especificación
Pureza	%	99,8 Mín.
Temperatura de fusión	°C	69,0 – 70,0
Contenido de agua	%	0,12 Máx.
Cenizas sulfatadas	%	0,002 Máx.
Fenol libre	%	0,02 Máx.
Metales pesados (como Pb)	%	0,0004 Máx.
Arsénico	%	0,0001 Máx.

4. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y PRECAUCIONES

Condiciones de almacenamiento: Mantener en un lugar fresco, seco y bien ventilado. Mantener los recipientes bien cerrados.

Precauciones: El producto no es tóxico.

Nota: El uso final del producto es responsabilidad directa del cliente, la información consignada en este documento es sólo de carácter ilustrativo y fue tomada de distintas fuentes bibliográficas por nuestro departamento técnico. Estos datos no representan responsabilidad legal alguna y no eximen al comprador de hacer sus propios análisis e investigaciones.

Productos Químicos al por Mayor y al Detall – Artículos para Laboratorio y Reactivos
 Implementos de Protección Personal – Fragancias y Sabones – Productos para el Aseo y Limpieza
 Dirección: Cra. 52 No 6 Sur 35 (Medellín) – Colombia PBX: (57) (4) 444-8787
 E-mail: servicioalcliente@protokimica.com Web: www.protokimica.com



ANEXO 4.

Técnicas capacidad antioxidante

- Capacidad de captación de radicales libres: técnica del radical DPPH • (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo): se llevó de acuerdo al protocolo estandarizados por laboratorios AOXLAB, 2017. Se preparó una solución de DPPH a 200 mg/L en metanol. Las muestras de hidrolato se prepararon a una concentración de 0.05 g/ mL en metanol al 80%. Se preparó una curva estándar de Trolox a una concentración de 10 mM. La reacción en la muestras como en el

estándar con la solución de DPPH se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-22 °C), con agitación y en completa oscuridad durante 30 minutos. Las absorbancias se leyeron a 517 nm. Los resultados fueron expresados como TEAC (actividad antioxidante equivalente a trolox), la cual se expresa en unidades de $\mu\text{moles Trolox / L}$. La determinación del porcentaje de Inhibición del DPPH se realizó con base en una curva de calibración construida a partir del % de Inhibición en la absorbancia de las soluciones de Trolox vs. La concentración de trolox en $[\mu\text{M}]$.

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - ((\text{Abs M} - \text{Abs BM}) / (\text{Abs Ref}))] * 100 \quad \text{Ec1.}$$

Donde:

Abs M: Absorbancia muestra

Abs BM: Absorbancia blanco muestra

Abs BRef: Absorbancia blanco referencia

- Determinación de Fenoles totales; método de Folin-Ciocalteu con ácido tánico como estándar para proceder a elaborar la curva de calibración. Se siguió los parámetros establecidos por (Paladino, s.f)

Materiales

- Matraz aforado de 100 ml.
- Espectrofotómetro (760nm)
- Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico.
- Pipetas de 1, 5, 20 y 50 mL.
- Material usual de laboratorio.
- Agua destilada.
- Aceite esencial de orégano.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (se puede preparar con: 100g de tungsteno de sodio y 25g de molibdato de sodio, disueltos en 700ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido fosfórico a 85% (densidad = 1,71g/ml), 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (densidad = 1,19 g/ml). Poner a ebullición sobre reflujo durante 10 horas, agregar 150g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo y poner nuevamente en ebullición durante 15 minutos. Dejar enfriar y completar a 1 litro con agua destilada.)

- Acido tánico.
- Carbonato de sodio 0,7M.

Procedimiento

Preparar las siguientes soluciones:

Preparar una disolución 0,7 molar de carbonato sódico

Disolución madre de ácido tánico 500mg/l

Disolución patrón de ácido tánico 50mg/l

Solución de acetona agua 1:1

Preparación de la curva de calibración:

	blanco	1	2	3	4	5	6	7
Sln de ácido tánico	0	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Acetona agua 1:1	0,5	0,45	0,4	0,3	0,25	0,2	0,1	0
Folin Ciocalteu	1	1	1	1	1	1	1	1
Carbonato sódico	4	4	4	4	4	4	4	4
Correspondencia en µg/ml de fenoles	0	5	10	15	20	25	30	35

2. Tomar alícuotas de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 mL de solución de ácido gálico (1 mL = 0.1 mg de ácido Gálico)

2.1 Agregar en el orden de la tabla las disoluciones

- 2.2 Mezclar bien y medir el color después de 30 minutos a 760 nm contra el blanco de agua Destilada. Centrifugar.
- 2.3 Trazar absorbancia contra concentración para obtener la Curva estándar.

Muestra:

9. 0,5 mL de muestra
10. 1 mL de Reactivo Folin-Ciocalteu
11. 4 mL de Carbonato de Sodio 0,7M
12. Agitar para homogenizar
13. dejar reposar por 30 minutos.
14. Paralelamente, se prepara un blanco analítico con agua destilada.
15. La absorbancia de la muestra se mide en la oscuridad a una longitud de onda de 765 nm en espectrofotómetro.
16. La determinación de fenoles totales se debe realizar por triplicado.

Cálculos

La ecuación a obtener es del tipo: $y = ax + b$

Dónde:

y= Densidad óptica a 760 nm (Absorbancia)

a= Pendiente de la recta

x= concentración de Acido gálico (mg/L).

b= intercepto.

ANEXO 5.

Métodos para la determinación de la bioconservación de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

- **Índice de peróxido: Se procedió de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC-236.**

Materiales y reactivos

- Agua destilada
- Ácido acético glacial, fracción de masa de 100 %
- Isooctano, libre de peróxidos.
- Cloroformo, libre de peróxidos.
- Solución de ácido acético glacial e isooctano, preparada mezclando 60 ml de ácido acético glacial y 40 ml de isooctano (o en relación 3:2).
- Yoduro de potasio, libre de yodo y yodatos.
- Solución saturada de yoduro de potasio. Disuelva aproximadamente 14 g de yoduro de potasio en aproximadamente 8 g de agua destilada. Asegúrese de que la solución permanezca saturada (cristales no disueltos).
 - o Almacene en un lugar oscuro y prepare solución fresca cada día. Ensaye la solución de la siguiente manera: adicione dos gotas de solución de almidón a 0,5 ml de yoduro de potasio en 30 ml de la solución de ácido acético glacial e isooctano (o cloroformo). Si se forma una coloración azul y si se necesita más de una gota de la solución normal de tiosulfato de sodio para eliminarla, deseche la solución de yoduro de potasio.
- Solución normalizada o estandarizada de tiosulfato de sodio 0,1 N, $[Na_2S_2O_3]= 0,1 \text{ mol/L}$
- Utilice únicamente agua destilada para la preparación de esta situación. Esta solución se puede utilizar durante un mes y se almacena en un frasco color ámbar.
- Solución normalizada o estándar de tiosulfato de sodio 0,01 N, $[Na_2S_2O_3]=0,01 \text{ mol/L}$
 - o Es necesario preparar esta solución fresca a partir de la solución normalizada o estándar de tiosulfato de sodio 0,1 mol/L antes del uso o para determinar la titulación diariamente. Tal como muestra la experiencia, la estabilidad es limitada y depende del valor de pH y del contenido de dióxido de carbono libre. Para la solución utilice únicamente agua destilada.

- Solución de almidón. Mezcle 0,5 g de almidón y una cantidad pequeña de agua destilada. Adicione esta mezcla mientras agita a 50 ml de agua destilada en ebullición, mantenga en ebullición durante pocos segundos (10 s) y enfríe inmediatamente.
 - o La solución se debe preparar fresca diariamente.
 - o Se recomienda utilizar almidón de papa para la yodo métrica dado que este almidón suministra un color azul más oscuro. También se puede utilizar reactivos equivalentes.
- Yodato de potasio (KIO_3) estándar primario.
- Ácido clorhídrico [HCl]= 4 mol/L

Preparación de la muestra

La muestra de ensayo para la determinación del valor de peróxido se debe tomar primero y el valor de peróxido se debe determinar inmediatamente.

Homogenice la muestra, preferiblemente sin calentamiento y sin aireación. Evite la radiación solar directamente, caliente las muestras solidas cuidadosamente hasta 10 °c por encima de su punto de fusión. Las muestras con purezas visibles se deben filtrar; la filtración se debe registrar en el informe de ensayo.

Para algunos productos, la cantidad extraída de grasa y aceite puede ser inferior a 5 g, o el valor de peróxido de la grasa o el aceite puede estar por encima de 30 meq de oxígeno activo por kilogramo. En estos casos, el usuario debería seleccionar una muestra con masa inferior.

Procedimiento

Realice todas las etapas con la luz natural difusa o con luz artificial. Evite la exposición directa a la luz sola. Observe que todos los recipientes estén libres de compuestos oxidantes o

reductores. Almacene las soluciones normalizadas estándar de tiosulfato de sodio en frascos de color ámbar.

Preparación y determinación del título de la solución normal de tiosulfato de sodio 0,01N

- Preparación de la solución normalizada o estándar de tiosulfato de sodio 0,01 N: Por medio de una pipeta, transferir 100 ml de la solución normalizada o estándar de tiosulfato de sodio 0,1 N a un matraz volumétrico o Erlenmeyer con capacidad de 1000 ml. Diluya hasta la marca con agua destilada. Determine de la homogenización, transfiera la solución normal e tiosulfato de sodio 0,01 N a un frasco color ámbar.

- Determinación del título de la solución normalizada o estándar de tiosulfato de sodio 0,01 N.

Con aproximación de 0,001 g, pese 0,27 g a 0,33 g de yodato de potasio (KIO_3) en un matraz volumétrico o Erlenmeyer (250 ml o 500 ml) y diluya hasta la marca con agua destilada.

Por medio de una pipeta, transfiera 5 ml o 10 ml de esta solución de yodato de potasio a un matraz o Erlenmeyer de 250 ml. Adicione 60 ml de agua destilada, 5 ml de ácido clorhídrico 4 mol/L y 25 mg a 50 mg de yoduro de potasio o 0,5 ml de la solución saturada de yoduro de potasio.

Titule esta solución utilización el método yodo métrico (visual) para determinación el factor de la solución normalizada o estándar de tiosulfato de sodio 0,01 N. Calcule el factor, F, de la solución de tiosulfato de sodio 0,01 N utilizando la siguiente formula:

$$F = \frac{m_{KIO_3} \cdot V_1 \cdot 6 \cdot 1000 \cdot W_{KIO_3}}{M_{KIO_3} \cdot V_2 \cdot V_2 \cdot c_{thio} \cdot 100}$$

En donde:

M_{KIO_3} es la masa de yodato de potasio, en gramos;

6 es la masa equivalente para el título ($1 \text{ mol KIO}_3 \longleftrightarrow 3 \text{ mol I}_2$);

V_1 es el volumen de la solución de yodato de potasio, utilizando para la determinación del título (5 ml o 10 ml);

V_2 es el volumen total de la solución de yodato de potasio, en mililitros (250 ml o 500 ml);

V_3 es el volumen de la solución de tiosulfato 0,01 N utilizando para la determinación, en mililitros:

W_{KIO_3} es la pureza del yodato de potasio en g/100 g;

M_{KIO_3} es la masa molecular de yodato de potasio (214 g/mol)

C_{tio} es la concentración de la solución normal de tiosulfato de sodio en moles por litro (0,01 mol/l)

Determinación del valor de peróxido

Verifique que el matraz o Erlenmeyer este limpio y seco. Pese las siguientes cantidades en el matraz, con aproximación de 0,1 mg:

- 5,0 g \pm 0,1 g de la muestra de ensayo para los valores de peróxido esperados desde > 1 a 30 ;
- 10,0 g \pm 0,1 g de la muestra de ensayo para los valores de peróxido esperados desde 0 hasta 1.

Enjuague el matraz o Erlenmeyer con la solución de ácido acético glacial e isooctano o ácido acético glacial y cloroformo antes del uso para garantizar que el matraz no contenga ninguna sustancia oxidante ni reductora.

- Se adiciona 30 ml de solución de ácido acético / cloroformo en relación 3:2 o 50 ml de solución de ácido acético / iso-octano en relación 3: 2, para disolver la muestra de ensayo rápidamente mediante agitación, se añade 0,5 ml de solución de yoduro de potasio, se tapa el matraz y se agita con un agitador magnético sin crear un vórtice grande, o manualmente sin incorporarse aire. Se mantiene en reposo por un minuto a una temperatura entre 15 °c a 25 °c. se adiciona inmediatamente 30 ml de agua.

- Titule inmediatamente el yodo liberado con la solución normal de tiosulfato de sodio 0,01 N desde anaranjado amarillento hasta amarillo pálido, y después de la adición de 0,5 ml de solución de almidón, desde el violeta hasta la carencia de color. Detenga la titulación tan pronto la solución permanezca sin color durante 30 s.
- En un ensayo blanco paralelo, no se debe utilizar más de 0,1 ml de la solución de tiosulfato 0,01 N. sin el ensayo blanco es superior, entonces reemplace la solución saturada de yoduro de potasio ya que esta podría no ser adecuada.

Cálculos

Calcule el valor de peróxido (conocido comúnmente en la industria como “VP”), en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo activo, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(V - V_0) \times C_{tio} \times F \times 1000}{M}$$

En donde:

- V = es el volumen de la solución de tiosulfato de sodio utilizada para la determinación en mililitros.
- V₀ = es el volumen de la solución normal de tiosulfato de sodio utilizada para el ensayo blanco, en mililitros.
- F = es el factor de la solución de tiosulfato de sodio 0,001 N determinado según lo establecido.
- C_{tio} = es la concentración de la solución de tiosulfato de sodio, en moles por litro.
- m = es la masa de la porción de ensayo, en gramos.

- Índice de acidez: se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en norma mexicana NMX-F-101-SCFI-2012. Los cálculos se expresaron como ácidos grasos libres como oleico, en %.

Los reactivos que a continuación se mencionan, serán grado analítico, a menos que se indique otra cosa; cuando se hable de agua, esta será agua destilada.

- Solución de hidróxido de sodio exactamente valorada (según la tabla 1)

- Alcohol etílico de 95 ° (v/v) neutralizado en el momento de usarse con hidróxido de sodio 0,1 N. utilizando como indicador fenolftaleína.

- Solución alcohólica indicadora de fenolftaleína al 1,0 %.

Preparación de la muestra

La cantidad de muestra empleada para esta determinación debe estar de acuerdo con la siguiente tabla:

Porcentaje de ácidos grasos libres	Muestra en gramos	Mililitros de alcohol	de Normalidad de la solución.
0,0 a 0,2	56,4 ± 0,2	50,0	0,1
0,2 a 1,0	28,2 ± 0,2	50,0	0,1
1,0 a 30,0	7,05 ± 0,05	75,0	0,25
30,0 a 50,0	7,05 ± 0,05	100,0	0,25 o 1,0
50,0 a 100,0	3,525 ± 0,001	100,0	1,0

Procedimiento

A la muestra determinada en gramos, seca, fundida y filtrada, contenida en un matraz Erlenmeyer de 300 ml, se le agregan tantos mililitros de alcohol etílico como lo indica la tabla anterior, previamente neutralizado; si la disolución de los ácidos grasos libres no es completa en frío, caliente suavemente el matraz en baño de vapor a reflujo hasta disolución completa, y después se agrega 2 ml de fenolftaleína; se titula la mezcla con la solución de hidróxido de sodio valorada, agitando frecuentemente hasta que una coloración rosada persista durante 30 segundos.

Expresión de resultados:

El porcentaje de ácidos grasos libres en la mayoría de grasas y aceites son calculados como ácido oleico, sin embargo en aceites de coco son frecuentemente expresados como ácido laúrico y en aceite de palma en términos de ácido palmítico.

$$\text{Ácidos Grasos Libres como Oleíco, en \%} = \frac{VxNx\ 28,2}{pm}$$

$$\text{Ácidos Grasos Libres como Laurico, en \%} = \frac{VxNx\ 20,0}{pm}$$

$$\text{Ácidos Grasos Libres como Palmítico, en \%} = \frac{VxNx\ 25,6}{pm}$$

En donde:

- Meq= es el miliequivalente químico del ácido graso de referencia (Oleico 0,282, Laurico 0,200 y Palmítico 0,256);
- N = es la normalidad de la solución de hidróxido de sodio;
- V = son los mililitros de solución valorada de hidróxido de sodio gastados en la titulación de la muestra.
- pm = es la masa de la muestra en gramos.

Los ácidos grasos libres son expresados frecuentemente en términos de Valor Acido o Índice de Acidez, en vez de porciento de ácidos grasos libres. El valor ácido es definido como el número de miligramos de KOH necesario para neutralizar un gramo de muestra. Para convertir el porciento de ácidos grasos (como Oleíco) a valor ácido, se multiplica el porciento de ácidos grasos por 1,99

Contenido de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (índice de TBARS): fue evaluado mediante determinación colorimétrica de acuerdo con Perez, et al (2013),

Materiales

HCl: ácido clorhídrico

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

TEP: 1, 1, 3,3-tetraetoxipropano

- Disolución A: disolver 0,5 g de galato de propilo y 0,5 g de EDTA con una mezcla etanol/agua 1:1 (v/v) y enrasar a 100 mL (antioxidante).
- Disolución HCl 4 N
- Disolución de TBA (0,14415 g de TBA en 50 mL de agua destilada).
- Disolución B [0,110155 g de TEP (1, 1, 3,3-tetraetoxipropano malonaldehído; densidad=0,917 g/mL) = 0,12 mL de TEP aforado a 50 mL con disolución A].
- Disolución C (0,1 mL de disolución B aforada a 100 mL con disolución A)

Preparación de la muestra

- Pesar 10 g de muestra previamente picada (en caso de harinas y producto terminado) y en el caso del aceite solo se mide su masa, posteriormente pasarla a un tubo de destilación tipo Kjeldahl.

Añadir al tubo:

- 95 mL de agua destilada
- 2,5 mL de disolución antioxidante
- 2,5 mL de disolución HCl 4N
- 3-5 perlas de vidrio para regular la ebullición
- Los tubos se llevan a la unidad de destilación, donde se destilan hasta recoger un volumen de destilado de aproximadamente 50 mL (tomar el valor exacto del volumen del destilado, Vd).

- Tomar dos tubos de ensayo que tenga tapón de rosca. En uno de los tubos introducir 2 mL extracto recogido y en el otro tubo 4 mL. Completar con disolución A hasta un volumen final de 5 mL
- Finalmente, añadir al tubo de ensayo 5 mL de disolución de TBA.

Preparación del blanco

Blanco: 5 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA.

Elaboración de curva de calibración del patrón 1, 1, 3,3 tetraetoxipropano.

Se procederá a la preparación de una recta de calibrado con diferentes concentraciones del patrón (malonaldehído).

- Patrón 1: 0,1 mL de disolución C + 4,9 mL de disolución A + 5 mL de Disolución de TBA (equivale a 0.0012 μmol de malonaldehído).
- Patrón 2: 0,5 mL de disolución C + 4,5 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA (equivale a 0.005 μmol de malonaldehído).
- Patrón 3: 1 mL de disolución C + 4 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (equivale a 0.01 μmol de malonaldehído).
- Patrón 4: 2 mL de disolución C + 3 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (Equivale a 0.02 μmol de malonaldehído).
- Patrón 5: 3 mL de disolución C + 2 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (equivale a 0.03 μmol de malonaldehído).
- Patrón 6: 4 mL de disolución C + 1 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (equivale a 0.04 μmol de malonaldehído).

Representación de los valores de absorbancia (eje y) frente a la concentración de patrón 1,1,3,3 Tetraetoxipropano(eje x).

Desarrollo de la reacción y medida de la absorbancia

- Tapar todos los tubos e introducirlos en un baño con ebullición suave durante 40 min.
- Una vez finalizado el tiempo de reacción, se enfriarán los tubos en corriente de agua y agitando ligeramente.
- En caso que se observe la formación de burbujas en los tubos de ensayo, éstos se llevarán a un baño de ultrasonidos durante unos minutos, hasta que todo el aire incluido en la disolución se haya liberado.
- Finalmente, medir en un espectrofotómetro la absorbancia a 530 nm de cada una de las disoluciones contenidas en los tubos.

Cálculos

A partir de esta representación, se obtiene la ecuación de la recta de ajuste para los patrones medidos. Esta ecuación se empleará como recta de calibrado para determinar la concentración de malonaldehído (mg de MDA/kg de muestra) en las muestras a partir de sus lecturas de absorbancia. Se considerarán únicamente aquellos tubos cuyas lecturas de absorbancia hayan caído dentro de los valores registrados para los patrones con los que hemos calculado la recta de calibrado.

El valor de concentración de MDA en el tubo de muestra se sustituirá ecuación 1, para obtener el valor del índice de TBA, expresado en mg de malonaldehído/kg de muestra:

$$\text{Índice TBA} \left(\frac{\text{mgMDA}}{\text{kg}} \right) = \frac{72 * C * V_d}{m * V}$$

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del índice del TBA dónde:

72 = Peso molecular del malonaldehído

C = μ moles de malonaldehído obtenidos a partir de la recta de calibrado

Vd = volumen del destilado recogido (L)

m = peso en gramos de la muestra

V = volumen de la alícuota (2 mL)

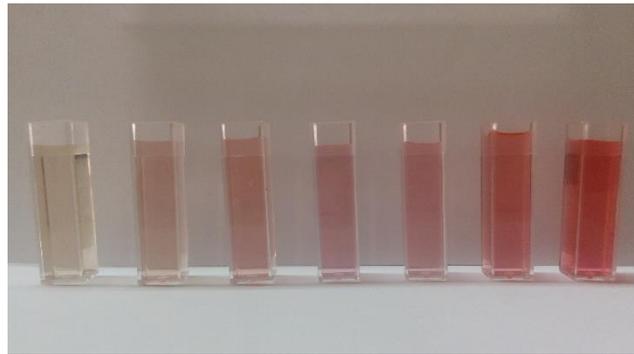


Imagen. Curva patrón TBARS

ANEXO 6.

Datos según número de réplicas, caracterización filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Replicas	Parámetros Caracterización Filetes de Trucha							
	%H	%MS	pH filete de trucha	% Grasa	% proteína	% cenizas	% acidez	pH filete de trucha
R1	89	11	6,00	4,34	25,13	4,0	1,6	6,00
R2	85	15	6,02	3,71	24,13	4,6	1,34	6,02
R3	90	10	6,02	4,03	24,63	4,3	1,1	6,02

ANEXO 7.

Medidas de tendencia central caracterización filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

%H	

%MS	

Media	88,6666666 7
Error típico	0,76011695
Mediana	89
Moda	89
Desviación estándar	1,86189867 3
Varianza de la muestra	3,46666666 7
Curtosis	4,64866863 9
Coefficiente de asimetría	- 2,065715983
Rango	5
Mínimo	85
Máximo	90
Suma	532
Cuenta	6
Coefficiente de variación	1

Media	11,3333333 3
Error típico	0,76011695
Mediana	11
Moda	11
Desviación estándar	1,86189867 3
Varianza de la muestra	3,46666666 7
Curtosis	4,64866863 9
Coefficiente de asimetría	2,06571598 3
Rango	5
Mínimo	10
Máximo	15
Suma	68
Cuenta	6
Coefficiente de variación	1

% Grasa	
Media	4,02666666 7
Error típico	0,18187297 2
Mediana	4,03
Moda	#N/A
Desviación estándar	0,31501322 7
Varianza de la muestra	0,09923333 3
Coefficiente de asimetría	- 0,047611716
Rango	0,63
Mínimo	3,71
Máximo	4,34
Suma	12,08
Cuenta	3
Coefficiente de variación	1

% proteína	
Media	24,63
Error típico	0,28867513 5
Mediana	24,63
Moda	#N/A
Desviación estándar	0,5
Varianza de la muestra	0,25
Coefficiente de asimetría	0
Rango	1
Mínimo	24,13
Máximo	25,13
Suma	73,89
Cuenta	3
Coefficiente de variación	1

% cenizas

% acidez

Media	3,93333333 3
Error típico	0,40551750 2
Mediana	4
Moda	#N/A
Desviación estándar	0,70237691 7
Varianza de la muestra	0,49333333 3
Curtosis	#¡DIV/0!
Coefficiente de asimetría	- 0,42327316
Rango	1,4
Mínimo	3,2
Máximo	4,6
Suma	11,8
Cuenta	3
Coefficiente de variación	1

Media	1,33666666 7
Error típico	0,13568755
Mediana	1,34
Moda	#N/A
Desviación estándar	0,23501773
Varianza de la muestra	0,05523333 3
Curtosis	#¡DIV/0!
Coefficiente de asimetría	- 0,063812132
Rango	0,47
Mínimo	1,1
Máximo	1,57
Suma	4,01
Cuenta	3
Coefficiente de variación	1

pH filete de trucha	
Media	6,01333333 3
Error típico	0,00666666 7
Mediana	6,02
Moda	6,02
Desviación estándar	0,01154700 5
Varianza de la muestra	0,00013333 3
Coefficiente de asimetría	- 1,732050808
Rango	0,02
Mínimo	6
Máximo	6,02
Suma	18,04
Cuenta	3
Coefficiente de variación	1

ANEXO 8.

Características sensoriales de frescura de la trucha arcoíris de acuerdo a la norma técnica colombiana NTC 1443.

Clasificación	Olor	piel	Carne	Ojos	textura	Color	Branquias
5	Fresco, característico de la especie	Brilla e iridiscente de escamas uniformes	Firme adherida a los huesos, elástica, no suelta jugo, vasos sanguíneos intactos.	Brillante ocular Saliente, iris nítido, transparente sin manchas.	Con rigor mortis firme.	Característico de la especie.	Color rojo intenso, separadas, mucus escaso.
4	Leve a pescado	Brilla nte, iridiscencia y color	Carne adherida a los huesos pero puede separar con	Brillante a s, algunas manchas de sangre frescas, ligeramente	Firme, elástica al presionar con el dedo, la	Leve mente decolorado.	Color rojo pálido, o rosado, algunas fácilmente separables;

disminui	presión	hundidos,	huella	levemente
dos.	ligera,	iris,	desapare	decolorada,
	suelta jugos	borroso.	ce	se observa
	al			mucus.
	comprimirla			
	; algunos			
	vasos			
	sanguíneos			
	rotos.			

3	Algo	Leve	Se	Ligeram	Defor	Decol	Color
	rancio,	mente	desprende	ente opacos.	mación	orado.	pardusco,
	olor leve.	brillante,	con		al		amarillento;
		escamas	facilidad de		presionar		seco; mucus
		flojas,	los huesos;		con el		abundante,
		fáciles de	suelta		dedo.		completame
		remover.	liquido				nte unidas,
			fácilmente;				decoloradas
			pegajosa.				.

2	Ranci	Flácid	Se separa	Opacos,	Pesca	Leve	Muy
	dez	a, opaca.	de los	no	se do	mente	decoloradas
	avanzada		huesos; se	observa	la blando.	blanquec	secas
	, olor		desintegra	parte		ino,	
	pútrido.		fácilmente	interna.		lechoso.	

Ligeram	al
ente	presionarla;
amoniac	vasos
al.	sanguíneos
	destruidos;
	suelta
	abundante
	líquido.

1	Algo	Glóbulo,	Excep	Blanq	Comple
	pútrido	ocular	cional-	uecino	amente
	amoniac	hundido,	mente	lechoso.	decoloradas
	al.	totalmente	blando.		, gran
		opacos.			cantidad de
					mucus.

Únicamente los pescados clasificados como 5 y 4 se pueden utilizar para el consumo humano o animal directo o para preparación de conservas.

ANEXO 9.
Datos según número de réplicas, caracterización hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*)

Replicas	Parámetros Caracterización Hidrolato		
	% acidez	pH	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]
R1	0,235	5,3	458,294

R2	0,151	5,3	452,301
R3	0,151	5,29	454,287

ANEXO 10.

Medidas de tendencia central caracterización hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*)

% Acidez	
Media	0,179
Error típico	0,028
Mediana	0,151
Moda	0,151
Desviación estándar	0,048497423
Varianza de la muestra	0,002352
Curtosis	#¡DIV/0!
Coficiente de asimetría	1,732050808
Rango	0,084
Mínimo	0,151
Máximo	0,235
Suma	0,537
Cuenta	3
Coficiente de variación	0,270935322

pH	
Media	5,296666667
Error típico	0,003333333
Mediana	5,3
Moda	5,3
Desviación estándar	0,005773503
Varianza de la muestra	3,33333E-05
Curtosis	#¡DIV/0!
Coficiente de asimetría	-1,732050808
Rango	0,01
Mínimo	5,29

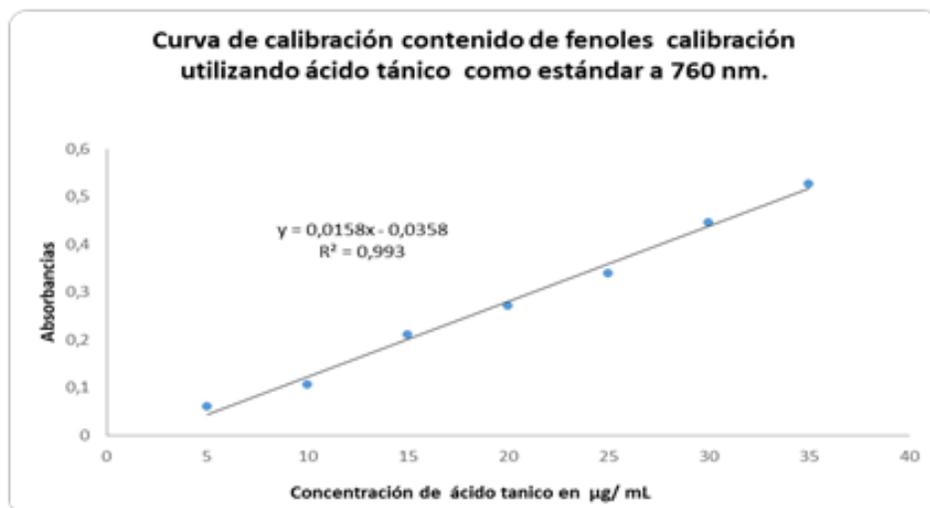
Máximo	5,3
Suma	15,89
Cuenta	3
Coefficiente de variación	0,001090026

Contenido de Fenoles	
Media	454,96
Error típico	1,762515469
Mediana	454,287
Moda	#N/A
Desviación estándar	3,052766341
Varianza de la muestra	9,319382333
Curtosis	#¡DIV/0!
Coefficiente de asimetría	0,944675896
Rango	5,993
Mínimo	452,301
Máximo	458,294
Suma	1364,882
Cuenta	3
Coefficiente de variación	0,006709957

ANEXO 11.

Resultados curva patrón contenido de fenoles totales.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ABS (760 nm)
5	0,0594
10	0,1058
15	0,2105
20	0,2717
25	0,3393
30	0,4462
35	0,5262



ANEXO 12. Marcha fitoquímica del hidrolato de caléndula.

Prueba	Compuesto	Resultado	Observaciones	foto
Cloruro Ferrico	Fenoles	acido tanico + Hidrolato +	Al realizar la prueba de cloruro ferrico, se obtiene un resultado positivo presentado una coloracion azul, lo que nos indica presencia de taninos derivados del acido galico.	
Acetato de plomo	Fenoles	acido tanico + Hidrolato parcialmente +	En esta prueba arroja un resultado parcialmente positivo, ya que en el hidrolato se muestra un tenue precipitado blanco, pero no es muy contundente el resultado positivo.	
Shinoda	Flavonoides	acido tanico + Hidrolato +	Esta prueba arroja una coloracion rosa por consiguiente confirma la existencia de flavonoides en la muestra siendo un resultado positivo.	
Leucoantocianidas	Leucoantocuanidas	acido tanico + Hidrolato +	Esa prueba arroja unas coloraciones rojas, lo cual afirma la presencia de leucoantocianidinas en la muestra, siendo un resultado positivo.	

ANEXO 13.

Datos según número de réplicas para la determinación del valor TEAC (DPPH) [μmoles/L]

Hidrolato			Antioxidante comercial (BHT)		
replica	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/g]	replica	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/L]
1	458,294	75,875	1	1095,9	1052,4
2	452,301	76,148	2	1070,8	1050,5
3	454,287	76,420	3	1083,4	1051,4

ANEXO 14.

Análisis estadístico y análisis de varianza de la Actividad antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L.*) y del BHT.

Contenido de fenoles totales [mg/100 g] (hidrolato)		Contenido de fenoles totales [mg/100 g] (BHT)	
Media	454,960483	Media	1083,363472
Error típico	1,76261712	Error típico	7,238629053
Mediana	454,286805	Mediana	1083,363472
Moda	#N/A	Moda	#N/A
Desviación estándar	3,05294241	Desviación estándar	12,5376733
Varianza de la muestra	9,32045738	Varianza de la muestra	157,1932517
Curtosis	#¡DIV/0!	Curtosis	#¡DIV/0!
Coficiente de asimetría	0,94464185	Coficiente de asimetría	8,19345E-14
Rango	5,99335478	Rango	25,07534659
Mínimo	452,300645	Mínimo	1070,825799
Máximo	458,294	Máximo	1095,901145
Suma	1364,88145	Suma	3250,090416
Cuenta	3	Cuenta	3
Coficiente de variación	0,00671035	Coficiente de variación	0,011572915

VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/g] (hidrolato)		VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/L] (BHT)	
Media	76,1478599	Media	1051,428571
Error típico	0,15725494	Error típico	0,549857399
Mediana	76,1478599	Mediana	1051,428571
Moda	#N/A	Moda	#N/A
Desviación estándar	0,27237354	Desviación estándar	0,952380952
Varianza de la muestra	0,07418735	Varianza de la muestra	0,907029478
Curtosis	#¡DIV/0!	Curtosis	#¡DIV/0!
Coficiente de asimetría	-2,3431E-13	Coficiente de asimetría	0
Rango	0,54474708	Rango	1,904761905
Mínimo	75,8754864	Mínimo	1050,47619
Máximo	76,4202335	Máximo	1052,380952
Suma	228,44358	Suma	3154,285714
Cuenta	3	Cuenta	3
Coficiente de variación	0,0035769	Coficiente de varianza	0,000905797

ANOVA

Contenido de fenoles por método hidrolato

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	269985,064	1	269985,064	90,078	0,001
Dentro de grupos	11988,912	4	2997,228		
Total	281973,976	5			

ANOVA

Actividad Antioxidante DPPH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1529,607	1	1529,607	19,312	0,012
Dentro de grupos	316,813	4	79,203		
Total	1846,420	5			

ANEXO 15. Estadísticos del coeficiente de correlación entre contenido de fenoles totales [mg/100 g] y valor TEAC (DPPH) [μmoles/g].

Coeficiente de correlación para las técnicas de evaluación antioxidante del hidrolato de caléndula (*Caléndula officinalis L*)

	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/g]
Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	1	
VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/g]	0,499994711	1

	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/g]
Media	458,2938167	76,14785992
Varianza	675,6401996	0,074187346
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	9107,216234	
P(F<=f) una cola	0,000109791	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Coeficiente de correlación para las técnicas de evaluación antioxidante del Butilhidroxitolueno – BHT.

	Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	VALOR TEAC (DPPH) [μmoles/g]
Contenido de fenoles totales [mg/100 g]	1	

ANEXO 16.

Indicadores de la capacidad oxidativa de los filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Determinación de pH:

Día	Tratamiento	pH	Día	Tratamiento	pH	Día	Tratamiento	pH
0	FSR1	6,29	0	FAC (control) R1	2 6,4	0	FHPR1	6,4
0	FSR2	6,36	0	FAC (control) R2	3 6,4	0	FHPR2	2 6,3
0	FSR3	6,33	0	FAC (control) R3	6,4	0	FHPR3	6 6,3
5	FSR1	6,38	5	FAC (control) R1	3 6,4	5	FHPR1	6,4
5	FSR2	6,35	5	FAC (control) R2	4 6,4	5	FHPR2	6,4
5	FSR3	6,36	5	FAC (control) R3	6,4	5	FHPR3	6,4
10	FSR1	6,5	10	FAC (control) R1	6,5	10	FHPR1	1 6,4
10	FSR2	6,5	10	FAC (control) R2	6,5	10	FHPR2	6,4
10	FSR3	6,5	10	FAC (control) R3	6,5	10	FHPR3	6,4
15	FSR1	7,5	15	FAC (control) R1	6,8	15	FHPR1	6,8
15	FSR2	7,4	15	FAC (control) R2	6,9	15	FHPR2	6,7
15	FSR3	7,5	15	FAC (control) R3	6,8	15	FHPR3	6,7
20	FSR1	8,5	20	FAC (control)R1	7,1	20	FHPR1	7,1
20	FSR2	8,1	20	FAC (control)R2	7,2	20	FHPR2	7
20	FSR3	8,3	20	FAC (control)R3	7,2	20	FHPR3	7,2

Índice de acidez:

0	FSR1	4,73	0	FAC (control) R1	4,6	0	FHPR1	4,0
0	FSR2	4,52	0	FAC (control) R2	5,3	0	FHPR2	3,9
0	FSR3	4,64	0	FAC (control) R3	5,1	0	FHPR3	3,9
5	FSR1	7,57	5	FAC (control) R1	5,6	5	FHPR1	5,3
5	FSR2	7,38	5	FAC (control) R2	5,7	5	FHPR2	5,5
5	FSR3	7,48	5	FAC (control) R3	5,5	5	FHPR3	5,4
10	FSR1	9,62	10	FAC (control) R1	6,6	10	FHPR1	7,6
10	FSR2	10,4	10	FAC (control) R2	6,4	10	FHPR2	7,5
10	FSR3	10,0	10	FAC (control) R3	6,8	10	FHPR3	7,7
15	FSR1	12,9	15	FAC (control) R1	6,6	15	FHPR1	7,9
15	FSR2	13,0	15	FAC (control) R2	6,9	15	FHPR2	8,0
15	FSR3	13,0	15	FAC (control) R3	6,8	15	FHPR3	7,9
20	FSR1	16,2	20	FAC (control) R1	6,0	20	FHPR1	8,2
20	FSR2	15,5	20	FAC (control) R2	6,7	20	FHPR2	7,9
20	FSR3	16,4	20	FAC (control) R3	6,4	20	FHPR3	8,2

Índice de TBA o TBARS

Día	Tratamiento	TBA (mg MDA/ Kg de muestra)	Día	Tratamiento	TBA (mg MDA/ Kg de muestra)	Día	Tratamiento	TBA (mg MDA/ Kg de muestra)
0	FSR1	0,80	0	FAC (control) R1	0,84	0	FHPR1	0,67
0	FSR2	0,83	0	FAC (control) R2	0,78	0	FHPR2	0,68

0	FSR3	0,82	0	FAC (control) R3	0,81	0	FHPR3	0,68
5	FSR1	2,60	5	FAC (control) R1	1,24	5	FHPR1	1,19
5	FSR2	2,54	5	FAC (control) R2	1,23	5	FHPR2	1,24
5	FSR3	2,62	5	FAC (control) R3	1,23	5	FHPR3	1,22
10	FSR1	4,59	10	FAC (control) R1	1,68	10	FHPR1	1,86
10	FSR2	4,10	10	FAC (control) R2	1,76	10	FHPR2	1,77
10	FSR3	4,34	10	FAC (control) R3	1,72	10	FHPR3	1,81
15	FSR1	5,80	15	FAC (control) R1	1,91	15	FHPR1	2,56
15	FSR2	5,79	15	FAC (control) R2	1,91	15	FHPR2	2,35
15	FSR3	5,80	15	FAC (control) R3	1,91	15	FHPR3	2,46
20	FSR1	7,53	20	FAC (control) R1	1,98	20	FHPR1	3,11
20	FSR2	7,13	20	FAC (control) R2	2,38	20	FHPR2	2,70
20	FSR3	7,33	20	FAC (control) R3	2,18	20	FHPR3	2,90

ANEXO 17.

Análisis de varianza ANOVA para indicadores de capacidad oxidativa. Estadísticos para pH.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: LnpH

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático o promedio	F	Sig.
Modelo corregido	,209 ^a	6	,035	29,781	,000
Interceptación	163,660	1	163,660	139948, 271	,000
Trat	,023	2	,012	10,017	,000

Dia	,186	4	,046	39,663	,000
Error	,044	38	,001		
Total	163,913	45			
Total corregido	,253	44			

a. R al cuadrado = ,825 (R al cuadrado ajustada = ,797)

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: LnpH

HSD Tukey

(I) trat	(J) trat	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Sin aplicación	Antioxidante comercial BHT	,0424*	,004
	Hidrolato (Caléndula)	,0527*	,000
Antioxidante comercial BHT	Sin aplicación	-,0424*	,004
	Hidrolato (Caléndula)	,0103	,689
Hidrolato (Caléndula)	Sin aplicación	-,0527*	,000
	Antioxidante comercial BHT	-,0103	,689

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,001.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

ANOVA^a

Modelo	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	7,694	1	7,694	62,507	,000 ^b
Residuo	5,293	43	,123		

Total	12,987	44			
-------	--------	----	--	--	--

a. Variable dependiente: pH

b. Predictores: (Constante), Día en que se toma la medida

12.2 Estadísticos para acidez.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Lnacidez

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático o promedio	F	Sig.
Modelo corregido	13,184 ^a	6	2,197	121,433	,000
Interceptación	10,218	1	10,218	564,703	,000
trat	3,403	2	1,702	94,033	,000
Día	9,781	4	2,445	135,134	,000
Error	,688	38	,018		
Total	24,090	45			
Total corregido	13,872	44			

a. R al cuadrado = ,950 (R al cuadrado ajustada = ,943)

La ANOVA muestra que hay efecto del día en que se toma la información y de los tratamientos

ANOVA^a

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	9,507	1	9,507	93,670	,000 ^b
Residuo	4,364	43	,101		

Total	13,872	44			
-------	--------	----	--	--	--

a. Variable dependiente: Lnacidez

b. Predictores: (Constante), Día en que se toma la medida

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Lnacidez

HSD Tukey

(I) trat	(J) trat	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Sin aplicación	Antioxidante comercial BHT	,5895*	,000
	Hidrolato (Caléndula)	,5770*	,000
Antioxidante comercial BHT	Sin aplicación	-,5895*	,000
	Hidrolato (Caléndula)	-,0125	,706
Hidrolato (Caléndula)	Sin aplicación	-,5770*	,000
	Antioxidante comercial BHT	,0125	,706

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,002.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

12.3 Estadísticos para peróxidos

ANOVA^a

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	185,761	1	185,761	30,963	,000 ^b
Residuo	257,979	43	6,000		
Total	443,740	44			

a. Variable dependiente: Oxidación grasa

b. Predictores: (Constante), Día en que se toma la medida

El modelo de regresión es significativo

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: índice de peróxidos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático o promedio	F	Sig.
Modelo corregido	342,698 ^a	6	57,116	21,480	,000
Interceptación	2630,912	1	2630,912	989,432	,000
trat	153,409	2	76,705	28,847	,000
Día	189,289	4	47,322	17,797	,000
Error Total	101,042	38	2,659		
Total corregido	3074,653	45			
Total	443,740	44			

a. R al cuadrado = ,772 (R al cuadrado ajustada = ,736)

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: índice de peróxidos

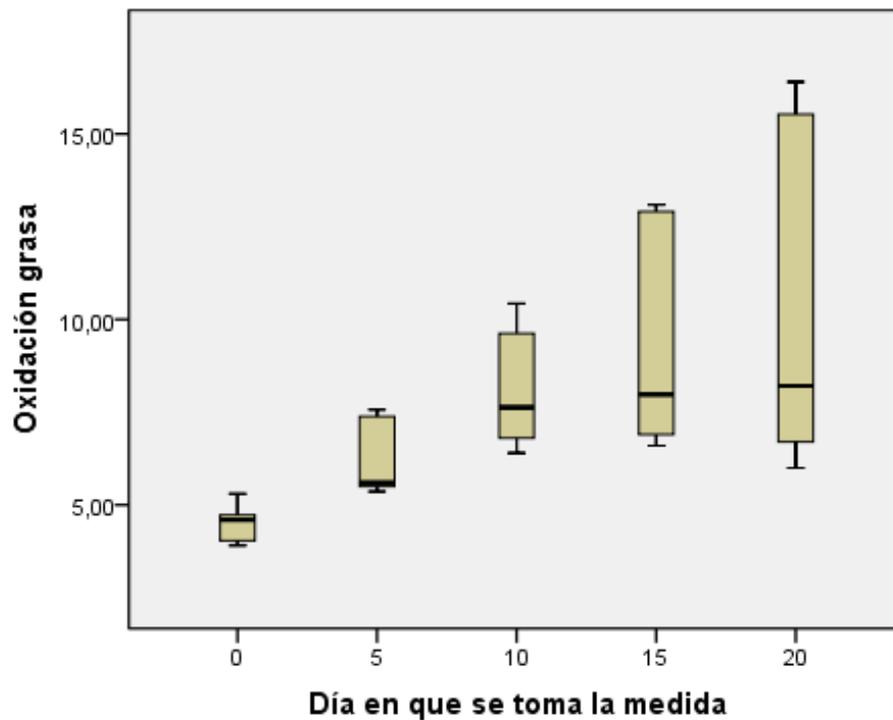
HSD Tukey

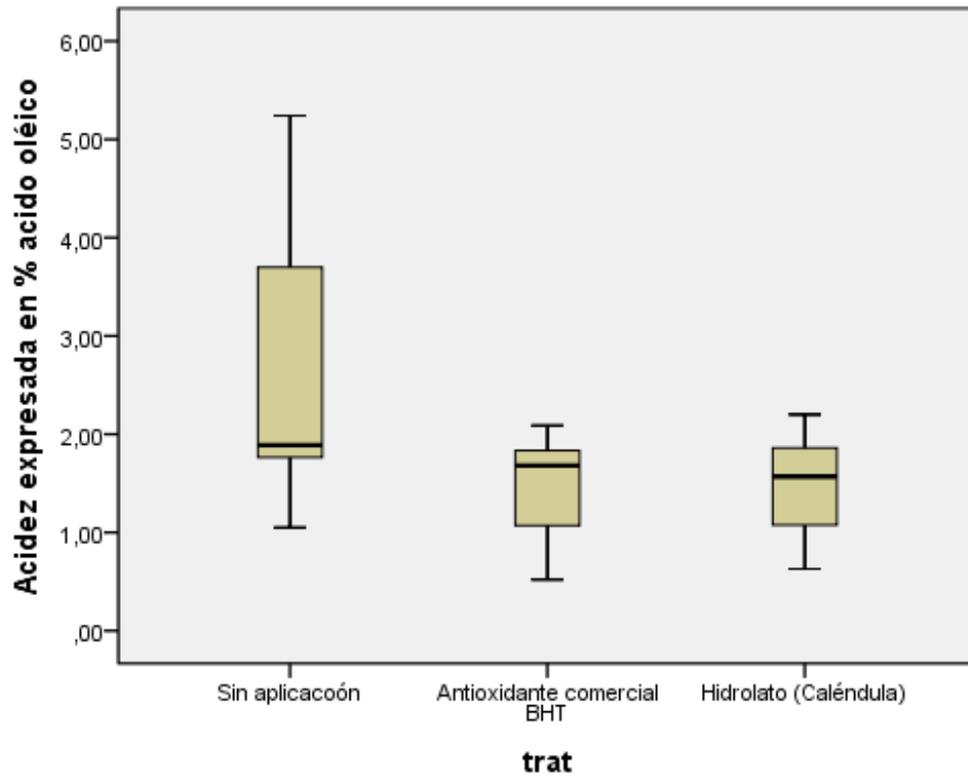
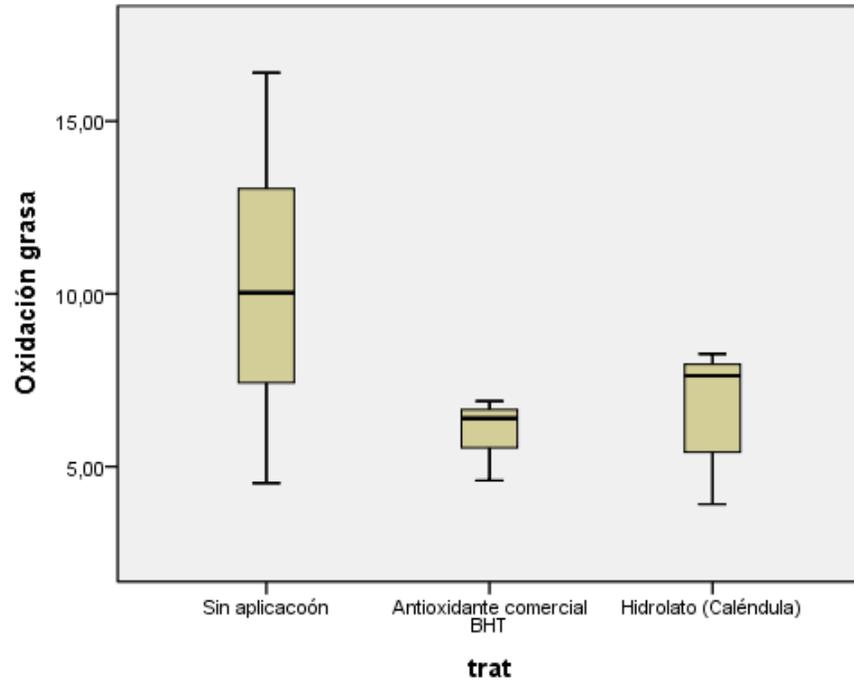
(I) trat	(J) trat	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Sin aplicación	Antioxidante comercial BHT	4,1700*	,000
	Hidrolato (Caléndula)	3,6013*	,000
Antioxidante comercial BHT	Sin aplicación	-4,1700*	,000
	Hidrolato (Caléndula)	-,5687	,609
Hidrolato (Caléndula)	Sin aplicación	-3,6013*	,000
	Antioxidante comercial BHT	,5687	,609

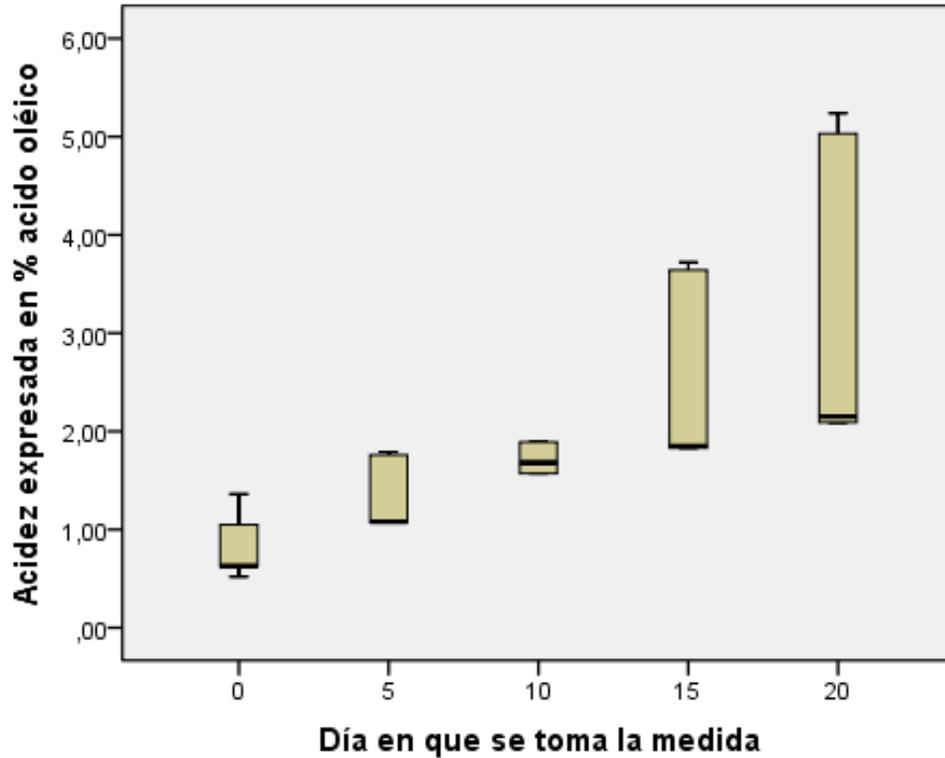
Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 2,659.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.







12.4 Estadísticos para TBARS.

Pruebas de efectos inter-sujetos ANOVA

Variable dependiente: lnTBA

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático o promedio	F	Sig.
Modelo corregido	18,415 ^a	3	6,138	97,834	,000
Interceptación	,058	1	,058	,917	,344
Día	12,590	1	12,590	200,650	,000
trat	5,826	2	2,913	46,426	,000
Error	2,572	41	,063		
Total	42,170	45			
Total corregido	20,988	44			

a. R al cuadrado = ,877 (R al cuadrado ajustada = ,868)

Observe que al realizar el análisis de varianza para juzgar la hipótesis

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

H_1 : al menos 2 medias difieren

Se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los tratamientos (antioxidantes) difieren en su efecto. De la misma manera, el tiempo también influye en el efecto de los antioxidantes, debido a que los valores Sig. Resaltados en negrilla son pequeños.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: lnTBA

(I) Testigo, BHT comercial e hidrolato de calendula.	(J) Testigo, BHT comercial e hidrolato de calendula.	Diferencia de medias (I- J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Sin aplicación	Antioxidante comercial BHT	,8000*	,21939	,002	,2670	1,3330
	Hidrolato (Caléndula)	,7203*	,21939	,006	,1873	1,2533
Antioxidante comercial BHT	Sin aplicación	-,8000*	,21939	,002	- 1,3330	-,2670
	Hidrolato (Caléndula)	-,0797	,21939	,930	-,6127	,4533
Hidrolato (Caléndula)	Sin aplicación	-,7203*	,21939	,006	- 1,2533	-,1873
	Antioxidante comercial BHT	,0797	,21939	,930	-,4533	,6127

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,361.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

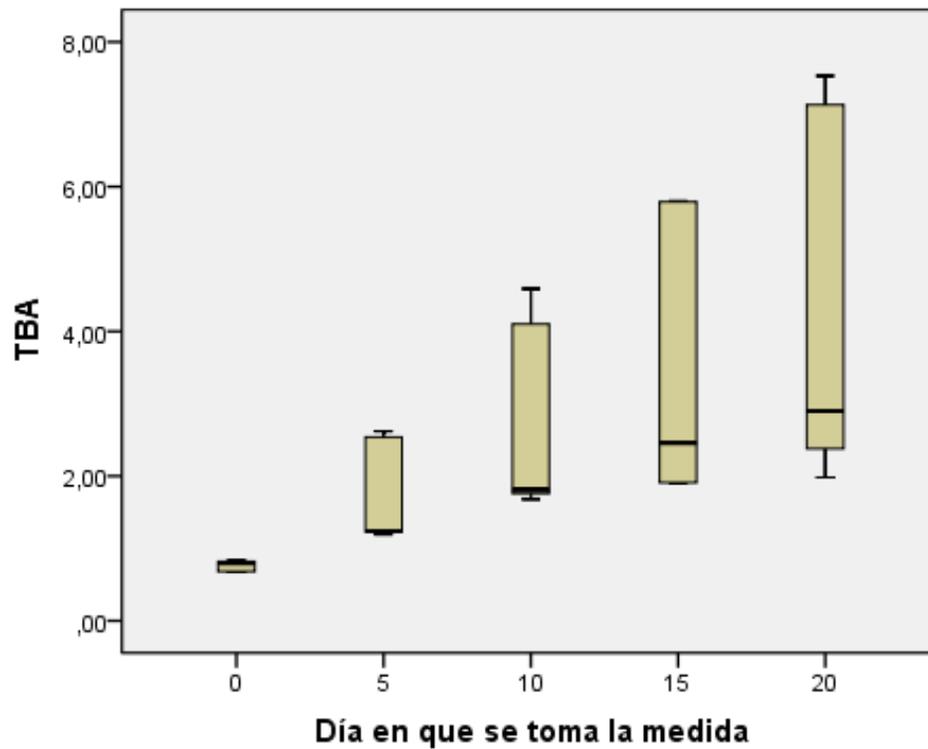
Coefficientes

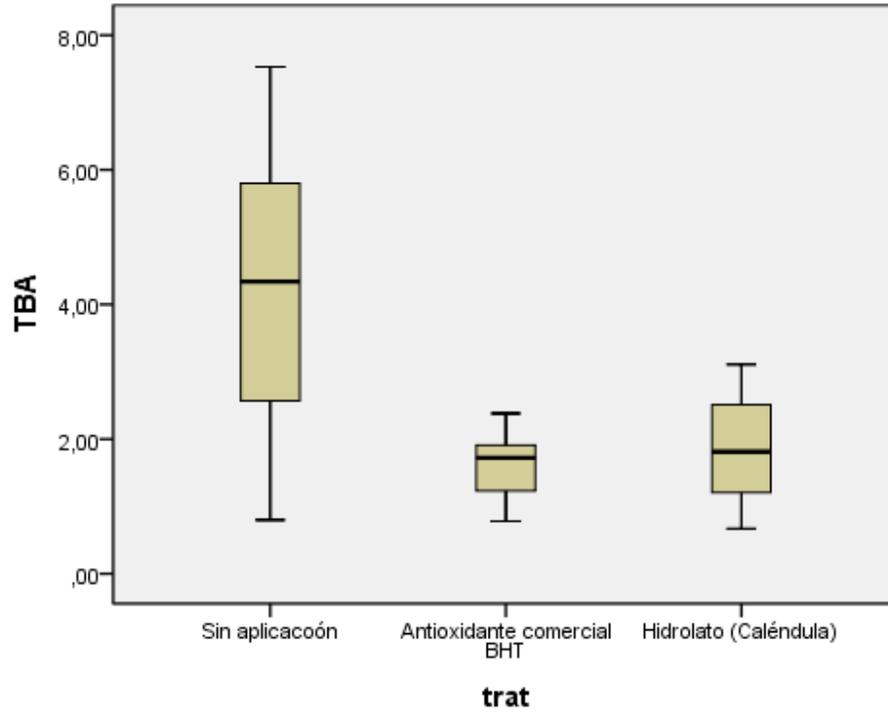
Modelo	Coefficients no estandarizados		Coefficient es estandarizado s	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		

1	(Constante)	,830	,375		2,211	,032
	Día en que se toma la medida	,169	,031	,644	5,515	,000

a. Variable dependiente: TBA

Por cada da de almacenamiento l ranciedad aumenta en 0,169

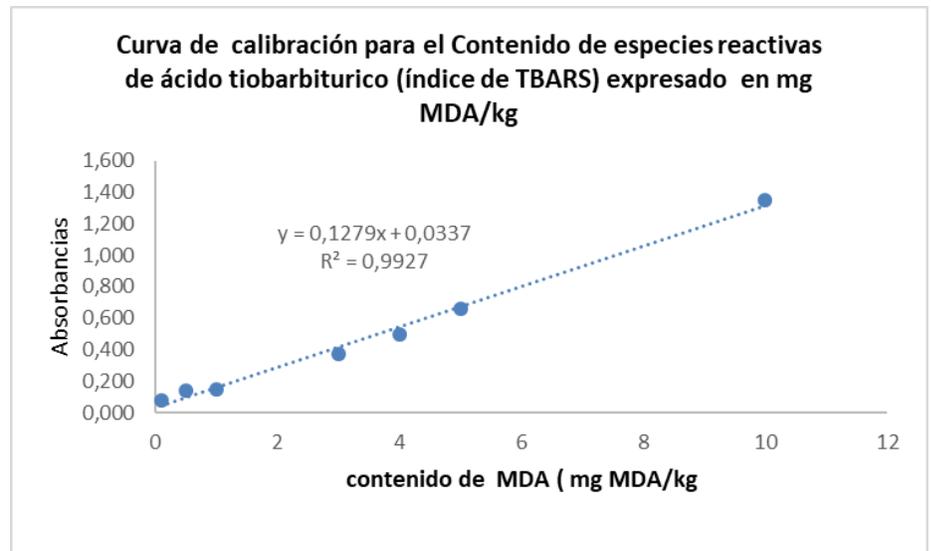




ANEXO 18.

Contenido de especies reactivas de ácido tiobarbiturico (índice de TBARS) expresado en mg MDA/kg

MDA (ppm)	ABS530
0,1	0,0793
0,5	0,1411
1	0,1516
3	0,3729
4	0,4991
5	0,6608



10	1,3488
-----------	--------

ANEXO 19. Evaluación sensorial filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Tiempo cero (t₀)

Apariencia	Puntuación	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Carcaterística de pescado cocino, billante.	10	xxxx	xx	xxxx
Característica, menos intensa.	9		xxxx	xx
ligeramente apagada.	8			
Reseca.	7	xxx		
Aumento del atributo anterior.	6			
Aspecto gelatinoso.	5			
Presencia de abundante exudado lechoso.	4			
Aumento del atributo anterior.	3			

Olor	Puntuación	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
característico, ligeramente dulce.	10	xxxx	xxx	xxx
Característico, menor intenso, carne cocida.	9			xx
Característicos menor intenso, a leche o patatas cocidas.	8	xx		x
Neutro, patatas cocidas.	7		xx	
Dulce , afrutado	6			
A pescado	5		x	
Olor intenso a pescado, ácido, agrio.	4			
Acido Lactico, amoniacal, rancio.	3			

Textura	Puntuación	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Firme y elastica, se desmenuza con facilidad.	10	xxxx	xxx	xxxx
Menos firme y elastica.	9		xx	
Menos elastica.	8			
Blanda.	7	xx		xx
Muy Blanda.	6		x	
Pastosa	5			
Aumento del atributo	4			
Muy pastosa.	3			

Tiempo Veinte (t₂₀)

Apariencia	Puntuación	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Característica de pescado cocino, brillante.	10			x
Característica, menos intensa.	9	xx	xx	xxx
ligeramente apagada.	8			xx
Reseca.	7	xxxx	xxxx	
Aumento del atributo anterior.	6			
Aspecto gelatinoso.	5			
Presencia de abundante exudado lechoso.	4			
Aumento del atributo anterior.	3			

Olor	Puntuación	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
característico, ligeramente dulce.	10			
Característico, menor intenso, carne cocida.	9			
Característicos menor intenso, a leche o patatas cocidas.	8			
Neutro, patatas cocidas.	7			
Dulce , afrutado	6			
A pescado	5	xxxxxx	xxxx	xxxxxxx
Olor intenso a pescado, ácido, agrio.	4		xx	
Acido Lactico, amoniacal, rancio.	3			

Textura	Puntuación	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Firme y elastica, se desmenuza con facilidad.	10		xx	xx
Menos firme y elastica.	9			
Menos elastica.	8	xxxx	xxxx	
Blanda.	7	xx		xxxx
Muy Blanda.	6			
Pastosa	5			
Aumento del atributo	4			
Muy pastosa.	3			

Registro fotográfico Evaluación Sensorial:

