

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Escuela de Tecnología de Alimentos

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Tesis para optar por el grado de  
Licenciatura en Alimentos

**Caracterización fisicoquímica del aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies  
y un híbrido de palma aceitera y determinación del perfil de carotenoides y la  
bioaccesibilidad *in vitro* de estos aceites**

**Crisbel Retana Salazar**

**A64708**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**San José, Costa Rica**

**2017**

## **DEDICATORIA**

*A Dios, a mis padres pilares fundamentales en mi vida, a mamá por su infinito amor, a la vida por las segundas oportunidades.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al ser supremo que nos da coraje en los momentos en que más se necesita para continuar construyendo sueños. Por el apoyo incondicional gracias a mis padres y hermanos por, además servir de inspiración. Gracias a mi alma mater, la Universidad de Costa Rica, por la formación integral que me brindó. Al CITA, a la profesora Patricia Esquivel por dejarme ser parte de este proyecto. Al profesor Víctor Jiménez por su apoyo científico, y a Andrea Irías por estar ahí para guiarme en todo momento.

Un agradecimiento especial a esas personas que hicieron del proceso algo agradable y que sin importar la hora tuvieron gestos de solidaridad. Gracias Sil, Bea, Ale y Verny por ayudarme en la pelada de frutos, Eu por la compañía y alimentos proporcionados en las noches largas de laboratorio. A Ariela y Pila por su disponibilidad dentro y fuera del país para colaborarme en lo que se presentó. A Camachito por sus consejos de vida. A Luga, Juanma, Laury, Gre, Raque por ser mis amigos de toda la vida. A Giova y Luis por su paciencia en el laboratorio (la mayoría de las veces). A don Wilfredo por la confianza depositada y sobre todo por el invaluable conocimiento profesional transmitido.

Un agradecimiento especial a don Amancio por todo el tiempo, paciencia y disponibilidad para aclarar dudas, así como a la empresa ASD de Costa Rica por los frutos entregados y por recibirnos en las plantaciones y hacernos sentir como en casa. Gracias al Baden Württemberg Stipendium, por la oportunidad de crecimiento personal y profesional que significó esa beca. A Javier sin el cual habría terminado al menos dos meses antes. Y a todas las personas maravillosas conocidas durante mi paso por Europa.

## TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado en la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:  
Crisbel Retana Salazar

Aprobado por:



---

Lic. Ana Lucía Mayorga Gross  
Presidenta del tribunal



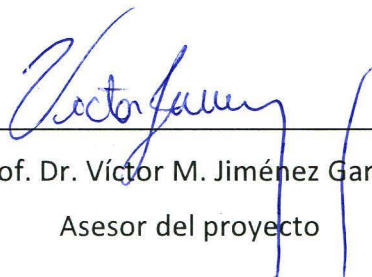
---

Ph.D Patricia Esquivel Rodríguez  
Directora del proyecto



---

M.Sc. Andrea Irías Mata  
Asesora del proyecto



---

Prof. Dr. Víctor M. Jiménez García  
Asesor del proyecto



---

Ph.D. Rosaura M. Romero Chacón  
Profesora designada

## ÍNDICE GENERAL

Caracterización fisicoquímica del aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera y determinación del perfil de carotenoides y la bioaccesibilidad *in vitro* de estos aceites.

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
TRIBUNAL EXAMINADOR .....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
Índice de Cuadros .....	viii
Índice de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas .....	xii
Resumen .....	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo General: .....	5
2.2 Objetivos Específicos:.....	5
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
3.1 Generalidades de la planta de palma aceitera.....	6
3.1.1 <i>Elaeis guineensis</i> (Palma africana) .....	10
3.1.2 <i>Elaeis oleifera</i> (Palma americana) .....	11
3.1.3 <i>Elaeis guineensis x Elaeis oleifera</i> (Híbrido: Amazon) .....	13
3.2 Generalidades del aceite de palma.....	14
3.3 Procesamiento y refinado del aceite de palma.....	16
3.4 Parámetros de calidad de aceites y grasas .....	17
3.4.1 Índice de saponificación (IS).....	17
3.4.2 Índice de yodo (IY).....	17
3.4.3 Índice de refracción (IR) .....	18
3.4.4 Índice de acidez (ácidos grasos libres) (AGL) .....	19
3.4.5 Índice de peróxidos (IP).....	19
3.4.6 Gravedad específica (GE) .....	20
3.5 Carotenoides .....	20
3.5.1 Definición, clasificación y estructura.....	20
3.5.2 Carotenoides en frutas y vegetales.....	24
3.5.2 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de carotenoides .....	25

<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1 Localización del proyecto .....	29
4.2 Materia prima.....	29
4.3 Pre-tratamiento de la materia prima .....	30
4.4 Tratamiento de las muestras .....	32
4.4.1. Análisis fisicoquímicos.....	33
4.4.1.1 IS.....	34
4.4.1.2 IY.....	35
4.4.1.3 IR.....	36
4.4.1.4 GE .....	36
4.4.1.5 AGL .....	37
4.4.1.6 IP.....	38
4.4.1.7 Diseño experimental .....	39
4.4.1.8 Análisis estadístico .....	39
4.4.2 Perfil de carotenoides .....	39
4.4.2.1 Determinación del color.....	40
4.4.2.2 Identificación de carotenoides.....	40
4.4.2.3 Cuantificación de $\beta$ -caroteno .....	42
4.4.2.4 Diseño Experimental .....	43
4.4.2.5 Análisis Estadístico .....	43
4.5. Comparación de la bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de los carotenoides de los diferentes aceites de palma y de un aderezo elaborado con uno de estos aceites .....	43
4.5.1 Extracción de carotenoides micelados para la determinación de la bioaccesibilidad.....	45
4.5.2 Determinación del porcentaje de carotenoides micelados .....	47
4.5.3 Diseño experimental .....	47
4.5.4. Análisis estadístico .....	48
<b>5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
5.1 Caracterización fisicoquímica de las materias primas .....	49
5.2 Perfil y concentración de carotenoides en el aceite del mesocarpo de dos especies y un híbrido de palma aceitera .....	54
5.2.2 Perfil de carotenoides de los aceites analizados.....	55
5.2.3 Cuantificación del $\beta$ -caroteno de las diferentes variedades de aceite .....	61
5.2.4 Actividad provitamina A de los aceites .....	63
5.3 Bioaccesibilidad del $\beta$ -caroteno presente en los aceites y aderezos.....	65
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>74</b>

6.1 Conclusiones.....	74
6.2 Recomendaciones .....	76
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>91</b>
8.1 Rendimientos de extracción del aceite del mesocarpo del fruto de diferentes variedades de palma aceitera.....	91
8.2 Curvas de calibración para las determinaciones en el HPLC-UV.....	94
8.3 Resultados de los análisis de varianza y las pruebas de TUKEY realizadas sin bloquear la influencia de los lotes (repeticiones). .....	96
8.4...Resultados de los análisis de varianza y las pruebas de TUKEY realizadas sin bloqueando la influencia de los lotes (repeticiones).....	97
8.5 Procedimiento seguido para la preparación del reactivo de Hanus .....	99
8.6 Marca y proveedor de los reactivos empleados en la presente investigación .....	100

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro I.</b> Composición porcentual típica de los ácidos grasos presentes en el aceite de palma derivado de <i>Eg</i> .....	15
<b>Cuadro II.</b> Actividad provitamina A relativa de carotenoides presentes en algunos alimentos.	22
<b>Cuadro III.</b> Formulación del aderezo elaborado a partir del aceite derivado del híbrido conocido como Amazon.....	44
<b>Cuadro IV.</b> Resultados obtenidos en la determinación de los parámetros fisicoquímicos de los aceites de los tres genotipos de palma estudiados. Valores de una misma fila cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los resultados se muestran con su respectiva desviación estándar. ....	49
<b>Cuadro V.</b> Resultados de la determinación del color del aceite del mesocarpo de dos especies y un híbrido de palma aceitera, mediante la escala CIE $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ . Valores de una misma fila cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos se muestran con su respectiva desviación estándar.....	54
<b>Cuadro VI.</b> Identificación de carotenoides de los tres aceites de palma analizados. ....	57
<b>Cuadro VII.</b> Cuantificación de la concentración de $\beta$ -caroteno y su respectiva desviación estándar presente en los aceites de palma estudiados, mediante su análisis por HPLC-UV. Valores cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). ....	62
<b>Cuadro VIII.</b> Resultados obtenidos en la determinación de $\beta$ -caroteno inicial y en la fase micelar (después de realizar la digestión <i>in vitro</i> ) de los aceites de <i>Eg</i> , <i>Eo</i> , <i>EoxEg</i> . Valores cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los resultados se presentan con su respectiva desviación estándar. ....	67
<b>Cuadro IX.</b> $\beta$ -caroteno presente en la fase micelar después de la digestión <i>in vitro</i> de las muestras del aderezo comparadas con las del aceite Amazon .....	70
<b>Cuadro X.</b> Rendimientos de extracción del lote 1 de aceite de palma obtenido del mesocarpo de los frutos de <i>Elaeis guineensis</i> , como parte de la extracción sólido líquido realizada con hexano.....	91
<b>Cuadro XI.</b> Rendimientos de extracción del lote 2 de aceite de palma obtenido del mesocarpo de los frutos de <i>Elaeis oleifera</i> , como parte de la extracción sólido líquido realizada con hexano.....	92
<b>Cuadro XII.</b> Rendimientos de extracción del lote 3 de aceite de palma del mesocarpo de los frutos de Amazon, como parte de la extracción sólido líquido realizada con hexano. ....	93
<b>Cuadro XIII.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la caracterización fisicoquímica de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados. ....	96
<b>Cuadro XIV.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la determinación de color de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados. ....	96
<b>Cuadro XV.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración y bioaccesibilidad del betacaroteno presente en los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes.....	97



<b>Cuadro XVI.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración de $\beta$ -caroteno tanto liberado como en la fase micelar (bioaccesible) de los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes. ....	97
<b>Cuadro XVII.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la caracterización fisicoquímica de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados. ....	97
<b>Cuadro XVIII.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la determinación de color de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados. ....	98
<b>Cuadro XIX.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración y bioaccesibilidad del betacaroteno presente en los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes.....	98
<b>Cuadro XX.</b> Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración de $\beta$ -caroteno tanto liberado como en la fase micelar (bioaccesible) de los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes. ....	98
<b>Cuadro XXI.</b> Cantidad de $I_2$ , $Br_2$ y HOAc a utilizar según el volumen de reactivo de Hanus deseado.....	99
<b>Cuadro XXII.</b> Marca y proveedor de los reactivos empleados para los análisis fisicoquímicos, determinación del perfil y la concentración de los carotenoides, así como en la determinación de la bioaccesibilidad del $\beta$ -caroteno.....	100

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Racimo del fruto de la palma aceitera ( <i>Eg</i> ). Fuente. Despradel (2013).....	7
<b>Figura 2.</b> Corte transversal del fruto de palma aceitera exponiendo sus partes. Modificado a partir de: Hormaza <i>et al</i> (2010).....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema del cruzamiento de frutos con el cuesco tipo Dura x Pisífera para la producción de semillas comerciales. Fuente. ASD (2010). .....	9
<b>Figura 4.</b> Planta de palma africana: <i>Elaeis guineensis</i> . Fuente. Hormaza <i>et al.</i> (2010). .....	10
<b>Figura 5.</b> Fruto de la especie <i>E.guineensis</i> L: largo, a: ancho. Fuente. Hormaza <i>et al.</i> (2010)....	11
<b>Figura 6.</b> Frutos de palma aceitera de la especie <i>Elaeis oleifera</i> y su corte transversal. Fuente. Rabelo (2013). .....	13
<b>Figura 7.</b> Frutos del híbrido <i>EoxEg</i> y su corte transversal. Fuente. Hormaza <i>et al.</i> (2010).....	14
<b>Figura 8.</b> Reacciones involucradas en la determinación del IY de un triacilglicerol por el método de Hanus. Fuente. Herrera <i>et al.</i> (2008).....	18
<b>Figura 9.</b> Reacciones involucradas en la determinación del índice de peróxido de un aceite o una grasa. Fuente. Herrera <i>et al.</i> (2008). .....	20
<b>Figura 10.</b> Unión de ocho unidades isoprenoides para dar lugar al $\beta$ -caroteno. Fuente. Kumar <i>et al.</i> (2015). .....	21
<b>Figura 11.</b> Conversión del $\beta$ -caroteno a retinal, retinol y ésteres de retinol. Fuente. Chacón (2014). .....	23
<b>Figura 12.</b> Estructura molecular del $\beta$ -caroteno, el cromóforo se encuentra resaltado con color rojo. Fuente. Kumar <i>et al.</i> (2015). .....	24
<b>Figura 13.</b> Diagrama del procesamiento seguido para la obtención del aceite de los diferentes frutos de palma aceitera. ....	31
<b>Figura 14.</b> Diagrama del procedimiento seguido desde la recolección de las muestras hasta la determinación de la bioaccesibilidad de los carotenoides. ....	33
<b>Figura 15.</b> Diagrama de los parámetros fisicoquímicos a determinar para la caracterización de los aceites empleados. ....	34
<b>Figura 16.</b> Esquema general de trabajo para la determinación de carotenoides en los aceites de los tres materiales de palma aceitera. ....	40
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de cálculo del factor $D_B/D_{II}$ (%) usado en la identificación de los isómeros cis. Fuente: Britton <i>et al.</i> (1995).....	42
<b>Figura 18.</b> Diagrama de la metodología de la bioaccesibilidad in vitro para la obtención de la fracción micelar y de carotenoides liberados de la matriz alimentaria. Adaptado de. Chacón (2014). .....	46
<b>Figura 19.</b> Aceites obtenidos de los diferentes materiales de palma aceitera que se estudiaron. ....	55
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas del perfil de carotenoides de los tres aceites estudiados mediante HPLC-UV, monitoreados a 450 nm. Ver el cuadro VII para la asignación de los picos. La intensidad de las señales se encuentra en diferentes escalas. ....	56
<b>Figura 21.</b> Espectros de separación de los carotenoides presentes en la fase micelar una vez que se ha realizado el proceso de bioaccesibilidad de los tres aceites de palma analizados mediante HPLC-UV, monitoreados a 450 nm. (La asignación de los picos puede observarse en el cuadro VI). .....	66
<b>Figura 22.</b> Fracción de $\beta$ -caroteno recuperado de la fase supernatante (antes de filtrar), así como en la fracción micelar (bioaccesibilidad) de los tres aceites analizados mediante	

HPLC-UV y monitoreada a 450 nm. Letras diferentes dentro de un mismo tipo de aceite indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Las líneas superiores indican la desviación estándar. ....	68
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de $\beta$ -caroteno bioaccesible (fracción micelar) en las muestras de aceite Amazon y del aderezo elaborado a base de este. Las barras superiores indican la desviación estándar de los resultados. ....	70
<b>Figura 24.</b> Bioaccesibilidad del $\beta$ -caroteno procedente de diferentes fuentes alimentarias. Los valores del mango, papaya, tomate y zanahoria fueron tomados de Schweiggert <i>et al.</i> (2012). ....	72
<b>Figura 25.</b> Curva de calibración de $\beta$ -caroteno inyectada en la ETA de la UCR para la determinación de la concentración de este en los aceites antes de la digestión <i>in vitro</i> . .	94
<b>Figura 26.</b> Curva de calibración de $\beta$ -caroteno inyectada en la ETA de la UCR para la determinación de la concentración de este en los aceites después de la digestión <i>in vitro</i> . ....	95
<b>Figura 27.</b> Curva de calibración de $\beta$ -caroteno inyectada en el CITA para la determinación de la concentración de este en los aceites antes de la digestión <i>in vitro</i> . ....	95
<b>Figura 28.</b> Curva de calibración de $\beta$ -caroteno inyectada en el CITA para la determinación de la concentración de este en los aceites después de la digestión <i>in vitro</i> . ....	96

## Lista de Abreviaturas

**AGLs:** ácidos grasos libres.

**AOAC:** Association of Official Agricultural Chemists.

**Br<sub>2</sub>:** bromo.

**C18:1:** ácido oleico.

**C20:** veinte átomos de carbono.

**C30:** treinta átomos de carbono.

**C40:** cuarenta átomos de carbono.

**CANAPALMA:** Cámara Nacional de Productores de Palma.

**cg:** centigramos.

**CITA:** Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

**cm:** centímetros.

**DxP:** Dura x Pisífera.

**Eg:** *Elaeis guineensis*.

**Eo:** *Elaeis oleífera*.

**EoxEg:** híbrido interespecífico entre *Elaeis oleífera* y *Elaeis guineensis*.

**ETA:** Escuela de Tecnología de Alimentos.

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations.

**FAOSTAT:** Food and Agriculture Organization Statistics Division.

**hás:** hectáreas.

**HCl:** ácido clorhídrico.

**HOAc:** ácido acético.

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography.

**I<sub>2</sub>:** yodo.

**IA:** índice de acidez.

**IP:** índice de peróxidos.

**IR:** índice de refracción.

**IS:** índice de saponificación.

**IY:** índice de yodo.

**kg:** kilogramos.

**KI:** yoduro de potasio.

**KOH:** hidróxido de potasio.

**kPa:** kilopascales.

**L:** litro.

**m/v:** relación masa/volumen.

**M:** molaridad.

**MAG:** Ministerio de Agricultura y Ganadería.

**MeOH:** metanol.

**min:** minuto.

**mm:** milímetros.

**MTBE:** metil tert-butil éter.

**N.D:** no determinado.

**N:** normalidad.

**nm:** nanómetros.

**PLs:** Fosfolípidos.

**ppm:** Partes por millón.

**RAE:** Retinol Activity Equivalents.

**R-COOH:** hidroperóxidos.

**RE:** retinol equivalents.

**s:** segundos.

**SIRIM:** Standards and Industrial Research Institute of Malaysia.

**TAGs:** triacilgliceroles.

**TBA:** Ácido tiobarbitúrico.

**UCR:** Universidad de Costa Rica.

**USA:** United States of America.

**USDA:** United State Department of Agriculture

**UV:** ultravioleta.

**v/v:** relación volumen/volumen.

**Vis:** visible.

**WHO:** World Health Organization.

**$\lambda$ :** longitud de de onda.

**%:** porcentaje.

**°C:** grados Celsius.

**$\mu$ :** micro.

## Resumen

En la presente investigación se trabajó con frutos de dos especies (*Elaeis oleifera* (*Eo*) específicamente con la variedad Manaos y *Elaeis guineensis* (*Eg*) concretamente con la variedad Deli Dami), y un híbrido interespecífico denominado Amazon (*EoxEg*). Se extrajo el aceite de la pulpa de los frutos que fue caracterizado fisicoquímicamente y se le determinó el perfil y la concentración de los carotenoides presentes. Finalmente se elaboró un aderezo con aceite del híbrido interespecífico y se determinó la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides tanto de los aceites como del aderezo, con especial interés en el  $\beta$ -caroteno, el cual resultó ser el componente principal.

Los aceites estudiados presentaron propiedades diversas, algunos de muy alta calidad y grado de insaturación, como el derivado de la variedad de palma americana (*Eo*), un aceite con cualidades intermedias como es el del híbrido interespecífico *EoxEg* y finalmente un aceite de menor calidad y mayor saturación, que por su alto rendimiento es el más utilizado a nivel comercial (*Eg*).

El principal pigmento identificado en todos los casos fue el  $\beta$ -caroteno, el cual además es el carotenoide con mayor potencial de actividad provitamina A. En los aceites estudiados se determinó una alta concentración de este carotenoide, así como también de  $\alpha$ -caroteno y una amplia gama de estereoisómeros derivados de estos dos carotenoides. Se realizó la cuantificación concretamente del  $\beta$ -caroteno, así como la confirmación de la identidad de este contra un estándar y se determinó el potencial provitamina A de los tres aceites estudiados.

Mediante el método *in vitro* de simulación de la digestión, se determinó que, en general, el porcentaje de  $\beta$ -caroteno bioaccesible en los aceites no es tan alto cuando se utiliza el aceite directamente en la determinación (matriz 100% lipídica). Dichos porcentaje van desde 0,87% para *Eo*, pasando por 4,18% para *EoxEg* y hasta 6,90% para *Eg*, con un porcentaje de  $\beta$ -caroteno bioaccesible significativamente diferente para los diferentes materiales ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte se determinó un aumento de la bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno en un aderezo elaborado con una formulación en la que se integró un 30% de aceite de

Amazon. La bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno de dicho aderezo (48,3%) resultó ser 7 veces mayor que la del aceite puro (4,2%).

## 1. INTRODUCCIÓN

La deficiencia de vitamina A (retinol) es un importante problema de salud pública en países en vías de desarrollo en todo el mundo. De acuerdo con un reporte de la Organización Mundial de la Salud (WHO: por sus siglas en inglés) en el 2009, 109 millones de niños pre-escolares y 19,1 millones de mujeres embarazadas mostraron bajas concentraciones de retinol ( $<0,7 \mu\text{mol/L}$ ), lo cual es un indicador de deficiencia de vitamina A. Particularmente en países con bajos índices de ingresos per cápita, las fuentes vegetales de vitamina A son recursos importantes en la prevención de la deficiencia de dicha vitamina, dado que los recursos animales, como huevos, hígado y leche, son muy caros o difíciles de adquirir (FAO/WHO, 2002; WHO, 2009).

La vitamina A es un nutriente esencial necesario para humanos en pequeñas cantidades para el funcionamiento normal del sistema visual, crecimiento y desarrollo, el mantenimiento de la integridad del epitelio celular, la función inmune y la reproducción. Estas necesidades dietéticas de vitamina A son normalmente aportadas por el retinol preformado (principalmente como éster de retinol) y por carotenoides provitamina A (FAO/WHO, 2001).

Los carotenoides son micronutrientes lipofílicos con potenciales beneficios para la salud de los seres humanos. Estudios epidemiológicos han mostrado asociaciones entre la ingesta de frutas y vegetales ricos en carotenoides con la reducción del riesgo causado por diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y la degeneración ocular asociada a la edad (Werner & Böhm, 2011). Se puede afirmar que, entre todos los pigmentos presentes en los organismos vivos, no hay duda de que los carotenoides son, después de las clorofilas, los más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se les encuentra en todo el reino vegetal, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (son responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de la mayoría de frutos). También son los responsables de pigmentaciones en bacterias, algas, hongos y animales. Estos últimos no son capaces de sintetizarlos y por tanto es necesario incorporarlos a través de la dieta (Mínguez *et al.*, 2005).

En muchos países subdesarrollados, en donde acceder a los alimentos de origen animal es más complicado, se vuelve de vital importancia estudiar otra gama de



derivados alimenticios más ampliamente difundidos, como es el caso de la palma aceitera africana (*Elaeis guineensis*). El aceite de palma crudo es la fuente natural más rica del mundo de carotenoides en términos de retinol (provitamina A) equivalente. Este contiene alrededor de 15 a 300 veces más carotenoides que las zanahorias, los vegetales de hojas verdes y tomates, todos estos son considerados por tener una importante actividad provitamina A (May, 1996).

La palma aceitera africana es una planta tropical propia de climas cálidos. Se desarrolla hasta los 500 metros sobre el nivel del mar. Dentro de los cultivos de semillas oleaginosas es el que produce mayor cantidad de aceite por hectárea. Su fruto es una drupa ovoide, de 3 a 5 cm de largo. Las partes de esta son: estigma, exocarpo, mesocarpo o pulpa, endocarpo o cuesco, endospermo o almendra y embrión. Es originaria del Golfo de Guinea (África occidental), de ahí su nombre científico, *Elaeis guineensis* Jacq, y su denominación popular: palma aceitera africana. Esta planta se cultiva hasta los 15° de latitud norte o sur. Su introducción en América tropical se atribuye a los colonizadores y comerciantes portugueses, que la usaban como parte de la dieta alimentaria de los esclavos en Brasil. Los principales países productores son: Indonesia, Malasia, Nigeria, Zaire, Costa de Marfil, y otros países africanos y algunos sudamericanos (FAO, 2006).

Además de *Elaeis guineensis*, también se conocen otras especies del género *Elaeis*, como *Elaeis oleifera*. Esta es una especie de palma aceitera originaria del continente americano. Esta palma ha sido encontrada en el bosque Amazónico e incorporada en programas de mejoramiento genético dadas algunas cualidades llamativas para la industria aceitera que presenta en comparación con otras especies. Algunas de estas características son: un crecimiento más lento de la planta, aceite de mayor calidad (mayor cantidad de ácidos grasos insaturados), resistencia a enfermedades, incluyendo el “amarillamiento letal”, el mayor problema entre los cultivos de palma aceitera en América (Moretzsohn *et al.*, 2002). Además, gracias a esta búsqueda de nuevas variedades resistentes a enfermedades y con producción de aceites de mayor calidad, se ha trabajado en cruces genéticos entre variedades de palma africanas y americanas. De ahí que una de las materias primas a emplear en la

presente investigación es un híbrido entre estas dos especies (Alvarado & Henry, 2015).

Del fruto de la palma, específicamente de la pulpa de este, se extrae el aceite crudo. Según FAO (2011), este es el aceite vegetal más consumido actualmente en el mundo, con una producción anual de 62.79 millones de toneladas métricas, y es empleado principalmente como aceite de cocina (UDSA, 2017). Así mismo, tiene una relación 1:1 entre ácidos grasos saturados e insaturados y contiene antioxidantes naturales, como los tocoferoles. Se han realizado múltiples estudios sobre los efectos del consumo de aceite de palma en la salud humana, principalmente relacionados con el perfil lipídico, la trombosis arterial y el cáncer. En estos se determinó que es fuente natural de vitamina E, de tocoferoles y tocotrienoles. Estos últimos actúan como protectores contra el envejecimiento de las células, la arteriosclerosis y el cáncer. Sin refinar, el aceite de palma es fuente muy rica de  $\beta$ -caroteno (OilWorld, 2006; FAO, 2006). Según Mustapa *et al.* (2011), normalmente el aceite de palma crudo contiene entre 500 y 700 ppm de carotenoides, que contribuyen a su estabilidad y valor nutricional.

Para la evaluación nutricional de un producto alimenticio determinado, así como para la comparación con otros alimentos, no solo hay que considerar la cantidad de nutrientes, sino también su biodisponibilidad. Biodisponibilidad se define como la fracción de un nutriente ingerido que llega a la circulación sistémica. Por su parte, la bioccesibilidad se describe como la fracción de un nutriente disponible para la absorción en los enterocitos (células epiteliales del intestino encargadas de absorción de diversos nutrientes) (Werner & Böhm, 2011; Miron & Cristea, 2012). Es decir, con el fin de que se encuentren accesibles para la absorción en el intestino, los nutrientes deben ser liberados de la matriz que los contiene. La biodisponibilidad de los nutrientes incluye, además, la absorción de los nutrientes, metabolismo, distribución tisular y bioactividad. Esto quiere decir que un prerrequisito para que los nutrientes estén biodisponibles es que primero sean bioaccesibles. Por lo tanto, una alta bioaccesibilidad puede ser un indicio de alta biodisponibilidad. La bioaccesibilidad es comúnmente determinada por métodos *in vitro* de simulación de la digestión humana (Moelants *et al.*, 2012).

Como lo describen Moelants *et al.* (2012) tanto la bioaccesibilidad como la biodisponibilidad de los carotenoides son afectadas por factores endógenos y exógenos, ambos combinados en el término “SLAMENGI”: especies de carotenoides, enlaces a nivel molecular, cantidad de carotenoides, matriz, efectores, estado de los nutrientes, genética, factores relacionados con el huésped y las interacciones entre estas variables. Otros factores que afectan la composición y contenido de los carotenoides en los alimentos son: condiciones climáticas, ubicación geográfica, estado de madurez de los frutos y las condiciones de cultivo (Maiani *et al.*, 2009).

Dado que los carotenoides son moléculas muy lipofílicas, su incorporación en micelas es una condición previa para la absorción en el tracto intestinal durante la digestión. La presencia de grasa durante la ingesta de alimentos puede incrementar la dispersión de los carotenoides en una mezcla micelar, por lo tanto, la adición de aceite a una suspensión alimentaria de origen vegetal puede tener un efecto importante en la bioaccesibilidad de dichos carotenoides. Varios estudios han demostrado el efecto beneficioso del aceite en la bioaccesibilidad de los carotenoides (Moelants *et al.*, 2012).

Dado que, como se mencionó anteriormente, la bioaccesibilidad de los carotenoides se ve directamente relacionada con la cantidad de grasa presente en la matriz alimentaria disponible para formar micelas, sería interesante analizar el efecto de un exceso de ésta en la matriz. De ahí que en el presente estudio se plantea la determinación de la bioaccesibilidad de forma directa sobre el aceite de palma, y además sobre un aderezo elaborado a partir de dichos aceites. Esto es importante ya que, al utilizar métodos de digestión *in vitro* se puede hacer una buena aproximación de la bioaccesibilidad de los carotenoides (Rodríguez-Amaya, 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General:**

Determinar la calidad del aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera (*E. guineensis*, *E. oleífera*, un híbrido entre estas), el perfil de carotenoides y la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides del aceite crudo.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

1. Caracterizar fisicoquímicamente el aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera por determinación de parámetros generales para la evaluación de su calidad.
2. Determinar parámetros de color y el perfil y concentración de carotenoides del aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera para la evaluación de su potencial nutricional.
3. Comparar la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides presentes en el aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera, así como la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides de un aderezo elaborado con aceite del híbrido seleccionado (Amazon).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades de la planta de palma aceitera

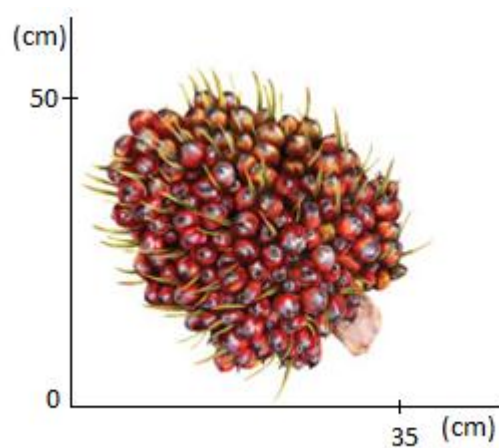
La palma aceitera, principalmente la especie *Elaeis guineensis*, es una planta ampliamente distribuida a través de América Latina, cuyas plantaciones se ubican, sobre todo, en las regiones tropicales, donde en 1997 abarcaban 6,5 millones de hectáreas, a partir de las cuales se producían 17,5 millones de toneladas de aceite de palma (obtenido del mesocarpo externo y fibroso de los frutos) y 2,1 millones de toneladas de aceite de palmiste (producido a partir del “coquito” o endospermo). Para el 2008 ocupaban ya 9,3 millones de hectáreas plantadas. Por su parte en otras partes del mundo, por ejemplo en Asia, sobresalen Malasia e Indonesia, que se han constituido en los principales productores de aceite de palma, contando ambos con más de 2 millones de hectáreas de plantaciones (MAG, 2007; Hormaza *et al.*, 2010).

En África sólo se manejan datos aproximados del área que ocupan las plantaciones industriales, dado que *Elaeis guineensis* es una palma nativa de muchos países de África Occidental. Por su parte en América Latina, las cifras apuntan a que por ejemplo en Ecuador, la extensión plantada con esta palma es de 150.000 hectáreas (ha), mientras que en Colombia 130.000 ha, lo cual implica que dicha especie ha experimentado una ocupación creciente de su territorio, extendiéndose por numerosos países entre ellos Honduras (50.000 ha), Brasil (39.000 ha), Perú (33.000 ha), Venezuela (30.000 ha), Costa Rica (67 500 ha), Guatemala (15.000 ha), República Dominicana (9.000 ha), Nicaragua (4.000 ha), México (4.000 ha), así como Panamá, Surinam y Guyana (MAG, 2007; CANAPALMA, 2014).

La planta de palma aceitera pertenece a la familia Arecaceae, es una de las más grandes familias de monocotiledóneas, con más de 190 géneros y 2.364 especies distribuidas en áreas tropicales a nivel mundial. Dicha planta pertenece al género *Elaeis*. Este género se compone de las siguientes especies: *Elaeis guineensis* Jacq. (palma africana), *Elaeis oleifera* (palma americana) (Dransfield *et al.*, 2008) y dos especies menos conocidas, como son: *Elaeis odora* Wess (Sur América) y *Elaeis madascariensis* (África) (Soh *et al.*, 2003). De estas, sólo las dos primeras se cultivan con fines comerciales, destacando *E. guineensis* como la especie más utilizada en el

mundo y, a raíz de esto, es la más estudiada (Corley & Tinker, 2009). La especie *E. oleifera* y el híbrido interespecífico (*EoxEg*) han venido cobrando relevancia a causa de que tienen algunas propiedades deseables, como son: el hecho de que el aceite obtenido es de mayor calidad puesto que contiene más ácidos grasos insaturados, el desarrollo de la altura de la planta es más lento y según algunas investigaciones las plantas son menos susceptibles ante ciertas enfermedades cuando se compara contra *Eg* (Govaerts & Dransfield, 2005).

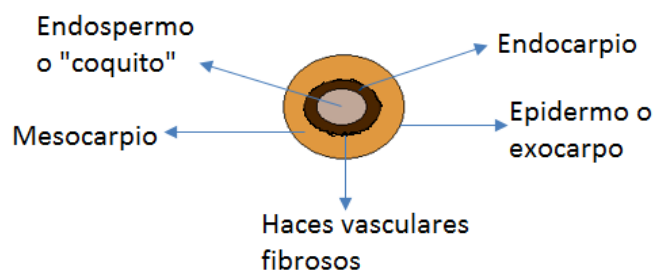
En cuanto a la fenología de la planta de palma aceitera, se puede decir que ésta se caracteriza por presentar un tallo único de tipo pleonántico, lo cual quiere decir que las inflorescencias aparecen entre las uniones de las hojas y los tallos (axilas) (Adam *et al.*, 2005; Dransfield & Uhl, 1998). La primera floración aparece entre las hojas 17 y 20 y el desarrollo del racimo hasta la etapa de madurez de los frutos puede tardar de 4,5 a 6 meses. El racimo maduro llega a medir más de 50 cm de largo y 35 cm de ancho (Corley *et al.*, 1971, Corley & Tinker, 2009). Los frutos insertados en las espiguillas rodean el raquis en forma helicoidal, conformando los racimos, con un peso variable entre 5 y 40 kg. Un racimo presenta un peso promedio de 25 kg, la cantidad media de frutos por racimo varía desde 1 000 a 3 000 (León, 1987). En la figura 1 se puede observar cómo luce un racimo de frutos de palma aceitera, en este caso *Eg*, cuando ha alcanzado el grado óptimo de madurez.



**Figura 1.** Racimo del fruto de la palma aceitera (*Eg*). **Fuente.** Despradel (2013).

El fruto, por su parte, es una drupa sésil con forma ya sea esférica, ovoide o elongada y algo abultada en el ápice; el largo varía de alrededor de 2 a 5 cm y el peso de 3 a 30 g o más (Corley & Tinker, 2003). Una forma de caracterizar morfológicamente los frutos de algunas poblaciones y variedades, se basa en la coloración externa de los frutos durante el proceso de maduración. La coloración más común es violeta oscuro en el ápice y verde-amarillento en la base antes de la maduración y se denominan *nigrescens*. Otra coloración, aunque menos común es aquella en que los frutos tienen tonalidades verdes antes de la maduración y se les denomina *virescens* (Corley & Tinker, 2009).

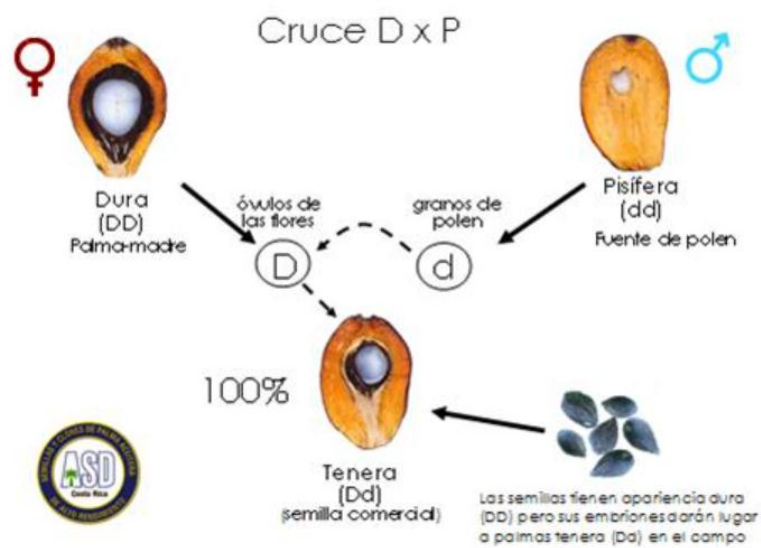
Dicha drupa (ver figura 2) está conformada desde el exterior al interior por: el epidermo o exocarpo, el cual es liso, duro y brillante. La pulpa, en la que se encuentra la mayor parte del aceite, proviene del mesocarpo; la coloración de la misma va desde amarillo hasta anaranjado; éste material es fibroso y vascularizado. El endocarpo o cuesco, esclerificado, consta de una superficie protectora sumamente dura, de color negro, envuelto por fibras adherentes; la consistencia y grosor del endocarpo es una característica intrínseca de cada variedad. El endospermo o coquito (de donde se extrae el aceite de palmiste), tiene forma ovular y se encuentra rellenando la cavidad del endocarpo. El embrión es lineal, de 4 a 5 mm de longitud, y está alojado en una pequeña cavidad del albumen (Hormaza *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Corte transversal del fruto de palma aceitera exponiendo sus partes. Modificado a partir de: Hormaza *et al* (2010).

Entre las clasificaciones que se pueden hacer de los frutos, cabe destacar la que se relaciona con el grosor del endocarpo o cuesco. Dichas diferencias de grosor están controladas por un solo gen (Homaza *et al.*, 2010). De acuerdo con las características

del fruto, las especies se pueden clasificar como Dura, Pisífera o Tenera. En el caso de la especie *Eg*, se presentan los tres tipos de frutos antes mencionados, pues se tienen palmas con frutos Dura, los cuales presentan un cuesco grueso; palmas Pisífera, cuyos frutos no presentan cuesco y el producto del cruzamiento de las palmas Dura X Pisíferas o Tenera, en la que los frutos tienen un cuesco intermedio entre Dura y Pisífera, ya que presenta un cuesco delgado. Lo anterior se ilustra para una mejor comprensión en la figura 3 (Corley & Tinker, 2003).



**Figura 3.** Esquema del cruzamiento de frutos con el cuesco tipo Dura x Pisífera para la producción de semillas comerciales. Fuente. **ASD (2010).**

Desde el punto de vista comercial, la recolección consiste en trasladar los racimos y frutos sueltos desde el campo al sitio de acopio el mismo día en que se ha realizado el corte. Así debe ser porque demoras adicionales inducirían el incremento del contenido de los ácidos grasos libres (AGL). En efecto, cada golpe que recibe un racimo o un fruto, producto de su manipulación, e incluso el contacto con impurezas, hace que la velocidad de formación de AGL se incremente. Esto deteriora la calidad del aceite antes de iniciar el proceso de extracción. Por consiguiente, la recolección debe ser manual, de manera que se evite el maltrato de racimos y frutos, y se minimicen las magulladuras y el contacto con las impurezas (Franco, 2010).

El cultivo de la palma de aceite a través del continente americano está ligado a la historia de la empresa United Fruit Company, la cual se encargó de introducir y



distribuir esta especie en toda América tropical a principios del siglo XX. A raíz de esto nace el programa de mejoramiento genético en palma aceitera de ASD en Costa Rica, el cual tiene ahora más de 40 años de existencia. Durante este período se ha formado y enriquecido un diverso banco de germoplasma de *Eg* y *Eo* (ASD, 2010). En Costa Rica el cultivo de palma aceitera ha aumentado de 57.000 hás en el 2010 a 67.500 hás en el 2013. Actualmente hay plantaciones de palma en 17 cantones del país, entre ellos Parrita, Aguirre, Osa, Corredores y Golfito, a lo largo del litoral Pacífico, desde Esterillos (en Parrita) y hasta la frontera con Panamá (en Golfito) (MAG, 2007; CANAPALMA, 2014).

### 3.1.1 *Elaeis guineensis* (Palma africana)

La especie *Eg* procede del oeste de África. El nombre del género procede de una palabra griega que significa aceite, de la que derivó el latín “oleum”, que posteriormente dio lugar en castellano a la palabra óleo. Para tener una idea de su importancia cabe mencionar que dicho aceite supone aproximadamente el 12% de toda la producción de grasa del mundo y, además, la cosecha anual va en aumento (Chinchilla, 2003; Cañizo, 2011). En la figura 4 se ilustra la forma que presenta una planta adulta de *Eg*.

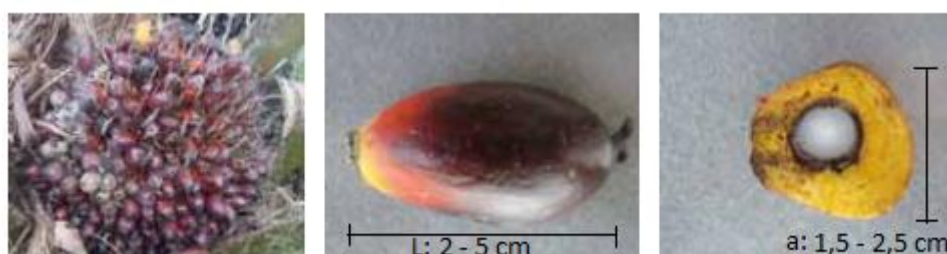


**Figura 4.** Planta de palma africana: *Elaeis guineensis*. **Fuente.** Hormaza *et al.* (2010).

Los frutos de la especie *E. guineensis* son de color vino tinto o rojo intenso cuando entran a la madurez, su forma es más abultada en el ápice del fruto, con un peso que varía entre 3 y 30 g o más. De estos se extraen dos tipos de aceite: uno de su pulpa carnosa y anaranjada, que se emplea en la fabricación de margarinas,

dentríficos, cosméticos, combustibles, lubricantes, velas y grasas diversas; y otro de sus semillas, llamado aceite de palmiste y utilizado en la industria del jabón (Hormaza *et al.*, 2010).

De la especie *Eg* se deriva la población genéticamente avanzada conocida como *dura Deli*, la cual proviene de estaciones experimentales de Asia y África, población que ha venido a diversificar en Costa Rica la colección de *Eg*. Ésta presenta muy buenas cualidades agronómicas, se ha empleado como base para crear variedades con alta productividad y presenta un excelente desempeño en condiciones adecuadas de clima, suelos y manejo agronómico. Sus plantas se caracterizan por la producción de racimos grandes, con alto porcentaje de mesocarpio en sus frutos y ricos en aceite (ver figura 5). Por su parte la empresa ASD dirige la investigación relacionada con el potencial de su mejoramiento genético para aumentar el porcentaje de aceite que producen los racimos. Esto se ha ido alcanzando a través de cuatro ciclos de selección de palmas madre. De hecho, el potencial de producción de aceite de la población de palmas madres dura Deli de ASD supera los estándares establecidos por el SIRIM (Standards and Industrial Research Institute of Malaysia) (Alvarado *et al.*, 2010; ASD, 2010).



**Figura 5.** Fruto de la especie *E.guineensis* L: largo, a: ancho. **Fuente.** Hormaza *et al.* (2010).

### 3.1.2 *Elaeis oleifera* (Palma americana)

Esta es una especie de palma aceitera que se encuentra naturalmente en el sur y centro de América, desde Honduras hasta Colombia y en la región del Amazonas. Esta especie es familia de la conocida *Eg*, pero el hábitat y forma de desarrollo presenta algunas diferencias entre ambas especies de tipo morfológicas. Entre las diferencias se encuentra el hecho de que con el paso del tiempo el tallo de *Eo* se

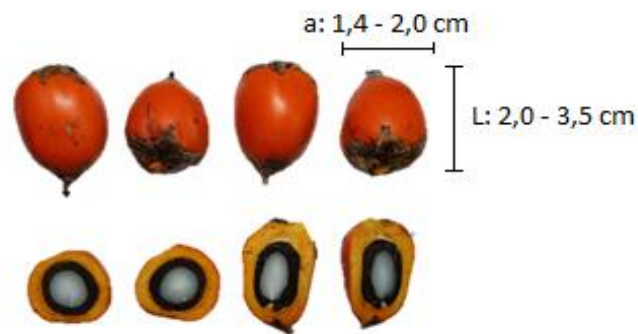
doblega postrándose sobre el suelo y generando problemas de espacio en la plantación, además de que sus plantaciones autóctonas suelen encontrarse en llanuras inundadas, bosques y pantanos, pueden crecer hasta los 20 a 30 m de alto y se han encontrado palmas con más de 200 años de edad (Smith, 2015; Latiff, 2000).

Esta especie americana es vista como un recurso genético promisorio para el mejoramiento del aceite de palma y se utiliza actualmente en programas de mejoramiento de híbridos de palma aceitera (*EoxEg*). Ha llamado la atención de los productores debido a varias razones agronómicas interesantes como menor altura de las plantas, tasa de crecimiento lento y resistencia a *Fusarium*, enfermedad que causa un amarillamiento y marchitez letal de la planta. Además de las características agronómicas, el aceite de *Eo* es más rico en ácidos grasos insaturados en comparación con *Eg*, y presenta un alto contenido de ácido linoleico y oleico, así como bajo contenido de ácido palmítico y alta concentración de carotenos (Zaki *et al.*, 2012).

Las plantas de la especie *Eo* poseen racimos con características inferiores a los estándares de la *Eg*, lo cual es inherente a la especie. Dichos racimos pesan usualmente entre 8 y 12 kg y ocasionalmente alcanzan los 30 kg. Los frutos son pequeños y numerosos, con cantidades que pueden superar inclusive los 5000 (Ooi *et al.*, 1981). Los rendimientos de extracción de aceite son muy inferiores a los de *Eg*; sin embargo, dichos rendimientos de producción fueron mejorados de 5,5 % en la población original producida en ASD Costa Rica (es decir antes de mejorar genéticamente las plantas) a 9,0 % de aceite en la población de *Eo* conocida como *Manaos* sembradas en el 2003. Cabe destacar que la productividad de los racimos de la variedad de *Eo* seleccionada (*Manaos*) es superior al estándar del SIRIM, y esta variedad posee tolerancia a algunos problemas agronómicos (en particular las pudriciones del cogollo) (Alvarado & Henry, 2015).

Los frutos maduros (ver figura 6) miden aproximadamente entre 2,0 cm - 3,5 cm por 1,4 cm - 2,0 cm, la coloración varía de amarilla a anaranjada o roja anaranjada. Las plantas de *Eo* son más pequeñas que las de *Eg*; sin embargo, crecen en el mismo hábitat que es apropiado para el cultivo de *Eg*. Sus frutos rara vez son recolectados (probablemente por la dificultad que supone sacar los racimos de entre las hojas,

situación particular de la especie *Eo*) y principalmente por su bajo contenido de aceite (Morales, 2006).



**Figura 6.** Frutos de palma aceitera de la especie *Elaeis oleifera* y su corte transversal.  
**Fuente.** Rabelo (2013).

### 3.1.3 *Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera* (Híbrido: Amazon)

La mejora de los cultivares “*oleifera*” originales y de las compactas (variedades con hojas y troncos cortos que permiten aumentar la productividad, ya que pueden ser plantadas más cercanas entre sí), fue la base para el desarrollo del híbrido *EoxEg*, denominado Amazon. Este consiste en el cruce de *Eo* de la variedad “Manaos” con pisíferas compactas. Dicho híbrido ha superado varias de las limitaciones que presentaban las especies de las que procede, ya que su desarrollo vegetativo es similar a las variedades *Eg* en términos de largo de la hoja, grosor del pecíolo, y su tolerancia a plagas es mayor que la de otros híbridos. Una característica particular del híbrido Amazon es la mayor proporción de genes de *Eo* presentes en su material genético (más del 50%), comparado con otros híbridos *EoxEg* tradicionales, los cuales poseen máximo 50% de genes “*oleifera*” (ASD, 2010); esto ha permitido mejorar la calidad del aceite (más contenido de ácidos grasos insaturados) (Alvarado *et al.*, 2010).

Los frutos de los híbridos interespecíficos son alargados en los extremos si las raquillas están en la parte superior o central del racimo (ver figura 7), o con forma “regordeta” si ellas se encuentran ubicadas en la parte inferior (Hormaza *et al.*, 2010). Además, esta variedad también tiene un elevado rendimiento de fruta y buena producción de aceite (Alvarado *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Frutos del híbrido *EoxEg* y su corte transversal. **Fuente.** Hormaza *et al.* (2010).

### 3.2 Generalidades del aceite de palma

La producción de aceite de palma se ha duplicado en la última década, y actualmente domina el mercado mundial de aceite vegetal (FAO, 2011). Dicho aceite se obtiene principalmente del prensado de la pulpa (mesocarpio) de la especie *Eg* (Saxon & Roquemore, 2011). Actualmente Malasia es el segundo mayor productor y exportador de aceite de palma después de Indonesia (FAO, 2013).

El aceite de palma es conocido por ser altamente saturado, se mantiene en estado sólido en vez de líquido a temperatura ambiente. Esto lo vuelve un producto atractivo en las industrias alimentaria y cosmética, así como para la elaboración de productos de limpieza. Al ser el aceite comestible más barato del mundo, se convierte en el principal aceite utilizado para cocinar en países en vías de desarrollo de Asia, África y en el Oriente Medio. En el 2009/2010, países asiáticos, como India, China, Pakistán y Bangladesh, importaron 35% del suministro mundial. La demanda en dichos países es amplia y creciente (Saxon & Roquemore, 2011).

La composición del aceite de palma comercial, guarda una relación de ácidos grasos saturados e insaturados similar entre sí. Como se observa en el cuadro I, los ácidos grasos principales son: ácido palmítico (44-45%) y ácido oleico (39-40%), seguidos por el ácido linoleico (10-11%) y sólo cantidades traza de ácido linolénico. El bajo nivel de ácido linoleico, y de ácido linolénico hacen este aceite relativamente estable ante el deterioro oxidativo (Gunstone, 2002).

**Cuadro I.** Composición porcentual típica de los ácidos grasos presentes en el aceite de palma derivado de *Eg*

<b>Nombre, número de átomos de carbono del ácido graso e insaturaciones</b>	<b>Media (%)</b>
Laúrico C12:0	0,3
Mirístico C14:0	1,1
Palmítico C16:0	43,5
Palmitoleico C16:1	0,2
Esteárico C18:0	4,3
Oleico C18:1	39,8
Linoleico C18:2	10,2
Linolénico C18:3	0,3
Araquídico C20:0	0,2

**Fuente:** Sambanthamurthi *et al.* (2000).

Por su parte el aceite de palma de *Eo* parece ser más insaturado con un promedio de 43,2% de ácido oleico y 11,5% de linoleico. Híbridos de *EoxEg* producen aceites con características intermedias entre las especies de las que provienen (Gunstone, 2002).

El aceite de palma crudo es rico en componentes menores, tales como carotenoides, tocoferoles, tocotrienoles, esteroides, fosfolípidos, triterpeno alcoholes, escualeno, alcoholes alifáticos e hidrocarburos alifáticos (Goh *et al.*, 1985). Los componentes de mayor interés son los carotenos, tocoferoles, tocotrienoles, esteroides y escualeno. Los carotenos y tocoferoles al ser antioxidantes protegen al aceite de la oxidación. Durante el refinamiento, blanqueamiento y desodorización con vapor se remueve algunos de estos valiosos componentes. La cantidad retenida en el aceite refinado depende de las condiciones del refinamiento (Gunstone, 2002).

El color rojo-naranja oscuro del aceite de palma se debe a su concentración de carotenoides y antocianinas. El aceite de palma crudo, extraído comercialmente por presión y esterilización, contiene entre 400-1000 ppm de carotenoides, las variaciones en dichas concentraciones se deben a las condiciones de procesamiento, a las diferentes especies, así como al nivel de oxidación que sufran los aceites. Dichos carotenoides son  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, fitoeno, fitoflueno, *cis*- $\beta$ -caroteno, *cis*- $\alpha$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno,  $\beta$ -zeacaroteno,  $\alpha$ -zeacaroteno y licopeno. Los componentes mayoritarios son  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno.

El aceite de palma crudo obtenido de la especie *Eg* tiene un contenido de caroteno de 500-700 ppm, mientras que *Eo* puede llegar a presentar hasta alrededor 4600 ppm. El contenido de carotenos en los aceites de palmas híbridas derivadas de estas dos especies se ubica en valores intermedios a los anteriores. Aceites refinados físicamente no muestran trazas de carotenoides. Estos compuestos son también absorbidos durante el blanqueamiento o destruidos durante el tratamiento térmico (Yap *et al.*, 1991; Jalani *et al.*, 1997; Choo, 1995).

### **3.3 Procesamiento y refinado del aceite de palma**

El mesocarpio de los frutos de palma aceitera contiene alrededor de 56% - 70% de aceite comestible cuando es cosechado totalmente maduro. Dicho aceite puede ser extraído usando diferentes métodos. Estos métodos se encuentran agrupados en cuatro diferentes categorías basadas en su rendimiento y grado de complejidad. Están los métodos tradicionales, el uso de unidades mecánicas de pequeña escala, de molinos de mediana escala, y de molinos de gran escala. Las operaciones unitarias básicas asociadas con el procesamiento de palma aceitera incluyen: esterilización de los frutos, desprendimiento/desgrane, extracción y clarificación del aceite. La esterilización de los frutos denota prestación de calor y absorción de humedad. El objetivo de esta esterilización es inactivar las enzimas lipolíticas del mesocarpio de los frutos (Poku, 2002; Mba *et al.*, 2015).

Los dos principales procedimientos de extracción son: presión mecánica y extracción con solventes. Entre los compuestos deseables presentes en el aceite de palma se encuentran los TAGs y compuestos beneficiosos para la salud como vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), carotenoides y fitoesteroles. Estos sirven como nutrientes, antioxidantes y compuestos beneficiosos para la salud. Los AGL's, fosfolípidos o gomas, y productos de la oxidación lipídica son los mayores componentes. Las impurezas son eliminadas durante el proceso de refinamiento del aceite (Čmolík & Pokorný, 2000; Dunford, 2012; Sambanthamurthi *et al.*, 2000).

### **3.4 Parámetros de calidad de aceites y grasas**

#### **3.4.1 Índice de saponificación (IS)**

El término “saponificación” significa la hidrólisis de un éster para formar un alcohol y el ácido o la sal del ácido correspondiente. Aplicado a las grasas, denota la reacción entre una base fuerte y un aceite o una grasa, que da como resultado la formación de un jabón (sal alcalina de los ácidos grasos) y glicerina (Herrera et al., 2008).

El IS mide el contenido global de triglicéridos en el aceite con respecto a los grupos alcalinos reactivos y, por ende, permite conocer el peso molecular de un aceite (Ho & Chow, 2000).

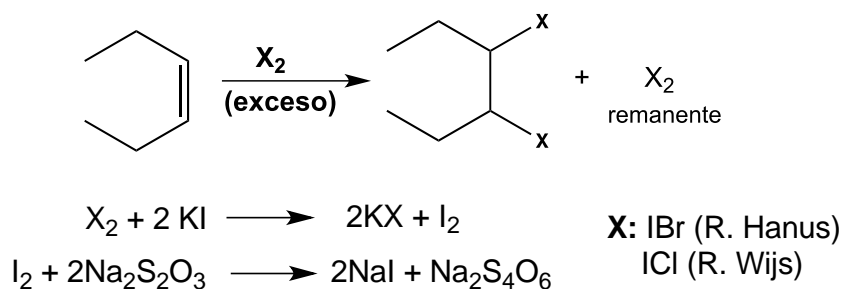
#### **3.4.2 Índice de yodo (IY)**

La determinación de este índice en aceites y grasas cuyos ácidos grasos contienen enlaces dobles se basa en el principio de absorción del compuesto halogenado bajo ciertas condiciones, que desencadenan en resultados estequiométricos. El compuesto que se emplea normalmente para halogenar es el yodo. Los resultados se reportan en términos de cg de yodo/g aceite o grasa (Herrera et al., 2008).

El procedimiento consiste en la adición de un exceso de halógeno a una muestra lipídica exactamente pesada y disuelta en un disolvente orgánico (cloroformo o tetracloruro de carbono), posteriormente se presenta una reacción de reducción del exceso de halógeno, con yoduro de potasio y, finalmente se lleva a cabo la valoración con una disolución patrón de tiosulfato de sodio, utilizando una disolución de almidón como indicador. Muchos procesos se han propuesto para la determinación del IY, los más conocidos son los métodos de Wijs y de Hanus, siendo el de Hanus el más utilizado en el campo industrial y de laboratorio (Herrera et al., 2008).



Las reacciones involucradas en dicho procedimiento se muestran en la figura 8.



**Figura 8.** Reacciones involucradas en la determinación del IY de un triacilglicerol por el método de Hanus. **Fuente.** Herrera *et al.* (2008).

A partir de los ácidos grasos presentes en un aceite o grasa, es posible estimar la susceptibilidad de estos compuestos a sufrir reacciones de oxidación lipídica. Con respecto a los ácidos grasos, se ha encontrado que un aumento en el número de hidrógenos alílicos o doblemente alílicos acorta el período de inducción y, por lo tanto, más rápidamente transcurrirá la oxidación (Belitz & Grosch, 1997).

El número de dobles enlaces es un indicador del posible deterioro que pueden llegar a presentar los aceites y grasas, ya que entre mayor sea el número de dobles enlaces presentes en las muestras, más propensas serán a sufrir procesos de oxidación (Castro, 2004).

Es importante conocer la actividad autoxidativa de los diferentes triacilglicerolos presentes en los alimentos debido a que producen en el organismo humano radicales libres, peróxidos, hidroperóxidos, malonaldehído, etc., que aceleran el proceso de envejecimiento, el deterioro de diversos órganos y aumentan la posibilidad de desarrollo de tejidos cancerosos (Belitz & Grosch, 1997; Watkins *et al.*, 1996).

### 3.4.3 Índice de refracción (IR)

Por su parte, IR se basa en una propiedad física que relaciona el peso molecular del compuesto lipídico, el grado de insaturación de sus ácidos grasos, el grado de conjugación de sus componentes y el largo de sus cadenas. Este índice además, varía

con la temperatura. Pequeñas variaciones pueden ser indicativas de la identidad, calidad y pureza del aceite (Soto, 2011; Gunstone, 2002).

Este índice puede ser definido como la relación de la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en el medio en cuestión. El índice de refracción puede ser obtenido en algún tipo de refractómetro, por ejemplo, el de Abbé. La lectura se realiza normalmente a 40 °C, o, en su defecto, se hace una corrección de la temperatura a que se efectúa la medición, multiplicando la constante 0,000365 por cada grado Celsius de cambio de la temperatura normal de la lectura (Herrera *et al.*, 2008).

#### **3.4.4 Índice de acidez (ácidos grasos libres) (AGL)**

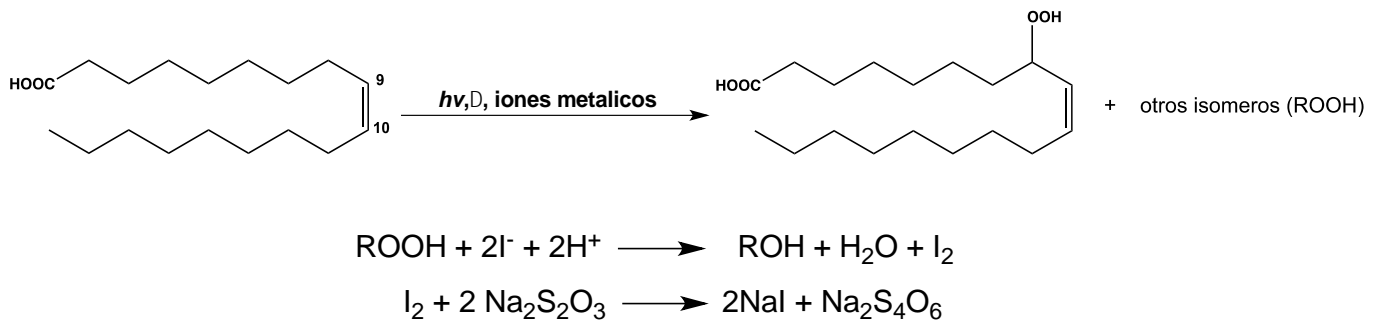
El índice de acidez de un producto lipídico, se define como los miligramos de hidróxido de sodio o potasio empleados para neutralizar la acidez libre por gramo de muestra. Normalmente, el resultado se expresa como el porcentaje de ácido oleico presente en la muestra (Nielsen, 2010; Herrera *et al.*, 2008).

El índice de acidez determina el grado de descomposición del aceite o de la grasa, principalmente por causa de las lipasas. El grado de descomposición se acelera por factores como la luz y el calor. Usualmente, la degradación causada por los AGL se acompaña de olor a rancio por lo que la determinación es usada, con frecuencia, como una indicación general de la condición y la comestibilidad de los aceites y las grasas (Herrera *et al.*, 2008 & Kirk *et al.*, 2009).

#### **3.4.5 Índice de peróxidos (IP)**

Los hidroperóxidos son los productos iniciales de la oxidación (rancidez) de aceites y grasas; sin embargo, se les suele denominar como peróxidos. Con frecuencia la determinación de peróxidos se realiza por volumetría, gracias a la capacidad que tiene el yoduro de potasio de liberar yodo cuando se encuentra disuelto en ácido acético glacial. El yodo formado se titula con una disolución patrón de tiosulfato de sodio, con almidón como indicador (Herrera *et al.*, 2008; Kirk *et al.*, 2009).

El IP se expresa en mmol de yodo/kg de aceite o grasa, los cuales son equivalentes a los hidroperóxidos presentes en el triacilglicerol. Las reacciones involucradas en la determinación del índice de peróxidos se muestran en la figura 9 (Herrera *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Reacciones involucradas en la determinación del índice de peróxido de un aceite o una grasa. **Fuente.** Herrera *et al.* (2008).

### 3.4.6 Gravedad específica (GE)

La GE se puede determinar mediante el uso de un picnómetro, el cual consiste de un recipiente calibrado, con el que se puede pesar el volumen de un líquido con mucha precisión. Es considerablemente más importante que otras propiedades físicas, ya que el valor numérico de una sustancia pura a una temperatura particular es constante. La gravedad específica, indica la densidad del líquido, en este caso del aceite en cuestión comparada con la densidad de un volumen igual de agua a una temperatura de referencia. Dicho parámetro es muy utilizado en la industria para la determinación de adulteraciones puesto que se cuenta con valores tabulados para cada tipo de aceite. Este valor está relacionado con el grado de saturación, con la razón cis/trans de los dobles enlaces y puede estar influenciado por el daño que sufre el aceite tras la oxidación (Macias, 1996). En la ecuación 1 se muestra el cálculo para la determinación de la gravedad específica de aceites.

$$(1) \text{ Gravedad específica} = \frac{\text{Densidad del aceite a } 40\text{ }^\circ\text{C}}{\text{Densidad del agua a } 40\text{ }^\circ\text{C}}$$

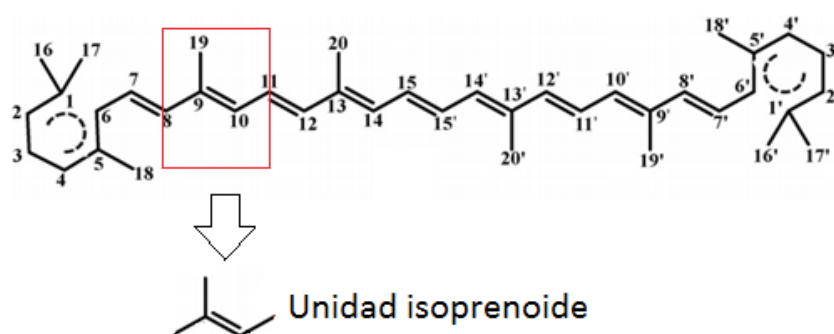
## 3.5 Carotenoides

### 3.5.1 Definición, clasificación y estructura

Los carotenoides son pigmentos naturales liposolubles, que son sintetizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas ampliamente distribuidos en frutas y vegetales. Son los responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de muchos

alimentos. Si bien los animales no son capaces de biosintetizar estos pigmentos, sí los pueden acumular o transformar una vez que han sido ingeridos, de ahí que se les relaciona con importantes funciones y acciones fisiológicas, donde la actividad pro vitamina A es la más conocida. Adicionalmente, se ha establecido una relación entre el consumo de frutos y vegetales que contienen carotenoides y la prevención de enfermedades crónicas-degenerativas, como el cáncer, inflamación, enfermedades cardiovasculares, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, entre otras (Namitha & Negi, 2010; De Rosso & Mercadante, 2007; Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Los carotenoides son pigmentos con una cadena de 40 átomos de carbono (C40), biosintetizados por la unión de dos moléculas geranil-geranil-pirofosfato C20. Los carotenoides consisten de ocho unidades isoprenoideas unidos de manera tal que la organización de dichas unidades isoprenoideas se invierte, ya que se cuenta con enlaces cabeza-cola en la parte externa y enlaces cola-cola en la parte interna (figura 10). Los carotenoides en plantas pueden ser encontrados en forma libre o esterificada con ácidos grasos (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2003; Britton & Khachik, 2009).



**Figura 10.** Unión de ocho unidades isoprenoideas para dar lugar al  $\beta$ -caroteno. **Fuente.** Kumar *et al.* (2015).

Los carotenoides pueden ser clasificados en dos grupos sobre la base de sus grupos funcionales; xantófilos que contienen oxígeno como grupo funcional, y que incluyen luteína y zeaxantina, y carotenos, con una cadena formada por hidrocarburos sin ningún grupo funcional, tales como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno. Además, los grupos polares (epoxi, hidroxil y ceto) alteran la polaridad de los carotenoides y

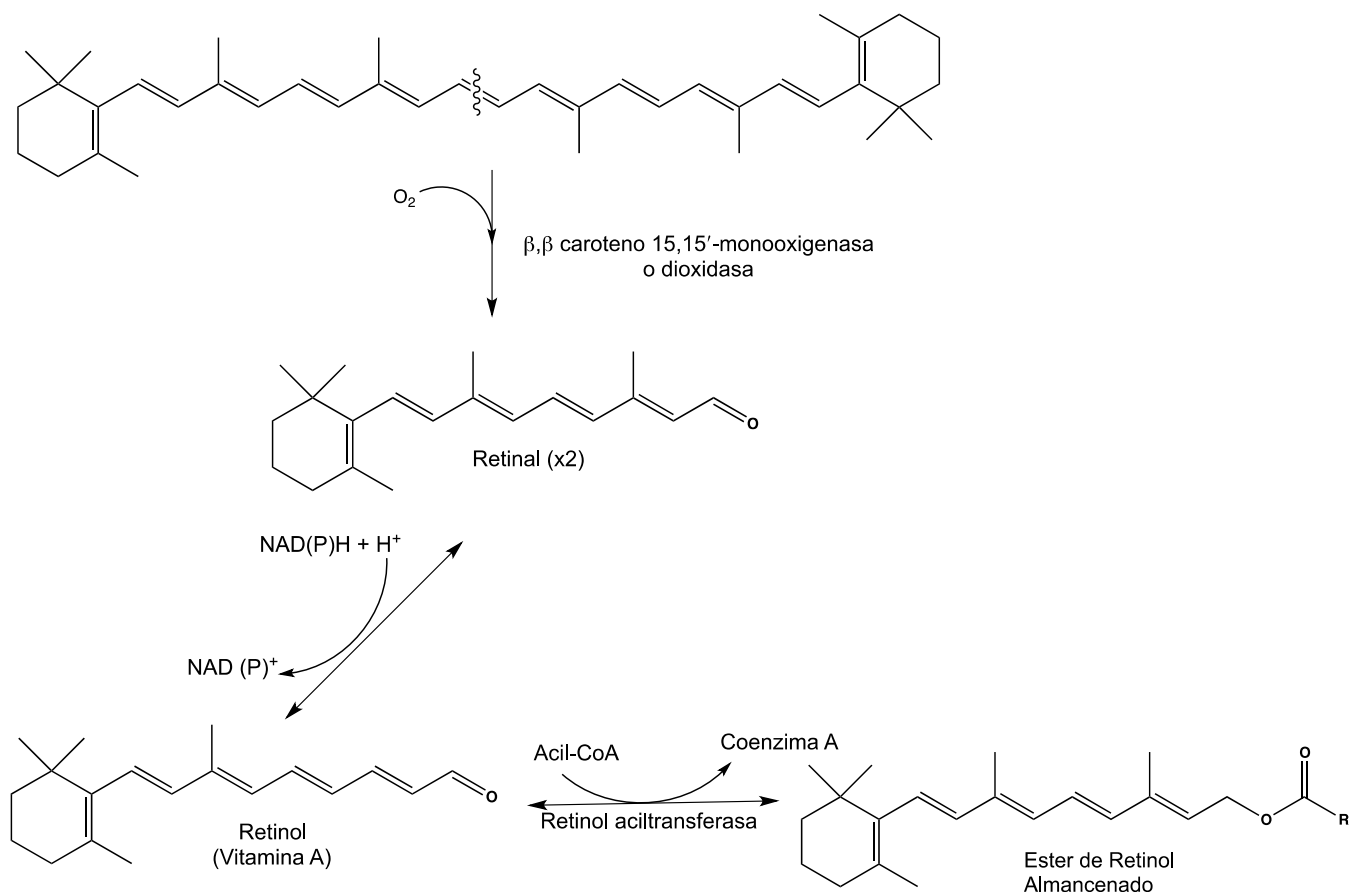
afectan las funciones biológicas. Los carotenoides, como el  $\beta$ -caroteno y los demás con una  $\beta$ -ionona en su anillo terminal, actúan como precursores de vitamina A. La actividad pro vitamina A de los principales carotenoides se muestra en el cuadro II. El porcentaje de pro vitamina A de los carotenoides se relaciona con la cantidad de anillos de  $\beta$ -ionona que el carotenoide presente en su estructura, lo cuales pueden ser transformados por acción de la caroteno dioxigenasa en vitamina A (retinol y retinal). Debido a que el  $\beta$ -caroteno presenta dos anillos de  $\beta$ -ionona en su estructura se dice que su actividad pro vitamina A es del 100%, mientras que el licopeno al no tener anillos de  $\beta$ -ionona en su estructura carece de actividad pro vitamina A (Kumar *et al.*, 2015).

**Cuadro II.** Actividad provitamina A relativa de carotenoides presentes en algunos alimentos

<b>Carotenoide</b>	<b>Actividad Pro vitamina A (%)</b>
E- $\beta$ -caroteno	100
E- $\beta$ -criptoxantina	57
13-Z- $\beta$ -caroteno	53
E- $\alpha$ -caroteno	53
E-mutatocromo	50
15-E- $\beta$ -criptoxantina	42
9-E- $\beta$ -caroteno	38
9-Z- $\beta$ -criptoxantina	27
$\beta$ -caroteno-5,6-epóxido	21
13-Z- $\alpha$ -caroteno	16
9-cis- $\alpha$ -caroteno	13

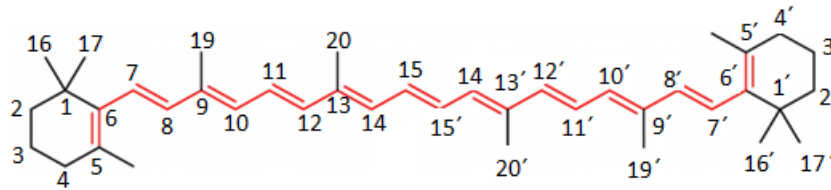
**Fuente:** Kumar *et al.* (2015).

Estos carotenoides son atacados por la enzima dioxigenasa en el enlace central 15-15<sup>1</sup> para obtener retinal (ver figura 11). En el caso del  $\beta$ -caroteno, se pueden obtener dos moléculas de retinal (Britton, 2008; Woollard, 2012).



**Figura 11.** Conversión del β-caroteno a retinal, retinol y ésteres de retinol. **Fuente.** Chacón (2014).

En la naturaleza, la mayoría de los carotenoides se encuentran en la forma de su isómero trans, el cual es más estable en comparación con el isómero cis. Las funciones y propiedades naturales de los carotenoides están determinadas por la estructura molecular. En el centro de la estructura se ubican varios enlaces dobles que constituyen el cromóforo, que es el grupo que le da la capacidad de absorber luz y determina su estructura molecular y su actividad química. La estructura molecular del cromóforo del β-caroteno se muestra en la figura 12; el doble enlace del carbono 11 forma el cromóforo de la molécula, que absorbe en el rango de luz visible del espectro electromagnético (400–500 nm) (Ötles & Cagind, 2008; Namitha & Negi, 2010; Britton, 2008).



**Figura 12.** Estructura molecular del  $\beta$ -caroteno, el cromóforo se encuentra resaltado con color rojo. **Fuente.** Kumar *et al.* (2015).

El aceite de palma crudo, es consumido en algunos países como fuente de vitamina A. El contenido de carotenos en este es tomado como un indicativo de la calidad del aceite. Sin embargo, los estándares de calidad de un aceite no se determinan únicamente por su alto contenido de carotenos, sino también por características como una baja oxidación secundaria, en la cual el aceite de palma bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ha mostrado tener una alta resistencia a la oxidación y por consiguiente una vida útil larga. El aceite de palma crudo es una fuente pro vitamina A, y su color rojo-naranja puede ser útil como colorante natural en la industria alimentaria, en la elaboración de margarinas, galletas y confitería. Además del rol que cumple este aceite como fuente de vitamina, los carotenoides son considerados por sus propiedades anticancerígenas (Imoisi *et al.*, 2015; Gunstone, 2002).

### 3.5.2 Carotenoides en frutas y vegetales

Muchas veces el tipo y disponibilidad de carotenoides en frutas y vegetales puede ser anticipada por su color. Amarillo y naranja son colores que generalmente se encuentran en frutas y vegetales ricos en  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -criptoxantina y zeaxantina pueden ser encontrados en frutos naranjas, tales como mandarinas, naranjas y papaya. Similarmente, licopeno (pigmento responsable del color rojo brillante) es el mayor constituyente de tomates y sandía. Por su parte, luteína (cerca de 45%) y  $\beta$ -caroteno (25–30%) seguido por violaxantina (10–15%), y neoxantina (10–15%) son las formas de carotenoides predominantes en los cloroplastos de los vegetales de hojas verdes. En la mayoría de frutas y vegetales,  $\beta$ -caroteno es generalmente dominante en comparación con su isómero  $\alpha$ -caroteno. Un contenido significativamente alto de  $\alpha$ -caroteno puede ser encontrado en un número limitado de frutas y vegetales, tales

como papas, zanahorias, calabazas, y vegetales de hojas verde oscuro, como judías verdes, espinacas y brócoli (Lakshminarayana *et al.*, 2005; Priyadarshani & Jansz, 2014; Khoo *et al.*, 2011).

El conocimiento de la composición de carotenoides en diferentes partes comestibles y cultivos puede ser muy útil a los expertos en nutrición para la selección de plantas ricas en nutrientes que puedan emplearse en la fortificación de alimentos y en la recomendación de dietas adecuadas. Frutas tradicionales y no tradicionales son consideradas ricas en carotenoides y otros compuestos bioactivos, que indican perspectivas prometedoras para la utilización de estas especies de frutas y sus derivados como materias primas de alto potencial (Saini *et al.*, 2015).

El aceite de palma es el objeto de estudio del presente trabajo de graduación. Dicho aceite ha sido estudiado recientemente, debido a que se distingue por ser una de las fuentes más ricas de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno (400 ppm y 3500 ppm, respectivamente). Si bien dicha cantidad de carotenoides se ve afectada por los procesos de refinamiento propios de este aceite, sin embargo, alrededor del 80% de los carotenoides originales pueden ser retenidos como fuente de pro vitamina A en el aceite procesado (Schroeder *et al.*, 2006 & Ooi, 1999; Imoisi *et al.*, 2015).

### **3.5.2 Bioaccesabilidad y biodisponibilidad de carotenoides**

Muchos compuestos bioactivos (por ejemplo, carotenoides) deben ser liberados de la matriz alimentaria de manera que alcancen su sitio de acción para ejercer su efecto a nivel biológico, es por esto que tanto la bioaccesabilidad como la biodisponibilidad son características importantes en la evaluación del rol de estos componentes en la salud humana. Bioaccesabilidad representa la cantidad máxima de carotenoides liberados del alimento que está disponible para la absorción en los enterocitos, mientras la fracción de la dosis que ingresa a la circulación sistémica para participar en funciones fisiológicas (o se almacena para su posterior utilización) se conoce como biodisponibilidad. (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013., Mandalari *et al.*, 2013., Ekesa *et al.*, 2012., Gleise *et al.*, 2013).

La biodisponibilidad requiere de estudios clínicos con humanos, los cuales por lo general son costosos económicamente, invasivos y demandan mucho tiempo. De ahí



que los modelos de digestión *in vitro* se hayan propuesto como alternativas para predecir la biodisponibilidad. Estos modelos pueden evaluar la bioaccesibilidad de los componentes, la cual corresponde a la capacidad de los procesos de digestión de liberar metabolitos de las matrices alimentarias. Los carotenoides atraviesan los procesos de digestión y al final de dichos procesos la fracción que se incorpora en micelas es recuperada. La miceralización de carotenoides es un pre-requisito par su posterior absorción en las células de los enterocitos. De ahí que se considera la bioaccesibilidad como parte de la biodisponibilidad (Fernández-García *et al.*, 2012; Rodríguez-Amaya, 2010; Goñi *et al.*, 2006; Parker, 1996).

Hoy en día no se ha llegado a un consenso sobre la mejor manera de estimar la biodisponibilidad de los carotenoides. Considerando que ningún modelo animal es idéntico a la absorción y metabolismo de los carotenoides en el cuerpo humano y, puesto que el estudio con humanos es una labor muy intensiva y cara, el estudio *in vitro* representa una herramienta accesible económicamente y además es rápida para la aproximación de los resultados con respecto a la biodisponibilidad. Por medio de procedimientos de digestión y simulación *in vitro* se puede obtener información acerca de algunos procesos de la industria alimentaria que en ocasiones modifican los diferentes pasos de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los carotenoides, como lo es la presencia o ausencia de grasa, reducción de tamaño de partículas, tratamientos térmicos, etc., (Alminger *et al.*, 2012., Fernández-García *et al.*, 2012).

La absorción de carotenoides incluye su liberación de la matriz alimentaria, su difusión en una emulsión lipídica, solubilización en las lipasas pancreáticas y en las sales biliares y la formación de micelas, movimiento a través de las microvellosidades, captación de los carotenoides por las células de la mucosa intestinal, incorporación dentro de los quilomicrones y entrada al sistema linfático y circulatorio (Donhowe & Kong, 2014).

La biodisponibilidad del  $\beta$ -caroteno procedente de fuentes vegetales es generalmente baja (10% - 65%), debido a la resistencia a la digestión y degradación para la adecuada liberación de los carotenoides que presenta el caroteno acompañado con proteínas, fibras y paredes celulares de las plantas. Así, las proteínas solubles han

mostrado inhibir la incorporación de  $\beta$ -caroteno dentro de la emulsión gástrica y de las sales biliares, indicando que las características de la interfase de la emulsión gástrica determinan el grado de absorción de los carotenoides en el intestino (Rein *et al.*, 2013).

La matriz alimentaria juega un rol muy importante en la biodisponibilidad, debido a que la liberación de los carotenoides de dicha matriz es un factor primario que limita su biodisponibilidad. Adicionalmente, un factor que a menudo no se toma en consideración es el fenómeno de transferencia de masa, el cual es crucial y limitante sobre la velocidad con que se lleva a cabo el proceso de digestión. El fenómeno de transferencia de masa consiste en el transporte de los carotenoides de la fase acuosa de las matrices alimentarias a la fase lipídica. De ahí la importancia de consumir dietas variadas que, además de frutas y vegetales, incluyan cierta proporción de lípidos (Lemmens *et al.*, 2014; Palafox-Carlos *et al.*, 2011).

La liberación de los carotenoides depende del nivel de digestión y degradación de la matriz alimentaria, la cual puede ser asistida por un proceso mecánico antes de la digestión. El procesamiento mecánico ayuda en la reducción del tamaño de partículas, dando como resultado una mayor área para entrar en contacto con las lipasas pancreáticas y las sales biliares para mejorar la digestión y liberación. La absorción de los carotenoides se produce cuando estos se mezclan con las micelas, por lo que factores que afectan la formación de micelas, también afectan la biodisponibilidad de los carotenoides. Dado que se requieren lípidos para su incorporación en micelas y también para estimular la liberación de la bilis para facilitar la formación de micelas, la adición de grasa en la dieta mejora la biodisponibilidad de los carotenoides (Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Lemmens *et al.*, 2014).

Las cantidades de lípidos que se encuentran de manera natural son bastante bajas en la mayoría de frutas y vegetales, por lo que la adición de lípidos extra durante el procesamiento y/o digestión puede jugar un rol importante en este contexto. La adición de aceite es más beneficiosa para carotenoides no polares (carotenos) en comparación con los polares (xantófilas). La adición de ácidos grasos de cadena larga, como ácido oleico (C18:1) es más beneficioso en comparación con grasas de cadenas

cortas. Algunos estudios inclusive han indicado la importancia de analizar la influencia del grado de insaturación de los ácidos grasos sobre la biodisponibilidad de los carotenoides. Sin embargo, dichos estudios no han sido concluyentes, por lo que se requiere realizar más estudios en esta línea (Victoria-Campos *et al.*, 2013; Colle *et al.*, 2013).

La fibra dietética y la pectina, que son componentes importantes de frutas y verduras, posiblemente también inhiben la formación de micelas y disminuyen la biodisponibilidad de los carotenoides. Si bien, algunos otros factores pueden modificar la biodisponibilidad de los carotenoides; por ejemplo, el procesamiento térmico, barreras estructurales del alimento (matriz, integridad de la pared celular y bioencapsulación), la adición de lípidos es el factor más determinante para aumentar la biodisponibilidad de carotenoides. Por lo tanto, se requieren estudios detallados que identifiquen los factores que mejoran la biodisponibilidad de los carotenoides de los diferentes alimentos, pues esto ayudará en el desarrollo de alimentos con carotenoides más biodisponibles (Schweiggert *et al.*, 2014).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización del proyecto

Las pruebas, extracción y análisis correspondientes se realizaron en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio en San Pedro de Montes de Oca.

El estudio se desarrolló con el apoyo financiero del proyecto: ***“Caracterización del perfil de carotenoides, su bioaccesibilidad y evaluación estructural de cromoplastos en frutos tropicales promisorios como fuente de carotenoides”*** el cual se encuentra inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica con el código: 735-B2-A16.

### 4.2 Materia prima

Para la realización de este trabajo final de graduación se emplearon frutos de palma aceitera de dos especies (*E. guineensis*: Deli Dami, *E. oleífera*: Manaos) así como un híbrido resultante del cruce entre ellas (*EoxEg* = Amazon). Estos fueron suministrados por la empresa ASD Costa Rica, ubicada en la región pacífico sur y donde la empresa tiene las plantaciones de palma aceitera, de las cuales fueron obtenidos los tres lotes de frutos analizados.

Cada lote consistió de aproximadamente 2,0 kg de frutos de los genotipos de palma aceitera seleccionadas (*Eg*, *Eo* y *EoxEg*) a los cuales se les extrajo el aceite del mesocarpo y se procedió con los respectivos análisis. Por cada uno de los tres genotipos se seleccionó una sola palma, de la cual se tomaron los tres lotes. Estos fueron analizados entre mayo y julio del 2015.

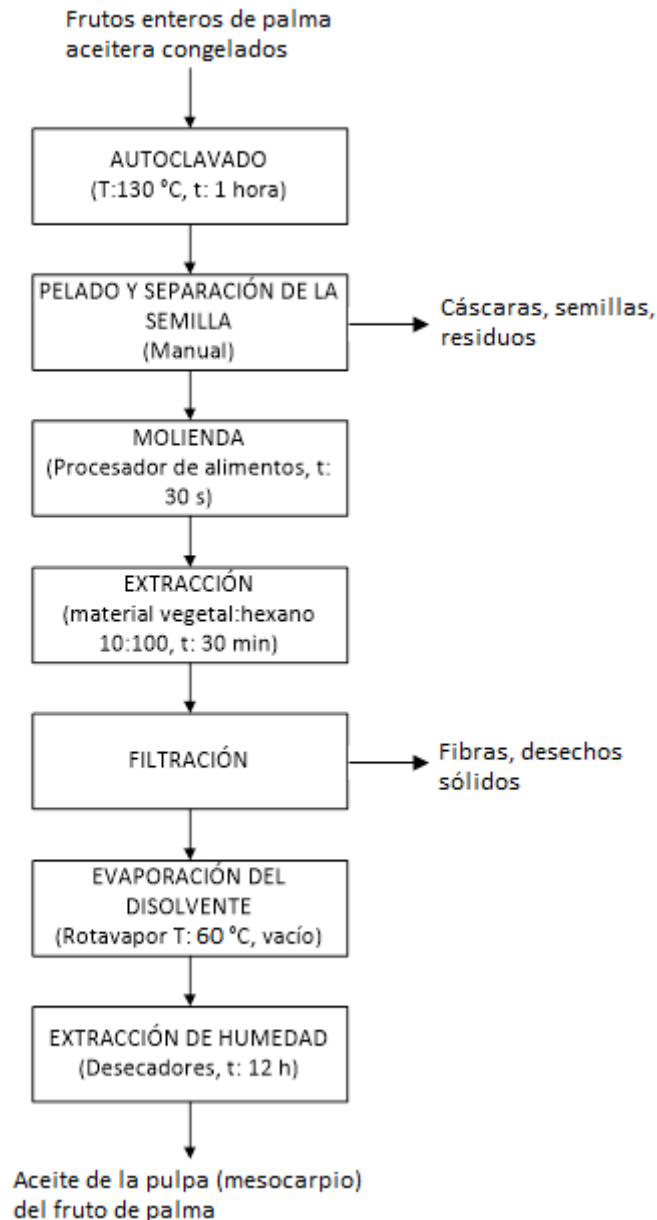
Los frutos fueron transportados hasta el Valle Central (San Pedro, San José), vía aérea (avioneta) o terrestre (encomiendas enviadas por transporte público) y se almacenaron en congelación a -65 °C hasta el momento de su utilización.

El primer lote se cosechó el 07 de mayo del 2015 y fue trasladado vía terrestre a San José el 08 de mayo del 2015. El segundo lote se cosechó el 10 de junio del 2015 y se trasladó vía aérea el 11 de junio del 2015. Finalmente el tercer lote se cosechó el 16 de julio del 2015 y se trasladó vía terrestre hacia San José ese mismo día.

#### **4.3 Pre-tratamiento de la materia prima**

Los frutos congelados fueron sometidos a un tratamiento térmico en una autoclave (marca: YAMATO, modelo: SQ510C) durante 60 min, a una temperatura de 130 °C y 121 kPa de presión. Para la obtención de los aceites se procedió a realizar un pelado manual de los frutos, así como la extracción de la semilla, seguido por la homogenización de la pulpa en un procesador de alimentos de alta velocidad (marca: Hobart, modelo FP41). El aceite fue extraído de la pulpa por medio de una extracción con disolventes orgánicos, en la cual se empleó hexano grado reactivo. Una vez concluido el tiempo de agitación de 30 minutos, las partículas sólidas, como fibras, se separaron por medio de filtración al vacío (papel filtro Whatman grado 1) y finalmente el disolvente se evaporó gracias al uso de un rotavapor (marca: Büchi, modelo R-124, calentador modelo: B-480, con sistema de refrigeración marca: Polyscience y una bomba de vacío modelo V-850), los aceites obtenidos se almacenaron en beakers, aislados de la luz y dentro de frascos desecadores con cloruro de calcio a temperatura ambiente durante al menos 12 horas para su posterior utilización.

Las operaciones y el proceso realizado para la obtención de los diferentes aceites de palma se observan en la figura 13, seguido por la descripción de cada una de estas etapas.



**Figura 13.** Diagrama del procesamiento seguido para la obtención del aceite de los diferentes frutos de palma aceitera.

**Autoclavado:** es una forma de esterilización e inactivación de enzimas, que se logra mediante un tratamiento térmico bajo presión de los frutos en una autoclave, a una temperatura cercana a los 130 °C durante 1 hora.

**Pelado y separación de la semilla:** tanto la cáscara como la semilla de los frutos son considerados residuos del procesamiento puesto que el aceite que interesaba para

el presente trabajo se obtenía únicamente de la pulpa, por lo tanto, se retiraron manualmente.

**Molienda:** se realizó en un procesador de alimentos a alta velocidad durante 30 segundos con el objetivo de romper los tejidos vegetales, de manera que la posterior extracción del aceite fuera más eficiente.

**Extracción:** el material vegetal previamente molido se colocó en contacto con un disolvente orgánico, en este caso hexano en una proporción 10:100, es decir 10 g de material vegetal y 100 g de disolvente. Se dejó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

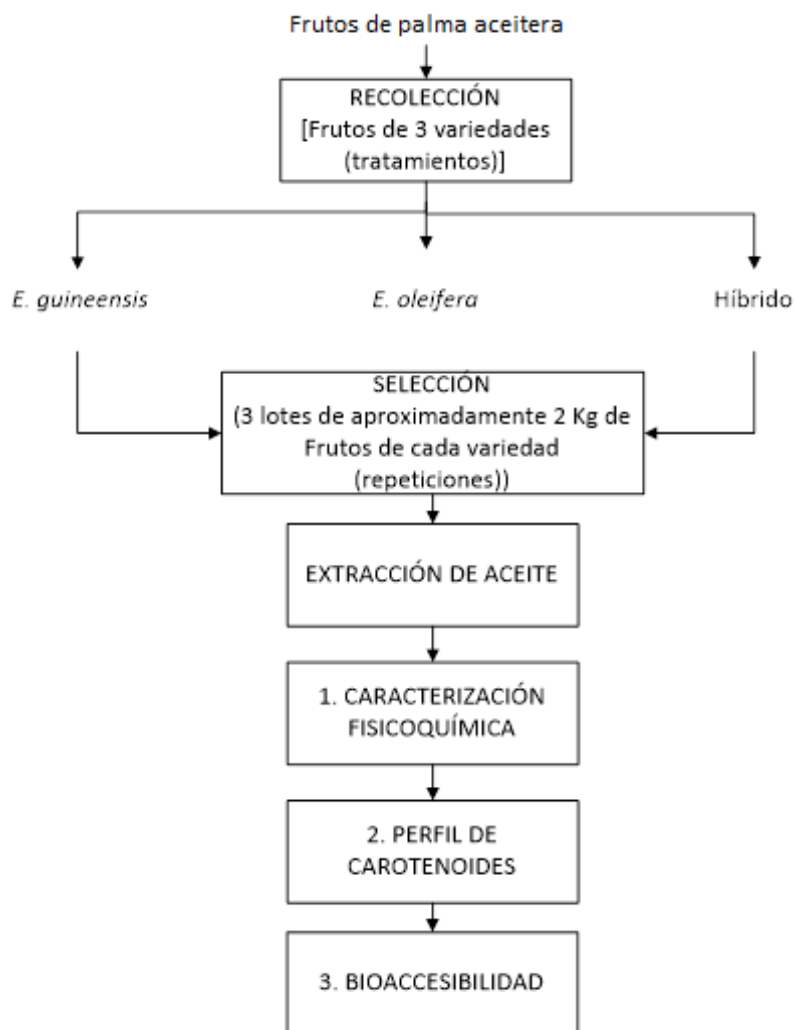
**Filtración:** se realizó una filtración al vacío con el objetivo de separar el aceite que se encuentra en la fase orgánica de los residuos de material vegetal.

**Evaporación del disolvente:** puesto que el aceite se encuentra mezclado con el disolvente orgánico, se procedió a realizar una evaporación al vacío del disolvente mediante el uso de un rotavapor a 60 °C, que es una temperatura cercana a la de evaporación del hexano (60-70 °C).

**Extracción de humedad:** el aceite extraído en el proceso se dejó en reposo durante al menos 12 horas dentro de frascos que contenían cloruro de calcio anhidro como desecante para extraer la mayor humedad posible.

#### **4.4 Tratamiento de las muestras**

Una vez que se hubo obtenido cada uno de los lotes de frutos de palma aceitera se procedió a trabajar de la forma en que se muestra en la figura 14 con el fin de abordar los objetivos planteados.

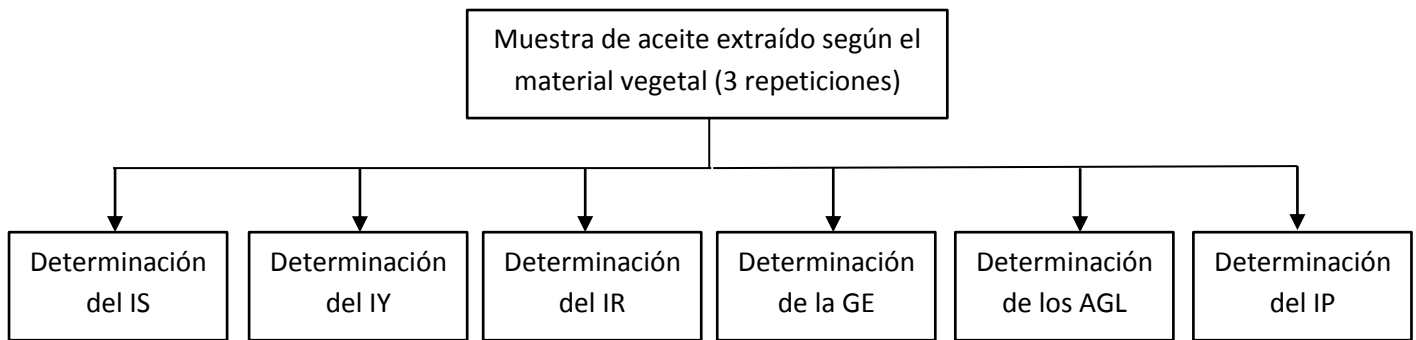


**Figura 14.** Diagrama del procedimiento seguido desde la recolección de las muestras hasta la determinación de la bioaccesibilidad de los carotenoides.

#### 4.4.1. Análisis fisicoquímicos

En la figura 15 se muestra el esquema de trabajo realizado para el desarrollo del objetivo 1: Caracterizar fisicoquímicamente los aceites extraídos de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera por determinación de parámetros generales para la evaluación de la calidad de los aceites. La marca y proveedor de los reactivos empleados se muestran en la sección 8.5.





**Figura 15.** Diagrama de los parámetros fisicoquímicos a determinar para la caracterización de los aceites empleados.

#### 4.4.1.1 IS

El IS se determinó con la metodología de la AOAC 920.160 (AOAC, 2005b), en la cual se define el IS como la cantidad de álcali necesaria para saponificar una cantidad dada de una grasa o aceite, expresado como mg de hidróxido de potasio para saponificar 1 g de muestra. Para ellos, se pesaron 5 g del aceite dentro de frascos de 250 a 300 mL que se conectaron posteriormente a un condensador. Se registró el peso de las muestras. Se prepararon muestras por triplicado y se les añadió, con una pipeta, exactamente 50 mL de la mezcla hidróxido de potasio/etanol (4% m/v). Se preparó un blanco con únicamente 50 mL de la disolución de hidróxido de potasio/etanol (4% v/v) en un recipiente de 250 a 300 mL. Se añadió a los recipientes con las muestras de aceite abundantes núcleos de ebullición. Los frascos con las muestras se adaptaron a un condensador y se colocaron a hervir suavemente, pero de manera constante, sobre una plantilla hasta que la muestra se tornó clara y homogénea, lo que indicaba que la saponificación estaba completa (se requirieron aproximadamente 60 min). Una vez que las muestras se enfriaron, se lavó el interior del condensador con agua desionizada. Se desconectó el frasco del condensador y las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se añadió 1 mL de fenolftaleína a las muestras y se tituló con ácido clorhídrico 0,5 N hasta que el color rosado desapareciera. Por último, se registró el volumen de titulante consumido por cada muestra y se repitió el procedimiento para el blanco. Para calcular el IS se utilizó la ecuación 2.

$$(2) \text{ IS (mg KOH/kg de muestra) } = \frac{28,5*(B-S)}{W}$$

Donde:

IS= mg de hidróxido de potasio/kg de muestra

B= Volumen de titulante consumido por el blanco (mL) (HCl 0,5 N)

S= Volumen de titulante consumido por la muestra (mL) (HCl 0,5 N)

W= Masa de la muestra (g)

#### 4.4.1.2 IY

El IY es una medida del grado de insaturación del aceite, definido como los gramos de yodo absorbidos por 100 g de muestra. Para la determinación de dicho índice se siguió el procedimiento AOAC 920.158 (AOAC, 2005a).

Para ello, se pesaron 0,5000 g de cada aceite dentro de frascos con tapón (frascos yodimétricos) de 500 mL. Además, se preparó un blanco (todos los reactivos menos el aceite). Se agregaron 10 mL de cloroformo para disolver el aceite. Con pipeta, se añadieron 25 mL del reactivo de Hanus (ver anexos sobre la preparación) y las muestras se dejaron reposar en la oscuridad durante 30 minutos, con agitación manual ocasional.

Una vez transcurridos los 30 minutos se añadieron 10 mL de una disolución de yoduro de potasio al 15%, además de 100 mL de agua desionizada. La mezcla se agitó fuertemente.

Las muestras se titularon con una disolución estándar de tiosulfato de sodio 0,1 M mediante agitación constante y hasta la aparición de un color amarillo paja. En ese momento se añadió 1 mL del indicador (disolución de almidón al 1 %) y se continuó titulando hasta la desaparición del color azul. Una vez obtenidos los resultados, se procedió con el cálculo del IY siguiendo la ecuación 3.

$$(3) \text{ IY} = \frac{(B-S) \cdot M \cdot 12,69}{W}$$

Donde:

IY= g yoduro absorbidos por 100 g de muestra

B= Volumen de tiosulfato de sodio consumido por el blanco (mL)

S= Volumen de tiosulfato de sodio consumido por la muestra (mL)

M= Molaridad del tiosulfato de sodio (mol/L)

W= Masa de la muestra (g)

#### 4.4.1.3 IR

Para la determinación del Ir se siguió la metodología expuesta por Herrera *et al.* (2008). Las muestras se calentaron a 40 °C y se mantuvieron a dicha temperatura previo a la determinación. Se procedió a colocar la muestra de aceite en el refractómetro de Abbé, marca Atago, modelo 1T, 4T.

#### 4.4.1.4 GE

La determinación de la GE se realizó con base en el Método Oficial AOAC 920.212 (AOAC, 2005c).

El método 920.212 o método del picnómetro consiste en la determinación de la masa de un cierto volumen de aceite a una temperatura establecida, previamente determinado por medio de un picnómetro calibrado a la misma temperatura.

Para dicha determinación, se pesó un picnómetro de 50 mL, limpio y seco; con su correspondiente tapa. Se preparó un baño María para mantener constante ( $\pm 5$  °C) la temperatura a la que se va a llevar a cabo la prueba. Se procedió a calibrar el picnómetro de la siguiente manera: se llena el picnómetro con agua recién ebulida y previamente enfriada a 5 °C por debajo de la temperatura del baño, cuidadosamente se inserta un termómetro evitando la formación de burbujas y se colocan dentro del baño maría. Después de 1 hora, se ajusta el nivel del agua hasta la línea de llenado del picnómetro y se vuelve a leer la temperatura. Se retiró el picnómetro del baño, se secó y se procedió a pesar. El picnómetro se vació, se lavó varias veces con jabón, después con alcohol y finalmente con acetona, se dejó secar completamente y se procedió a pesar vacío, con su tapa y termómetro correspondiente. El cálculo del volumen ocupado por el picnómetro a la temperatura de la medición se realizó con la ecuación 4.

Volumen (mL) del picnómetro a la temperatura de medición  $T=V_T$

$$(4) V_T = \frac{(W^* - W)}{d_{H_2O, T}} * [1 + a(T - T^*)]$$

Donde:

W\*= peso del picnómetro lleno (g)

W = peso del picnómetro vacío (g)

d<sub>H<sub>2</sub>O,T</sub> = densidad del agua a la temperatura de la medición (g/mL)

a= coeficiente de expansión cúbica (a=0,000010 para vidrio de borosilicato)

T= temperatura del baño María

T\*= temperatura del aceite

Propiamente para la determinación, se procedió a llenar el picnómetro con la muestra de prueba que se encontraba en el baño María, similar a la calibración del picnómetro. Por medio de la ecuación 5 se procedió a calcular la densidad de las sustancias de interés a la temperatura que se realizó la medición.

$$(5) D_T \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{W - W'}{V_T}$$

Donde:

D<sub>T</sub>= Masa por unidad de volumen (densidad) (g/mL)

W y W' = masa del picnómetro vacío y lleno con la muestra respectivamente (g)

V<sub>T</sub>= volumen del picnómetro a la temperatura de medición (mL)

Finalmente por medio de la ecuación 6 se determinó la GE.

$$(6) GE = D_T / d_{H_2O,T}$$

#### 4.4.1.5 AGL

El valor de AGL se define como los miligramos de hidróxido de sodio necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en 1 g de aceite, y para su determinación se siguió la metodología descrita por Nielsen (2010).

En un frasco de 250 mL se pesaron 5,00 g de cada uno de los aceites, luego se añadieron 100 mL de etanol neutralizado al momento de realizar la medición (neutralización del alcohol: 100 mL de etanol al 95% y 1 mL de fenolftaleína se calentó hasta ebullición e inmediatamente se retiró del calor y en caliente se tituló con

hidróxido de sodio 0,01 N hasta aparición de color rosado; se registró la cantidad de hidróxido de sodio utilizado) y 2 mL de fenolftaleína como indicador. Se agitó vigorosamente para mezclar homogéneamente y se tituló usando una base estándar (NaOH 0,25 N). Luego, se agitó vigorosamente hasta la aparición del punto final, el cual se presenta como una coloración rosa que persiste durante 30 s. Se registraron los mililitros hidróxido de sodio requeridos para esta segunda titulación. Los cálculos se realizaron según la ecuación 7.

$$(7) \%AGL_{\text{expresado como ácido palmítico}} = \frac{V \cdot N \cdot 256}{W \cdot 1000} * 100$$

Donde:

% AGL= Porcentaje de AGL (g de AGL/100 g de aceite), expresados como ácido palmítico

V=Volumen de valorante NaOH (mL)

N= Normalidad del valorante NaOH (0,25 N)

256= Masa molar del ácido palmítico (g/mol)

W= Masa de la muestra (g)

#### 4.4.1.6 IP

El valor de los peróxidos se define como los miliequivalentes de peróxido por kilogramo de grasa. Dicho índice se determinó siguiendo la metodología de Kirk *et al.* (2009).

La prueba se llevó a cabo con luz de día suave. Se pesó 1 g (o menos) del aceite y, en un tubo para ebullición limpio y seco, mientras seguía estando líquida se le agregó 1 g de yoduro de potasio en polvo y 20 mL de la mezcla de disolventes (2 volúmenes de ácido acético glacial + 1 volumen de cloroformo). Se colocó el tubo en agua en ebullición, de manera que la muestra hirvió a los 30 segundos aproximadamente y se dejó hervir vigorosamente por no más de 30 segundos. Se vació el contenido con rapidez a un matraz que contenía 20 mL de solución de yoduro de potasio (al 5%), se lavó el tubo dos veces con 25 mL de agua destilada y se tituló con solución de tiosulfato de sodio 0,002 M empleando almidón como indicador. Se analizó un testigo de manera simultánea. El valor de peróxido suele reportarse como el

número de mililitros de tiosulfato 0,002 M por gramo de muestra. El cálculo del IP se realizó siguiendo la ecuación 8.

$$(8) \text{ IP} = 2 * \frac{(S-B)*M}{W} * 1000$$

Donde:

IP= miliequivalentes de peróxidos por kg de muestra

S= Volumen de tiosulfato de sodio consumido por la muestra (mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,002 M)

B= Volumen de tiosulfato de sodio consumidos por el blanco (mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,002 M)

M= Molaridad de la solución de tiosulfato de sodio (0,002 mol/L)

1000= Factor de conversión (g/kg)

W= Masa de muestra (g)

#### **4.4.1.7 Diseño experimental**

Para el desarrollo de este objetivo se evaluaron los aceites de tres lotes, conformados por frutos de dos especies y un híbrido de palma aceitera (*E. guineensis*, *E. oleífera* y el híbrido entre estas: Amazon), con el fin de caracterizar fisicoquímicamente los aceites extraídos, se aplicó un diseño irrestricto aleatorio con tres tratamientos (tipos de aceite), tres repeticiones (lotes) y tres réplicas (cada análisis se realizó por triplicado).

#### **4.4.1.8 Análisis estadístico**

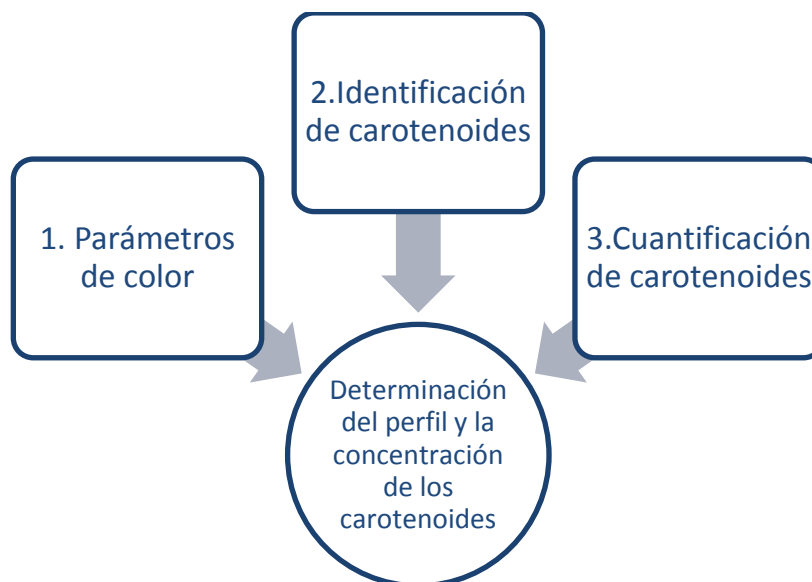
Los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de los tres aceites de palma aceitera fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANDEVA). Cuando se encontró diferencias significativas entre muestras se procedió a realizar una comparación de medias por medio de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Dichos análisis fueron llevados a cabo con el programa estadístico JMP 8 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Además con el objetivo de minimizar la influencia de los lotes sobre los análisis estadísticos se procedió a realizar el análisis estadístico en JMP 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) bloqueando la influencia de los lotes sobre los resultados.

#### **4.4.2 Perfil de carotenoides**

Los aceites se almacenaron en frascos desecadores, protegidos de la luz y a temperatura ambiente, hasta el momento prepararlos para su inyección en el HPLC.

Durante preparación de muestras se trabajó bajo condiciones de poca luz para evitar la degradación e isomerización de los carotenoides.

En la figura 16 se muestra el esquema de trabajo a seguir para el desarrollo del objetivo 2: determinar el perfil y concentración de carotenoides del aceite extraído del fruto de palma aceitera para la evaluación del potencial nutricional del aceite.



**Figura 16.** Esquema general de trabajo para la determinación de carotenoides en los aceites de los tres materiales de palma aceitera.

#### 4.4.2.1 Determinación del color

Se analizó el color de los aceites y aderezos colocando aproximadamente 10 g de la muestra en un recipiente plástico desechable específico para muestras líquidas. Se utilizó un colorímetro marca HunterLab, modelo Color Flex (HunterLab, Reston, USA), equipado con el software Spectra Manager. Se determinó el color utilizando la escala CIE-L\*, a\* y b\*, empleando una fuente de luz D65 y ángulo de visión de 10°. El parámetro L\* representa la luminosidad, siendo el 0 el color negro y 100 el blanco. El valor a\* corresponde a una escala de color de rojo a verde; mientras que el b\* representa el color amarillo y azul.

#### 4.4.2.2 Identificación de carotenoides

Para el análisis de carotenoides de los tres lotes se tomó una masa de 0,5000 g de cada tipo de aceite por triplicado, la cual se disolvió en 800 µL de cloroformo, se

agitó durante 30 s mediante el empleo de un agitador tipo Vortex (Thermolyne, Maxi Mix II), se filtró con un filtro de membrana de nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  de porosidad y se colocó en un vial para el análisis de HPLC.

Los análisis de HPLC se realizaron tanto en el Laboratorio de Química del CITA como en el de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la UCR. El equipo empleado en el CITA consistió de sistema HPLC Shimadzu (Prominence), cuyos componentes principales son: una bomba (LC-20AT), un automuestreador (SIL-20AHT), un horno (CTO-20A) y un detector con arreglo de diodos (SPD-M20A). La columna que se empleó fue de fase reversa YMC C30 de escala analítica de 150 x 3,0 mm i.d (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Alemania) con tamaño de poro de 3  $\mu\text{m}$  protegida con una pre-columna YMC C30 de 10 x 3.0 mm i.d y tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$  (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Alemania).

La temperatura de operación fue de 40°C. Los disolventes utilizados fueron metanol (eluyente A) y MTBE (eluyente B). Se empleó el siguiente programa de gradiente: 80 % A (5 min), 80 % A hasta 73 % A (del min 5 al min 7), 62,5 % A (del min 7 al min 15), se mantiene isocrático (62,5 % MeOH hasta el min 20) 45% A (hasta el min 30), 10 % A (del min 30 al min 35), se mantiene isocrático (10 % MeOH hasta el min 40). Finalmente 80 % A (hasta el min 45); por lo que, el tiempo total de la corrida fue de 45 min con un caudal de 0,80  $\mu\text{L}/\text{min}$ . El volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$ .

Por su parte el equipo empleado en la escuela de Tecnología de Alimentos consistió de un sistema HPLC HITACHI (LaChrom), cuyos componentes principales son: una bomba (L-7100), un automuestreador (L-7200), un horno (L-7350) y un detector de luz ultravioleta (L-7400). La columna que se empleó fue de fase reversa Acclaim<sup>TM</sup> C30 (Thermo Scientific) de escala analítica de 3.0 X 150 mm con tamaño deporo de 3  $\mu\text{m}$ , con una pre-columna C30 Acclaim (Thermo Scientific) de 10 mm x 3,0 mm con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .

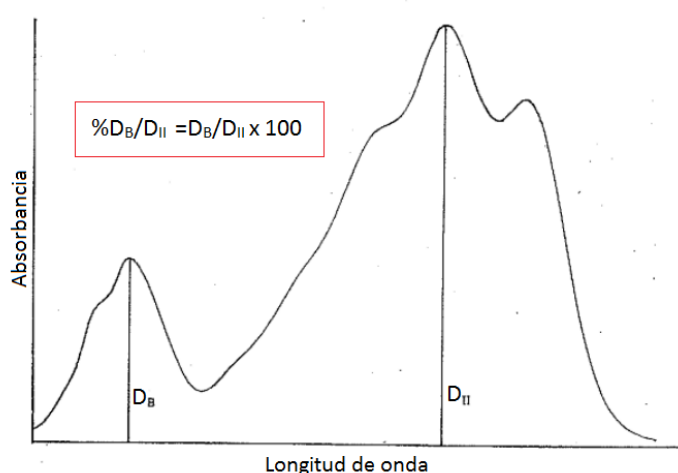
La temperatura de operación fue de 40°C. Los disolventes utilizados fueron metanol/MTBE/agua (80:18:2, v/v/v, eluyente A) y metanol/ MTBE/agua (8:90:2, v/v/v, eluyente B). Se empleó el siguiente programa de gradiente: 85 % A y 15 % de B (de 0 a 30 min), 36 % A y 64 % B (del minuto 30 al 35), 85 % A y 15 % B (del minuto 35 al 40).



Por lo que, el tiempo total de la corrida fue de 40 min con un caudal de 0,42 mL/min. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L.

Los carotenoides libres fueron monitoreados a 450 nm y adicionalmente se corrió un espectro UV/Vis en el rango de 200 a 700 nm. De esta forma, los carotenoides fueron identificados comparando su espectro de absorción UV/Vis y tiempo de retención.

Otra de las herramientas utilizadas en la identificación de los carotenoides presentes en los aceites fue la “Identificación de los isómeros geométricos”. La cual consiste en considerar la intensidad del pico cis y los cambios relativos de su absorción máxima que aparece en la región del UV cercano del espectro y usualmente se denota como  $D_B/D_{II}$  (Meléndez-Martínez *et al.*, 2013). En la figura 17 se ejemplifica la forma de calcular el valor del  $D_B/D_{II}$  para isómeros cis.



**Figura 17.** Ejemplo de cálculo del factor  $D_B/D_{II}$  (%) usado en la identificación de los isómeros cis. **Fuente:** Britton *et al.* (1995).

#### 4.4.2.3 Cuantificación de $\beta$ -caroteno

Se construyó una curva de calibración (las concentraciones de la curva se muestran en la sección 8.2 de los anexos) utilizando un estándar secundario farmacéutico de  $\beta$ -caroteno trazable a USP marca Sigma-Aldrich, cuyo proveedor fue Industrial Casjim I.C.J. S.A y a partir de esta se determinaron las concentraciones de dicho carotenoide en los diferentes aceites. Además, considerando la bioconversión de carotenoides a vitamina A, se calculó los RAE (Actividad Equivalentes de Retinos por

sus siglas en inglés), tomando en cuenta que 12 µg de (E)-β-caroteno equivale a 1 RAE (Institute of Medicine, 2001).

#### **4.4.2.4 Diseño Experimental**

Con el fin de evaluar si existieron diferencias tanto en el perfil como en la concentración de los carotenoides de los tres aceites extraídos, se realizó un diseño irrestricto aleatorio con tres tratamientos (aceites de palma de tres genotipos diferentes) y dos repeticiones (lotes), así como tres réplicas (cada análisis por triplicado).

#### **4.4.2.5 Análisis Estadístico**

A partir de los resultados obtenidos de perfil y concentración de carotenoides en los tres materiales de palma aceitera se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y en los casos en que se encontró diferencia significativa se aplicó la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), para determinar la (s) aceite (s) cuya concentración de β-caroteno fue significativamente diferente. Se utilizó el programa estadístico JMP 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). De igual manera se repitió el análisis estadístico en JMP 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) bloqueando la influencia de los lotes sobre los ANDEVAS.

### **4.5. Comparación de la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides de los diferentes aceites de palma y de un aderezo elaborado con uno de estos aceites**

Para el desarrollo del objetivo 3: Comparar la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides presentes en el aceite extraído de la pulpa del fruto de dos especies y un híbrido de palma aceitera, así como la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides de un aderezo elaborado con aceite del híbrido seleccionado (Amazon), se procedió a determinar la bioaccesibilidad con base en el contenido de β-caroteno presente en los tres aceites de palma analizados. Además, a partir del aceite con mayor rendimiento de extracción (*EoxEg*) se elaboró un aderezo para observar el efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad del β-caroteno presente. Para ellos se procedió a probar varias formulaciones con porcentajes diferentes de aceite de *EoxEg*, hasta

determinar la siguiente formulación, que presentó las características sensoriales más adecuadas, para su posterior análisis.

A continuación, en el cuadro III, se muestra la formulación del aderezo elaborado a partir del aceite extraído de los frutos del híbrido con el que se trabajó.

**Cuadro III.** Formulación del aderezo elaborado a partir del aceite derivado del híbrido conocido como Amazon

<b>Ingrediente</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Información de los ingredientes</b>
Agua	50,0	NA
Aceite	30,0	NA
Vinagre	11,0	Comprado en supermercado local (AMPM), marca: Algo del Tejar S.A (Salsas Alfaro), San Antonio del Tejar, Alajuela
Azúcar	4,0	Comprado en supermercado local (AMPM), marca: Doña María (LAICA). San José.
Sal	2,0	Comprado en supermercado local (AMPM), marca: Sal Sol (COONAPROSAL R.L). Colorado de Abangares, Guanacaste
Cebolla en polvo	2,0	Comprado en supermercado local (AMPM), marca: Badia Spices Inc. California, Estados Unidos.
Goma guar	0,5	Comprado en Insumos Químicos y Servicios de Costa Rica S.R.L, marca: TIC GUMS. Producto de India y/o Pakistán.
Maltodextrina	0,5	Comprado en Insumos Químicos y Servicios de Costa Rica S.R.L, marca: Shandong Longlive Bio-technology Co., Ltd. Producto de China.

#### **4.5.1 Extracción de carotenoides micelados para la determinación de la bioaccesibilidad**

El análisis de bioaccesibilidad *in vitro* se realizó de acuerdo al método descrito por Schweiggert *et al.* (2012). Este procedimiento constó de cuatro etapas que se describen a continuación y durante el cual se emplearon enzimas de la casa matriz Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany).

**Fase oral:** se tomaron 5,00 g de la muestra (aceite o aderezo) y se colocaron en un frasco de vidrio ámbar de 100 mL. Luego se adicionaron 10 mL de solución salival (50 mM de cloruro de sodio -NaCl-, 10 mM de fosfato de potasio monobásico -KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-, 40 mM de bicarbonato de sodio -NaHCO<sub>3</sub>- y 2mM de cloruro de calcio hexahidratado -CaCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O), se ajustó el pH a 6,9 con ayuda de hidróxido de sodio -NaOH- 1M o de ácido clorhídrico -HCl- 1 M. Posteriormente, se agregaron 100 µL de la solución de α-amilasa (53 mg de enzima en 10 mL de fosfato de sodio dibásico -Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM pH: 7,0) y se agitó ligeramente para lograr una buena distribución.

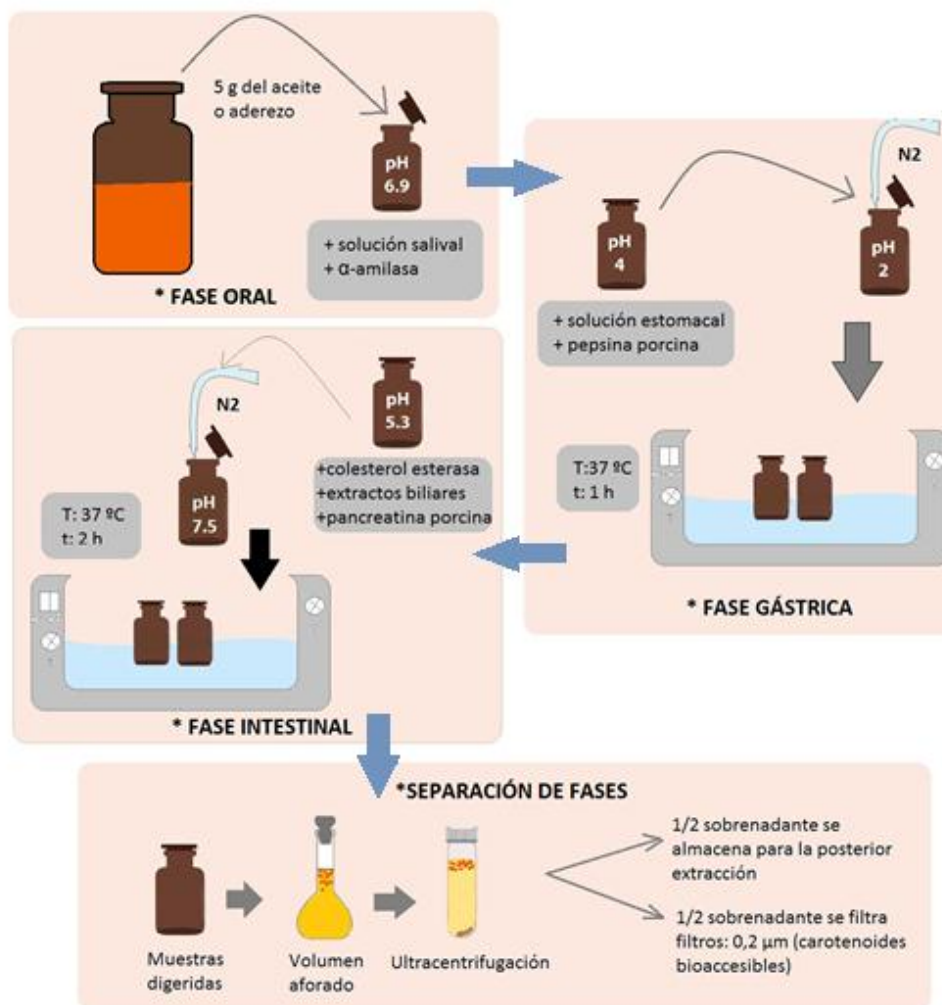
**Fase gástrica:** se adicionaron 3 mL de solución estomacal (51 mM de NaCl; 14,7 mM de cloruro de potasio -KCl-; 10 mM de cloruro de calcio dihidratado -CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O-; 3,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,4 mM de cloruro de magnesio hexahidratado -MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O); se ajustó el pH a 4,0 con HCl 1M. Se añadieron 2 mL de solución de pepsina porcina (40 mg/mL 0,1M HCl) y se ajustó el pH a 2,0 con HCl 1M. A los frascos que contenían las muestras se les desplazó el aire con nitrógeno gaseoso, se les colocó una tapa y se incubaron en baño María con agitación a una temperatura de 37 °C durante 1 hora.

**Fase intestinal:** una vez terminada la fase gástrica se procedió a ajustar el pH a **5,3 con NaHCO<sub>3</sub> 0,9 M y se añadieron 174 µL de solución de colesterol esterasa (1 mg/1 mL de buffer de fosfatos 0,1 M, pH: 7,0)**. A la mezcla se le agregaron 7 mL de solución de extractos biliares y pancreatina de origen porcino, se volvió a ajustar el pH, esta vez a 7,5 con NaOH 1M. Nuevamente se desplazó el aire con nitrógeno gaseoso. Los frascos se cerraron y se procedió a incubar en baño María a 37 °C por 2 horas.

**Separación de fases:** las muestras se trasvasaron a balones de 100,00 mL, se aforaron con agua des-ionizada se trasvasaron a tubos de centrifuga de 50 mL y se ultra-centrifugaron a 4000 rpm durante 90 minutos a 10 °C.

Del sobrenadante obtenido se almacenó aproximadamente la mitad (50 mL) y la otra mitad se filtró con un filtro de poliéster de 0,20 µm para obtenerse la fase micelar. Ambas porciones se almacenaron en frascos ámbar a -65 °C para análisis posteriores.

Para evaluar la bioaccesibilidad, se realizó una comparación entre el contenido de carotenoides en las muestras antes y después de la digestión (Garrett *et al.* 1999). En la figura 18 se muestra un esquema del procedimiento seguido durante la determinación de la bioaccesibilidad de las muestras en estudiadas.



**Figura 18.** Diagrama de la metodología de la bioaccesibilidad in vitro para la obtención de la fracción micelar y de carotenoides liberados de la matriz alimentaria. **Adaptado de.** Chacón (2014).

#### 4.5.2 Determinación del porcentaje de carotenoides micelados

Para la determinación de carotenoides micelados (fase obtenida de acuerdo a la sección 4.5.1 que fue sometida a la filtración en filtros con tamaño de poro de 0,20  $\mu\text{m}$ ), se siguió la metodología de Hempel (2013) con pequeñas modificaciones: se tomaron alícuotas de 10,00 mL de la fracción micelar, y se procedió a realizar la extracción de los carotenoides con un volumen equivalente del disolvente de extracción que consistió de una mezcla de metanol: benzina de petróleo: acetato de etilo (1:1:1, v/v/v). Se procedió a agitar vigorosamente para facilitar la extracción. Las muestras se dejaron a continuación en reposo durante algunos minutos hasta obtener una buena separación de las fases (acuosa y orgánica). Posteriormente, y con la ayuda de pipetas Pasteur desechables, se procedió a remover la fase orgánica (fase superior) y a depositarla en viales color ámbar. La extracción con los disolventes se repitió al menos tres veces o hasta que la disolución se tornara incolora. Finalmente, los viales que contenían todas las fases orgánicas extraídas se sometieron a corrientes de nitrógeno, de manera tal que el disolvente orgánico se evaporara. Las muestras secas se almacenaron a  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis cromatográfico. Para la identificación y cuantificación se siguió la metodología descrita en el inciso: 4.4.2. El porcentaje de micelarización se calculó de acuerdo con el área bajo la curva del pico de  $\beta$ -caroteno del extracto micelarizado con respecto al inicial de la muestra.

#### 4.5.3 Diseño experimental

La bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides en los distintos aceites se evaluó mediante el uso de un diseño irrestricto aleatorio. Además, la concentración del  $\beta$ -caroteno presente en la fracción micelar del aceite de la variedad Amazon se comparó contra la concentración de  $\beta$ -caroteno en la fracción micelar del aderezo elaborado con aceite de dicho híbrido. La variable respuesta correspondió a la concentración en mg de  $\beta$ -caroteno /100 g de muestra presente en la fracción micelar en relación al contenido en mg de  $\beta$ -caroteno /100 g de muestra inicial y a partir de esto se obtuvo una relación porcentual como se detalla en la ecuación 9.

(9)

$$\% \beta - \text{caroteno bioaccesible} = \frac{\beta\text{-caroteno en fase micelar del aceite o aderezo (ppm)}}{\beta\text{-caroteno inicial en los aceites (ppm)}} * 100$$

#### **4.5.4. Análisis estadístico**

A partir de los porcentajes de  $\beta$ -caroteno bioaccesibles obtenidos en la determinación de la bioaccesibilidad *in vitro* tanto del aderezo elaborado a base de aceite de la variedad Amazon como de los aceites propiamente de las tres variedades de palma aceitera, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y en los casos en que se encontró diferencias estadísticamente significativas se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Para ello utilizó el programa estadístico JMP 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Una vez más se repitió el análisis estadístico en el programa JMP 8.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) bloqueando la influencia de los lotes sobre el análisis de varianza (ANDEVA).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización fisicoquímica de las materias primas

La caracterización fisicoquímica de los aceites de los tres genotipos analizados en el presente estudio se resume en el cuadro IV, en el cual también se presentan los datos de referencia para aceite de *Eg* a nivel industrial.

**Cuadro IV.** Resultados obtenidos en la determinación de los parámetros fisicoquímicos de los aceites de los tres genotipos de palma estudiados. Valores de una misma fila cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los resultados se muestran con su respectiva desviación estándar

Parámetro	Fuente del aceite de palma			Datos de referencia	
	<i>E. oleifera</i>	<i>E. guineensis</i>	Amazon	Mín	Máx
IS (mg KOH/g TAG)	192,941 <sup>a</sup> ± 13,619	200,763 <sup>a</sup> ± 13,260	198,514 <sup>a</sup> ± 11,709	190,000-	209,000
IY (cg I <sub>2</sub> /g TAG)	79,266 <sup>a</sup> ± 5,055	46,724 <sup>c</sup> ± 6,459	58,849 <sup>b</sup> ± 3,832	50,000-	55,000
IR (T: 40 °C)	1,461 <sup>a</sup> ± 0,003	1,455 <sup>a</sup> ± 0,002	1,456 <sup>a</sup> ± 0,002	1,449 -	1,456
GE (T:40 °C/40 °C)*	0,890 <sup>a</sup> ± 0,003	0,890 <sup>a</sup> ± 0,009	0,887 <sup>a</sup> ± 0,007	0,891 -	0,899
AGL (%)	0,347 <sup>b</sup> ± 0,064	24,58 <sup>a</sup> ± 5,283	33,607 <sup>a</sup> ± 5,144	0,000 -	5,000
IP (mmol I <sub>2</sub> /kg TAG)	2,046 <sup>a</sup> ± 3,131	1,248 <sup>a</sup> ± 1,240	0,672 <sup>a</sup> ± 0,534	0,000 -	5,000

\*(T<sub>aceite</sub>/T<sub>agua</sub>), en el caso de los datos reportados en la literatura, estos son reportados a: 50 °C /20 °C

**Fuente:** Grupo Numar (2006)., CODEX (2015).

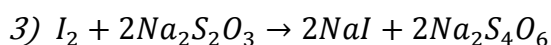
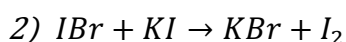
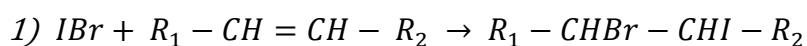


Con respecto al IS, se sabe que éste es una medida del contenido global de triglicéridos presentes en el aceite en función de grupos alcalinos reactivos y, por tanto, ofrece la posibilidad de conocer el peso molecular de un aceite (Rincón & Martínez, 2009). En términos moleculares, un mol de grasa o de aceite requiere tres moles de KOH para su saponificación completa, porque hay tres enlaces éster en una molécula de grasa o aceite (Bailey *et al.*, 1998). Este índice es útil para estimar la composición de la mezcla en el caso de las grasas, o para analizar la pureza del aceite o grasa. Además se sabe que los TAG's de peso molecular alto tienen índices de saponificación más bajos que los de peso molecular bajo (Mehlenbacher, 1979; Bailey *et al.*, 1998).

En el cuadro IV se puede observar que no hubo diferencia significativa en el IS entre los aceites de palma analizados. Bibliográficamente se conocen los ácidos grasos que conforman cada uno de los tres aceites de palma estudiados. En el caso de *Eg* se tiene que el ácido graso que se encuentra en mayor proporción es el palmítico (16:0), mientras que para *Eo* y *EoxEg* el mayor componente es el ácido oleico (18:1). Al tener estos últimos cadenas de ácidos grasos más largos en su estructura, se pensaba que podría haber diferencias en cuanto a los IS entre genotipos. Sin embargo, dichas diferencias en las cadenas de los ácidos grasos no fueron tan evidentes como para generar diferencia significativa en el IS de los tres aceites con los cuáles se trabajó con  $p < 0,05$  (Rajanaidu *et al.*, 2000).

Al determinar el IY de las tres variedades de aceite estudiadas, se pudo observar que *Eo* presentó el mayor índice de yodo, seguido de Amazon y finalmente el menor lo presentó la especie *Eg*. Estas fueron significativamente diferentes entre sí. El IY determina el número de insaturaciones que tienen los triglicéridos del compuesto lipídico (Rincón & Martínez, 2009). Cuanto más grande es el valor del IY, mayor es el número de insaturaciones del aceite. Con base en los valores reportados en la literatura (cuadro IV) IY para el aceite de palma se encuentra entre 50,0 y 55,0  $\text{cg I}_2/\text{g TAG}$ . El resultado que estuvo más cercano a dicho valor fue el del aceite de *Eg*, ya que los aceites de las otras dos variedades presentaron índices de yodo más altos. Es probable que el valor de la literatura se refiera a *Eg*, por ello la coincidencia en los valores. Los resultados de mayores valores en *Eo* probablemente se debe a que, como

lo exponen Rajanaidu *et al.* (2000), *Eo* está compuesto casi en un 80% por ácidos grasos mono y poliinsaturados (16:1, 18:1 y 18:2). Por su parte, *EgxEo* sólo presenta alrededor de un 60% de ácidos grasos con insaturaciones (18:1 y 18:2), en donde el ácido linoleico (18:2) es aproximadamente la mitad del que se encuentra en *Eo*. Finalmente, *Eg* presentó el menor IY, lo cual se puede explicar debido a que el ácido graso predominante en dicho aceite, es el ácido palmítico (16:0), el cual no presenta insaturaciones en su cadena de carbonos y, además, es el que menor contenido de ácido linoleico (18:2) presenta en su composición de los tres aceites. De ahí que el bromuro de yodo (IBr) utilizado en la valoración, tuviera menos dobles enlaces a los que unirse en la estructura del lípido. En consecuencia, la cantidad de exceso de IBr presente para reaccionar con el KI es mayor, por lo que al final se tiene más I<sub>2</sub>, que a su vez requiere una mayor cantidad de tiosulfato al ser titulado. Lo anterior se puede ver representado en las siguientes reacciones (Guarnizo & Martínez, 2009):



Como se observa en el cuadro IV, no se encontró diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para el índice de refracción (IR) entre los aceites de los tres genotipos de palma analizados. Cabe mencionar que dicho índice relaciona la propiedad óptica de la grasa o aceite con la estructura y composición de los glicéridos (Boatela *et al.*, 2004).

El IR también se ha relacionado con la longitud de la cadena hidrocarbonada, en una relación directamente proporcional, es decir que entre más larga es la cadena del ácido graso mayor será el índice de refracción. Lo anterior sería de mucha utilidad a la hora de detectar adulteraciones de los aceites con otro tipo de grasas de cadenas más cortas. En este caso era de esperarse que no hubiera diferencia significativa puesto que los tres aceites estudiados procedían del mesocarpio de frutos de palma, los cuales tienen un largo de cadena de hidrocarburos similar a pesar de proceder de genotipos de palma diferentes (Graciani, 2006; Gunstone, 2002).

Al igual que el IR, la GE, se emplea como parámetro de control de calidad en la detección de adulteraciones y mezclas de aceites. Como se observa en el cuadro IV, se

obtuvo resultados muy similares, sin diferencia significativa, en la determinación de la GE para las tres variedades. Al comparar dichos valores contra los reportados en la literatura para el aceite de palma se puede observar que los resultados obtenidos experimentalmente se encuentran muy cercanos al límite inferior y, puesto que en el estudio los tres aceites empleados son de palma aceitera sin mezclarse con otro tipo de grasas, era de esperarse que los resultados fueran tan similares entre sí.

Otra de las determinaciones realizada fue el índice de acidez (IA), también conocida como determinación de los AGL presentes en el aceite. Para dicho parámetro también se presentaron valores significativamente menores en *Eo* con respecto a los otros dos genotipos. La acidez mide el grado de los glicéridos de las grasas que se han descompuesto por acción de lipasas u otras acciones. La descomposición se acelera por el calor y la luz. En general, la rancidez se ve acompañada por la formación de ácidos grasos libres y su determinación se utiliza con frecuencia como un índice general del estado y comestibilidad de las grasas (Buitimea, 2008). Como se observa en el cuadro IV los AGL presentes en *Eo* fueron los únicos que se encontraron dentro del rango de referencia reportado como aceptable para este tipo de aceite (0,0 - 5,0 %). Por su parte tanto el aceite de la variedad *Eg* como *EgxEo*, presentaron valores por encima de los valores de referencia.

Los porcentajes altos de AGL para *Eg* y *EoxEg*, eran de esperarse puesto que los aceites no se sometieron al proceso de estandarización que se les realiza a nivel industrial para disminuir los AGL. A pesar de que en éste caso en que los aceites se extrajeron de frutos que habían sido cosechados bajo las mismas condiciones el aceite de *Eo* no presentó valores tan altos, lo cual puede deberse a que los AGL aumentan hasta alcanzazr un punto máximo, a artir del cual comienzan a disminuir. Ésta disminución podría deberse a que los AGL hayan comenzado a oxidarse a compuestos oxigenados, por la acción de agentes químicos o bioquímicos o la combinaciób de ambos en función de la composición del aceite almacenado, en éste caso se ha venido describiendo ciertas diferencias en la composición de *Eo* que pudieron ser las responsables de dicgo comportamiento (Martínez, 2012). En la industria aceitera, para eliminar AGL y componentes indeseables los aceites son sometidos a procesos de refinación (consiste en cinco etapas: deslecitinado, desengomado, desacidificación,

blanqueo y tratamiento de vapor). Este proceso se realiza en ausencia de oxígeno, a la menor temperatura posible e impidiendo la contaminación con metales pesados; sin embargo, para el presente trabajo se utilizó el aceite sin refinar, razón por la cual pudo haberse obtenido un alto porcentaje en el IA de *Eg* y *EoxEg* (Belitz & Grosch, 1997).

Finalmente el último parámetro que se le determinó a los aceites fue el IP. Como se observa en el cuadro IV, no se encontró diferencia significativa entre los tres aceites estudiados. De hecho, al comparar con el valor de referencia máximo permitido para este tipo de aceites (cuadro IV) se puede observar como los tres aceites de palma evaluados tenían su índice de peróxidos dentro del ámbito de valores reportados en la literatura, lo que indica que este tipo de aceite tiene una buena tolerancia ante la oxidación (Rincón & Martínez, 2009). De hecho, Rincón & Martínez (2009) destacan como una cualidad intrínseca del aceite de palma su alto contenido de antioxidantes naturales y su resistencia ante la oxidación. Según Bailey (2001), la formación de hidroperóxidos se presenta a causa de la oxidación, la cual al inicio se efectúa a un ritmo lento y varía dependiendo del tipo de aceite, lo cual muestra que probablemente los aceites de palma presentan una lenta formación de peróxidos.

Según Badui (1990), los ácidos grasos saturados son mucho más estables a los diversos mecanismos de oxidación que los insaturados, puesto que los dobles enlaces presentes en los insaturados les confieren una elevada reactividad química y están propensos a transformaciones oxidativas. Cuando los enlaces dobles de las grasas se oxidan, se forman los peróxidos y liberan el yodo del yoduro de potasio añadido a la disolución; esta cantidad de yodo es la que se utiliza para conocer el contenido de peróxido, tomando en cuenta el agente valorante tiosulfato de sodio (O'Brien, 2004). Debido a lo anterior se esperaba que *Eo*, cuyo aceite se compone de ácidos grasos más insaturados que *EoxEg* y este a su vez es más insaturado que *Eg*, presentara IP descendientes en el mismo orden. El comportamiento anterior no pudo demostrarse estadísticamente puesto que no hubo diferencia significativa con  $p < 0,05$  entre los genotipos estudiados.

## 5.2 Perfil y concentración de carotenoides en el aceite del mesocarpo de dos especies y un híbrido de palma aceitera

### 5.2.1 Apariencia visual y valores de color según la escala CIE - L\*a\*b\*

A continuación, en el cuadro V se resumen los resultados de las determinaciones de color realizadas a los aceites de los tres genotipos de palma estudiadas: *Eo*, *Eg* y *EoxEg*.

**Cuadro V.** Resultados de la determinación del color del aceite del mesocarpo de dos especies y un híbrido de palma aceitera, mediante la escala CIE L\*, a\*, b\*. Valores de una misma fila cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los datos se muestran con su respectiva desviación estándar

Parámetro	Variedad de aceite		
	<i>E. oleifera</i>	<i>E. guineensis</i>	<i>EoxEg</i>
L*	11,91 <sup>c</sup> ± 2,66	34,89 <sup>a</sup> ± 0,24	25,93 <sup>b</sup> ± 0,34
a*	21,85 <sup>ab</sup> ± 6,39	21,50 <sup>b</sup> ± 4,90	28,80 <sup>a</sup> ± 0,84
b*	17,29 <sup>c</sup> ± 3,83	56,30 <sup>a</sup> ± 0,55	41,62 <sup>b</sup> ± 1,55

Como se observa en la figura 19, los aceites de palma presentaron una coloración que va desde naranja amarillento hasta rojizo oscuro. Las mediciones de color se basaron en la escala CIE L\* a\* b\* (los resultados se muestran en el cuadro V). Los tres aceites presentaron diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para el parámetro de luminosidad (L\*). Los resultados muestran como el aceite de *Eo*, presenta una coloración que tiende más hacia tonos oscuros, mientras que *Eg* según los resultados es el aceite menos oscuro de los tres. Según Boss *et al.* (2007), la rica coloración del aceite de palma se debe a su alto contenido de carotenos, que en éste caso se podría asociar de mayor a menor en el siguiente orden  $Eo > EoxEg > Eg$ . Además, las diferencias de L\* en los aceites coincide con otro estudio anterior realizado por Choo *et al.* (1998), en el cual el contenido total de carotenoides en *Eg* se ubica entre 500-700 ppm, entre 4300-4600 ppm para *Eo* y entre 1200-2400 ppm para *EgxEo*.

Como se observa en la figura 19, los aceites obtenidos de la variedad *Eo* y *EoxEg* presentan una tonalidad rojiza similar, lo cual se refleja en los resultados del

cuadro V, ya que no hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre dichos aceites para el parámetro  $a^*$ . Mientras que *Eg* generó un aceite más anaranjado, que resultó significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) del aceite de *EoxEg* respecto al parámetro  $a^*$ . Según Chiu *et al.* (2009), el aceite de palma es una de las fuentes más ricas de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, los cuales constituyen alrededor del 80 % del total de carotenoides del aceite, dichos carotenoides serían los encargados de aportarle la coloración rojiza al aceite, y las variaciones deberían relacionarse con las concentraciones mayores o menores de carotenoides que presente la variedad de aceite. Según lo anterior, era de esperarse que *Eg* fuera significativamente diferente de *Eo* puesto que, como se indicó anteriormente dichos aceites presentan la menor y mayor concentración de carotenoides, respectivamente (Choo *et al.*, 1998). Sin embargo, la variabilidad dentro de los datos del parámetro  $a^*$  de ambas especies fue tan alta que no permitió determinar diferencia significativa entre los aceites de las dos especies (*Eo* y *Eg*).

Finalmente, con respecto a los valores del parámetro  $b^*$ , el cual se asocia con el color amarillo, también se presentó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Como se observa en el cuadro V, *Eg* presentó el valor más alto (56,30), es decir, que la variedad que presentó una coloración más amarillenta fue *Eg*, seguida por el híbrido y finalmente los valores más bajos los presentó *Eo*, lo cual se puede corroborar al observar la figura 19.

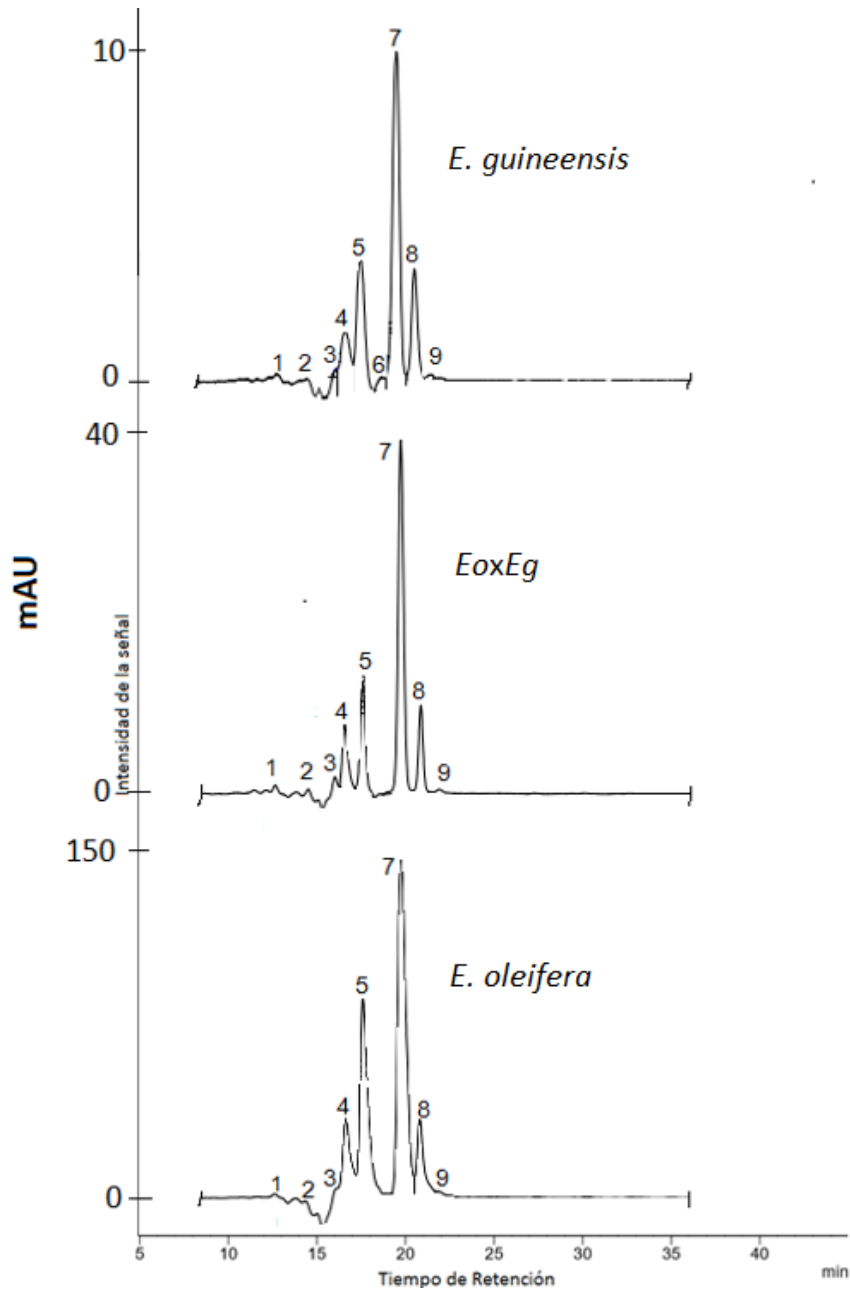


**Figura 19.** Aceites obtenidos de los diferentes materiales de palma aceitera que se estudiaron.

### 5.2.2 Perfil de carotenoides de los aceites analizados

Con el objetivo de identificar los carotenoides presentes en los aceites en cuestión, se procedió a analizar muestras de cada uno de estos por triplicado,

mediante el sistema HPLC-UV. Los cromatogramas obtenidos en la separación de los carotenoides no-saponificados de los aceites obtenidos de *Eg*, *Eo* y Amazon se muestran en la figura 20, mientras que en el cuadro VI, se muestra la lista de los carotenoides identificados de manera tentativa, con sus respectivos valores UV-Vis.



**Figura 20.** Cromatogramas del perfil de carotenoides de los tres aceites estudiados mediante HPLC-UV, monitoreados a 450 nm. Ver el cuadro VI para la asignación de los picos. La intensidad de las señales se encuentra en diferentes escalas.

**Cuadro VI.** Identificación de carotenoides de los tres aceites de palma analizados

Variedad Aceite	Número de pico	Tiempo de retención (min)	Identificación tentativa*	HPLC-UV-Vis máxima (nm)	D <sub>B</sub> /D <sub>II</sub>
<i>E. guineensis</i>	1	12,115	(13Z)- $\alpha$ -caroteno	IT	
	2	13,565	(13Z)- $\alpha$ -caroteno	IT	
	3	14,178	(Z)- $\beta$ -caroteno	IT	
	4	15,412	(13Z)- $\beta$ -caroteno	420-445-474	0,51
	5	16,212	(E)- $\alpha$ -caroteno	440-451-475	-
	6	17,133	(9Z)- $\alpha$ -caroteno	IT	
	7	17,936	(E)- $\beta$ -caroteno*	427-447-466	-
	8	18,750	(9Z)- $\beta$ -caroteno	426-444-466	0,27
	9	19,550	Desconocido	IT	
<i>E. oleifera</i>	1	11,998	(13Z)- $\alpha$ -caroteno	IT	
	2	12,860	(13Z)- $\alpha$ -caroteno	IT	
	3	14,338	(Z)- $\beta$ -caroteno	IT	
	4	15,559	(13Z)- $\beta$ -caroteno	419-443-466	0,50
	5	16,450	(E)- $\alpha$ -caroteno	421-445-473	-
	7	19,090	(E)- $\beta$ -caroteno*	426-446-472	-
	8	18,213	(9Z)- $\alpha$ -caroteno	428-450-477	0,19
	9	20,112	Desconocido	IT	
	<i>EoxEg</i>	1	11,879	(13Z)- $\alpha$ -caroteno	IT
2		12,886	(13Z)- $\alpha$ -caroteno	IT	
3		14,458	(Z)- $\beta$ -caroteno	IT	
4		15,477	(13Z)- $\beta$ -caroteno	418-443-472	0,56
5		16,288	(E)- $\alpha$ -caroteno	417-443-469	-
7		18,947	(E)- $\beta$ -caroteno*	422-446-470	-
8		18,044	(9Z)- $\alpha$ -caroteno	428-451-477	0,20
9		19,423	Desconocido	444-447-450	

\*El  $\beta$ -caroteno por ser el carotenoide predominante fue el único que se comparó contra un estándar. IT: identificado tentativamente.

En la figura 20 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada aceite analizado. Como se puede observar en dicha figura, los perfiles de carotenoides para los tres aceites son similares. Se destacan cuatro picos principales característicos, los cuales se identificaron de manera tentativa. El pico número 7, presente en las tres variedades, se identificó por medio de la comparación contra un estándar, en términos de tiempos de retención y espectro UV-Vis, correspondiendo al (E)- $\beta$ -caroteno.

En la literatura se encuentran varios estudios en donde, al igual que en este caso, no se cuenta con estándares para la identificación de todos los isómeros



presentes en los cromatogramas y por lo tanto se suele recurrir a metodologías alternas que se basan principalmente en los datos del espectro UV-Vis específico para cada isómero, y en asignaciones previamente tabuladas y documentadas en trabajos similares (Mortensen, 2005). De ahí que en la presente investigación se hayan empleado dichas técnicas para esclarecer la identidad de los picos obtenidos o al menos de la mayoría de éstos.

El pico número 4, primer pico mayoritario del cuadro VI se identificó tentativamente como el isómero (13Z)- $\beta$ -caroteno. Para ello se consideraron las características del espectro UV-Vis, en el cual las longitudes de onda de absorción máxima coinciden de forma cercana con las señales identificadas por De Rosso & Mercadante (2007) al analizar diferentes frutos del Amazonas, en el cual identifican también al (13Z)- $\beta$ -caroteno, con  $\lambda_{\text{máx}}$ : 420-444-470 nm.

Además, en estudios previos se emplea la técnica de "identificación de isómeros geométricos", la cual se explica en el apartado 4.4.2.2 y que aporta información sobre la identidad del carotenoide. Según lo reportado en la literatura, el valor de  $D_B/D_{II}$  para el (13Z)- $\beta$ -caroteno es 0,47; el cual, como se observa en el cuadro VI, es bastante cercano al obtenido experimentalmente para las tres variedades de aceite analizadas (De Rosso & Mercadante, 2007).

El pico número 5 fue identificado también de manera tentativa como (E)- $\alpha$ -caroteno. En este caso, las longitudes de onda máximas coinciden con los reportados en la literatura para este carotenoide. Según Meléndez-Martínez *et al.* (2013), para el (E)- $\alpha$ -caroteno los valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  son 420, 445, 473 nm. En este caso no se determinó el valor  $D_B/D_{II}$  puesto que no se trata de un isómero *cis*.

El pico 7 no sólo se identificó de manera tentativa como  $\beta$ -caroteno, sino que sus cromatogramas fueron comparados contra un estándar de este compuesto, en donde se observó que los tiempos de retención de este pico coincidieron de manera cercana con los del estándar. Además el principal punto de comparación para afirmar que dicho pico efectivamente se trataba de  $\beta$ -caroteno fue la investigación realizada por Kerfers (2016), en donde se trabajó al igual que en la presente investigación con muestras de *Eo*, *EoxEg* y *Eg*, inclusive las mismas poblaciones (Manaos, Amazon y Deli

Dami). De Rosso & Mercadante (2007) determinaron que las  $\lambda_{\text{máx}}$  para  $\beta$ -caroteno son 421, 452 y 478 nm, con lo cual puede corroborarse por medio de la literatura que los resultados obtenidos experimentalmente confirman la identidad del pico más sobresaliente como el  $\beta$ -caroteno.

El pico 8 se identificó tentativamente como (9Z)- $\beta$ -caroteno gracias a los espectros UV-Vis. De Rosso & Mercadante (2007) indican que dicho isómero presenta longitudes de onda de absorción máximas a 420, 447 y 472 nm. Estos valores son muy similares a los obtenidos experimentalmente para las tres variedades de aceite de palma estudiadas. Además, al tratarse de un estereoisómero con conformación *cis*, es posible determinar el valor  $D_B/D_{II}$ . Según De Rosso & Mercadante (2007), dicho valor es de 0,20, lo cual es bastante cercano al valor  $D_B/D_{II}$  de las especies *Eo* y *Eg* (0,27 y 0,19 respectivamente) en el híbrido Amazon dicha relación inclusive fue igual (0,20).

Los picos 1, 2 y 3 fueron detectados en trazas en todos los cromatogramas, y pudieron ser identificados tentativamente por comparación contra cromatogramas de otros estudios realizados con aceite de palma, considerando los tiempos de retención de los isómeros del  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno (De Rosso & Mercadante, 2007; Kerfers, 2016). El pico 6, que aparece entre el (E)- $\alpha$  caroteno y el (E)- $\beta$ -caroteno, se identificó tentativamente como (9Z)- $\alpha$ -caroteno. Dicho isómero se presentó únicamente en *Eg*. Este, había sido previamente identificado por Mortensen (2005), quien además determinó tres isómeros más en las posiciones entre el  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno. Estos isómeros, 9,13-Di-*cis*- $\beta$ -caroteno, 9,13,9'-Tri-*cis*- $\beta$ -caroteno y 9,9'-Di-*cis*- $\alpha$ -caroteno; sin embargo, no se observaron en el presente estudio.

Los picos 1, 2, 3 y 6, se identificaron tentativamente como isómeros tanto del  $\alpha$ - como del  $\beta$ -caroteno y la intensidad de los picos presentó una tendencia a ser bastante menor que la de los cuatro picos principales (4, 5, 7 y 8). Dichos resultados coinciden con el estudio de Chiu *et al.* (2009), quienes plantean que el 80% del total de carotenoides presentes en el aceite de palma corresponden a los compuestos  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, y el otro 20 % corresponde sobre todo a isómeros de dichos carotenoides.

Como puede observarse en la figura 20 y en el cuadro VI, varios carotenoides componen los cromatogramas de los aceites estudiados, y por lo general dichos

compuestos son repetitivos tanto entre las dos especies como en el híbrido. Sin embargo, en estudios previos y mediante el uso de tecnologías más avanzadas se ha podido determinar que el perfil del aceite de palma es incluso más complejo del obtenido. Tal es el caso de Kerfers (2016), quien, además de los compuestos identificados en el cuadro VI, pudo determinar otros isómeros del  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno que, por la sensibilidad propia del equipo empleado en el presente trabajo no pudieron ser observados. Además, determinó que a pesar de la mucha variedad genética que existe en cuanto a los cultivos de palma de *Eo*, *EoxEg*, y *Eg*, el perfil de carotenoides es el mismo en todos los genotipos, con variaciones mínimas.

En general los picos pequeños que logró identificar Kerfers (2016) se tratan de estereoisómeros del  $\alpha$ - y del  $\beta$ -caroteno. Según Meléndez-Martínez *et al* (2013), los carotenoides son propensos a la isomerización geométrica, por lo tanto, estos pueden encontrarse como *trans* (E) o *cis* (Z) isómeros. Sin embargo, la formación de estos últimos es bien conocida como resultado de la exposición a la luz, el calor y otras condiciones, tanto en extractos como en matrices alimentarias. De ahí que en los aceites analizados se encontrarán varios isómeros de esta naturaleza, pues como parte del proceso de inactivación enzimática, los frutos son autoclavados bajo condiciones de presión y temperatura muy elevadas, lo cual puede favorecer la formación de dichos estereoisómeros.

Por su parte, Mortensen (2005), además de identificar los picos anteriores en aceite de *Eg*, también detectó cantidades menores de licopeno en muestras altamente concentradas (30 g de carotenoides por cada 100 g de muestra). De Rosso & Mercadante (2007) identificaron luteína como componente minoritario del aceite de palma, la cual no pudo ser identificada en los aceites de palma del presente estudio, así como en los investigados por Kerfers (2016). Lo anterior se puede deber a variaciones en el perfil de carotenoides dentro de las poblaciones de *Eg* empleadas en dichos estudios, puesto que como se pudo constatar al realizar la presente investigación, dentro de cada especie se cuenta con una gran cantidad de poblaciones que han sido genéticamente modificadas con diferentes propósitos, de ahí que hayan cambios a nivel fisicoquímico en los aceites que se extraen a partir y por ende en el perfil y concentración de carotenoides.

### 5.2.3 Cuantificación del $\beta$ -caroteno de las diferentes variedades de aceite

En la figura 20 puede observarse como el pico de mayor importancia corresponde al (E)- $\beta$ -caroteno. Según De Rosso & Mercadante (2007), en el aceite de *Eg* sin refinar, el componente mayoritario es el (E)- $\beta$ -caroteno (representa más del 50 % del total de carotenoides), seguido del  $\alpha$ -caroteno ( $\approx 17$  %), 9-cis- $\beta$ -caroteno ( $\approx 13$  %) y demás isómeros del  $\alpha$ - y del  $\beta$ -caroteno, cuyas proporciones fueron menores al 6%. Debido a la cantidad e importancia del  $\beta$ -caroteno en aceites de palma, y al contar con un estándar, se decidió cuantificar su contenido exclusivo en cada una de las variedades de aceite estudiadas.

Como puede observarse en el cuadro VII, se encontró diferencia significativa en el contenido de  $\beta$ -caroteno entre los tres tipos de aceite del mesocarpo de los frutos de palma aceitera analizados, siendo la especie americana la que presentó el mayor contenido de  $\beta$ -caroteno, mientras que el híbrido interespecífico (Amazon) presentó, como era de esperarse, una concentración intermedia entre las concentraciones de sus "padres". Según Choo *et al.* (1998), el contenido total de carotenoides en *Eg* se ubica entre 500-700 mg/kg, entre 4300-4600 mg/kg para *Eo* y entre 1200-2400 mg/kg para *EoxEg*, por lo que las concentraciones obtenidas se encuentran en todos los casos por debajo de lo reportado.

Comparando con estudios anteriores, se determinó que hay una gran variación en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno en este tipo de aceite. Por ejemplo, Kerfers (2016) estudió el mesocarpo de cinco variedades de *Eo* y encontró concentraciones de  $\beta$ -caroteno que iban desde 505 ppm hasta 1799 ppm, por lo que las concentraciones determinadas en este trabajo se encuentran dentro de los valores reportados previamente. En el caso de la especie africana, se obtuvo una concentración de  $\beta$ -caroteno de 79,45 ppm. Cabe destacar que al ser esta especie la más utilizada comercialmente para extraer su aceite, es también la más estudiada. Entre las concentraciones de  $\beta$ -caroteno que se reportan se encuentran valores de 251 ppm para la variedad Deli Dami (Kerfers, 2016), también utilizada en el presente estudio. Por su parte, Yap *et al.* (1991) trabajaron con una variedad de *Eg* cuya concentración de  $\beta$ -caroteno fue aproximadamente 377 ppm, por lo que se puede observar que para el aceite estudiado en el presente trabajo se obtuvo concentraciones de dicho

carotenoide por debajo de los valores reportados en la literatura, lo cual puede deberse a variaciones genéticas en las plantas así como a diferentes estándares de madurez a la hora de cosechar dentro y entre países, lo cual hace que se obtengan variaciones en el contenido de los carotenoides (Clegg, 1973). Además, según Corley & Tinker (2003), el contenido de carotenoides varía extensamente racimos, e incluso entre frutos de un mismo racimo.

**Cuadro VII.** Cuantificación de la concentración de  $\beta$ -caroteno y su respectiva desviación estándar presente en los aceites de palma estudiados, mediante su análisis por HPLC-UV. Valores cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

Variedad de aceite	Concentración de $\beta$ -caroteno en los aceites (mg/kg de aceite)	Actividad provitamina A ( $\mu\text{g/g}$ aceite)*
<i>E.oleifera</i>	1408,42 <sup>a</sup> $\pm$ 59,26	117,37 <sup>a</sup> $\pm$ 4,94
<i>E.guineensis</i>	79,45 <sup>c</sup> $\pm$ 1,11	6,62 <sup>c</sup> $\pm$ 0,09
Amazon	307,75 <sup>b</sup> $\pm$ 20,50	25,65 <sup>b</sup> $\pm$ 1,71

\*Fuente: Institute of Medicine (2011).

Las concentraciones con valores intermedios de  $\beta$ -caroteno en el aceite de *EoxEg* eran de esperarse puesto que, según Corley & Tinker (2003), la concentración de  $\beta$ -caroteno en el híbrido se ubica en medio de las especies de las cuales proviene, lo cual pudo ser comprobado en este caso. Sin embargo, los valores de la concentración de  $\beta$ -caroteno obtenida se encuentran por debajo de lo reportado en la literatura, pues Yap *et al.* (1991) reportan valores que oscilan entre 865,58 ppm y 1311,20 ppm para dos híbridos de *EoxEg*. Por su parte, Kerfers (2016), quien también trabajó con el híbrido costarricense Amazon, reporta concentraciones de  $\beta$ -caroteno de 896 ppm, por lo que efectivamente hubo una diferencia considerable.

Las bajas concentraciones de  $\beta$ -caroteno encontradas en los aceites de *Eg* como *EoxEg*, inferiores a lo reportado en estudios previos, se pueden deber a procesos de hidrólisis propios de los aceites con alta concentración de AGL, en éste caso específicamente en dos aceites (ver cuadro IV). Según la normativa vigente, el porcentaje de AGL en aceites debe ser menor a 5,0 %. Sin embargo, en este caso se determinó 28,6% para *Eg* y 33,6% para *EoxEg*. Lo anterior pone en evidencia la

importancia de los procesos de neutralización a los cuales son sometidos los aceites en la industria aceitera como parte del proceso de refinamiento.

A pesar de las muchas variaciones que se pueden dar en los resultados de acuerdo a las condiciones antes mencionadas, la cuantificación de carotenoides es de suma importancia dado los beneficios que pueden proporcionar a la salud del consumidor. Sin embargo el muestreo es fundamental para poder comparar los resultados obtenidos con los de otros estudios, además de acompañar los resultados con información adicional, por ejemplo, cultivar, estado de maduración, parte analizada, origen geográfico. Sólo de esta manera, los resultados obtenidos pueden ser reproducidos de forma tal que contribuyan en la investigación de alimentos que puedan ser útiles como fuente, por ejemplo, de fortificación de otros productos (Rodríguez-Amaya, 1997).

Finalmente, es relevante observar cómo se relaciona la alta concentración de  $\beta$ -caroteno del aceite proveniente de *Eo* con su coloración. Como se observa en el cuadro V, en el caso de la *Eo* se tuvo un menor valor del parámetro  $L^*$  (luminosidad), lo cual indica que el aceite es más oscuro que los otros dos analizados. Según Yap *et al.* (1991), la rica coloración del aceite de palma se debe al alto contenido de carotenoides, de los cuales  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno son los principales, y representan alrededor del 90% del total. Por eso se pudo establecer una relación entre las diferentes coloraciones presentadas por los aceites de palma analizados con su respectiva concentración de  $\beta$ -caroteno. Por lo anterior se plantea que entre más oscuro es el color del aceite (menor valor de  $L^*$ ) mayor la concentración de  $\beta$ -caroteno.

#### **5.2.4 Actividad provitamina A de los aceites**

Al determinar la concentración de carotenoides en una determinada matriz alimentaria, uno de los factores importantes a destacar cuando se piensa en su propiedades nutritivas, es qué porcentaje de sus sus carotenoides es precursor de vitamina A. Entre los compuestos que destacan por su actividad provitamina A se encuentran:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina. Dado que los resultados de los aceites estudiados se dieron con base en la concentración de  $\beta$ -caroteno, fue posible calcular los RAEs. El término RAE fue introducido por el U.S. Institute of Medicine (IOM), para sustituir el término Retinol Equivalent (RE) empleado por la FAO/WHO,

esto con el propósito de tomar en consideración la actividad provitamina A de los carotenoides (bioeficacia). Sin embargo, en algunos estudios aún se encuentran los resultados en términos de RE (1 RAE=2 RE). En el presente trabajo las conversiones se realizaron según lo planteado por el Institute of Medicine (2001), el cual establece que por cada 12  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno se produce 1  $\mu\text{g}$  de retinol, que es equivalente a 1 RAE (Benadé, 2012).

En la tercera columna del cuadro VII, se pueden observar los RAE's de los aceites estudiados. En estudios previos realizados a aceites de diferentes variedades de palma aceitera, se han determinado concentraciones inferiores, como es el caso de De Rosso & Mercadante (2007), quienes estudiaron un aceite de palma comercial procedente de *Eg* y usando el factor de conversión de NAS-NRC en el cual 1 mg de  $\beta$ -caroteno produce 0.167 mg de retinol determinaron un valor de 1535  $\mu\text{g}$  RE/100 g de aceite, lo cual equivale a 8  $\mu\text{g}$  RAE/g de aceite (NRC, 1989). De igual manera se han encontrado concentraciones similares o incluso mayores en otras variedades de aceites. Por ejemplo, Trujillo-Quijano *et al.* (1990) analizaron frutos de palma aceitera de Brasil y reportaron valores de 12 404 – 21 691  $\mu\text{g}$  RE/100 g de aceite, lo cual equivale 62 – 108  $\mu\text{g}$  RAE/g de aceite. En la presente investigación, los resultados son más comparables contra los de Trujillo-Quijano *et al.* (1990), puesto que trabajan directamente con los frutos de palma y no con un aceite comercial que pudo ser sometido a procesos de refinamiento. Con base en esto, podría decirse que el aceite procedente del híbrido, como el de la variedad *Eg* tendrían concentraciones inferiores, sin embargo *Eo* se encontraría ligeramente por encima de dichos resultados.

Kerfers (2016) determinó que, en el caso de *Eo*, los RAEs obtenidos iban desde 14 hasta 126  $\mu\text{g}/\text{g}$  de aceite, entre 19 y 29  $\mu\text{g}/\text{g}$  de aceite para *Eg* y entre 17 y 67  $\mu\text{g}/\text{g}$  de aceite para *EoxEg*. Los resultados muestran la gran variabilidad genética de las plantas de palma que se pueden encontrar en las plantaciones nacionales. Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con los de Kerfers (2016), se puede observar cómo los RAEs del aceite de *Eo* se encuentran cercana al límite superior (117,37  $\mu\text{g}/\text{g}$  de aceite), el aceite de *Eg* presentó valores inferiores (6,62  $\mu\text{g}/\text{g}$  de aceite), mientras que el aceite de *EoxEg* también estuvo cerca del límite inferior (25,65  $\mu\text{g}/\text{g}$  de aceite). El hecho de que algunos resultados hayan sido inferiores puede

deberse a que los cálculos de los RAE's en la presente investigación no se realizaron con todos los carotenoides provitamina A presentes en el aceite de palma como sí lo hizo Kerfers (2016), sino que en el presente estudio los RAE's se calcularon con base en el  $\beta$ -caroteno, que si bien es el principal carotenoide provitamina A presente en dichos aceites, no es el único.

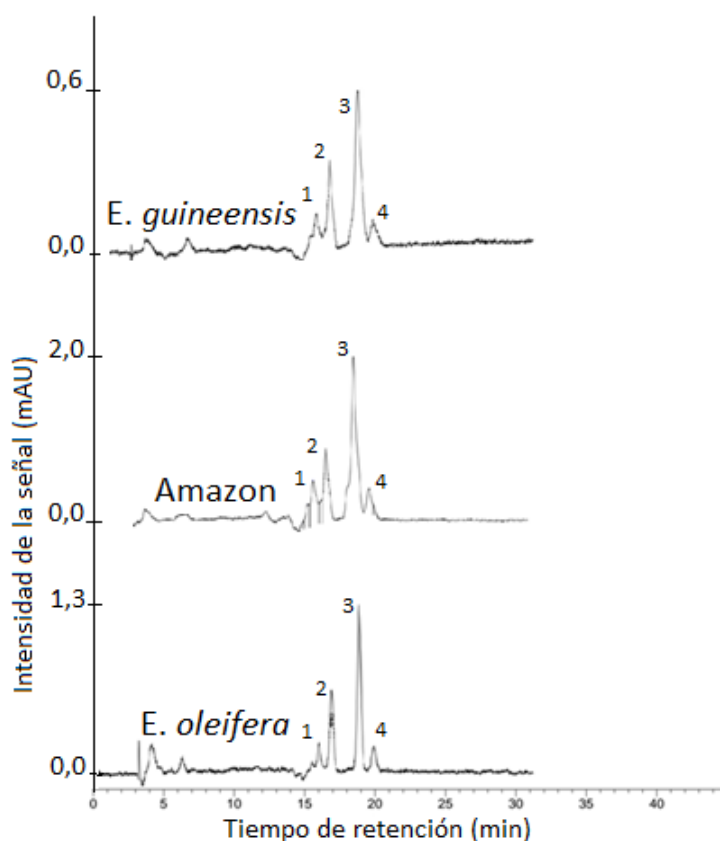
Según el Institute of Medicine (2001), la dosis diaria recomendada de vitamina A es de 700 y 900  $\mu\text{g}$  RAE para una mujer y un hombre mayor de 19 años, respectivamente, por lo que si se considera en este caso el aceite que obtuvo las concentraciones intermedias (*EoxEg*) bastaría con 27 y 35 g de aceite para satisfacer la demanda diaria de vitamina A, respectivamente. Benadé (2012) y Solomons & Orozco (2003) propusieron en estudios previos que el factor de conversión de  $\beta$ -caroteno en RAE específicamente para el aceite de palma no debería ser de 12:1, sino de 2:1, es decir 2  $\mu\text{g}$   $\beta$ -caroteno equivalen a 1  $\mu\text{g}$  RAE, por lo que si se tomara en consideración dicho factor de conversión la dosis diaria de aceite Amazon debería ser de 4,5 g para las mujeres y 6 g para los hombres. A pesar de eso, en el presente estudio se le dio prioridad al factor de conversión del Institute of Medicine (2001), puesto que es considerado como el más realista.

### **5.3 Bioaccesibilidad del $\beta$ -caroteno presente en los aceites y aderezos**

La fracción supernatante obtenida después de la centrifugación (operación realizada durante la simulación *in vitro* del proceso de digestión) corresponde a los carotenoides que fueron liberados de la matriz alimentaria, mientras que la fracción micelar o bioaccesible corresponde a la recuperada después de la microfiltración del supernatante (Chacón, 2014). Como era de esperarse, el carotenoide predominante al finalizar el proceso de digestión *in vitro* fue el  $\beta$ -caroteno, el cual, como se observa en la figura 21, presentó un comportamiento similar en los tres aceites estudiados, siendo en todos los casos el pico más sobresaliente de los cuatro principales (la asignación de los picos concuerda con la establecida en el cuadro VI). Si se compara el cromatograma obtenido al finalizar el proceso de digestión *in vitro*, contra el cromatograma inicial de los aceites (figura 20), se puede observar cómo la intensidad de las señales (picos) disminuye. Esto era de esperarse, pues, según Rein *et al.* (2013), la biodisponibilidad



del  $\beta$ -caroteno procedente de fuentes vegetales es generalmente baja (10–65%), debido a la resistencia a la digestión que presenta dicho carotenoide, entre otros factores que se expondrán más adelante.



**Figura 21.** Espectros de separación de los carotenoides presentes en la fase micelar una vez que se ha realizado el proceso de bioaccesibilidad de los tres aceites de palma analizados mediante HPLC-UV, monitoreados a 450 nm. (La asignación de los picos puede observarse en el cuadro VI).

En general, el nivel de carotenoides liberados así como los incorporados a las micelas y por ende el porcentaje de  $\beta$ -caroteno bioaccesible resultó ser bastante diferente entre variedades. En el cuadro VIII se muestran los contenidos de  $\beta$ -caroteno en la fracción micelar.

**Cuadro VIII.** Resultados obtenidos en la determinación de  $\beta$ -caroteno inicial y en la fase micelar (después de realizar la digestión *in vitro*) de los aceites de *Eg*, *Eo*, *EoxEg*. Valores cuyas letras son diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Los resultados se presentan con su respectiva desviación estándar

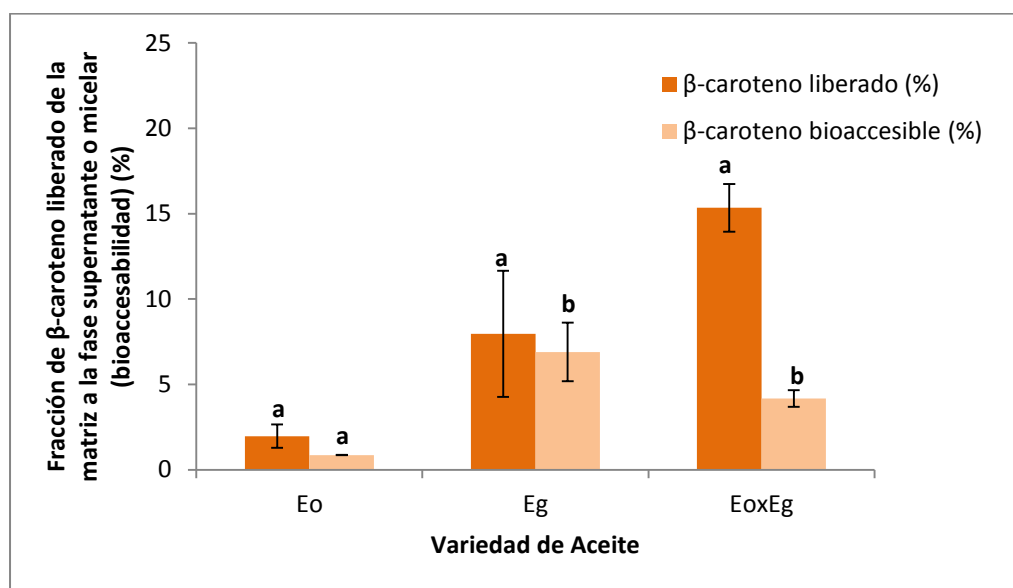
Variedad de aceite	Concentración de $\beta$ -caroteno inicial (mg/kg de aceite)	Concentración de $\beta$ -caroteno en la fracción micelar (mg/kg de aceite)
<i>Eo</i>	1408,42 <sup>a</sup> $\pm$ 59,26	12,25 <sup>a</sup> $\pm$ 0,56
<i>Eg</i>	79,45 <sup>c</sup> $\pm$ 1,11	5,48 <sup>b</sup> $\pm$ 1,61
<i>EoxEg</i>	307,75 <sup>b</sup> $\pm$ 20,50	12,86 <sup>a</sup> $\pm$ 2,19

Como se observa en el cuadro VIII la concentración de  $\beta$ -caroteno en la fracción micelar del aceite de *Eg* (5,48 mg/kg de aceite) es significativamente menor que en los aceites de *Eo* y *EoxEg* (12,25 y 12,86 mg/kg de aceite respectivamente). Es decir que al finalizar la digestión dos situaciones pudieron presentarse. La primera es que se logra una mejor formación de las micelas con los aceites provenientes de *Eo* y de *Eg*, tendencia similar a la determinada antes de la digestión para cada tipo de aceite, en donde  $Eo > Amazon > Eg$ . La segunda situación que se pudo haber presentado es que las micelas se hayan formado de manera similar en los tres tipos de aceite pero guardando siempre la proporción de que en *Eg* la concentración de  $\beta$ -caroteno inicial era menor y por ende la concentración de este en la fracción micelar también lo fue.

En la figura 22, entre otras cosas se muestra el porcentaje de bioaccesibilidad. El cual hace referencia a la relación entre la concentración de  $\beta$ -caroteno en la fracción micelar, versus la concentración que había al inicio. Se puede observar cómo varía el porcentaje de  $\beta$ -caroteno bioaccesible entre las fuentes de aceite, al punto que resultan ser significativamente diferentes para éste parámetro (con magnitudes de bioaccesibilidad que van desde 0,87% para *Eo*, hasta 6,88% para *Eg*). Lo anterior era de esperarse, puesto que es la consecuencia de la gran diferencia en la concentración inicial de  $\beta$ -caroteno presente en los aceites (columna 2 del cuadro VIII).

En la figura 22 también se muestra el porcentaje de  $\beta$ -caroteno liberado (antes de la filtración) y bioaccesible (después de filtrar). En general se puede observar que los porcentajes son similares a los reportados previamente para alimentos de origen vegetal. Si bien no se tienen estudios previos sobre la bioaccesibilidad de los

carotenoides de aceite de palma, sí hay sobre otras fuentes alimentarias de origen vegetal. Por ejemplo, Chacón (2014) expone los resultados de bioaccesibilidad del sapote, en donde dicho porcentaje fue de alrededor de 2%. El tipo de matriz alimentaria que se estudia tiene mucha influencia sobre el porcentaje de bioaccesibilidad. En este caso específico se trabajó con aceites, los cuales son una matriz lipídica que por una parte no cuentan con la interferencia de otras matrices vegetales en donde los carotenoides son difíciles de liberar. Ejemplo de lo anterior son las sólidas estructuras de las paredes celulares, o como en el caso de las carnes, donde los carotenoides se encuentran atrapados en una red densa de fibras en las estructuras musculares (Johnston *et al.*, 2000., Kotate-Nara & Nagao, 2011). Sin embargo, al ser los aceites sustancias compuestas en un 98-99 % de triglicéridos, que a su vez están constituidos principalmente de ácidos grasos, podría dificultarse la formación de las micelas para la posterior absorción de los nutrientes, sobre la causa de lo anterior se profundizará más adelante (Delgado & Días, 2005).



**Figura 22.** Fracción de  $\beta$ -caroteno recuperado de la fase supernatante (antes de filtrar), así como en la fracción micelar (bioaccesibilidad) de los tres aceites analizados mediante HPLC-UV y monitoreada a 450 nm. Letras diferentes dentro de un mismo tipo de aceite indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Las líneas superiores indican la desviación estándar.

La diferencia significativa entre la bioaccesibilidad de los tres aceites podría relacionarse con la tasa de hidrólisis lipídica, la cual es influenciada por la concentración de sales biliares y lipasas (Jin Hur *et al.*, 2011). La hidrólisis lipídica puede ser mayor o menor según la cantidad de lípidos que ingresa al sistema digestivo, por lo que era de esperarse que aceites con diferente composición de sus ácidos grasos presentaran diferentes porcentajes de absorción. Por su parte, Verrijssen *et al.* (2015) destacan que la velocidad de hidrólisis de la lipasa puede depender de diferentes factores; entre ellos, el tamaño de las gotas de aceite, por ejemplo, influye en el área de la superficie lipídica disponible para la lipasa. Además, la composición de la superficie de las gotas y las propiedades reológicas del medio circundante son importantes también.

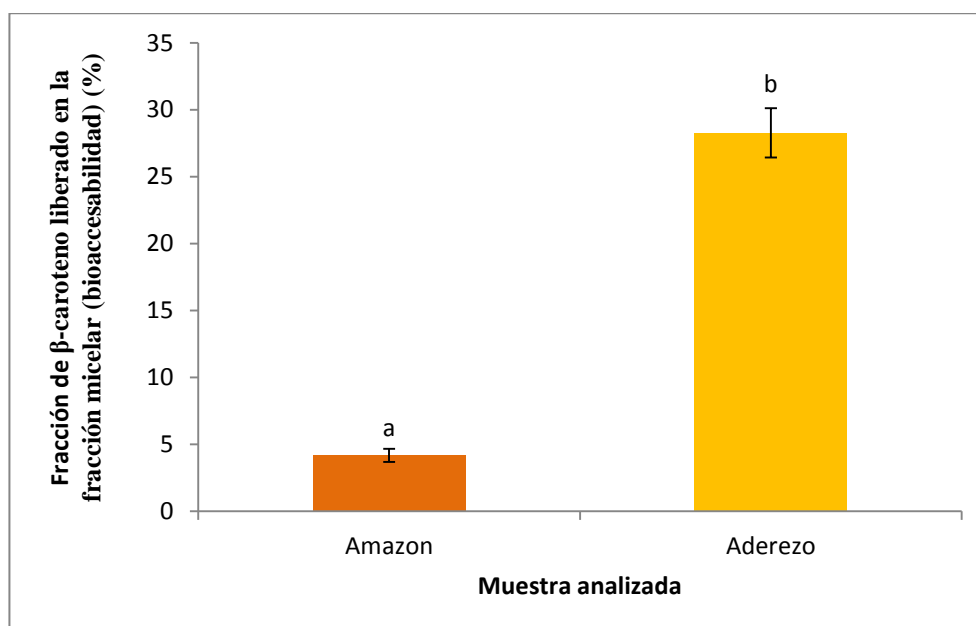
Dado que los carotenoides son micronutrientes lipofílicos es necesario entender el proceso de digestión de los lípidos para relacionar las diferencias en la digestión de los carotenoides de los aceites. Como se planteó anteriormente, las diferencias en las concentraciones iniciales de  $\beta$ -caroteno en los aceites podrían relacionarse con la composición química de estos, la cual es diferente, una de las diferencias es la saturación de los ácidos grasos que los componen, en la cuál se determinaron diferencias por medio del IY. Según Verrijssen *et al.* (2015) cuanto más saturada y larga la cadena del ácido graso, menor es la incorporación de estos en las micelas. En este contexto, Karupaiyah & Sundram (2007) encontraron que cadenas largas y saturadas de AGLs son pobremente absorbidas porque tienden a formar jabones en el intestino delgado debido a sus fuertes interacciones electrostáticas con minerales catiónicos multivalentes (por ejemplo: calcio o magnesio, presentes en los jugos digestivos) y debido a su alto punto de fusión (Verrijssen *et al.*, 2015).

Considerando que por lo general los aceites de palma no se consumen directamente, sino que se integran en la dieta, ya sea al utilizarse para cocinar, freír, o aderezar, por mencionar algunos ejemplos, se decidió determinar el efecto que tiene sobre la bioaccesibilidad la reducción del porcentaje de aceite mediante la elaboración de un aderezo con únicamente 30% de aceite Amazon. Los resultados obtenidos de dicho experimento se muestran en el cuadro IX y en la figura 23.

**Cuadro IX.**  $\beta$ -caroteno presente en la fase micelar después de la digestión *in vitro* de las muestras del aderezo comparadas con las del aceite Amazon

Muestra	Concentración de $\beta$ -caroteno en la fracción micelar (mg/kg)
Aderezo	26,11 <sup>a</sup> $\pm$ 6,60
Amazon	12,86 <sup>b</sup> $\pm$ 2,19

Como se puede observar en el cuadro IX, la concentración de  $\beta$ -caroteno en la fracción micelar del aderezo fue más del doble de la presentada cuando se determinó la bioaccesibilidad del aceite. Por su parte, en la figura 23 se presenta el efecto de la integración del aceite dentro de una formulación (en este caso el aderezo) versus la determinación de la bioaccesibilidad del aceite directamente. Como puede observarse, la bioaccesibilidad del aderezo (28,3%) es alrededor de 7 veces más bioaccesible que el aceite (4,2%), lo cual es un claro ejemplo de la importancia que tiene la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de los carotenoides.



**Figura 23.** Porcentaje de  $\beta$ -caroteno bioaccesible (fracción micelar) en las muestras de aceite Amazon y del aderezo elaborado a base de este. Las barras superiores indican la desviación estándar de los resultados.

Estudios previos han determinado un efecto positivo entre la bioaccesibilidad de los carotenoides y la adición de algún tipo de lípido a la matriz alimentaria

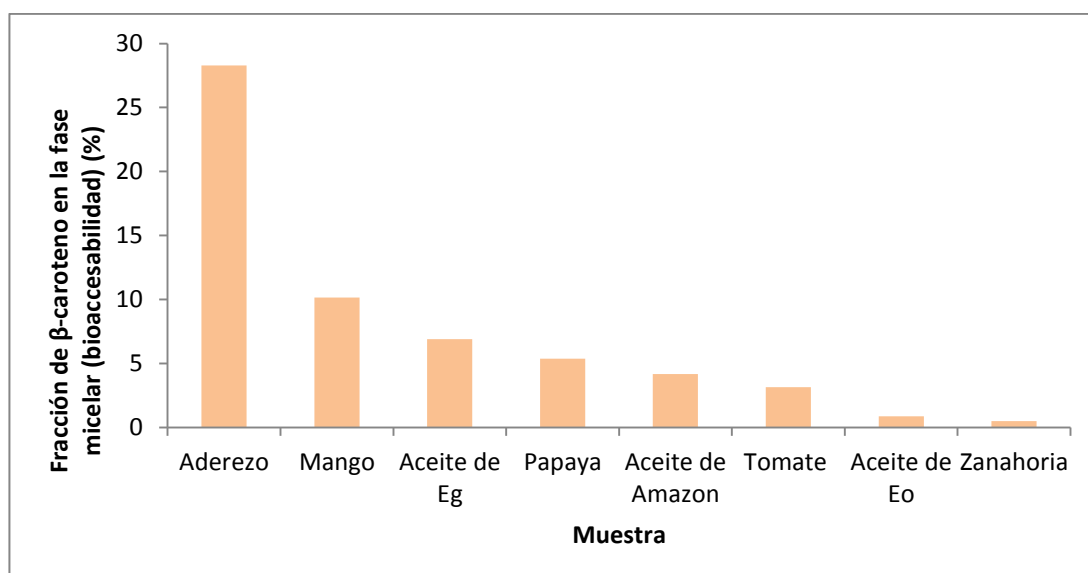
(Schweiggert *et al.*, 2012; Hedrén *et al.*, 2002). La absorción intestinal de carotenoides depende de la presencia de grasa; sin embargo, la cantidad requerida para obtener una óptima bioaccesibilidad/biodisponibilidad no ha sido claramente definida, debido a la gran variabilidad que presentan los resultados. Posiblemente, la cantidad agregada de grasa puede determinar la medida de: 1) los carotenoides liberados de las matrices vegetales, 2) la transferencia de los contenidos gastrointestinales a la fase grasa, y 3) la solubilización en micelas (Dimitrov *et al.*, 1988; Prince & Frisoli, 1993).

Usando el sistemas de digestión *in vitro*, se ha visto cómo la adición de aceites en muestras animales o vegetales con bajo contenido de grasa *per se* puede favorecer la absorción de los carotenoides del alimento. Así, Hedrén *et al.* (2002) determinaron que utilizar un 20% de aceite de cocina sobre muestras de zanahoria crudas liofilizadas aumenta la bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno en un 30%. En nuestro caso emplear únicamente un 30% de aceite Amazon (aderezo) en vez del 100 % (aceite de Amazon) aumenta la bioaccesibilidad en alrededor de 24%. Es decir que el exceso de grasa disminuyó la bioaccesibilidad, por lo que valdría la pena estudiar la proporción de aceite adecuada para obtener el máximo contenido de  $\beta$ -caroteno bioaccesible.

El hecho de que el exceso de grasa haya limitado la bioaccesibilidad de los aceites puede deberse a una saturación del sistema de digestión *in vitro*, puesto que el método emplea una cantidad limitada de enzimas, colesterol esterasa (lipasa) por ejemplo. Las lipasas catalizan la hidrólisis de TAG en la interfase lípido-agua. Por lo que es probable que en los aceites, las lipasas hayan hidrolizado los TAG hasta consumirse la enzima por completo y a partir de ese momento se haya afectado la bioaccesibilidad de los carotenoides. Mientras que en el aderezo al emplearse sólo el 30% del aceite, es posible que las lipasas hayan podido ejercer de una mejor manera su trabajo. De igual manera en el aderezo, además de aceite se empleó vinagre, lo cual pudo variar el pH del alimento y favorecer la acción de las enzimas, pues se conoce que las enzimas tienen un rango de pH óptimo en el cual presentan la máxima eficiencia (Rivera & García, 2007).

Finalmente, y con el objetivo de tener una idea del rango en que se ubican los resultados de bioaccesibilidad obtenidos para los aceites, en la figura 24 se presentan

los resultados obtenidos en el presente trabajo, y se comparan con la bioaccesibilidad de diferentes frutas y vegetales que fueron publicados previamente en el estudio de Schweiggert *et al.* (2012). Se emplean los resultados de dicho estudio para compararlos con los aceites y aderezo, puesto que los autores emplean la misma metodología para el proceso de bioaccesibilidad y, además, puesto que el estudio abarca varios alimentos de origen vegetal, como en el presente estudio. Sin embargo, cabe destacar que las matrices alimentarias que se están comparando son completamente diferentes, ya que en el presente estudio se trata de aceites (matriz aproximadamente 100 % lipídica) vs frutas, con porcentajes muy inferiores de lípidos y mayor contenido de fibras, azúcares y demás.



**Figura 24.** Bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno procedente de diferentes fuentes alimentarias. Los valores del mango, papaya, tomate y zanahoria fueron tomados de Schweiggert *et al.* (2012).

Como se observa en la figura 24, las fuentes de origen vegetal normalmente presentan porcentajes bajos de bioaccesibilidad (<10,1%). Sin embargo, el porcentaje de  $\beta$ -caroteno bioaccesible del aderezo elaborado con 30% de aceite procedente de *EoxEg* presentó un porcentaje de más del doble (28,3%) que el del mango (10,1%). De acuerdo con lo resultados obtenidos, cabe destacar la importancia de buscar la relación ideal de grasa que optimice el porcentaje de bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno, puesto que no hay estudios suficientes que muestren en qué proporción o hasta qué

punto el porcentaje de grasa agregado deja de aumentar la bioaccesibilidad de los carotenoides en diferentes fuentes, lo cual puede venir a representar un importante avance en términos de salud alimentaria causada por deficiencias de vitamina A (Hedrén *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2004).



## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

- Los IR de los tres aceites de palma estudiados no presentaron diferencia significativa entre sí y además se encuentran dentro del rango establecido por la normativa vigente, la cual no diferencia entre variedades de aceite, sino que se usa un IR para aceite de palma en general.
- Al relacionar el IS con la longitud de las cadenas de los ácidos grasos que componen los aceites estudiados se determina que estas son muy similares entre sí, puesto que no se encontró diferencia significativa entre los tipos de aceites y, además, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango reportado en la literatura para IS de aceite de palma en general.
- El aceite de *Eo* caracterizado en la literatura como un aceite con una mayor composición de ácidos grasos insaturados en su estructura efectivamente presentó un mayor índice de yodo, de ahí que ordenando de forma descendente los aceites de acuerdo a dicho índice se tendría  $Eo > Egx > Eo > Eg$ . Además, se presentaron diferencias significativas entre los tres aceites para este parámetro, lo cual deja ver que realmente el híbrido desarrollado por la empresa ASD cuenta con características fisicoquímicas mejoradas, como el hecho de ser un aceite más insaturado que el aceite de uso comercial actual (*Eg*).
- Los aceites utilizados en el presente estudio presentaron IP dentro del rango permitido según los valores establecidos por el CODEX, lo cual es normal al trabajar con aceites recién extraídos y que además han sido caracterizados previamente por su alta capacidad antioxidante.
- Solamente el aceite proveniente de *Eo* se encuentra dentro del rango de AGL reportados como aceptables para cumplir con los estándares de calidad. Lo cual pone en manifiesto la importancia de los procesos de refinación que se realizan en la industria aceitera para eliminar dichas sustancias que causan el deterioro de los aceites.

- De acuerdo con algunas de las propiedades fisicoquímicas estudiadas, como el II, IP y el IA, se logra comprobar que la calidad nutricional del aceite proveniente de la especie americana es mejor que la del híbrido, y éste a su vez mejor que la especie africana.
- El perfil de carotenoides es básicamente el mismo en los tres aceites del mesocarpo de palma aceitera analizados; en los cuales destacan cuatro picos: (13Z)- $\beta$ -caroteno, (E)- $\alpha$ -caroteno, (E)- $\beta$ -caroteno y (9Z)- $\beta$ -caroteno siendo el (E)- $\beta$ -caroteno el componente principal.
- El contenido de  $\beta$ -caroteno varía significativamente en los aceites de palma estudiados. Se presentó una mayor concentración en la especie americana, seguido del híbrido interespecífico y finalmente la especie africana con el menor contenido de dicho carotenoide.
- El contenido de  $\beta$ -caroteno presente en cada aceite pudo relacionarse con la coloración, pues a mayor concentración de éste, más intenso el color rojizo del aceite.
- Se obtuvo porcentajes de bioaccesibilidad significativamente diferentes entre los aceites de *Eo* (0,87%), *EoxEg* (4,18%) y *Eg* (6,88%) con la particularidad de que el  $\beta$ -caroteno fue el principal compuesto presente en la fracción micelar.
- El  $\beta$ -caroteno del aceite de Amazon es alrededor de 7 veces más bioaccesible cuando se utiliza en una proporción de 30% (aderezo) en comparación con 100% aceite.
- Los aceites pudieron haber saturado el sistema de digestión *in vitro* reduciendo la eficiencia de las enzimas lipolíticas, lo que pudo desencadenar en la diferencia de bioaccesibilidad de los aceites puros respecto al aderezo.
- Los otros ingredientes del aderezo, como por ejemplo el vinagre y las otras sales, pudieron modificar el medio en que se realizó la digestión *in vitro*, por ejemplo, con variaciones en el pH haciendo que las enzimas trabajaran de manera más eficiente y por ende la bioaccesibilidad del aderezo fuera mayor.

## 6.2 Recomendaciones

- Se recomienda emplear un disolvente diferente al cloroformo a la hora de redissolver los extractos y los aceites para su posterior inyección en el equipo HPLC, pues se han visto mejores resultados en la separación de picos a la hora de emplear disolventes como MTBE, MeOH o mezclas de éstos.
- Se recomienda realizar más variaciones al gradiente de elución de acuerdo con la metodología desarrollada por Kerfers (2016), puesto que es posible obtener cromatogramas con picos mejor separados y mayor cantidad de señales.
- Se recomienda ver el comportamiento de la bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno en aderezos elaborados con aceites de todas las variedades para corroborar la tendencia del aumento de la concentración de éste en la fracción micelar cuando se emplea parcialmente en la formulación.
- En estudios previos se ha visto que el tamaño del glóbulo de grasa, así como los emulsificantes pueden influir en la bioaccesibilidad de los carotenoides, por lo tanto, se recomienda estudiar diferentes tiempos de homogeneización a la hora de realizar el aderezo, así como otros tipos de gomas y comparar las bioaccesibilidades obtenidas.
- Se sugiere además trabajar en una metodología para la determinación de la bioaccesibilidad *in vitro* para matrices más lipídicas, puesto que la empleada había sido probada en frutas, vegetales, algunos productos cárnicos, pero no en aceites, por lo cual hay etapas que podrían mejorarse con el objetivo de obtener mejores resultados.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, H.; JOUANNIC, S.; ESCOUTE, J.; DUVAL, Y.; VERDEIL, J.; TREGEAR, J.W. 2005. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *American Journal of Botany*, 92 (11), 1836-1852.
- ALMINGER, M., SVELANDER, C., WELLNER, A., MARTINEZ-TOMAS, R., BIALEK, L., LARQUE, E & PEREZ-LLAMAS, F. 2012. Applicability of in vitro models in predicting the in vivo bioavailability of lycopene and  $\beta$ -carotene from differently processed soups, *Food and Nutrition Sciences* 3, 477–489.
- ALVARADO, A., ESCOBAR, R & PERALTA, F. 2010. El Programa de Mejoramiento Genético de la Palma de Aceite de ASD Costa Rica y su Contribución a la Industria. *ASD Oil Palm Papers* 34, 17-32. Costa Rica.
- ALVARADO, A., HENRY, J. 2015. Comportamiento Agronómico del híbrido O x G Amazon. *ASD Oil Palm Papers*. 44, 01-07. Costa Rica.
- AOAC. 2005a. Official Methods of Analysis of AOAC International. Method 920.158 Iodine Absorption Number of Oils and Fats (Hanus Method). 18 edición.
- AOAC. 2005b. Official Methods of Analysis of AOAC International. Method 920.160 Saponification Number (Koettstorfer Number) of Oils and Fats. 18 edición.
- AOAC. 2005c. Official Methods of Analysis of AOAC International. Method 920.212 Specific Gravity (apparent) of oils. Pycnometer method. 18 edición.
- ASD. 2010. El programa de mejoramiento de la palma aceitera de ASD. INTERNET: [http://www.asdcr.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54&Itemid=60&lang=es](http://www.asdcr.com/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=60&lang=es). Consultado el: 26/02/2016.
- BADUI, S. 1990. Química de los alimentos. 2 ed. Alhambra Mexicana. México.
- BAILEY, A. 2001. Aceites y grasas industriales. REVERTE. Nueva York.
- BAILEY, P., BAILEY, C., ESCALONA, H. 1998. Química Orgánica. Conceptos y aplicaciones. Prentice Hall. México.
- BELITZ, H. D & GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. 2 da edición. Acribia, Zaragoza.

- BENADÉ, A. 2012. Red Palm Oil Carotenoids- Potencial Role in disease prevention. In: Watson, R.R & Preedy, V. (eds.) *Biactive Food as Dietary for Cardiovascular Disease*. Elsevier Science. Burlington. 333-343 pp.
- BOATELA, J., CODONY, R & LÓPEZ, P. 2004. *Química y Bioquímica de los Alimentos II*. Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona. España.
- BOSS, E., MACIEL, R., WOF, R., RIOS, L & PEREZ, H. 2007. Palm oil carotenoids extraction: preparation process optimization. School of Chemical Engineering. University of Campinas.
- BRITTON, G. 2008. Functions of intact carotenoids. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids*. pp. 189–212. Basel: Birkhäuser. INTERNET: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7643-7499-0\\_10](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7643-7499-0_10) Consultado el: 21/02/2016.
- BRITTON, G., KHACHIK, F. 2009. Carotenoids in Food. In *Carotenoids. Nutrition and Health*. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, eds, 5, 45-80. Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin.
- BRITTON, G., LIAEEN, S. & PFANDER, H. 1995. *Carotenoids: Spectroscopy*. Birkhauser Verlag. 1B:13-62. Basel, Boston, Berlin.
- BROWN, M., FERRUZZI, M., NGUYEN, M., COOPER, D., ELDRIDGE, A., SCHWARTZ, S & WHITE, W. 2004. Carotenoids bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80, 396-403.
- BUITIMEA, N. 2008. *Formulación de una grasa cero trans a base de estearina de palma y aceite de cártamo en ácido oleico para tortillas de harina de trigo*. Tesis M.Sc. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. México.
- Cámara Nacional de Productores de Palma (CANAPALMA). 2014. Información del cultivo de palma en Costa Rica. INTERNET: [http://www.canapalma.cr/images/CANAPALMA\\_Informacion\\_Cultivo\\_de\\_PA\\_en\\_Costa\\_Rica\\_12Dic2014.pdf](http://www.canapalma.cr/images/CANAPALMA_Informacion_Cultivo_de_PA_en_Costa_Rica_12Dic2014.pdf) Consultado el: 13/11/2016.

- CAÑIZO, J.A. 2011. Palmeras: todos los géneros y 565 especies. 3era edición. Mundi – Prensa. Madrid, España. 1157 pp.
- CASTRO, M. 2004. Estudio de grasas, aceites y otros derivados producidos y/o comercializados en Costa Rica, considerando índices de aterogenicidad, índices de caracterización, índices de posible deterioro y etiquetado. Tesis Lic. Tecnología de Alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.
- CHACÓN, T. 2014. Zapote (*Pouteria sapota*) como fuente de carotenoides: ultraestructura de cromoplastos y bioaccesibilidad. Tesis M.Sc. Académica en Ciencia de Alimentos. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- CHINCHILLA, C. 2003. Manejo integrado de problemas fitosanitarios en palma aceitera *Elaeis guineensis* en América Central. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 67, 69-82. Costa Rica.
- CHIU, M., DE MORAIS, C & GUARALDO, L. 2009. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. Desalination 245, 783-786.
- CHOO, Y.M. 1995. Carotenoids in palm oil. Palm Oil Development 22, 1-6. Malaysia.
- CHOO, Y.M., MA, A.N & YAP, S.C. 1998. Carotenes, vitamin E and sterols in oils from *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* and their hybrids. Palm Oil Developments 27 (1), 1-9.
- CMOLIK, J., POKORNÝ. 2000. Physical refining of edible oils. European Journal of Lipid Science and Technology 102 (7), 472-486.
- CLEGG, A.J. 1973. Composition and related nutritional and organoleptic aspects of palm oil. Journal of the American Oil Chemists' Society 50(8), 321-324.
- COLLE, I. J. P., LEMMENS, L., VAN BUGGENHOUT, S., MET, K., VAN LOEY, A. M., & HENDRICKX, M. E. 2013. Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. Food Research International 51(1), 32-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.024>.

- Comisión del Codex Alimentarius (CODEX). 2015. Informe de la 24a reunión del comité del CODEX sobre grasas y aceites. Programa conjunto FAO/OMS. Roma, Italia.
- CORLEY R.V.H.; GRAY, B.S.; NG, S.K. 1971. Productivity of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Malaysia. *Experimental Agriculture* 7, 129-136.
- CORLEY, R.V.H.; TINKER, P.B. 2009. La palma de aceite. 4ta Edición (versión en español). Fedepalma. 604 pp. Bogotá, Colombia.
- CORLEY, R.V.H., TINKER, P.B. 2003. The oil palm. 4ta Edición. Blackwell Science, Oxford, Malden, MA.
- DE ROSSO, V., MERCADANTE, A. 2007. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5062-5072.
- DELGADO, N., DÍAS, J. 2005. Fundamentos de Nutrición Parental. Editorial Médica Panamericana. Bogotá, Colombia.
- DELGADO-VARGAS, F., PAREDES-LÓPEZ, O. F. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Ratón, USA: CRC Press.
- DESPRADEL, C. 2013. Cosechas de la República Dominicana. Vicini.
- DIMITROV, NV; MEYER, C; ULLREY, DE; CHENOWETH, W; MICHELAKIS, A; MALONE, W; BOONE, C & FINK, G. 1988. Bioavailability of beta-carotene in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 48 (2), 298-304.
- DONHOWE, E. G., & KONG, F. 2014. Beta-carotene: Digestion, microencapsulation, and in vitro bioavailability. *Food and Bioprocess Technology* 7(2): 338–354.
- DRANSFIELD, J.; UHL, N.W. 1998. Families and genera of vascular plants, flowering plants: monocotyledons. Springer-Verlag. 306-389. Berlin, Alemania
- DRANSFIELD, J; UHL, N.W.; ASMUSSEN, C.B.; BAKER, W.J.; HARLEY, M.M.; LEWIS, C. E. 2008. Genera palmarum: The evolution and classification of palms. Kew Publishing. Reino Unido 732 p.

- DUNFORD, N.T. 2012. Advancements in oil and oilseed processing. Food and industrial bioproducts and bioprocessing, John Wiley and Sons Inc., Iowa, USA. 115-143 p.
- EKESA, B., POULAERT, M., DAVEY, M.W., KIMIYWE, J., VAN DEN BERGH, I., BLOMME, G., & DHUIQUE-MAYER, C. 2012. Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in bananas (*Musa spp.*) and derived dishes in African countries. Food Chemistry 133, 1471-1477.
- FAO/WHO. 2001. Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand.
- FAO/WHO. 2002. Vitamin A. FAO/WHO, Human vitamin and mineral requirements: report of a joint FAO/WHO expert consultation. Roma.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I., JARÉN-GALÁN, M., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J., PÉREZ-GÁLVEZ, A., HORNERO-MÉNDEZ, D. 2012. Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. Food Research International 46 (2), 438-450.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2006. Palma de Aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Fichas Técnicas Productos Frescos y Procesados.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2011. Southeast Asian forests and forestry to 2020: Subregional report of the second Asia-Pacific forestry sector outlook study. Bangkok. INTERNET. [www.fao.org/docrep/013/i1964e/i1964e00.htm](http://www.fao.org/docrep/013/i1964e/i1964e00.htm). Consultado 24/09/2014
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2013. Analysis of Incentives and Disincentives for Palm Oil in Ghana. INTERNET. <http://www.fao.org/3/a-at550e.pdf>. Consultado 24/10/2015.
- FRANCO, P. 2010. Cosecha del Fruto de la Palma de Aceite. Convenio de asociación entre Fedepalma, UNIMINUTO, UNAD Uninariño y otros. Primera edición. Bogotá, Colombia.



- GARRETT, D. A., FAILLA, M. L., & SARAMA, R. J. 1999. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10), 4301-4309.
- GLEIZE, B., TOURNIAIRE, F., DEPEZAY, L., BOTT, R., NOWICKI, M., ALBINO, L., LAIRON, D., KESSE-GUYOT, E., GALAN, P., HERCBERG, S., and BOREL, P. (2013). Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. *British Journal of Nutrition* 110 (01), 1-10.
- GOH, S.H., CHOO, Y.M., & ONG, A.S.H. 1985. Minor components of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62, 237-240.
- GOÑI, I., SERRANO, J., & SAURA-CALIXTO, F. 2006. Bioaccessibility of  $\beta$ -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (15), 5382-5387.
- GOVAERTS, R & DRANSFIELD, J. 2005. *World Checklist of Palms*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew. 223 pp.
- GRACIANI, E. 2006. *Los aceites y las grasas: Composición y propiedades*. Mundi-Prensa. España.
- GUARNIZO, A., MARTÍNEZ, P. 2009. *Experimentos de Química Orgánica: con enfoque en ciencias de la vida*. Ediciones Elizcom. Colombia.
- GUNSTONE, F. 2002. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, properties and uses*, Blackwell Publishing. 59-93 pp.
- HEDREN, E., MULOKOZI, G., & SVANBERG, U. 2002. In vitro accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *International Journal of Food Science and Nutrition* 53, 445–453.
- HEMPEL, J. 2013. Characterization of morphological and chemical traits of *Bactris gasipaes* fruits with special reference to their carotenoid composition. Tesis para optar por el grado de Máster en Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Instituto de Ciencias de Alimentos y Biotecnología, Universidad de Hohenheim. Alemania.

- HERRERA, C., BOLAÑOS, N., LUTZ, G. 2008. Manual de Laboratorio: Química de Alimentos. San José. Costa Rica. Editorial UCR.
- HO, C.; CHOW, M. 2000. The effect of the refining process on the interfacial properties of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77 (2), 191-199.
- HORMAZA, P., FORERO, D., RUIZ, R & ROMERO, H. 2010. Fenología de la Palma Aceitera Africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y del híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* [Kunt] Cortes x *Elaeis guineensis* Jacq.) Cenipalma. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias. Colombia. 110 pp.
- IMOISI, O., ILORI, G., AGHO, I & EKHATOR, J. 2015. Palm oil, its nutritional and health implications (Review). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 19 (1), 127-133.
- INSTITUTE OF MEDICINE. 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- INSTITUTE OF MEDICINE. 2011. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- JALANI, B.S., CHEAH, S.C., RAJANAIDU, N & DARUS, A. 1997. Improvement of oil palm through breeding and biotechnology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 47, 1451-1455.
- JIN HUR, S., OU LIM, B., DECKER, E & MCCLEMENTS, D.J. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 125 (1), 1-12.
- JOHNSTON, I.A., ALDERSON, R., SANDHAM, C., DINGWALL, A., MITCHELL, D., SELKIRK, C., NICKELL, D., BAKER, R., ROBERTSON, B., WHZTE, D & SPRINGATE, J. 2000. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoke Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture* 189 (3-4), 335 - 349.

- KARUPAIAH, T., & SUNDRAM, K. 2007. Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: A review of their nutritional implications. *Nutrition & Metabolism* 4, 16.
- KERFERS, M. 2016. Characterization of oil palm fruit from *Elaeis guineensis* Jacq., *E. oleifera* [Kunth] Cortés and several hybrid genotypes with particular focus on their fatty acid, carotenoids and vitamin E profile. Master Thesis in Food Science and Engineering. Universidad de Hohenheim. Institute of Food Science and Biotechnology. Stuttgart, Germany.
- KIRK, R.S., SAWYER, R., EGAN, H. 2009. *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. Segunda Edición. Grupo Editoriaal Patria S.A. México.
- KHOO, H. -E., PRASAD, K. N., KONG, K. -W., JIANG, Y., & ISMAIL, A. 2011. Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables. *Molecules* 16 (2). 1710-1738.
- KOTAKE-NARA, E., and NAGAO, A. 2011. Absorption and metabolism of xanthophylls. *Marine Drugs* 9 (6), 1024-1037.
- KUMAR, R., HARIRAM, S., WON, S. 2015. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International* 76, 735-750.
- LAKSHMINARAYANA, R., RAJU, M., KRISHNAKANTHA, T. P., & BASKARAN, V. 2005. Determination of major carotenoids in a few Indian leafy vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (8), 2838-2842.
- LATIFF, A. 2000. The biology of the genus *Elaeis*. *Advances in Oil Research* 1, 19-38. Bangi: Malaysian Palm Oil Board.
- LEMMENS, L., COLLE, I., VAN BUGGENHOUT, S., PALMERO, P., VAN LOEY, A., & HENDRICKX, M. 2014. Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro) structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends in Food Science & Technology* 38(2), 125-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.005>.

- LEÓN, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. 2da ed. IICA. 50-56. San José, Costa Rica.
- MACIAS, A. 1996. Introducción al comportamiento de fluidos: densidad y gravedad específica. IPL Technology & Consulting Services Inc. Canadá.
- MAIANI, G., PERIAGO, M.J., CATASTA, G., TOTI, E., GOÑI, I., BYSTED, A., GRANADO, F., OLMEDILLA, B., KNUTHSEN, P., MALOTI, M., BÖHM, V., MAYER, E., BEHSNILIAN, D & SCHELEMMER, U. 2009. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition Food Research* 53, 194-218.
- MANDALARI, G., BISIGNANO, C., FILOCAMO, A., CHESSA, S., SARÒ, M., TORRE, G., FAULKS, R & DUGO, P. 2013. Bioaccessibility of pistacho polyphenol, xanthophylls and tocopherols during simulated human digestion. *Nutrition* 29, 338-344.
- MARTINEZ, C. 2012. Determinación del índice de acidez de aceites y grasas comestibles. Scribd. Consultado el 10/05/2017. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/97574878/Determinacion-del-indice-de-acidez-en-aceites-y-grasas-comestibles>
- MAY, Y. 1996. Carotenoid from Palm Oil. *Palm Oil Development* 17(1), 1-6.
- MBA, O., DUMONT, M. J., NGADI, M. 2015. Palm Oil: Processing, characterization and utilization in the food industry. A review. *Food Bioscience* 10, 26-41.
- MEHLENBACHER, V. 1979. Análisis de grasas y aceites. URMO. 637 pp. España.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A., STINCO, C., LIU, C & WANG, X.D. 2013. A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometricals isomers of carotenoids for nutritional studies. *Food Chemistry* 138, 1341-1350.
- MÍNGUEZ, M.F., PÉREZ, A., HORNERO, D. 2005. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simple “colorantes” naturales. *CTC Alimentación* 26, 108-113. Instituto de la Grasa (CSIC). Sevilla, España.

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (MAG). 2007. Cadena Agroalimentaria del Cultivo de Palma Aceitera en Distrito de Chires de Puriscal. Agrocadena de Palma Aceitera. La Gloria, Chires de Puriscal, Costa Rica.
- MIRON, N & CRISTEA, V. 2012. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical & Experimental Immunology* 167, 405-412
- MOELANTS, K., LEMMENS, L., VANDEBROECK, M., VAN BUGGENHOUT, S., VAN LOEY, A & HENDRICKX, M. 2012. Relation between particle size and carotenoid bioaccessibility in carrot- and tomato-derived suspensions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11995-12013.
- MORALES, J. 2006. *Elaeis oleifera*. In Biodiversidad de Costa Rica. INBIO. Costa Rica.
- MORETZSOHN, M.C., FERREIRA, M.A., AMARAL, Z.P.S., COELHO, P.J.A., GRATTAPAGLIA, D & FERREIRA, M.E. 2002. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. *Euphytica*. 124, 5-45.
- MORTENSEN, A. 2005. Analysis of a complex mixture of carotenes from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extract. *Food Research International* 38, 847-853.
- MUSTAPA, A., MANAN, Z., MOHD, C., SETIANTO, W & MOHD, A. 2011. Extraction of  $\beta$ -carotenes from palm oil mesocarp using sub-critical R134a. *Food Chemistry* 125, 262-267.
- NAMITHA, K. K., & NEGI, P. S. 2010. Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50(8), 728-760.
- NIELSEN, S. 2010. *Food Analysis Laboratory Manual*. Springer. 2da Edición. Estados Unidos.
- NRC. 1989. *Recommended Dietary Allowances*. 10th ed. National Academy of Sciences. Washington, DC.
- NUMAR. 2006. Productos Industriales. INTERNET: <http://www.gruponumar.com/esp/proindaceites.html>. Consultado: 30/11/2015.
- O'BRIEN, R.D. 2004. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. CRC Press., 2nd ed., Boca Ratón., USA.

- OIL WORLD. 2006. Palm Oil. INTERNET: <http://www.oilworld.biz/app.php?fid=1061&fpar=YToyOntzOjEzOiJQdWJsaWNhdGlvbklkljtzOjQ6IjgxmjMiO3M6NDoiVHlwZSI7aTowO30%3D&isSSL=0&aps=0&blub=036afaa46f7dbfc0b0a316b4ecfb1af>. Consultado: 24/09/2014
- OOI, S.C., DA SILVA, E.B., MULLER, A.A., NASCIMENTO, J.C. 1981. Oil palm genetic resources – native *E. oleifera* populations in Brazil offer promising sources. Pesquisa Agropecuária Brasileira 16, 385-395.
- OOI, C.K. 1999. Minor components of palm oil. PORIM Bull. 38, 29-32.
- ÖTLES, S., CAGIND, Ö. 2008. Carotenoids as natural colorants. In C. Socaciu Ed., Food Colorants: chemical and functional properties. Boca Ratón, USA: CRC Press. 51-70 pp.
- PALAFOX-CARLOS, H., AYALA-ZAVALA, J. F., & GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. 2011. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. Journal of Food Science 76(1), R6-R15.
- PARKER, R. S. 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. FASEB Journal 10, 542-551.
- POKU, K.2002. Small-scale palm oil processing in Africa. FAO Agricultural Services Bulletin, #148 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome Italy. 1-38 pp.
- PRINCE MR, FRISOLI JK. 1993. Beta-carotene accumulation in serum and skin. The American Journal of Clinical Nutrition 57,175-81.
- PRIYADARSHANI, A.M. & JANSZ, E. R. 2014. A critical review on carotenoid research in Sri Lankan context and its outcomes. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 54(5), 561-571.
- RABELO, A. 2013. Caiaué ou dendê da amazônia, fruteira oleaginosa pouco cultivada na amazônia. Brasil. INTERNET: <http://arvores-frutiferas.blogspot.com/2013/07/caiaue-ou-dende-da-amazonia-fruteira.html>. Consultado el: 10/01/2016.

- RAJANAIDU, N., KUSHARI, A., RAFII, M., MOHD DIN, A., MAIZURA, I & JALANI, B.S. 2000. Oil Palm Breeding and Genetic Resources, In *Advances in Oil Palm Research*, Vol. 1 (eds B. Yusof, B.S. Jalani and K.W. Chan), Malaysian Palm Oil Board. Malaysia. 171-224 pp.
- REIN, M. J., RENOUF, M., CRUZ-HERNANDEZ, C., ACTIS-GORETTA, L., THAKKAR, S. K., & DA SILVA PINTO, M. 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology* 75(3), 588-602
- RINCÓN, S., MARTÍNEZ, D. 2009. Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Palmas* 30(2), 11-24.
- RIVERA, C., GARCÍA, F. 2007. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *Bio Tecnología* 11(2).
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. 1997. Análisis de carotenoides. En MORÓN, C (Editor A), ZACARÍAS, I (Editor B), de PABLO, s (editor C). *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Depósito de Documentos de la FAO. Santiago, Chile.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. 2010. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 726-740.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B & KIMURA, M. 2004. *Harvest plus handbook for carotenoid analysis*. Washington: International Food Policy Research Institute and International Center for Tropical Agriculture.
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M.J., ROJAS-GRAÜ, M.A., ELEZ-MARTÍNEZ, P & MARTÍN-BELLOSO, O. 2013. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 1859-1867.
- SAINI, R., NILE, S & PARK, S. 2015. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International* 76, 735-750.

- SAMBANTHAMURTHI, R; SUNDRAM, R. & TAN, Y.A. 2000. Chemistry and biochemistry of palm oil. *Progress in Lipid Research* 39(6), 507-558.
- SAXON, E., ROQUEMORE, S. 2011. Palm Oil. *Union of Concern Scientists: Citizens and Scientists for Environmental Solutions*. Chapter 6. United States.
- SCHROEDER, M., BECKER, E & SKIBSTED, L. 2006. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3445-3453.
- SCHWEIGGERT, R. M., KOPEC, R. E., VILLALOBOS-GUTIERREZ, M. G., HÖGEL, J., QUESADA, S., ESQUIVEL, P., SCHWARTZ, S & CARLE, R. 2014. Carotenoids are more bioavailable from papaya than from tomato and carrot in humans: A randomised cross-over study. *British Journal of Nutrition* 111(03), 490-498. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114513002596>.
- SCHWEIGGERT, R., MEZGER, D., SCHIMPF, F., STEINGASS, C. & CARLE, R. 2012. Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya and tomato. *Food Chemistry* 135, 2736-2742.
- SMITH, N. 2015. *Palm and people in the Amazon*. Springer International Publishing. University of Florida. USA. 225-234 pp.
- SOH, A., WONG, G., HOR, T., TAN, C & CHEW, P. 2003. Oil palm genetic improvement. In: Janick, J. (ed.). *Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons. 22, 165-219.
- SOLOMONS, N.W & OROZCO, M. 2003. Alleviation of vitamin A deficiency with palm fruits and its products. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition* 12 (3), 373-384.
- SOTO, M. 2011. *Control de Calidad de Aceites Vegetales*. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú.
- TRUJILLO-QUIJANO, J., RODRÍGUEZ-AMAYA, D., ESTEVES, W & PLONIS, G. 1990. Carotenoid composition and vitamin A values of oils from four Brazilian palm fruits. *Fat Science and Technology* 92, 222-226.
- United State Department of Agriculture (USDA). 2017. *Oilseeds: World Markets and Trade*. Foreign Agricultural Service. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>



- VERRIJSEN, T., SMEETS, K., CHRISTIAENS, S., PALMERS, S., VAN LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. 2015. Relation between in vitro lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in  $\beta$ -carotene-enriched emulsions with different concentrations of L- $\alpha$ -phosphatidylcholine. *Food Research International* 67, 60-66.
- VICTORIA-CAMPOS, C. I., ORNELAS-PAZ, J. DE J., YAHIA, E. M., & FAILLA, M. L. 2013. Effect of the interaction of heat-processing style and fat type on the micellarization of lipid soluble pigments from green and red pungent peppers (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(15), 3642-3653. <http://dx.doi.org/10.1021/jf3054559>.
- WATKINS, B., HENNING, B & TOBOREK, M. 1996. Dietary Fat and Health. In Hui, Y. H., ed. *Edible Oil and Fats Products: General Applications*. 5ta edición. Wiley – Interscience. New York. 1: 159-214pp.
- WERNER, S., BÖHM, V. 2011. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: evaluation of an in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 1163-1170.
- WOOLLARD, G. 2012. Retinol, retinoic acid, carotenes and carotenoids: Vitamin A structure and terminology. In V. R. Preedy Ed., *Vitamin A and carotenoids: Chemistry* Dorchester, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry. pp. 3-22.
- World Health Organization (WHO). 2009. Global prevalence of vitamin A deficiency in population at risk 1995-2005. WHO global database on vitamin A deficiency. Geneva: World Health Organization.
- YAP, S.C., CHOO, Y.M., OOI, C.K., ONG, A.S.H & GOH, S.H. 1991. Quantitative analysis of carotenes in the oil from different palm species. *Elaeis* 3, 369-378.
- YONEKURA, L., & NAGAO, A. 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51, 107-115
- ZAKI, N., SINGH, R., ROSLI, R & ISMAIL, I. 2012. *Elaeis oleifera* Genomic-SSR Markers: Exploitation in Oil Palm Germplasm Diversity and Cross-Amplification in Arecaceae. *International Journal of Molecular Sciences* 13(4), 4069-4088.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Rendimientos de extracción del aceite del mesocarpo del fruto de diferentes variedades de palma aceitera.

**Cuadro X.** Rendimientos de extracción del lote 1 de aceite de palma obtenido del mesocarpo de los frutos de *Elaeis guineensis*, como parte de la extracción sólido líquido realizada con hexano

Réplica	Masa de mesocarpo (g)	Masa de aceite (g)	Rendimiento (%)
1	50.43	6.13	12.16
2	50.25	5.85	11.64
3	50.20	8.50	16.93
4	49.95	8.01	16.04
5	50.57	8.21	16.23
6	44.83	5.50	12.27
7	42.66	7.46	17.49
8	48.20	9.64	20.00
9	40.13	6.37	15.87
10	40.04	6.48	16.18
11	41.08	4.69	11.42
12	41.15	7.01	17.04
13	41.67	10.00	24.00
14	46.03	10.85	23.57
15	40.94	7.70	18.81
16	41.72	10.12	24.26
17	50.94	23.50	46.13
18	49.79	31.50	63.27
19	50.24	33.20	66.08
20	50.35	33.58	66.69
21	50.48	33.12	65.61
22	50.16	33.84	67.46
23	50.31	33.70	66.98
24	49.96	33.00	66.05
25	50.48	37.65	74.58
26	49.99	39.35	78.72
27	51.89	41.11	79.23
28	50.62	34.10	67.36
29	50.60	36.19	71.52
30	51.54	37.95	73.63
31	51.35	35.19	68.53
32	50.28	38.28	76.13
33	50.63	37.15	73.38
34	50.91	36.98	72.64
35	54.34	40.76	75.01
36	52.03	41.97	80.67

37	52.45	35.50	67.68
38	51.95	35.04	67.45
39	50.40	39.89	79.15
40	51.03	34.84	68.27
41	50.42	38.55	76.46
42	50.10	35.17	70.20
43	50.39	35.30	70.05

**Cuadro XI.** Rendimientos de extracción del lote 2 de aceite de palma obtenido del mesocarpo de los frutos de *Elaeis oleifera*, como parte de la extracción sólido líquido realizada con hexano

Réplica	Masa de mesocarpo (g)	Masa de aceite (g)	Rendimiento (%)
1	40.19	5.70	14.18
2	40.20	7.03	17.49
3	40.02	problemas de calentamiento	ND
4	40.19	5.67	14.11
5	40.16	11.98	29.83
6	40.27	6.47	16.07
7	40.09	4.71	11.75
8	40.15	6.38	15.89
9	40.38	5.90	14.61
10	40.50	7.48	18.47
11	40.38	6.32	15.65
12	40.45	7.20	17.80
13	50.50	4.20	8.32
14	50.46	5.67	11.24
15	50.11	5.30	10.58
16	50.97	6.21	12.18
17	50.52	7.11	14.07
18	50.17	7.60	15.15
19	50.66	6.78	13.38
20	50.58	6.44	12.73
21	50.35	5.53	10.98
22	50.73	7.15	14.09
23	50.69	5.82	11.48
24	50.88	7.21	14.17
25	45.10	8.89	19.71
26	50.84	10.50	20.65
27	50.02	10.57	21.13
28	50.68	12.86	25.37
29	50.05	12.70	25.37
30	50.04	9.52	19.02
31	50.06	12.20	24.37
32	50.74	11.31	22.29
33	50.24	12.45	24.78
34	50.11	8.89	17.74

35	50.21	9.67	19.26
36	51.69	11.79	22.81
37	50.07	10.11	20.19
38	50.02	9.03	18.05
39	50.09	9.36	18.69
40	50.09	8.49	16.95
41	50.16	9.51	18.96
42	80.92	16.74	20.69

**ND:** No determinado

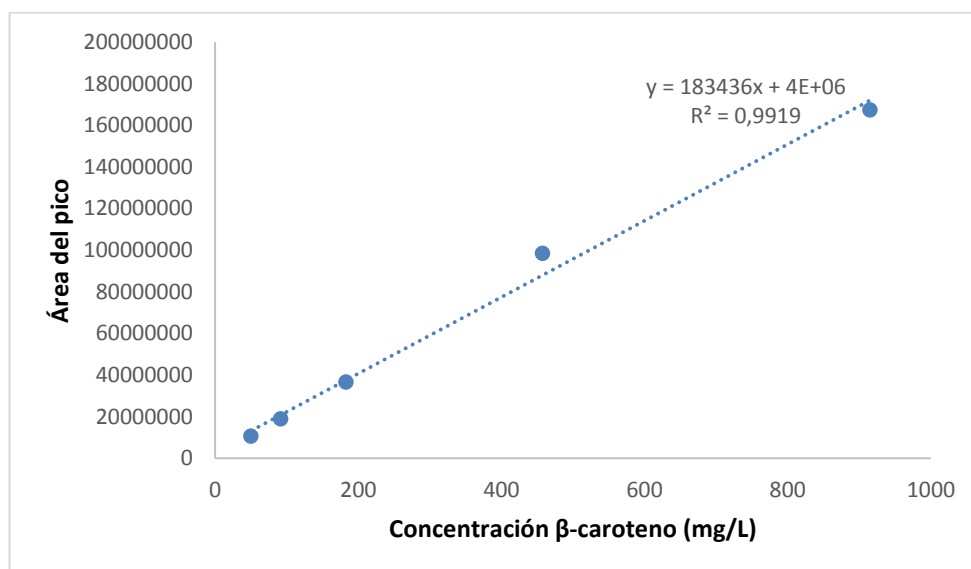
**Cuadro XII.** Rendimientos de extracción del lote 3 de aceite de palma del mesocarpo de los frutos de Amazon, como parte de la extracción sólido líquido realizada con hexano

Réplica	Masa de pulpa (g)	Masa de aceite (g)	Rendimiento (%)
1	40.82	19.88	48.70
2	40.77	24.80	60.83
3	51.16	27.18	ND
4	50.02	28.16	56.30
5	50.39	34.20	67.87
6	50.36	32.25	64.04
7	50.68	33.10	65.31
8	50.80	30.24	59.53
9	50.15	22.40	44.67
10	50.11	18.67	37.26
11	50.23	25.60	50.97
12	50.17	26.04	51.90
13	50.24	32.46	64.61
14	50.10	28.11	56.11
15	50.29	30.90	61.44
16	47.40	33.60	70.89
17	50.01	25.50	50.99
18	50.54	26.69	52.81
19	50.57	30.72	60.75
20	50.40	32.22	63.93
21	50.12	30.66	61.17
22	50.57	23.53	46.53
23	50.34	23.70	47.08
24	51.25	23.80	46.44
25	50.29	26.80	53.29
26	50.49	24.01	47.55
27	50.05	22.95	45.85
28	50.46	23.35	46.27
29	50.21	22.70	45.21
30	50.32	20.60	40.94
31	50.12	26.80	53.47

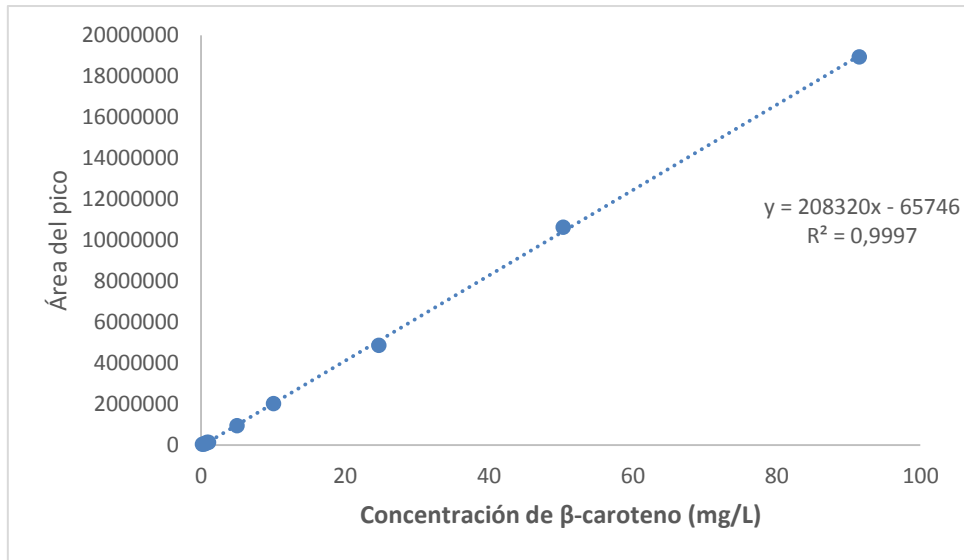
32	50.59	27.00	53.37
33	50.20	24.75	49.30
34	54.24	27.07	49.91
35	50.39	27.61	54.79
36	50.61	24.16	47.74
37	51.06	27.96	54.76
38	51.34	30.01	58.45
39	50.19	34.46	68.66
40	51.47	29.89	58.07
41	50.11	27.63	55.14
42	50.63	34.08	67.31
43	50.75	31.05	61.18
44	50.24	25.25	50.26
45	52.00	33.46	64.35
46	51.30	34.80	67.84
47	50.60	30.91	61.09
48	50.23	28.71	57.16
49	50.24	27.45	54.64
50	51.60	24.69	47.85
51	50.64	35.16	69.43
52	45.70	29.70	64.99

ND: no determinado

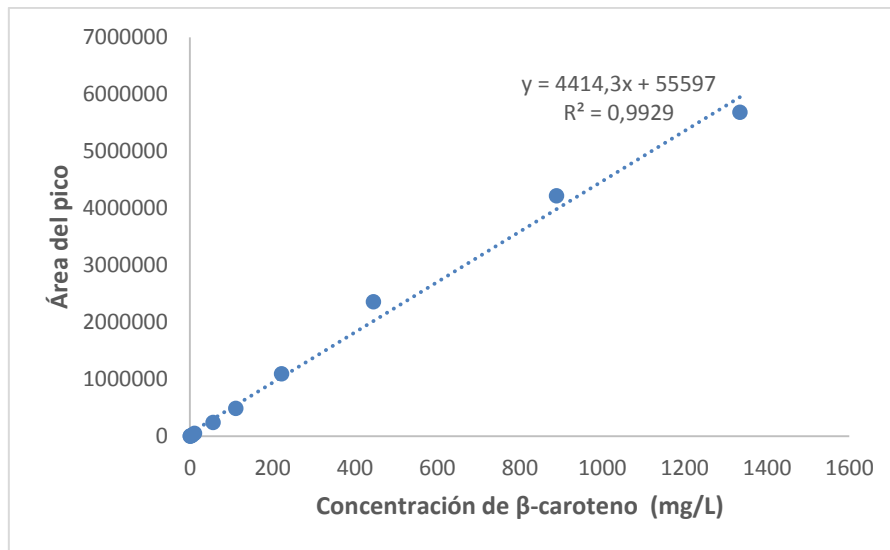
## 8.2 Curvas de calibración para las determinaciones en el HPLC-UV



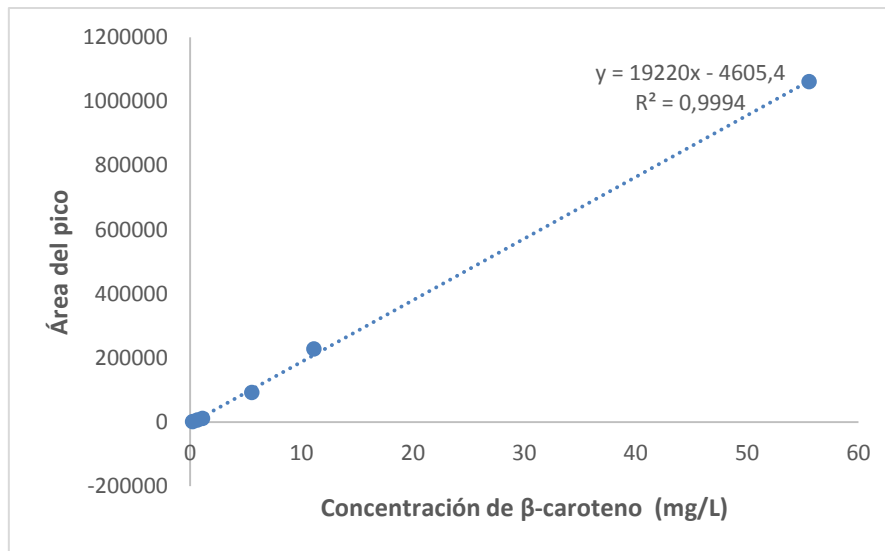
**Figura 25.** Curva de calibración de β-caroteno inyectada en la ETA de la UCR para la determinación de la concentración de este en los aceites antes de la digestión *in vitro*.



**Figura 26.** Curva de calibración de  $\beta$ -caroteno inyectada en la ETA de la UCR para la determinación de la concentración de este en los aceites después de la digestión *in vitro*.



**Figura 27.** Curva de calibración de  $\beta$ -caroteno inyectada en el CITA para la determinación de la concentración de este en los aceites antes de la digestión *in vitro*.



**Figura 28.** Curva de calibración de  $\beta$ -caroteno inyectada en el CITA para la determinación de la concentración de este en los aceites después de la digestión *in vitro*.

### 8.3 Resultados de los análisis de varianza y las pruebas de TUKEY realizadas sin bloquear la influencia de los lotes (repeticiones).

**Cuadro XIII.** Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la caracterización fisicoquímica de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados

Fuente	Parámetros	Índice de Refracción	Gravedad específica	Índice de saponificación	Índice de yodo	Índice de peróxidos	Ácidos grasos libres
Variedad	F	5,6909	0,1110	2,5108	172,472	0,2137	62,6181
	Probabilidad>F	0,0676	0,8976	0,1966	0,0001*	0,8162	0,0010*
Lote	F	1,6545	0,4228	31,8874	17,7485	0,2361	3,0254
	Probabilidad>F	0,2995	0,6815	0,0035*	0,0103*	0,8000	0,1584

**Cuadro XIV.** Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la determinación de color de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados

Fuente	Parámetros	L*	a	b
Variedad	F	495,5500	4,4553	671,3843
	Probabilidad>F	<0.0001*	0.0318*	<0.0001*
Lote	F	0.3526	0.3887	4.0355
	Probabilidad>F	1.4428	0.5430	0.1823

**Cuadro XV.** Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración y bioaccesibilidad del betacaroteno presente en los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes

Fuente	Parámetros	Concentración inicial de $\beta$ -caroteno	Bioaccesibilidad $\beta$ -caroteno
<b>Variedad</b>	F	2258,9820	64,3463
	Probabilidad>F	<0,0001*	<0,0001*
<b>Lote</b>	F	889,9000	11,5120
	Probabilidad>F	0,4290	0,0044*

**Cuadro XVI.** Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración de  $\beta$ -caroteno tanto liberado como en la fase micelar (bioaccesible) de los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes

Fuente	Parámetros	Concentración $\beta$ -caroteno liberado/bioaccesible
<b>Liberado/Bioaccesible</b>	F	7,5252
	Probabilidad>F	0,0227*
<b>Lote</b>	F	0,0575
	Probabilidad>F	0,8159

#### 8.4 Resultados de los análisis de varianza y las pruebas de TUKEY realizadas sin bloqueando la influencia de los lotes (repeticiones).

**Cuadro XVII.** Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la caracterización fisicoquímica de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados

Fuente	Parámetros	Índice de Refracción	Gravedad específica	Índice de saponificación	Índice de yodo	Índice de peróxidos	Ácidos grasos libres
<b>Variedad</b>	F	5,6909	0,1110	2,5108	172,472	0,2137	62,6181
	Probabilidad>F	0,0676	0,8976	0,1966	0,0001*	0,8162	0,0010*
<b>Lote</b>	F	1,6545	0,4228	31,8874	17,7485	0,2361	3,0254
	Probabilidad>F	0,2995	0,6815	0,0035*	0,0103*	0,8000	0,1584



**Cuadro XVIII.** Valores de F y probabilidad obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de la determinación de color de los aceites estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y lotes analizados

Fuente	Parámetros	L*	a	b
Variedad	F	495,5500	4,4553	671,3843
	Probabilidad>F	<0.0001*	0.0318*	<0.0001*
Lote	F	0.3526	0.3887	4.0355
	Probabilidad>F	1.4428	0.5430	0.1823

**Cuadro XIX.** Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración y bioaccesibilidad del betacaroteno presente en los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes

Fuente	Parámetros	Concentración inicial de $\beta$ -caroteno	Bioaccesibilidad $\beta$ -caroteno
Variedad	F	2258,9820	64,3463
	Probabilidad>F	<0,0001*	<0,0001*
Lote	F	889,9000	11,5120
	Probabilidad>F	0,4290	0,0044*

**Cuadro XX.** Valores de F y probabilidad obtenidos en la determinación de la concentración de  $\beta$ -caroteno tanto liberado como en la fase micelar (bioaccesible) de los aceites de palma estudiados con el fin de observar el efecto de las variedades y los lotes

Fuente	Parámetros	Concentración $\beta$ -caroteno liberado/bioaccesible
Liberado/Bioaccesible	F	7,5252
	Probabilidad>F	0,0227*
Lote	F	0,0575
	Probabilidad>F	0,8159

## 8.5 Procedimiento seguido para la preparación del reactivo de Hanus

**Cuadro XXI.** Cantidad de  $I_2$ ,  $Br_2$  y HOAc a utilizar según el volumen de reactivo de Hanus deseado

Masa de $I_2$ (g)	Volumen de HOAc para $I_2$ (mL)	Volumen de $Br_2$ (mL)	Volumen de HOAc para $Br_2$ (mL)	Volumen de disolución (mL)
4,15	250	1,2	70	250
6,64	450	2,0	120	500
13,62	850	3,7	220	1025
27,24	1650	7,0	420	2050
40,86	2450	10,3	620	3075

- Medir la masa de  $I_2$  y  $Br_2$  y disolver en el volumen respectivo de HOAc para la preparación del volumen deseado de disolución.
- Valorar la disolución de  $I_2$  (tomar una alícuota de 15,00 de la disolución de  $I_2$  y colocarla en un frasco yodimétrico o Erlenmeyer de 250 mL, proceder a valorar con tiosulfato de sodio 0,1 M hasta que adquiera tonalidad amarillo pálido, agitar constantemente. Agregar 2 mL de disolución de almidón al 1% como indicador. Continuar valorando hasta la desaparición del color azul).
- Valorar la disolución de  $Br_2$  (tomar una alícuota de 5,00 mL de la disolución de  $Br_2$  y colocarla en un Erlenmeyer de 250 mL, agregar 10 mL de disolución de KI al 15%. Valorar con una disolución de tiosulfato de sodio 0,1 M hasta que adquiera una coloración amarillo pálido. Agregar 2 mL de disolución indicadora de almidón al 1%, continuar valorando hasta la desaparición del color azul).
- Calcular la cantidad de moles presentes en cada una de las disoluciones anteriormente valoradas.
- Calcular la cantidad adecuada de volumen de disolución de bromo a agregar al volumen de disolución de yodo, de forma tal que exista una igual cantidad de moles en ambos.
- Mezclar con exactitud las cantidades de disolución de yodo y bromo requeridas para la preparación del reactivo.

## 8.6 Marca y proveedor de los reactivos empleados en la presente investigación

**Cuadro XXII.** Marca y proveedor de los reactivos empleados para los análisis fisicoquímicos, determinación del perfil y la concentración de los carotenoides, así como en la determinación de la bioaccesibilidad del  $\beta$ -caroteno

Reactivo	Marca	Proveedor
Hexano Ácido clorhídrico Cloroformo Yoduro de potasio Almidón Ácido acético Metanol Metil tert-butil éter Cloruro de sodio Bicarbonato de sodio Cloruro de potasio Éter de petróleo	J.T Baker	Tecnodiaagnóstica
Hidróxido de potasio Cloruro de magnesio	Riedel de Haden	Tecnodiaagnóstica
Etanol Fenolftaleína Hidróxido de sodio Fosfato de sodio Terc butanol	Merck	Tecnodiaagnóstica
Tiosulfato de sodio	BDH, Laboratory Reagents	Tecnodiaagnóstica
Fosfato de potasio	Fisher	Tecnodiaagnóstica
Cloruro de calcio	Sigma	Tecnodiaagnóstica