

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE COMPUESTOS
ANTINUTRICIONALES EN ACEITE DE SACHA INCHI (*Plukenetia
volubilis L.*)”**

Presentado por:

FABIOLA BEATRIZ SALDAÑA ESPINOZA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Lima - Perú

2018

DEDICATORIA

A mis padres y hermana por su incondicional apoyo y aliento.

AGRADECIMIENTO

- A PERU BIODIVERSO por el financiamiento de reactivos utilizados para la presente tesis, con el fin de brindar información adecuada acerca de los productos o sub-productos que se deriven de esta cadena de valor a los comerciantes y consumidores.
- Asimismo, agradezco a la Dra. Patricia Glorio Paulet, por la oportunidad de recibir apoyo del proyecto y por guiarme en la búsqueda del conocimiento.
- A la profesora Ada del Pilar Aliaga Rota y al Dr. Jorge Chávez por colaborar en parte de la metodología de la presente tesis.
- A mi familia, que me apoyó y alentó en el transcurso de esta investigación.
- A las técnicas del laboratorio de Microbiología de Alimentos y Fisicoquímica de Alimentos, quienes con paciencia me acompañaron en el desarrollo de método.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. SACHA INCHI.....	4
2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.....	3
2.1.2. ACEITE DE SACHA INCHI.....	3
2.2. COMPONENTES ANTINUTRICIONALES.....	6
2.2.1. ANTECEDENTES.....	6
2.2.2. DEFINICIÓN Y TIPOS.....	6
2.2.3. ESTERES DE FORBOL.....	7
2.2.4. LECTINAS.....	8
2.2.5. ÁCIDO FÍTICO (FITATOS).....	10
2.2.6. INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	11
2.2.7. TANINOS.....	12
2.2.8. SAPONINAS.....	13
2.2.9. GLICÓSIDOS CIANOGENICOS.....	14
2.3. FRACCIONES PROTEICAS ALERGÉNICAS.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	16
3.2. MATERIA PRIMA.....	16
3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	17
3.3.1. EQUIPOS.....	17
3.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO.....	18
3.3.3. REACTIVOS.....	19
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	21
3.4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.....	21
3.4.2. PROTEÍNA SOLUBLE.....	21
3.4.3. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTINUTRIENTES Y PROTEÍNAS	
MARCHA FITOQUÍMICA.....	22
a. MARCHA FITOQUÍMICA.....	22

3.5. MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA DETERMINACIÓN DE ANTINUTRIENTES Y PROTEÍNAS.....	22
3.5.1. DETERMINACIÓN DE TANINOS.....	22
3.5.2. DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	23
3.5.3. PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN: CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DE LECTINA.....	23
3.5.4. DETERMINACIÓN DE ESTERES DE FORBOL.....	23
3.5.5. DETERMINACIÓN DE FITATOS.....	23
3.5.6. DETERMINACIÓN DE GLICÓSIDOS CIANOGENICOS.....	23
3.5.7. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS CON REACTIVIDAD CRUZADA A PROTEÍNAS DE LUPINO.....	24
3.6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	24
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS.....	28
4.2. ALCALOIDES.....	30
4.3. SAPONINAS.....	31
4.4. TANINOS.....	33
4.5. PROTEÍNAS.....	35
4.5.1. PROTEÍNAS SOLUBLES.....	36
4.5.2. INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	37
4.5.3. ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE.....	38
4.5.4. PROTEÍNAS CON REACTIVIDAD CRUZADA A PROTEÍNAS DE LUPINO.....	39
4.6. ESTERES DE FORBOL.....	41
4.7. FITATOS.....	42
4.8. GLICÓSIDOS CIANOGENICOS.....	44
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. RECOMENDACIONES.....	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
VIII. ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición de ácidos grasos del aceite de sachá inchi.....	4
Cuadro 2: Características fisicoquímicas del aceite de Sachá inchi ^a	28
Cuadro 3: Marcha fitoquímica de alcaloides ^{a, b}	31
Cuadro 4: Marcha fitoquímica de saponinas ^{a, b}	32
Cuadro 5: Marcha fitoquímica de Sapogeninas ^{a, b}	33
Cuadro 6: Marcha fitoquímica de taninos ^{a, b}	34
Cuadro 7: Concentraciones de taninos ^a	34
Cuadro 8: Marcha fitoquímica de proteínas ^{a, b}	35
Cuadro 9: Cuantificación de proteínas solubles por método de Bradford y Lowry.....	36
Cuadro 10: Concentraciones de inhibidores de tripsina.....	38
Cuadro 11: Proteínas con reactividad cruzada a proteínas alérgicas de lupino.....	41
Cuadro 12: Concentraciones de ésteres de forbol ^{a, b}	42
Cuadro 13: Concentraciones de fitatos ^a	43
Cuadro 14: Concentraciones de glicósidos cianogénicos.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metodología experimental.	26
Figura 2: Muestras de extracto de aceite de fuente del INIA (a) y de fuente comercial (b) después de centrifugación siguiendo metodología de prueba hemaglutinación.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODO BRADFORD PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES.....	55
ANEXO 2: MÉTODO LOWRY PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	58
ANEXO 3: PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PARA MARCHA FITOQUÍMICA.....	60
ANEXO 4: MÉTODO PARA LAS REACCIONES DE MARCHA FITOQUÍMICA.....	61
ANEXO 5: MÉTODO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TANINOS	64
ANEXO 6: MÉTODO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	66
ANEXO 7: MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD DE LECTINA.....	68
ANEXO 8: MÉTODO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ESTERES DE FORBOL.....	70
ANEXO 9: METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE FITATOS.....	72
ANEXO 10: MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLICÓSIDOS CIANOGENICOS.....	76
ANEXO 11: MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS ALÉRGICAS.....	79
ANEXO 12: RESULTADOS y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CARACTERÍSTICAS FISIQUÍMICAS.....	82
ANEXO 13: RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA.....	85
ANEXO 14: RESULTADOS DE TANINOS.....	89
ANEXO 15: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	91
ANEXO 16: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ESTERES DE FORBOL.....	93
ANEXO 17: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE FITATOS.....	97
ANEXO 18: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GLICOSIDOS CIANOGENICO	99

ANEXO 19: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROTEÍNAS SOLUBLES.....	101
ANEXO 20: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROTEÍNAS CON REACTIVIDAD CRUZADA A PROTEÍNAS ALÉRGICAS DE LUPINO.....	107

RESUMEN

La semilla de Sacha inchi es fuente importante de proteínas generando subproductos como su aceite. Sin embargo, no conocemos si existen compuestos presentes en el aceite que sean antinutricionales, alergénicos u tóxicos. El objetivo principal de la presente investigación es determinar la presencia de antinutrientes y proteínas alergénicas con reactividad cruzada a proteínas de lupino en el aceite Extra-Virgen de Sacha inchi de fuente comercial y del INIA, ecotipo Apangura. Se logró determinar en el aceite de Sacha inchi de las muestras mediante marcha fitoquímica, ausencia de alcaloides, taninos y presencia escasa de proteínas y saponinas; y mediante métodos colorimétricos y cromatográficos, cantidades por debajo de los límites permitidos para humanos de: taninos, esteroides de forbol, fitatos y glicósidos cianogénicos. A su vez, mediante los métodos de *Lowry* y *Bradford* se encontraron contenidos traza de proteínas solubles. No se encontró lectinas, y en niveles muy bajos, inhibidores de tripsina. Asimismo, se utilizó un kit de inmunoensayo tipo sándwich, el cual permitió determinar ausencia de reactividad cruzada entre las proteínas alergénicas de Lupino y las proteínas solubles del aceite de Sacha inchi, lo cual indica que el aceite de Sacha inchi de las muestras analizadas no sería alergénico para las personas que presentan alergenidad a las proteínas de lupino. Del estudio anterior se pudo concluir que las muestras de Aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y del INIA no presentan diferencia significativa entre sí ni contenidos por encima de los límites permitidos para humanos de compuestos antinutricionales y proteínas solubles con reactividad cruzada a proteínas alérgicas de Lupino.

Palabras Clave: Antinutrientes, marcha fitoquímica, aceite de Sacha inchi, reactividad cruzada, proteínas alérgicas.

ABSTRACT

The Sacha inchi seed is an important source of proteins generating subproducts such as its oil. However, we don't know if there are antinutritional, allergenic or toxic compounds present in the oil. The main goal of the present research is to determinate the presence of antinutritional compounds and allergenic proteins with cross reactivity to lupin proteins in the Extra-Virgin Sacha inchi oil from commercial and INIA sources from the ecotype Apangura. In the Sacha inchi oil samples was determined through phytochemical screening, the absence of: alkaloids, tannins and the minimum presence of proteins and saponins; and through colorimetric and chromatographic methods, quantities below the permitted limits for humans of: tannins, phorbol esters, phytates and cyanogenic glycosides. At the same time, through Lowry and Bradford methods, trace levels of soluble proteins were found. Lectins weren't found, and trypsin inhibitors in very low levels. Likewise, a type sandwich immunoassay kit was used, which determined the absence of cross reactivity between Lupin allergenic proteins and soluble proteins from the Sacha inchi oil, indicating that Sacha inchi oil from the analyzed samples it's not allergenic for persons with allergenicity to Lupin proteins. From this research, it can be concluded that samples of Sacha inchi oil from commercial and INIA sources from Apangura ecotype didn't present significant differences between each other or contents above the permitted levels for humans of antinutritional compounds and soluble proteins with cross reactivity to lupin allergenic proteins.

Keywords: Antinutritional compounds, phytochemical screening, Sacha inchi oil, cross reactivity, allergenic proteins.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente se están realizando estudios, para encontrar especies nativas de gran contenido de aceite, alta cantidad de proteínas en la torta, y de producción factible y rentable (Mejía, 1997). Una de estas especies nativas que podría ser utilizada como materia prima oleaginosa es el Sacha Inchi, debido a que su semilla contiene altas cantidades de aceite (54 por ciento) y relativamente alto contenido protéico (27 por ciento) (Hamaker *et al.*, 1992).

El sachu inchi es un fruto obtenido de una planta perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* (Euforbiáceas), cuyo género y especie son *Plukenetia* y *volúbilis linneo* (Arévalo,1996), familia a la que pertenece también la semilla *Jatropha Curcas*, de la cual su semillas y aceite son tóxicos para humanos y animales por lo que su uso nutricional no es posible (Wilhelm; citado por Ahmed y Salimon, 2009), presumiéndose la posibilidad de que tales compuestos también se encuentren tanto en la semilla y aceite de semilla de Sacha Inchi. Debido a ello es necesario descartar presencia de antinutrientes en el aceite de semilla de Sacha Inchi.

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la presencia o ausencia de compuestos antinutricionales y proteínas con reactividad cruzada a anticuerpos que reconocen proteínas alergénicas de Lupino en muestras de aceite comercial y del INIA (ecotipo Apangura), y la subsecuente caracterización de los compuestos antinutrientes encontrados, comprobando que no sobrepasen los límites permitidos y descartar su posible toxicidad, permitiendo su libre comercialización a mercados externos y demostrando su inocuidad para el consumidor potencial.

De esta manera se busca promover no sólo el desarrollo de las comunidades del departamento de San Martín que se dedican a su cultivo y a la extracción de su aceite, sino también el consumo de un alimento rico en ácidos grasos omega 3 y tocoferoles benéficos para la salud.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. SACHA INCHI

El Sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*), también llamado Inca Inchi, es una planta oleaginosa salvaje, perenne de la familia *Euphorbiaceae* que crece en las junglas tropicales de América a altitudes entre 200 y 1500 m. Es también conocida como "Cacahuete del Inca", o "Cacahuete salvaje". Esta legumbre tiene semillas de forma lenticular, que son ricas en aceite y proteínas y contienen sustancias lábiles al calor con un sabor amargo. Tradicionalmente ha sido consumido por los indígenas de Perú. Era probablemente cultivada por los pre-Incas y los Incas a juzgar por las representaciones de esta planta y sus frutos encontradas en vasijas en tumbas incaicas (Guillén *et al.*, 2003).

Los nativos amazónicos obtuvieron harina y aceite de las semillas de sachá inchi. Estos productos son usados en la preparación de diferentes platos y bebidas; las semillas tostadas y hojas tiernas cocinadas son también consumidas. Sin embargo, esta planta ha sido raramente estudiada, y su importancia desde el punto de vista nutricional y funcional es todavía sujeto de investigación. Sólo una investigación (Hamaker *et al.*, 1992; Guillén *et al.*, 2003) indica la composición de las semillas, estos autores señalan que estas pueden ser consideradas como un potencial nuevo cultivo para algunas regiones boscosas de Sudamérica, debido a que contienen 35-60 por ciento de aceite y cerca de 27 por ciento de proteínas ricas en cisteína, tirosina, treonina y triptófano.

Recientemente, ha sido vislumbrada, la salud e importancia nutricional de los grupos acilos poliinsaturados n-3, tales como el docohexanoico presente en los lípidos del pescado o los grupos acilos α -linolenico presentes en algunos aceites vegetales (Simoupolous, 1991); (Guillén *et al.*, 2003), conocidos por proveer protección contra las enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, cáncer y posiblemente la severidad de infecciones virales. Debido a estos beneficios, la manufactura de suplementos alimentarios con grupos n-3 acil, tales como fórmulas infantiles y productos nutritivos clínicos, se ha incrementado considerablemente y, al mismo tiempo, también la demanda de aceites ricos en grupos

ácidos poliinsaturados n-3, como el de semilla de Sacha Inchi. En este contexto, el estudio del aceite de Sacha Inchi como un material crudo para la industria alimentaria y nutracéutica puede ser considerado (Guillén *et al.*, 2003).

2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Soukup (1985), Moreno (2002) clasifican al sachá inchi de la siguiente forma:

Reino	:	Vegetal
División	:	Anthopyta
Sub-división	:	Angeospermae
Clase	:	Dicotiledónea
Sub-clase	:	Choripetalae
Orden	:	Tricoccae
Familia	:	Euforbiaceae
Sub-Familia	:	Crotonoideae
Especie	:	<i>Plukenetia volubilis</i>

Según Pascual y Correal (1992), se ha investigado la composición química de más de 120 especies, principalmente del género *Euphorbia*, al cual pertenece la semilla de Sacha Inchi. Sus principales compuestos químicos son triterpenoides, flavonoides y alcaloides, pero también contienen cumarinas, glucósidos cianogénicos y taninos. Además, en géneros como *Áleurites*, *Crotón*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Sapium*, etc., se encuentran ciertas sustancias tóxicas como ésteres de alcoholes diterpénicos, forbol, resiniferonol e ingenol que son irritantes de la piel.

2.1.2. ACEITE DE SACHA INCHI

Según el Cuadro 1, el total de ácidos grasos saturados asciende a solo el $6,90 \pm 0,01$ por ciento destacándose el ácido palmítico con un $3,95 \pm 0,01$ por ciento. El total de ácidos grasos insaturados es de 93.1 por ciento, destacándose el ácido linolénico con un $47,06 \pm 0,02$ por ciento y en segundo lugar el ácido linoléico con un $36,19 \pm 0,02$ por ciento valores que demuestran que el aceite que estudiamos es altamente insaturado y por lo tanto

es factible en la industrialización de aceites comestibles. En general, por su alto grado de insaturación es posible concluir que el aceite de sacha inchi sería una buena fuente potencial de aceite comestible. Por la alta cantidad de ácido linolénico, el aceite de sacha inchi pertenece al grupo de los ácidos linolénicos. Las grasas de este grupo contienen cantidades sustanciales de ácido linolénico; entre ellas están los aceites de soja, germen de trigo, linaza, cáñamo y perilla (Bernardini, 1981).

Cuadro 1: Composición de ácidos grasos del aceite de sacha inchi

ACIDO GRASO	ACEITE DE SACHA INCHI (%)
Palmítico (16:0)	3.95 ± 0.01
Estearico (18:0)	2.97 ± 0.01
Oleico (18:1)	9.01 ± 0.01
Linoleico (18:2)	36.19 ± 0.02
Linolénico (18:3)	47.06 ± 0.02
RESUMEN:	
Saturados	6.90 ± 0.01
Monoinsaturados	9.86 ± 0.02
Poliinsaturados	83.24 ± 0.01

FUENTE: Gorriti *et al.*, (2010).

Actualmente, la industria aceitera busca encontrar un aceite con una cantidad mínima de ácidos grasos saturados, por ello la alta industrialización del aceite de soja y de girasol. El problema del aceite de sacha inchi es ser altamente insaturado y así es más factible a la oxidación. Esto llevará a la industria a utilizar el aceite y en el proceso de refinación, realizar una hidrogenación selectiva a nivel de ácido linolénico, llevándolo a ácido linoleico, tal como se realiza para el caso del aceite de soja, y aplicar antioxidantes naturales para su conservación (Pascual y Mejía, 2000).

El ácido oleico es el ácido graso más ampliamente distribuido, se encuentra en todos los aceites o grasas. Es el principal componente de la mayor parte de los aceites vegetales líquidos alcanzando el 20 por ciento o más del total de los ácidos grasos. En los aceites vegetales el ácido oléico está invariablemente asociado al ácido linoleico. En los aceites vegetales poco insaturados, tales como soja, linaza, perilla, etc., hay más ácido linoleico que oleico. El ácido linolénico se encuentra en cantidades variables en algunos de los aceites vegetales más insaturados constituyendo muchas veces el 40 por ciento o más del total de ácidos grasos (Bailey,1961; Pascual y Mejía, 2000).

Braverman (1981) y Pascual y Mejía (2000), mencionan que la importancia de los ácidos grasos polinsaturados es que cumplen ciertas funciones fisiológicas importantes, pero como no pueden sintetizarse en el cuerpo con suficiente rapidez deben suministrarse con los alimentos.

La composición de ácidos grasos es reportada en el Cuadro 1. La composición de este aceite poco común es interesante bajo el punto de vista nutricional gracias a su contenido de ácidos grasos linoleico (omega-6) y linolénico (omega-3), representando más del 80 por ciento del total de ácidos grasos (Bondioli *et al.*, 2006).

La composición de ácidos grasos tiene varias similitudes con el muy conocido aceite de semilla de lino (*Linum usitatissimum*): tiene el mismo contenido de ácido linoleico. Como consecuencia, esta composición particular posee los mismos problemas como el aceite de semilla de lino en términos de tendencia a oxidación y estabilidad de almacenamiento. A pesar de estas consideraciones se puede decir que el aceite de *Plukenetia Volubilis* es una fuente de integración interesante para la dieta lipídica común, tradicionalmente rica en ácidos grasos mono y diinsaturados y muy baja en los triinsaturados (Bondioli *et al.*, 2006).

El contenido de esteroides se encuentra dentro del rango de los aceites vegetales más comunes y se encontró un valor de 2472 mg/kg de aceite (Bondioli, *et al.*, 2006).

El contenido total de tocoferol fue encontrado en 2259 mg/kg y la composición de tocoferoles fue de 63.3 por ciento de alfa, 36.7 por ciento de beta más gamma y rastros de delta. Ningún tocotrienol fue encontrado (Bondioli *et al.*, 2006).

2.2. COMPONENTES ANTINUTRICIONALES

2.2.1. ANTECEDENTES

La semilla del Sacha Inchi pertenece a la misma familia (Euphorbiaceae) de la semilla de *Jatropha*, por lo cual se sospecha presencia de compuestos antinutricionales en la primera.

De acuerdo a Schultes y Raffauf (1990) y López (2008) los constituyentes del género *Jatropha* incluyen taninos, sapogeninas, alcaloides, ésteres (aceites), toxalbuminas y compuestos cianogénicos. En los frutos y semillas de la *J. curcas* se han reportado propiedades contraceptivas.

La toxicidad de *Jatropha Curcas* está asociada a diferentes compuestos del tipo mencionado, los cuales están presentes tanto en hojas como en frutos. Luego de la extracción del aceite, el cual lleva consigo varios de los compuestos tóxicos, haciendo inadecuado su aprovechamiento alimenticio, la torta de la extracción aún contiene muchos de los componentes tóxicos que se encuentran presentes en las semillas de *Jatropha curcas* L. La toxicidad de la torta puede ser causada por varios componentes, entre ellos los ésteres de forbol, lectinas (curcina) y ácido curcalónico así como algunos componentes antinutricionales que incluyen saponinas, fitatos e inhibidores de proteasa (tripsina) (Trabi, *et al.*, 1997; Makkar y Becker, 1998; López, 2008).

2.2.2. DEFINICIÓN Y TIPOS

Debe ser enfocada una atención especial en el análisis de equivalencia de sustancias en tóxicos inherentes y constituyentes antinutricionales. La definición de tóxicos y antinutrientes inherentes a plantas son entendidos como sustancias que inhiben importantes caminos en el metabolismo, especialmente la digestión. Los antinutrientes reducen la máxima utilización de nutrientes (especialmente proteínas, vitaminas o minerales), y en consecuencia obstruyen la explotación óptima de los nutrientes presentes en un alimento y decrece su valor nutritivo (Watzl y Leitzmann, 1995). Muchos antinutrientes, pueden ser también tóxicos más allá de cierta dosis, por ejemplo el oxalato o ácido cianogénico (Akpanyung *et al.*, 1995; Isong y Essien, 1996; Novak y Haslberger, 2000)

Muchos de los efectos perjudiciales de los antinutrientes son causados por materiales crudos de plantas. La mayoría de las sustancias antinutricionales se convierten inefectivas

por simples medidas, tales como el calentamiento, remojado, germinación o autoclavado. Recientemente, data acerca de efectos positivos de toxinas de plantas y sustancias antinutrientes ha sido publicado, por ejemplo, cualidad anticarcinogénicas y antibacteriales han sido encontradas (Watzl y Leitzmann, 1995).

Las legumbres son usualmente utilizadas en las dietas occidentales debido a sus efectos nutricionales benéficos y también a causa de que son una fuente de bajo costo de proteínas (Borade *et al.*, 1984; Muzquiz, Burbano *et al.*, 1999). Sin embargo, su uso no es tan difundido debido a su contenido de factores antinutricionales, tales como inhibidores de enzimas (tripsina, quimiotripsina, alfa-amilasa), ácido fítico, factores de flatulencia, saponinas y factores tóxicos, lectinas y la necesidad de cocción prolongada (Lyimo *et al.*, 1992; Muzquiz, *et al.*, 1999). Por lo tanto es necesaria más información acerca de sus implicaciones nutricionales potenciales de dietas basadas en legumbres.

2.2.3. ESTERES DE FORBOL

a. Definición y mecanismo de acción

El término de esteres de forbol es usado hoy para describir una familia de compuestos naturales ampliamente distribuidos en las especies de plantas de las familias Euphorbiaceae y Timelaeaceae. (Hass *et al.*, 2002; Ahmed y Salimon, 2009) reportó ésteres de forbol del aceite de semilla de *J. curcas*, donde todos los compuestos poseen la misma mitad diterpenica, nombrada, 12-deoxy-16-hidroxiforbol.

En general, los esteres de forbol son conocidos por activar la proteína kinasa C imitando el diacil glicerol, que en cambio activa la cascada de reacciones de señales de transducción causando promoción de las tumoraciones. Los esteres de forbol son carcinogénicos, causan promoción de tumores sólo en presencia o exposición prolongada a dosis subcarcinogénicas de carcinógenos (Devappa, *et al.*, 2010).

Los esteres de forbol (PEs) son hidrofílicos en naturaleza, solubles en aceite y estables al calor cuando están presentes en la torta de semillas o en el aceite (Devappa, *et al.*, 2010).

b. Fuentes

Los esteres de forbol (PEs) están localizados generalmente en la porción central de la semilla y su concentración varía con el genotipo variando de 0.8 a 3.3 mg/g en la semilla (Makkar *et al.*; citado por Devappa *et al.*, 2010).

Las semillas y aceite de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) son tóxicas para el ser humano y animales y por esa razón su utilización nutricional no es posible. Un obstáculo crucial en el establecimiento de *J. curcas* como un cultivo comercial sería la detoxificación de las semillas/aceite (Wilhelm Haas, 2002 y Waled y Jumad, 2009). A pesar que los esteroides de forbol (miristato-12-forbol 13-acetato) han sido identificados como el mayor componente tóxico en *Jatropha* (Makkar y Becker, 1997; Ahmed y Salimon, 2009), pero también los esteroides de forbol dependen del suelo y condiciones climáticas (Martinez-Herrera *et al.*, 2005; Ahmed y Salimon, 2009).

c. Efectos

Entre los factores antinutricionales (inhibidores de tripsina, fitatos, lecitina y curcina), los PEs son los más potentes y exhiben un gran rango de actividades biológicas afectando desde microorganismos a animales más grandes (Devappa *et al.*, 2010)

Los efectos biológicos de estos componentes en adición a la promoción de tumores, llevan a un rango amplio de efectos bioquímicos y celulares, alteran la morfología celular, sirven como mitógenos de linfocitos e inducen la agregación plaquetaria (Blumberg, 1981; Ahmed y Salimon, 2009). La fracción tóxica aislada del aceite de *jatropha* no sólo tuvo un efecto irritante luego de la aplicación tópica, sino que también causó diarrea y mortalidad en animales, indicando que hay una absorción sustancial percutánea de los compuestos tóxicos del aceite (Gandhi *et al.*, 1995; Ahmed y Salimon 2009).

2.2.4. LECTINAS

a. Definición y mecanismo de acción

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas, que son recolectadas en un grupo artificial debido a su propiedad de unir residuos de carbohidratos en las superficies celulares. De acuerdo a esto, las lectinas son definidas por esta propiedad, y los métodos más ampliamente empleados para medir cantidades de lectina dependen de esta actividad de unión celular. La actividad de aglutinación es medida por diluciones sucesivas de la lectina con estimación visual del punto final, donde ninguna aglutinación es observada. La estimación visual de la hemaglutinización usando el método de microtitulación en placa es ampliamente usada. Las ventajas particulares de este simple test son pequeño volumen de muestra, alta sensibilidad, y rápida performance (Köhle y Kauss, 1979).

b. Fuentes

En los vegetales, la mayoría de la lectina se encuentra en órganos de reserva, lo cual es una evidencia indirecta de su papel como proteínas de defensa (Mendoza, 2007)

La curcasina o cursina, una lectina o albúmina tóxica parecida al ricino, y una sustancia resinosa (resinolipoide), es considerado el principio activo tóxico de la planta de *Jatropha*, se encuentra en las semillas y su aceite, frutos y savia, altamente irritante y con características propias de un antígeno (López, 2008).

c. Efectos

Las lectinas son proteínas con habilidad de unir azúcares que unen y aglutinan las células rojas. La toxicidad de las lectinas es caracterizada por la inhibición del crecimiento en animales experimentales y diarrea, náusea, hinchazón y vomito en humanos (Liener, 1982; Muzquiz *et al.*, 1999).

Las lectinas son un grupo de productos naturales, proteínas o glicoproteínas con la propiedad de estar ligadas a ciertos glúcidos y la capacidad para aglutinar los eritrocitos (Moll y Moll, 2006; López, 2008). Estos productos presentan además otras propiedades químicas y biológicas de interés como: capacidad para inducir mitosis, para aglutinar células tumorales o para interactuar con grupos sanguíneos específicos, así como su toxicidad en animales, todos estos efectos derivan de la unión de las lectinas a ciertos tipos de azúcares presentes en la superficie celular (López *et al.*, 2006; López, 2008). Afortunadamente la mayoría de las lectinas son termolábiles y su actividad puede disminuirse por tratamiento térmico (Aregheore *et al.*, 1998), sin embargo en algunas condiciones no se logra una detoxificación completa, sobre todo si se utilizan semillas molidas o si se aplican procedimientos industriales rápidos, dado que las lectinas no se inactivan por el tratamiento de calor seco (Jaffe, 1980; López, 2008) y por su carácter proteico se desnaturalizan al aplicar calor húmedo (Morales y Troncoso, 2006; López, 2008).

La curcasina o cursina, una lectina o albúmina tóxica parecida al ricino, y una sustancia resinosa (resinolipoide), es considerada el principio activo tóxico de la planta de *Jatropha*, se encuentra en las semillas y su aceite, frutos y savia, altamente irritante y con características propias de un antígeno (Gil *et al.*, 2006; FAO, 1983; López, 2008). La toxicidad de las semillas se atribuyó generalmente a la presencia de lectina, sin embargo, estudios en especies tóxicas y no tóxicas muestran que éste no es el único compuesto

tóxico de la planta, por la ausencia de este compuesto en las variedades no tóxicas de *Jatropha*. La lectina no parece ser responsable de la toxicidad de corto plazo, pero puede aumentar los efectos tóxicos en combinación con otras toxinas como los ésteres de forbol (Makkar y Becker, 1998; López, 2008).

2.2.5. ÁCIDO FÍTICO (FITATOS)

a. Definición y mecanismo de acción

Compuestos cíclicos, sal de ácido fítico (hexafosfato de inositol), es un agente de quelación cargado negativamente que puede combinarse con cationes di y trivalentes para formar complejos insolubles (López, 2008).

Su efecto antinutricional está asociado a la susceptibilidad de quelación con el calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre. Los fitatos además de acomplejar iones, interactúan de forma inespecífica con proteínas e hidratos de carbono como el almidón. Esta unión altera la solubilidad, funcionalidad, digestión y absorción de estos componentes de los alimentos; por otro lado, el ácido fítico puede interaccionar con las enzimas digestivas, inhibiendo su función (López, 2008).

b. Fuentes

El ácido fítico es la forma de reserva del fósforo en ciertos organismos vegetales, y se acumula en las semillas de algunas especies vegetales durante su maduración (López, 2008).

c. Efectos

Estos compuestos reducen la biodisponibilidad de los minerales esenciales y pueden aumentar la absorción de otros minerales tóxicos (Moll y Moll, 2006; López, 2008).

Los elementos traza del ácido fítico y macroelementos tales como el zinc, calcio, magnesio y hierro, en el tracto gastrointestinal hacen que los minerales de la dieta no estén disponibles para la absorción y utilización por el cuerpo. También pueden formar complejos con proteínas, proteasas y amilasas del tracto intestinal, por lo tanto inhibiendo la proteólisis (Tabekhia, 1980; Muzquiz *et al.*, 1999). Además, el fosforo en el fitato ha sido considerado de muy difícil asimilación por el organismo debido a la capacidad limitada de las especies monogástricas de hidrolizar el fitato en el intestino delgado (Muzquiz *et al.*, 1999).

Debido al efecto antinutriente del ácido fítico se ha estudiado la forma de eliminación de los alimentos que lo contienen, llegándose a la conclusión de que la germinación o

malteado y la fermentación son los procesos más eficientes a causa de la actividad de la fitasa. (Morales y Troncoso, 2006; López, 2008).

d. Límites permitidos en alimentos

El límite máximo permitido es de 0.001 g por el Reglamento Técnico para el Establecimiento de la Identidad y Calidad de una Mezcla de Cereales de Bran (Brasil, 2000; Leal y Gonçalves *et al.*, 2010).

2.2.6. INHIBIDORES DE TRIPSINA

a. Definición y mecanismo de acción

Los inhibidores de tripsina pertenecen a una amplia clase de proteínas (inhibidores de proteasas) que inhiben las enzimas proteolíticas. La actividad de los inhibidores de tripsina se incrementa a medida que la maduración de la semilla progresa (Kute *et al.*, 1984; Jain *et al.*, 2009). La mayoría de los inhibidores de proteasas de las plantas son destruidos por el calor resultando en un incremento del valor proteico (Liener, 1962; Jain *et al.*, 2009). El tamaño parcial, contenido de humedad, tiempo, temperatura y presión son los mayores factores que influyen las velocidades de cocimiento (Rackis, 1981; Jain *et al.*, 2009). La germinación también influye la actividad de los inhibidores de tripsina, y subsecuentemente incrementa el valor nutritivo (Jain *et al.*, 2009).

Según Martínez-Herrera *et al.* (2006), los inhibidores de tripsina interfieren con el proceso fisiológico de digestión a través de la interferencia con el funcionamiento normal de las enzimas proteolíticas del páncreas, llevando a una severa depresión del crecimiento. Es posible que el efecto antinutriente de los inhibidores de tripsina sea debido a su directa interacción con las enzimas proteolíticas del páncreas y una reducción correspondiente en la digestibilidad de las proteínas de la dieta.

b. Fuentes

Los extractos de leguminosas presentan inhibidores de serín-proteasas para enzimas tipo tripsina y quimotripsina. (Sánchez y Ramirez, 1998).

c. Efectos

Los inhibidores de proteasas pueden producir ciertos efectos fisiológicos en animales; se especula aún sobre los efectos nutricionales y significancia fisiológica en humanos. La amplia distribución de los inhibidores de proteasa entre aquellas plantas que son una fuente

importante de proteínas, ha estimulado la investigación sobre su posible implicación nutricional. Los inhibidores más estudiados han sido los de tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos como el ser humano (Morales y Troncoso, 2006; López, 2008).

En muchos casos, en el material vegetal no existe solo un inhibidor, sino una serie de ellos que se diferencian en su especificidad, actividad y estabilidad térmica. En relación a su efecto antinutriente, parecen causar retraso en el crecimiento y un bajo índice de eficacia proteica. Estos inhibidores enzimáticos, debido a su naturaleza proteica, se desnaturalizan térmicamente en la mayoría de los casos, perdiendo su efecto antinutriente (Morales y Troncoso, 2006; López, 2008).

Algunos estudios destinados a evaluar la actividad del inhibidor de tripsina (AIT) de la harina de *Jatropha*, mostraron ser del mismo orden que en la harina de soja en bruto (sin tratamiento térmico), lo cual podría causar efectos fisiológicos negativos en monogástricos (Makkar *et al.*, 1998; López, 2008).

2.2.7. TANINOS

a. Definición y mecanismo de acción

Estos compuestos engloban un grupo heterogéneo de polifenoles con alto peso molecular, que aparecen en las plantas y que contienen suficientes grupos hidroxilo que permiten uniones estables con proteínas (Morales y Troncoso, 2006; López, 2008).

b. Efectos

El efecto antinutricional de los taninos está relacionado con su capacidad de formar complejos con las proteínas, disminuyendo la digestibilidad de las mismas y aumentando los niveles de nitrógeno fecal, así como complejos con iones de calcio, hierro y cobre. Estos compuestos también pueden inhibir las enzimas digestivas como amilasas y proteasas, y actuar como antivitaminas. Sin embargo, estos compuestos también ejercen efectos beneficiosos sobre la salud: tienen actividad antioxidante, previenen y mejoran actividades cardiovasculares y ejercen actividad anticancerígena (Morales y Troncoso, 2006; López, 2008).

Estudios en *Jatropha* mostraron una cantidad insignificante de fenoles totales en la harina y la cáscara. Sin embargo, no se observó presencia de Taninos y taninos condensados en la harina. (Makkar *et al.*, 1998; López, 2008).

2.2.8. SAPONINAS

a. Definición y mecanismo de acción

Otros factores antinutricionales son las saponinas, que son compuestas de un aglicón esteroidal o triterpeno unido a una o tres cadenas de sacáridos de tamaño variable y complejo vía uniones éter y éster (Muzquiz y Burbano, 1999).

Son glicósidos muy difundidos en el reino vegetal. Son tóxicas para el hombre en razón a su capacidad de hemolizar los glóbulos rojos; algunos tienen acciones inhibitoras de enzimas (Moll y Moll, 2006; López, 2008).

Las Saponinas de algunas plantas producen efectos adversos o beneficiosos. La saponina de la Soya es relativamente inocua, y en estudios comparativos el contenido de saponina (como diosgenina equivalente) para la harina *Jatropha* fue inferior a la soya. Este compuesto no parece desempeñar un papel importante en la toxicidad de la semilla (Makkar y Becker, 1998; López, 2008).

Las saponinas esteroides son glicósidos esteroides con un núcleo espirostano, que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas. La porción esteroide de las saponinas esteroides (también denominada sapogenina o aglicona esteroide) se origina de la acetilCoenzima vía ácido mevalónico y escualeno. (Martínez, 2001).

b. Fuentes

La saponina es considerada como un antinutriente, frecuentemente asociado con los lípidos. Se concentra en las capas externas del pseudo-grano, principalmente en el pericarpio. Dentro de su composición incluye los sapogenoles, ácido oleanólico, hederagenina (Solíz *et al.*, 2002; Parker, 2005). El contenido y adherencia de la saponina en los granos es muy variable y ha sido el motivo de diferentes estudios y técnicas para eliminarlo, por el sabor amargo que confiere al grano (Tapia, 1997; Parker, 2005). Estas sustancias se pueden eliminar con lavado de los granos en agua fría (Ogungbenle, 2003; Parker, 2005). Las saponinas poseen propiedades detergentes muy fuertes, forman espuma estable en soluciones acuosas (Lépoire, 2005; Parker, 2005).

c. Efectos

Entre los efectos biológicos más conocidos de las saponinas se encuentra su capacidad de lisis de los eritrocitos (Khalil y El-Adawy, 1994; Muzquiz y Burbano, 1999) y de hacer la mucosa de la membrana intestinal permeable (Johnson *et al.*, 1986; Muzquiz *et al.*, 1999)

Presentan actividad hemolítica y sabor amargo y son en general carácter tóxico para animales de sangre fría (Lépore, 2005; Parker, 2005).

2.2.9. GLICÓSIDOS CIANOGENICOS

Los glicósidos cianogénicos (cianida) son un efectivo inhibidor de la citocromo oxidasa e interfieren con el sistema de respiración aeróbica. El ácido hidrocianico se combina con azúcar para formar un compuesto no tóxico conocido como glicósido cianogénico (Inuwa *et al.*, 2011).

Bolhuis (2003) indica que la cadena respiratoria al nivel de la citocromo oxidasa se pierde durante el remojado y cocción por lo que su contenido en plantas y fruta cocida no posee peligro o toxicidad.

2.3. FRACCIONES PROTEICAS ALERGÉNICAS

Breiteneder y Mills (2005), indican que se ha vuelto cada vez más obvio que casi todos los alérgenos de plantas son proteínas de almacenamiento o de defensa. Cucu *et al.* (2013) señala que los alérgenos alimentarios son en su mayoría representados por fracciones proteicas y son reportados típicamente como resistentes a la proteólisis y estables durante el procesamiento alimentario. Doval *et al.* (2010), indica que representan una mínima porción del alimento, pero aun así, poseen una gran potencia biológica, por lo que pequeñas cantidades son suficientes para desencadenar síntomas importantes, y también, producir una respuesta cutánea positiva en personas sensibilizadas.

a. Definición y mecanismo de acción

Los alérgenos alimentarios pueden ser de origen animal o vegetal, siendo proteínas todos los involucrados en reacciones IgE dependientes. En general, son glicoproteínas, es decir, poseen una o más moléculas de azúcares unidos a las cadenas de aminoácidos. La mayoría son estables al calor, a los ácidos y a las proteasas (Doval *et al.*, 2010).

b. Fuentes

Los alérgenos más frecuentes se encuentran en la leche de vaca, el trigo y otros cereales, los huevos, el pescado, los crustáceos y mariscos, las frutas, las leguminosas (en particular el cacahuete y la soja), las nueces, otros frutos secos y las hortalizas (apio,...). Además,

algunos aditivos alimentarios (sulfitos, tartracina, glutamato,...) pueden provocar reacciones alérgicas (Doval *et al.*, 2010).

c. Reactividad Cruzada

La reactividad cruzada es definida como una respuesta positiva a una muestra que no contiene ninguno de los analitos objetivos. Los alimentos testeados para reactividad cruzada deben incluir aquellos que son genéticamente similares al alérgeno objetivo y que son posibles de ser analizados por presencia de alérgenos alimentarios. En general, los alimentos a ser testeados deben ser preparados como normalmente son consumidos (crudos o cocinados) (AOAC, 2012).

d. Efectos

Representan una mínima porción del alimento, pero aun así, poseen una gran potencia biológica, por lo que pequeñas cantidades son suficientes para desencadenar síntomas importantes, y también, producir una respuesta cutánea positiva en personas sensibilizadas (Doval *et al.* 2010).

e. Inmunoensayo enzimático

Es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o antígeno, se fija a un soporte sólido previamente a su interacción con el reactante complementario. Debido a esta característica de la técnica y al uso de anticuerpos acoplados a enzimas, la técnica se describe como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). La detección de alérgenos alimentarios por ELISA, es un procedimiento analítico único caracterizado por el reconocimiento y unión de antígenos específicos por anticuerpos (AOAC, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en los siguientes laboratorios de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú:

- Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, donde se realizó la determinación de proteínas solubles, taninos, inhibidores de tripsina, actividad de lectina y proteínas alérgenas.
- Laboratorio Análisis Físico Químico de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias donde se realizó la determinación de fitatos y de glicósidos cianogénicos.
- Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, donde se realizó la determinación de Esteres de Fórbol.
- Laboratorio de Transformación Química de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales donde se realizó la Marcha Fitoquímica.

3.2. MATERIA PRIMA

Se utilizaron dos muestras de aceite, siendo estas las siguientes:

- Aceite, producido por el método de prensado en frío de semillas de sachá inchi, procedentes de la planta piloto del INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria) obtenido de semilla de ecotipo Apangura del área del distrito Pinto Recodo, Provincia de Lamas-San Martín, Perú.

Proceso de Extracción:

- **Descapsulado, Descascarado, Selección manual:** pelado y selección manual.
- **Prensado en frío:** la almendra es ingresada a la máquina prensadora que extrae el aceite, no se utilizan solventes.
- **Filtrado:** En vacío.

- Aceite de Sacha Inchi de fuente comercial de la empresa Shanantina S.A.C. obtenido de semilla de ecotipo Apangura del área del distrito Pinto Recodo, Provincia de Lamas-San Martín, Perú.

Proceso de Extracción:

- **Descapsulado, Descascarado, Selección manual:** ingreso de la semilla de Sacha Inchi a una máquina peladora donde, mediante un proceso de fricción se separa la semilla de la cáscara.
- **Prensado en frío:** la almendra es ingresada a la máquina prensadora que en frío, extrae el aceite. Se colocan las semillas de Sacha Inchi en el cilindro extractor, y después el mismo es sometido lentamente a la presión hasta alcanzar la requerida a temperatura ambiente.
- **Decantado y filtrado:** En él, el aceite extraído reposa 24 horas para separar las impurezas que se asientan al fondo del depósito. Luego, se bombea por una máquina filtradora, por último pasa por un control de calidad para luego ser envasado en botellas de vidrio oscuro.

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. EQUIPOS

- Agitador Vortex
- Agitador Magnético
- Balanza analítica
- Baño María con sistema de calentamiento
- Baño maría con sistema de agitación
- Campana extractora
- Centrífuga con sistema de refrigeración de 5 000 g
- Micro Centrifuga de 15 000 g
- Equipo HPLC Elite LaChrom (p.a. Hitachi) con:
 - Bomba degasificadora interna
 - Automuestreador
 - Detector UV
- Equipo de Cómputo
- Equipo de digestión
- Lector de Micropozos

- Potenciómetro digital
- Rotavapor
- Refrigerador a 4 °C
- Sistema de Purificación de agua (p.a. Millipore)
- Sonicador

3.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO

- Clips de Tubos de diálisis SnakeSkin (p.a. Pierce)
- Columnas de 0,7 x 15 cm (p.a. Bio-Rad)
- Columna de fase reversa C-18 250 x 4mm di. X Bridge (p.a. Waters)
- Columnas desalinizadoras desechables PD-10 (p.a. Supelco)
- Filtro de jeringa 25 mm 0,2 um "Acrodisc" (p.a. Pall)
- Fiolas con tapa esmerilada de 25 ml, 50 ml y 100ml
- Gradillas de metal
- Jeringas descartables de 5 ml
- Matraces Erlenmeyer de 25 ml, 50 ml, 125 ml y 1L
- Magnetos
- Micropipeta de 10 ul, 100 ul y 1000 ul
- Micropipeta multicanal
- Papel filtro Whatman N° 1, 2 y 4
- Placas de 96 micropozos con tapas Corning® (p.a. Corning)
- Pipeta Volumétrica de 5ml.
- Resina de intercambio iónico Dowex® 1 x 4-50 forma cloruro (p.a. Sigma-Aldrich)
- Tips para micropipeta de 10 ul, 100 ul y 1 000 ul
- Tips para micropipeta multicanal
- Tubos PCR Eppendorf
- Tubos de ensayo de 5ml y 10ml
- Tubos de prueba con tapa esmerilada
- Tubos Falcon de 50ml
- Balones de digestión
- Tubos de diálisis SnakeSkin 3,5K MWCO, 16 mm (p.a. Pierce)
- Vasos Beacker de 10 ml, 50 ml, 100 ml y 1 L

3.3.3. REACTIVOS

- Ácido acético glacial (p.a. Tedia)
- Ácido sulfúrico 95-97% (p.a. Merck)
- Ácido orto-Fosfórico al 85% (p.a. Fermont)
- Ácido bórico granulado (p.a. Fermont)
- Ácido nítrico 65% P.A (p.a. Merck)
- Ácido tricloroacético (p.a. Fermont)
- Ácido tánico ACS (p.a. Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico 37% (p.a. Merck)
- Ácido 4-Amino-3-Hidroxi-1 Nephthalenosulfónico (p.a. Sigma-Aldrich)
- Agua destilada
- Agua desionizada ultrapura
- Agua para HPLC (p.a. Tedia)
- Acetonitrilo (p.a. Tedia)
- Alcohol metílico anhidro (p.a. Fermont)
- Bisulfito de sodio granular ACS, mezcla de NaHSO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (p.a. Sigma-aldrich)
- Buffer Tris-Glycine 10X (p.a. Pierce)
- Buffer y estándar Trizma base (p.a. Sigma-Aldrich)
- Buffer fosfato salino (PBS) (p.a. Sigma-Aldrich)
- Carbonato de sodio anhidro en polvo PA/GR/QP/ACS (p.a. Fermont)
- Cloruro de calcio dihidratado (p.a. Fermont)
- Cloruro de sodio 99.5% (p.a. Merck)
- Cloruro hexahidratado de hierro III P.A. EMSURE® ACS (p.a. Merck)
- Cloruro de cobalto
- Cloruro de antimonio III P.A. EMSURE® (p.a. Merck)
- Dimetil Sulfóxido
- Estándar Forbol-12-miristato 13 acetato (p.a. Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potasio dibásico ACS $\geq 98\%$ (p.a. Sigma-Aldrich)
- Gelatina de piel porcina de 300 de fortaleza de gel Tipo A (p.a. Sigma-Aldrich)
- Kit de ensayo de proteínas Coomassie (Bradford) (p.a. Thermo-Scientific):
 - Reactivo de ensayo de proteínas de Coomassie

- Ampollas de albumina de suero bovino (BSA) de 2mg/ml
- Metileno cloruro (Diclorometano) (p.a. Tedia)
- Eter dietílico ACS, ISSO Emsure (p.a. Merck)
- Folin & Ciocalteu's fenol 2N (p.a. Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio lentejas (p.a. Fermont)
- Kaolin (p.a. Sigma-Aldrich)
- Kit Ridascreen Inmunoensayo enzimático rápido de Lupino para el análisis cuantitativo de proteínas de lupino dulce (p.a. R-Biopharm AG):
 - Anticuerpo conjugado de enzima.
 - Buffer de extracción de alérgenos
 - Tampón de lavado
 - Sustrato cromógeno
 - Solución de parada
- Metanol ACS (p.a. Baker)
- Metanol grado HPLC (p.a. Baker)
- Molibdato de amonio (p.a. Fermont)
- Reactivo de Dragendorff: Tetrayodo bismuto de potasio
- Reactivo de Wagner: solución de yodo-yoduro de potasio
- Reactivo de Mayer: Mercurio tetrayoduro de potasio
- Reactivo de Erdman: Solución de ácidos nítrico y sulfúrico
- Reactivo de Marquis: Solución de Formaldehído al 37% y ácido sulfúrico (1/9) P/V.
- Reactivo de Millon's: compuesto de 10 g de mercurio disueltos en 20 ml de ácido nítrico, diluido todo en 4 volúmenes de agua
- Sal disódica dihidratada de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ACS 99.0-101.0% (p.a. Sigma-Aldrich)
- HClO
- Sustrato sintético Nalpha-Benzoyl-Dl-Arginina 4 & 5G (BAPNA) (p.a. Sigma-Aldrich)
- Sulfato de cobre II pentahidratado (p.a. MERCK)
- Sulfito de sodio anhidro (Na₂SO₃) (p.a. Fermont)
- Tartrato de sodio dihidratado (p.a. Merck)
- Tetrahidrofurano HPLC (p.a. J.T. Baker)

- Tripsina porcina cristalina 20 UG (p.a. Sigma-Aldrich)
- Vainillina EMPROVE EXP PH EUR,BP,NF (p.a. Merck)

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Para caracterizar las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura se realizaron los siguientes análisis: índice de refracción, índice de yodo, densidad, índice de acidez e índice de peróxidos. La metodología empleada para cada análisis correspondió a protocolos oficiales y se describe a continuación:

- **Densidad:** Se utilizó el método de la AOAC 920.212, el cual consiste de la determinación de la relación de peso entre el aceite y agua a 20 °C (AOAC, 2000).
- **Índice de refracción:** Se utilizó el método de la AOAC 921.08, el cual consiste de la medición de la línea de refracción en un prisma a 20 °C (AOAC, 2000).
- **Índice de Yodo:** Se utilizó el método de la AOAC 921.08, el cual consiste de la determinación de la cantidad de yodo absorbido con relación a la cantidad de instauraciones (AOAC, 2000).
- **Índice de Acidez:** Se utilizó el método de la AOAC 940.28, el cual consiste de la determinación de la cantidad de KOH que reacciona con ácidos grasos libres (AOAC, 2000).
- **Índice de Peróxidos:** Se utilizó el método de la AOAC 965.33, el cual consiste de la determinación de la cantidad de yodo absorbido en relación al oxígeno activo de un aceite (AOAC, 2000).

3.4.2. PROTEÍNA SOLUBLE

Crevel *et al.*, (2000) indican que entre las metodologías aprobadas para proteínas totales se encuentran las siguientes: Bradford, donde el tinte azul de Coomassie se une a aminoácidos específicos; Lowry, que recae en aminoácidos aromáticos o el ácido biciconinico (BCA), donde los enlaces peptídicos son detectados por la reacción de Biuret seguida de la unión del tinte. La detección es espectrofotométrica para todos estos métodos.

Se determinó proteínas solubles por el método Bradford (1976), el cual se muestra en el Anexo 1 y el método de Lowry *et al.* (1951), el cual se muestra en el Anexo 2. Cada muestra fue convenientemente diluida y se analizó por triplicado.

3.4.3. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTINUTRIENTES Y PROTEÍNAS: MARCHA FITOQUÍMICA

Se prepararon extractos metanólicos y salinos con las muestras de aceite de Sacha Inchi ecotipo Apangura de fuente Comercial y de la estación del INIA (Anexo 3).

a. MARCHA FITOQUÍMICA

Se realizaron reacciones para identificación de alcaloides, fenoles, Saponinas y proteínas en los extractos de aceite de Sacha Inchi ecotipo Apangura, de fuente comercial y de la estación del INIA (Anexo 4).

Para la determinación de saponinas, de acuerdo a Muñoz (2011), se agita fuertemente durante tres minutos y se observa si la espuma es abundante y estable durante media hora. Asimismo, Ayala y Machaca (2007) indican que la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas, se reconoce por el ensayo de espuma, el cual se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor y si persiste por más de 2 min.

3.5. MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA DETERMINACIÓN DE ANTINUTRIENTES Y PROTEÍNAS

3.5.1. DETERMINACIÓN DE TANINOS

Para la cuantificación de taninos en los extractos de aceite de Sacha inchi se utilizó un método analítico espectrofotométrico, el cual según Lastra *et al.* (2000) está basado en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (tungsto-fosfomolibdico; carbonato de sodio al 20 por ciento), el cual produce un complejo de color azul, cuya extinción es medida a 700 nm, determinando el contenido total de fenoles. Posteriormente se utilizó una solución de gelatina para garantizar el secuestro de los taninos, obteniéndose de la diferencia de ambas determinaciones el porcentaje de taninos reportados como ácido tánico.

Se preparó la curva estándar, luego se determinó el contenido de Polifenoles A (polifenoles totales) y Polifenoles B (polifenoles residuales) y el contenido de taninos se obtuvo restando los Polifenoles A menos los Polifenoles B y se expresó en mg.ac.tánico/mL (Anexo 5).

3.5.2. DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

La determinación de la actividad del inhibidor de tripsina se realizó en las muestras de aceite de semilla de Sacha inchi ecotipo Apangura (Anexo 6). La extracción del inhibidor se realizó utilizando NaOH, por ser la forma más eficiente de extracción (Aliaga, 2001; Aliaga y Gómez, 2007). Para cada muestra se realizaron tres extracciones del inhibidor.

3.5.3. PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN: CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DE LECTINA

Se determinó la actividad hemoaglutinante en las muestras aceite de semilla Sacha inchi ecotipo Apangura (Anexo 7).

3.5.4. DETERMINACIÓN DE ESTERES DE FORBOL

La determinación de la esteres de forbol se realizó en las muestras de aceite de Semilla de Sacha Inchi ecotipo Agangura de fuente del INIA y fuente Comercial (Anexo 8). La extracción de los esteres de forbol se realizó sometiendo las muestras de aceite a extracciones sucesivas con metanol (Devappa *et al.*, 2010). Para cada muestra se realizaron tres repeticiones.

3.5.5. DETERMINACIÓN DE FITATOS

La determinación de fitatos se realizó en las muestras de aceite de Semilla de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente del INIA y fuente Comercial (Anexo 9). Se utilizó la técnica tomada de los Métodos Oficiales de la AOAC (1998), la cual se basa en extraer los fitatos de la muestra, usando HCl. El extracto es mezclado con una solución de EDTA/NaOH y colocado en una columna de intercambio aniónico. La muestra es enjuagada con solución de NaCl 0,7 M, posteriormente se digiere en el con una mezcla de concentrado de HNO₃/H₂SO₄ para liberar fósforo; el cual es medido colorimétricamente.

3.5.6. DETERMINACIÓN DE GLICÓSIDOS CIANOGENICOS

En el presente estudio se utilizó el método picrato (Anexo 10), para la determinación del contenido total de cianuro, el cual según Vetter (2000) está basado en la cuantificación del contenido de HCN liberado de la muestra, mediante la reacción del papel de picrato alcalino con el HCN liberado en un tubo cerrado por una hidrolisis espontánea enzimática. El cianuro puede ser detectado a concentraciones de 30 ± 50 mg/g. Lo cual es adecuado

para las bajas concentraciones de glicósidos cianogénicos que se esperan encontrar en las muestras de aceite de Sacha inchi.

Tava y Annicchiarico (2000), indican que el método picrato se basa en la formación de compuestos rojos coloreados por la reacción del cianuro y el picrato alcalino, los cuales son medidos espectrofotométricamente en orden de proveer resultados que son basados en los contenidos exactos de cianuro de hidrógeno liberados.

3.5.7. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS CON REACTIVIDAD CRUZADA A PROTEÍNAS DE LUPINO

Se utilizó el test de inmunoensayo (ELISA) en su formato de ensayo sandwich, de RIDASCREEN®FAST para Lupino de la empresa R-BIOPHAM AG (2003), para el análisis cuantitativo de proteínas de lupino dulce en alimentos. El anticuerpo detecta específicamente las proteínas de lupino dulce, el test presenta reactividad cruzada con otras proteínas de semillas. Se determinó la reactividad cruzada con anticuerpos que reaccionan con proteínas alergénicas del lupino (Anexo 11).

Según ThermoFisher Scientific (2015), los test de ELISA pueden ser realizados con un número grande de modificaciones al procedimiento básico. El paso clave, la inmovilización del antígeno de interés, puede ser logrado por adsorción directa al plato de ensayo o indirecta vía anticuerpos capturados que han sido añadidos al plato. El antígeno es luego detectado ya sea directamente (anticuerpo primario) o indirectamente (anticuerpo secundario). El formato más poderoso de ensayo de ELISA es el ensayo Sandwich. Este tipo de ensayo de captura es llamado ensayo “Sandwich” debido a que el analito a ser medido está unido entre dos anticuerpos primarios – el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección. El formato Sandwich es usado debido a que es sensitivo y robusto. Es por este motivo que se utilizó este método.

3.6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental para evaluar la presencia de Antinutrientes y proteínas alergénicas del aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura se muestra en la Figura 1 y el resumen se describe a continuación:

- Extracción de antinutrientes: Se preparó extractos metanólicos y salinos de las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura.

- Evaluación de presencia de proteínas solubles y proteínas con reactividad cruzada a proteínas de Lupino: Se utilizó los extractos salinos de las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura para determinar Proteínas solubles y Proteínas con reactividad cruzada a proteínas de lupino.
- Determinación cualitativa de antinutrientes: Se determinó mediante Marcha fitoquímica la presencia o ausencia de alcaloides, saponinas, taninos y proteínas.
- Determinación cuantitativa de antinutrientes: Se determinó concentraciones de taninos, esteres de forbol, fitatos, glicósidos cianogénicos, inhibidores de tripsina y lectinas.
- Identificación de antinutrientes y proteínas con reactividad cruzada a proteínas alérgicas de lupino: Se identificó antinutrientes y proteínas alérgicas con valores por encima de los límites permitidos para humanos.

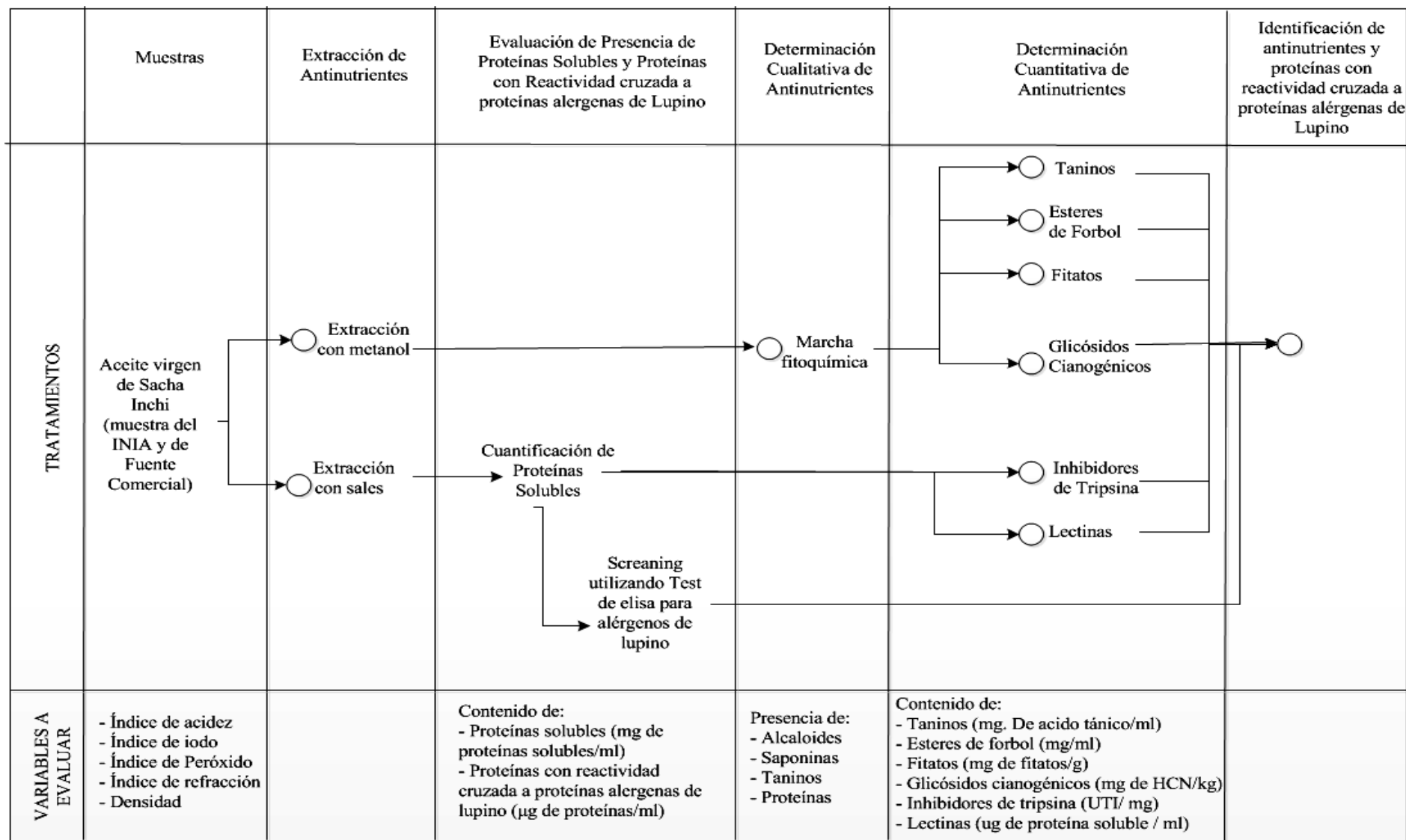


Figura 1: Metodología experimental.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el *software Statgraphics Centurion*.

Se analizó la influencia de los tratamientos del aceite de Sacha inchi (Aceite de fuente Comercial y de Fuente del INIA) en la presencia de compuestos antinutricionales y proteínas, utilizándose un análisis de varianza (ANOVA) de un factor ($p < 0.05$) para todas las muestras.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

A continuación en el Cuadro 2 se observan las características fisicoquímicas obtenidas para las muestras de Aceite de Sacha inchi de ecotipo Apangura.

Cuadro 2: Características fisicoquímicas del aceite de Sacha inchi^a

CARACTERÍSTICA FISICOQUÍMICA	ACEITE DE SACHA INCHI (ECOTIPO APANGURA)	
	FUENTE COMERCIAL	FUENTE INIA
Densidad a 20 °C	0,930 ± 0,001	0,928 ± 0,002
Índice de refracción a 20 °C	1,481 ± 0,0004	1,480 ± 0,0001
Índice de Yodo (g de I ₂ /100 g aceite)	191,743 ± 1,075	189,474 ± 0,294
Índice de Acidez (mgKOH/g aceite)	1,252 ± 0,004	1,274 ± 0,003
Índice de Peróxidos (meq. O ₂ /kg grasa)	3,948 ± 0,073	3,328 ± 0,024

^a Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar, n=3.

Los valores de densidad a 20°C para las muestras de aceite de Sacha inchi en estudio, presentan valores dentro del rango de 0,926 a 0,931 a 20 °C, dado por la NTP 151.400 de Requisitos de Aceite de Sacha inchi (2009). Además, entre las dos muestras de aceite de sachá inchi de fuente comercial y fuente del INIA no existe diferencia significativa al 95 por ciento de confianza para los valores de densidad (Anexo 12).

Según Gutiérrez *et al.* (2011), los valores de densidad del aceite de Sacha inchi son ligeramente más altos que los reportados para otros aceites vegetales tales como el aceite de oliva, maní, semilla de girasol, maíz, semilla de algodón y de soya, debido al alto grado de insaturación del aceite de Sacha Inchi.

Los valores de índice de refracción para las muestras de aceite de Sacha inchi en estudio, presentan valores dentro del rango de 1.478 a 1.481 a 20 °C, dado por la NTP 151.400 de Requisitos de Aceite de Sacha inchi (2009). Asimismo, entre las dos muestras de aceite de sachá inchi de fuente comercial y fuente del INIA no existe diferencia significativa al 95 por ciento de confianza para los valores de índice de refracción (Anexo 12).

Según O'Brien *et al.* (2007), los índices de refracción en el aceite de Sacha inchi son mayores que en otros aceites vegetales tales como el aceite de maíz, aceite de soya o aceite de semilla de algodón debido a que el índice de refracción se incrementa a medida que el número de enlaces dobles se incrementa.

Los valores de índice de yodo para las muestras de aceite de Sacha inchi en estudio, presentan valores dentro del rango de 183 a 199, dado por la NTP 151.400 de Requisitos de Aceite de Sacha Inchi (2009).

El índice de yodo indica el grado de insaturación de los aceites y grasas. Se puede decir también que se expresa como el número de gramos de yodo absorbidos por 100 gramos de grasa o aceite. Los valores de índice de yodo encontrados en el aceite de sachá inchi (191.743 g de yodo/100 g de grasa para el aceite de fuente comercial y 189.474 para el aceite de fuente del INIA), se acercan al valor del índice de aceites marinos, como el de la sardina (189-193 g de I/g grasa) (Mehlembacher *et al.*, 1994). Este índice de acuerdo a Hurtado (2013) se explica por la alta insaturación del aceite de sachá inchi. Asimismo, entre las dos muestras de aceite de sachá inchi de fuente comercial y fuente del INIA no existe diferencia significativa al 95 por ciento de confianza para los valores de índice de yodo (Anexo 12).

Como se observa en el Cuadro 2 el aceite en estudio, presenta índices de acidez superiores al aceite de oliva (87), maní (98) y girasol (104), citados por el CODEX (1999), indicando nuevamente, una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados. El índice de acidez para el aceite de sachá inchi de fuente comercial fue de 1.252 mg KOH/g aceite y para el de fuente del INIA fue de 1,274 mg KOH/g aceite, indicando una aceptable característica

de calidad, según el CODEX (1999), el cual permite valores para el índice de acidez de hasta de 4,0 mg KOH/g aceite para aceites vírgenes y prensados al frío. Asimismo, entre las dos muestras de aceite de sacha inchi de fuente comercial y fuente del INIA sí existe diferencia significativa al 95 por ciento de confianza para los valores de índice de acidez (Anexo 12).

El índice de peróxido fue para el aceite de Sacha inchi de fuente comercial de 3,948 meq O₂/Kg de aceite y para el aceite de Sacha inchi de fuente del INIA de 3,328 meq O₂/Kg de aceite; mostrando ser apto para consumo humano, ya que el límite máximo permisible es de 15 meq O₂/Kg de aceite. Este valor también indica que el aceite no ha presentado durante los procesos de almacenamiento y extracción deterioros en su composición de ácidos grasos insaturados, al no superar el valor máximo de 15 meq O₂/Kg indicado para aceites vírgenes y prensados al frío por el CODEX (1999). Indicando que el aceite no es altamente propenso a generar rancidez oxidativa a cortos tiempos de almacenamiento. Asimismo, los valores de índice de peróxido para las muestras de aceite de Sacha inchi en estudio, presentan valores por debajo de los 10 meq O₂/Kg de aceite, lo cual cumple la NTP 151.400 de Requisitos de Aceite de Sacha inchi (2009). Asimismo, entre las dos muestras de aceite de sacha inchi de fuente comercial y fuente del INIA sí existe diferencia significativa al 95 por ciento de confianza para los valores de índice de peróxido (Anexo 12).

4.2. ALCALOIDES

Según Muñoz (2011), la presencia de turbidez o precipitados color amarillo, naranja y violeta es considerado positivo para las pruebas de alcaloides. Puesto que otros compuestos pueden formar precipitados con los reactivos empleados para la detección de alcaloides, se considera que al menos 3 de las 5 pruebas deben dar positivo (Reacciones de Dragendorf, Wagner, Mayer, Erdman y Marquis). De acuerdo a lo anterior y a los resultados mostrados en el Cuadro 3, se puede descartar la presencia de alcaloides en los extractos metanólicos y salinos de aceite de Sacha inchi de las fuentes Comercial y del INIA del Ecotipo Apangura.

Cuadro 3: Marcha fitoquímica de alcaloides ^{a, b}

REACCIÓN	ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE COMERCIAL		ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE DEL INIA	
	Extracto Metanólico	Extracto Salino	Extracto Metanólico	Extracto Salino
Dragendorff	-	-	-	-
Wagner	-	-	-	-
Mayer	-	-	-	-
Erdman	-	-	-	-
Marquis	-	-	-	-

^aDeterminaciones por triplicado. ^bLeyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante.

Según Muñoz (2011), un precipitado color blanco o crema indica que la prueba de alcaloides es positiva para la prueba de Mayer. Un precipitado color café-rojizo es positivo para la prueba de Wagner. Un precipitado amarillo intenso es positivo para la prueba de Dragendorff. Presencia de coloración rojiza es positivo para la prueba de Erdman y presencia de coloración naranja, violeta o púrpura es positivo para la prueba de Marquis. De acuerdo a lo anterior en ninguna de las repeticiones se detectó presencia de alcaloides en las muestras de aceite de Sacha Inchi ecotipo Apangura de fuente Comercial y del INIA.

Según Pariona (2008), al realizar un análisis fitoquímico en la almendra de Sacha inchi se encontró una presencia abundante de alcaloides mediante las reacciones de Mayer, Wagner y Sonneschein, y una presencia moderada de alcaloides mediante la reacción de Dragendorff, utilizando extractos acuosos y etanólicos. De lo cual se puede indicar que el proceso de extracción del aceite de las almendras de Sacha Inchi elimina la presencia de alcaloides en el aceite.

4.3. SAPONINAS

De acuerdo a los resultados del Cuadro 4, para el caso de los extractos metanólicos provenientes del Aceite de Sacha inchi de Ecotipo Apangura de Fuente Comercial y de Fuente del INIA se observó presencia de espuma estable en una cantidad escasa, la cual persistió por más de 2 minutos, esto debido a según Castillo *et al.* (2010) las saponinas son un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de

ésta, por lo tanto al agitar sus soluciones se forma una espuma abundante y relativamente estable, por ser tensioactiva.

Asimismo según lo indicado por Castillo *et al.* (2010), fue factible la extracción de las saponinas con metanol debido a la afinidad química con el solvente utilizado, considerando que aquellas sustancias que tienen polaridades similares deben ser afines entre sí, siendo las saponinas polares al igual que el metanol.

Sin embargo, Muñoz (2011), señala que dado que otras sustancias pueden formar espuma, esta prueba tiene carácter presuntivo. Por lo cual se sugiere, posteriores estudios de identificación de saponinas en el aceite de Sacha Inchi, por espectrometría de masa o espectroscopia infrarrojo de acuerdo a lo señalado por Martínez (2001).

Por otro lado Mondragón (2009), indica que la familia Euphorbiaceae se caracteriza por presentar saponinas triterpenoides, además reporta en el residuo industrial de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., presencia de saponinas de núcleo triterpenico, de acuerdo a las reacciones de coloración específicas y manchas características observadas en la cromatografía de capa fina y en un estudio cuantitativo la presencia de 0.42 por ciento de saponinas totales. De acuerdo a lo anterior y a la presencia escasa de espuma en la marcha fitoquímica se sugieren estudios posteriores para determinación de saponinas en aceite de Sacha inchi.

Cuadro 4: Marcha fitoquímica de saponinas ^{a, b}

REACCIÓN	ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE COMERCIAL		ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE DEL INIA	
	Extracto Metanólico	Extracto Salino	Extracto Metanólico	Extracto Salino
Formación de Espuma	+	-	+	-

^aDeterminaciones por triplicado. ^bLeyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante.

Según Ayala y Machaca (2007), las saponinas dan coloraciones específicas a los reactivos según sean de tipo esteroidal o triterpénico. Así con el reactivo de Rosenthaler se presentan coloraciones amarillo-rojizo, con el reactivo de Acido Tricloroacético dan coloración que van del naranja al rojo. De acuerdo a lo anterior, en las reacciones de identificación de

sapogeninas no se obtuvo ningún resultado positivo para ninguna de las muestras, como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5: Marcha fitoquímica de Sapogeninas ^{a, b}

REACCIÓN	ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE COMERCIAL		ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE DEL INIA	
	Extracto Metanólico	Extracto Salino	Extracto Metanólico	Extracto Salino
Prueba de Ácido Tricloroacético	-	-	-	-
Reacción de Rosenthaler	-	-	-	-
Identificación de deltasapogeninas	-	-	-	-

^aDeterminaciones por triplicado. ^bLeyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante.

4.4. TANINOS

Según Goel *et al.* (2005), los taninos, siendo un grupo complejo de compuestos polifenólicos, son responsables de unir enzimas digestivas y proteínas de la dieta, entre sus efectos antinutricionales están la disminución de la biodisponibilidad de micronutrientes y la digestibilidad de proteínas. Por lo cual se consideró en este estudio su determinación en los extractos aceite de Sacha inchi.

Según Muñoz (2011), los taninos se caracterizan por la precipitación de metales pesados, así como las proteínas. Soluciones color verde, azul o negro luego de la adición del FeCl₃ son indicativos de la presencia de esta familia de metabolitos secundarios. Debido a que no se presentaron estas coloraciones, de acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 6, no se encontraron taninos en las muestras de aceite de Sacha inchi de ecotipo Apangura de fuente Comercial y de fuente del INIA, mediante la marcha fitoquímica.

Además, según (Domínguez, citado por Vonka, 2006), el cloruro férrico acuoso o etanólico forma colores con los compuestos fenólicos en general, si otorga una coloración verde o pardo verdosa sugiere derivados del catecol o taninos no hidrolizables, un color azul,

derivados del pirogalol o taninos hidrolizables. Por lo que se puede decir que no se detectaron taninos hidrolizables y no hidrolizables.

De acuerdo a lo indicado por (Trease y Evans, citados por Vonka, 2006) para ratificar el resultado de la prueba con cloruro férrico se realizó el ensayo con gelatina salada como prueba confirmatoria, sin observarse presencia de precipitado en ninguna de los extractos de Aceite de Sacha inchi de ecotipo Apangura de ambas fuentes (Comercial y del INIA).

Cuadro 6: Marcha fitoquímica de taninos ^{a, b}

REACCIÓN	ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE COMERCIAL		ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE DEL INIA	
	Extracto Metanólico	Extracto Salino	Extracto Metanólico	Extracto Salino
Reacción de FeCl ₃	-	-	-	-
Prueba de Gelatina Salada	-	-	-	-

^aDeterminaciones por triplicado. ^bLeyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante.

En el Cuadro 7, se puede observar que el contenido de taninos no se encuentra dentro de los límites de detección del método utilizado, por lo que se presume que su contenido en las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente Comercial y del INIA es traza.

Cuadro 7: Concentraciones de taninos ^a

MUESTRA	MG. ACIDO TÁNICO/ML
Aceite de Sacha Inchi de Comercial	ND ^a
Aceite de Sacha Inchi del INIA	ND ^a

^aND= niveles no detectados por el método, n=3

Muñoz *et al.*, (2013), reporta para aceite de *Plukenetia volúbilis L.* contenido de taninos en extracto metanólico (6,18 mg GAE/kg) y en extracto con solvente hexano (4,99 mg GAE/kg), siendo ambos contenidos de concentración bajos (coloración verde limón). Lo anterior indica que el contenido de taninos dependiendo del método utilizado se encuentra en cantidades bajas o como se encontró en el presente estudio no detectables.

Singleton (1981) indica que un efecto tóxico serio de los taninos ocurre sólo cuando son consumidos en grandes cantidades (más del 1 por ciento de la dieta). Lo cual no sería sobrepasado por las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura del presente estudio. Por otro lado, según Kumar y Singh (1984), el contenido de taninos requeridos para el rechazo por animales de pastoreo es cerca de 20 mg/g de materia seca.

4.5. PROTEÍNAS

Según Donnersberger y Lesak (2002), la reacción de Millon es específica para el aminoácido tirosina, que contiene un anillo de benceno al que se une un grupo hidróxilo (-OH). Un color rojo brillante indica presencia de tirosina, un aminoácido común en la mayoría de proteínas.

En las muestras de extractos metanólicos y salinos de aceite de Sacha inchi se formó un precipitado de color melón en los tubos de ensayo, por lo cual se indicó una presencia poca o escasa de proteínas en las muestras, como se señala en el Cuadro 8.

Cuadro 8: Marcha fitoquímica de proteínas ^{a, b}

REACCIÓN	ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE COMERCIAL		ACEITE DE SACHA INCHI DE FUENTE DEL INIA	
	Extracto Metanólico	Extracto Salino	Extracto Metanólico	Extracto Salino
Reacción de Millon's	+	+	+	+

^aDeterminaciones por triplicado. ^bLeyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante.

4.5.1. PROTEÍNAS SOLUBLES

Según Crevel *et al.* (2000) existe poca data acerca del efecto de los diferentes métodos de refinado en contenido proteico residual total. Mientras que ha sido claramente establecido que la refinación remueve o disminuye considerablemente la alergenicidad en aceites, el efecto del proceso en sus diferentes formas en la alergenicidad de las proteínas residuales per se no ha sido estudiado hasta la fecha. Motivo por lo cual se determinó proteínas solubles en las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura.

Encontrándose los contenidos proteicos residuales en el caso del aceite proveniente del INIA en el rango de 0.322 a 1.385 mg/ml de aceite, y en el caso del aceite proveniente de la fuente Comercial en el rango de 0.099 a 0.289 mg/ml de aceite (resultados mostrados en el Cuadro 9), por lo cual es justificable realizar en posterioridad un análisis para determinar si existen alérgenos en los aceites, debido a que se encuentran en el rango de proteínas residuales para aceites que sí contienen alérgenos como en los aceites de maní Crudo de: Anglia Southampton (0.220 mg/ml); de Leatherhead (0.187 mg/ml) y de Vlaardingen (0.091 mg/ml); reportados por Skinner y Haynes (1998), citados por Crevel *et al.* (2000).

Cuadro 9: Cuantificación de proteínas solubles por método de bradford y lowry

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES UTILIZADO	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES (MG/ML DE ACEITE)	
	Aceite de Sacha Inchi Comercial	Aceite de Sacha Inchi del INIA
Bradford	0.099 ± 0.002	1.385 ± 0.003
Lowry	0.289 ± 0.346	0.322 ± 0.063

Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar, n=3

Según Sathe *et al.* (2012), entre los solventes probados el NaOH 0,1N y el NaCl 2M fueron los más efectivos para solubilizar las proteínas de la harina de Sacha Inchi. Debido a que las fracciones de albumina constituyen una porción significativa de las proteínas totales de la semilla, una buena solubilidad fue esperada en solventes acuosos. A pesar de que el

NaOH 0,1M fue el solubilizador de proteínas más usado, la exposición al álcali es conocida por alterar proteínas a través de la deamidación de aminoácidos y por lo tanto puede alterar las propiedades proteicas. La exposición a álcali también puede causar la destrucción de algunos aminoácidos esenciales, tales como la lisina, disminuyendo por lo tanto el valor nutritivo de las proteínas solubilizadas. Por estas razones el NaCl 2M fue considerado el mejor solvente para solubilizar las proteínas de la harina de Sacha Inchi. Por lo cual se utilizó para suspender las proteínas de las muestras de aceite, la solución de NaCl 2M.

Según Crevel *et al.* (2000), resultados experimentales recientes muestran que valores consistentes del orden de 100-300 ug de proteína por ml de aceite para aceites crudos de maní y girasol. Esto también revela que la refinación resulta en una reducción de más de 100 veces del contenido proteico (al paso final) y que los diferentes pasos de la refinación todos contribuyen a esta reducción tanto para la refinación química como física. Lo cual se puede comprobar en los resultados obtenidos para el aceite de Sacha inchi proveniente del INIA, el cual es solamente filtrado al vacío a nivel de laboratorio, en cambio el aceite proveniente de fuente Comercial recibe un filtrado posterior en un filtro de placas el cual le permite obtener un mayor grado de separación de residuos proteicos, siendo por esto los valores encontrados para el aceite de fuente Comercial inferiores a los encontrados en el aceite del INIA, en lo correspondiente a proteínas solubles (Cuadro 9). Lo cual se respalda, por el hecho de que sí existe diferencia significativa al 95 por ciento de confianza para los valores de proteínas solubles determinados por el método de Bradford, entre las dos muestras de aceite de sachá inchi de fuente comercial y fuente del INIA (Anexo 19).

4.5.2. INHIBIDORES DE TRIPSINA

Devappa *et al.* (2011) señala que el inhibidor de tripsina se encuentra presente en algunas semillas no convencionales, como la variedad no tóxica de *Jatropha curcas* y *Moringa oleífera*, siendo localizados en el endospermo de la semilla. A su vez, Makkar *et al.* (2007) señala que algunos cereales y nueces contienen este inhibidor. Por lo cual se procedió a realizar el descarte de presencia de inhibidores de tripsina en las muestras de Aceite de Sacha inchi.

En el Cuadro 10 se puede observar que las unidades inhibitoras de tripsina en aceite del INIA ecotipo Apangura (4,017 UTI/mg) son mayores que las encontradas en el aceite Comercial (0,833 UTI/mg), sin embargo estos valores son mucho menores que los

reportados por Inuwa *et al.* (2011), para aceite de cacahuete (80,8 UTI/mg) y aceite de palma (54,7 UTI/mg), los cuales son aceites de consumo común.

No se encontró diferencia significativa al 95 por ciento de confianza entre las dos muestras de aceite de sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y fuente del INIA los valores de inhibidores de tripsina (Anexo 15).

Cuadro 10: Concentraciones de inhibidores de tripsina

MUESTRA	VALOR
Aceite de Sacha Inchi de Fuente Comercial	0.833 ± 2.059 UTI/mg ^a
Aceite de Sacha Inchi de Fuente del INIA	4.017 ± 6.053 UTI/mg ^a

^a UTI/mg (unidades de tripsina inhibida por mg de muestra) media ± desviación estándar, n=3.

Inuwa *et al.* (2011) reporta la dosis letal para inhibidores de tripsina de 2.5 g/kg de peso corporal. Siendo los valores encontrados en ambas muestras de aceite de Sacha inchi mucho menores a este valor indicado por Inuwa *et al.* (2011), se descarta la presencia de inhibidores de tripsina en niveles que puedan afectar al consumidor en las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y de fuente del INIA.

4.5.3. ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE

Según Matson *et al.* (2005) para la prueba de hemaglutinación, sólo se deben conservar las muestras que presenten precipitado, utilizándolo para continuar con el análisis de lectinas. Debido a que ninguna de las muestras mostró precipitado, como se observa en la Figura 2, no se continuó con el método, descartando la presencia de lectinas en las muestras de Aceite de Sacha inchi de Ecotipo Apangura de fuente Comercial y de fuente del INIA.



Figura 2: Muestras de extracto de aceite de fuente del INIA (a) y de fuente comercial (b) después de centrifugación siguiendo metodología de prueba hemaglutinación.

Además se cuantificaron las proteínas solubles en los extractos de Aceite de Sacha Inchi, encontrándose una presencia traza de proteínas. Lo cual ratifica la ausencia de lectinas, debido a que estas poseen naturaleza proteica.

Por otro lado, según Makkar *et al.* (1997), las lectinas son termolábiles y sus efectos adversos pueden por lo tanto ser mitigados por tratamiento térmico antes de que la torta o semillas sean consumidas por ganado o humanos. Martínez *et al.* (2012), señala que el tratamiento térmico mejora la calidad proteica, incrementando la digestibilidad y absorción en adición de inactivar completamente los inhibidores de tripsina y lectina que puedan tener efecto adverso en la salud. De acuerdo a lo anterior y al tratamiento térmico durante el proceso de tostado que han sufrido las semillas de Sacha Inchi para obtener el aceite, se puede indicar que este podría haber influido en la ausencia de lectinas en las muestras.

4.5.4. PROTEÍNAS CON REACTIVIDAD CRUZADA A PROTEÍNAS DE LUPINO

Crevel *et al.* (2000), indica que las alergias alimentarias involucran casi exclusivamente los componentes proteicos de los alimentos. Estas proteínas son capaces de producir varias reacciones en algunos individuos alérgicos a ellas después de su ingestión, en algunos casos, de cantidades minúsculas del alérgeno ofensivo. Los aceites comestibles son producidos por un rango botánico diverso de especies de plantas. Muchas de las semillas usadas para producir los aceites vegetales contienen proteínas que son altamente alergénicas. La producción involucra, presionar la semilla, seguido de una serie de procesos para refinar el aceite al grado deseado. A pesar de que el refinamiento completo de los aceites resulta en casi la completa remoción proteica, umbrales de reactividad no

han sido establecidos, ni siquiera para alérgenos que han sido bien estudiados. En estas circunstancias es posible que algunas veces suficiente proteína permanezca en el aceite para provocar una reacción en un individuo altamente sensible. Como resultado, dudas han sido llamadas en la seguridad de los aceites derivados de estas fuentes para individuos alérgicos, particularmente en la luz de casos bien documentados de reacciones después de ingestión de algunos aceites. A consecuencia de que las muestras de aceite de Sacha Inchi Ecotipo Apangura provenientes de la fuente del INIA y fuente Comercial son vírgenes, sólo se les realiza después de la extracción un filtrado, existe la posibilidad de que permanezca suficiente proteína en el aceite para provocar una reacción alérgica como enuncian Crevel *et al.* (2000).

Se utilizó el kit de Inmunoensayo de *Sandwich* de Elisa, en el cual se da la interacción entre anticuerpo específicos de las proteínas del Lupino dulce y el antígeno (alérgeno alimentario). Del cual se determinó las proteínas solubles asociadas a alergenicidad en Lupino, por reactividad cruzada, la cual según la AOAC (2012), se define como la respuesta positiva a una muestra que no contiene ninguno de los analitos objetivos. Encontrándose cantidades traza del orden 10^{-8} a 10^{-22} microgramos por ml de aceite de Sacha inchi (resultados mostrados en el Cuadro 11), de proteínas con reactividad cruzada a anticuerpos que reconocen proteínas alérgicas de lupino, lo cual indica una reactividad cruzada muy baja para el caso de las muestras de Aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura, es decir los límites detectados fueron muy bajos utilizando el Kit de Inmunoensayo de Sandwich de Elisa.

Los anteriores resultados indican que las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura no representarían alergenicidad para las personas alérgicas a las proteínas de lupino, debido a que se encontraron límites muy bajos de reactividad cruzada entre los anticuerpos (Ig) que reconocen proteínas alergénicas de Lupino y las proteínas solubles del Sacha inchi.

Lo cual se ve reforzado por los resultados obtenidos por Lazaro (2015), en los cuales se reporta que en un caso de alergenicidad a sachá inchi, al cual se le realizó la prueba cutánea (*Prick test*), el resultado fue positivo para la prueba de semilla, torta y cascara de sachá inchi, pero no para el aceite de sachá inchi, de lo cual se indica que el contenido de proteína en el aceite no es significativo, pues las proteínas se quedan en la torta luego de la extracción del aceite.

Cuadro 11: Proteínas con reactividad cruzada a proteínas alérgenas de lupino

FUENTE	MG DE PROTEÍNA DE LUPINO/ ML DE ACEITE DE SACHA INCHI
Aceite de Sacha Inchi Comercial	2.121 ± 5.147E-08
Aceite de Sacha Inchi del INIA	1.620 ± 2.593E-22

Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar, n=3

No se encontró diferencia significativa al 95% de confianza entre las 2 muestras de aceite de sachá inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y fuente del INIA para los valores de proteínas con reactividad cruzada a proteínas alérgenas de lupino (Anexo 20).

4.6. ESTERES DE FORBOL

En el cuadro 12, se muestran los resultados obtenidos de esteres de forbol para las muestras de Aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura, siendo para la Fuente Comercial de 0.0398 mg/ml de aceite, y para la fuente del INIA de 0.0240 mg/ml de aceite, los cuales no sobrepasan los valores reportados como tóxicos por Makkar *et al.* (1997) (0.87 a 3.32 mg/g para Torta de semilla de J. Curcas variedad tóxica) y Francis *et al.* (2013) (0.1 mg/g, límite superior bajo el cual animales de prueba empiezan a rechazar dietas de semillas de variedad tóxica de J. Curcas). Por lo cual se considera que el aceite de Semilla de Sacha inchi de ecotipo Apangura de fuente Comercial y de fuente del INIA no contiene concentraciones tóxicas para el ser humano de Esteres de Forbol.

La extracción de los esteres de forbol de las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura, fue posible debido a que según Severa *et al.* (2013) citado por Martínez-Herrera (2005) el mayor rendimiento de extracción de esteres de forbol se logra en metanol puro, presumiblemente debido a las interacción de uniones de hidrógenos entre los grupos metanol e hidroxil de los esteres de forbol. Los esteres de forbol son moderadamente polares y el etanol y metanol tienen mayor afinidad por ellos.

Según Makkar *et al.* (1997), el contenido de esteres de forbol en las semillas de J. curcas varía y de acuerdo a la presencia de esteres de forbol o su ausencia, J. curcas puede ser categorizado como tóxico o no tóxico/ comestible. Además, reporta que la torta de semilla de J. Curcas con un contenido de esteres de forbol de 0.11 mg/g es considerada no tóxica,

estas semillas son consumidas por humanos sin ningún efecto adverso aparente, y debido a ello, esta variedad es conocida por ser no tóxica, valor que se encuentra por encima de lo obtenido en los resultados mostrados en el Cuadro 12 con las muestras de aceite de Sacha inchi de ecotipo Apangura.

Cuadro 12: Concentraciones de esteres de forbol ^{a, b}

MUESTRA	CONCENTRACIÓN EN LA MUESTRA
Aceite de Sacha Inchi de fuente Comercial	0.0398 ± 0.0004 mg/ml de aceite ^b
Aceite de Sacha Inchi de fuente del INIA	0.0240 ± 0.0107 mg/ml de aceite ^b

^a Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar, n=3, ^b Equivalente a forbol-12-miristato 13-acetato

No se encontró diferencia significativa al 95 por ciento de confianza entre las dos muestras de aceite de sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y fuente del INIA para los valores de esteres de forbol (Anexo 16).

Además según Nokkaew (2008), no es posible destruir a los esteres de forbol por tratamiento térmico debido a que son estables al calor y pueden soportar temperaturas de tostado tan altas como 160 °C por 38 minutos. De acuerdo a lo anterior, se puede indicar los valores encontrados de esteres de forbol en las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura no fueron afectados por el tratamiento térmico durante el tostado de las semillas de sacha inchi previo a la extracción del aceite.

4.7. FITATOS

Según Martínez *et al.* (2012), el ácido fítico es considerado como un antinutriente principalmente debido a su habilidad de unirse a minerales dietarios tanto como a proteínas y almidón y consecuentemente disminuir su biodisponibilidad en humanos, razón por la cual se consideró su estudio en el aceite de Sacha inchi, aunado a lo indicado por Febles (1998), quién señala que el ácido fítico y en general los fitatos, se encuentran en elevadas concentraciones en las semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas, se sintetiza durante el desarrollo de la semilla y se deposita en unas estructuras denominadas globoides en forma de sales de magnesio y potasio. Estas estructuras se hallan localizadas en el interior

de los corpúsculos de proteínas de las células del cotiledón de las leguminosas y oleaginosas y en la cubierta de los granos de cereales.

Asimismo, Schlemmer *et al.* (2009), ratifica que las principales fuentes de fitatos en la dieta son los cereales y legumbres, incluyendo semillas oleaginosas y nueces. En semillas oleaginosas como las semillas de girasol, de soya, productos de soya, semillas de sésamo, semillas de limo y semillas de colza el contenido de ácido fítico varían desde 1 a 5.4 por ciento (peso seco). Debido a lo anterior se consideró realizar la cuantificación de fitatos en las muestras de aceite de Sacha inchi de ecotipo Apangura, con el fin de comprobar si después del proceso de extracción del aceite existía presencia de fitatos en este.

En el Cuadro 13, se muestran los resultados de contenido de fitatos en aceite de Sacha Inchi de fuente Comercial (3,909 mg/g de aceite) y aceite de Sacha Inchi de fuente del INIA (3.356 mg/g de aceite), valores que se encuentran cercanos a lo reportado por Inuwa *et al.* (2011) para aceite de cacahuete (4,18 mg/g).

No se encontró diferencia significativa al 95 por ciento de confianza entre las dos muestras de aceite de sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y fuente del INIA para los valores de fitatos (Anexo 17).

Cuadro 13: Concentraciones de fitatos ^a

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE FITATOS
Aceite de Sacha Inchi de Comercial	3,909 ± 0,402 mg/g de aceite ^a
Aceite de Sacha Inchi del INIA	3,356 ± 0,808 mg/g de aceite ^a

^aTodos los datos se expresaron como media ± desviación estándar, n=3.

Según Inuwa *et al.* (2011) la dosis letal para fitatos es de 50-60 mg/kg de peso corporal, de acuerdo a lo cual para una persona de 70 kg de peso, sería necesario consumir de 895.37 a 1071.44 ml de aceite de Sacha Inchi de fuente Comercial y de 1042.91 a 1251.49 ml de aceite de Sacha Inchi de fuente del INIA, para poder llegar a este valor.

4.8. GLICÓSIDOS CIANOGENICOS

Se encontró en el presente estudio una concentración de glicósidos cianogénicos expresados como mg de HCN liberados/ kg de muestra, de 6.058 mg de HCN/kg para el aceite de Sacha inchi de fuente Comercial y de 6.296 mg de HCN/kg para aceite de Sacha inchi de fuente del INIA, como se puede observar el Cuadro 14.

Cuadro 14: Concentraciones de glicósidos cianogénicos

MUESTRA	CONCENTRACIÓN
Aceite de sachá inchi de fuente comercial	6.058 ± 0.444 mg de hcn/kg ^a
Aceite de sachá inchi de fuente del INIA	6.294 ± 0.299 mg de hcn/kg ^a

^a Todos los datos se expresaron como media ± desviación estándar, n=3

No se encontró diferencia significativa al 95 por ciento de confianza entre las dos muestras de aceite de sachá inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y fuente del INIA para los valores de glicósidos cianogénicos (Anexo 18).

Según FAO y WHO (2011), el valor recomendado de 10 mg HCN/kg en productos de yuca, indica el consumo de harina de yuca no asociado con toxicidad aguda, valor también citado por el actual Estándar del *Codex* para harina de yuca comestible (*Codex Standard* 176-1989), De acuerdo a lo anterior, los contenidos de HCN/kg de muestra de aceite de Sacha inchi de Ecotipo Apangura encontrados en el presente estudio, no sobrepasan el límite de 10 mg de HCN/kg.

FAO y WHO (2011), reportan que el nivel de cianuro en sangre de un adulto con toxicidad aguda de cianuro causada por la ingestión de semillas de albaricoque fue 1.1 mg/L, 5 horas después de la ingestión. La exposición a cianuro estimada fue de 0.73 mg/kg de peso corporal. Según lo cual para que una persona de 70 kg fuera expuesta a toxicidad aguda, debería tener 51.1 mg de HCN, lo cual se aleja también de lo encontrado en las muestras de Aceite de Sacha inchi Ecotipo Apangura.

Según Eleazu *et al.* (2014), los glicosidos cianogénicos son compuestos que entregan glucosa, cianuro de hidrógeno y aldehído o ketona tras las hidrolisis con un ácido o enzima. Este cianuro puede ser letal a medida que intercala con la citocromo oxidasa para funciones aeróbicas. Akiyama *et al.* (2006) indica que la dosis letal de cianuro en humanos ha sido reportada que se encuentra entre 50-300 mg/ kg de peso corporal, además indica

que para el caso de adultos las dosis letales de intoxicación por cianuro son 200-300 mg/kg de peso corporal. De acuerdo a lo anterior, para alcanzar las dosis letales citadas anteriormente en el caso de las muestras de Aceite de Sacha Inchi Ecotipo Apangura de fuente comercial, una persona de 70 kg debería consumir entre 577.8 y 3466.5 kg de aceite para llegar a estas dosis letales; en el caso del Aceite de Sacha Inchi Ecotipo Apangura de fuente del INIA debería consumir entre 566.1 y 3336.5 kg de aceite.

Sin embargo, según Burns *et al.* (2012) el efecto tóxico del cianuro en humanos depende del tamaño corporal, estado de salud, la dosis de cianuro ingerida y el tiempo de duración a través del cual es ingerido. Por lo que a pesar de que las muestras de aceite de Sacha Inchi ecotipo Apangura no muestran una presencia significativa de glicósidos cianogénicos en la forma de HCN liberado, se recomendaría hacer estudios con animales para determinar las dosis letales correspondientes.

V. CONCLUSIONES

- Se pudo concluir que las muestras de Aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y del INIA no presentan diferencia significativa entre sí, ni contenidos por encima de los límites permitidos para humanos de compuestos antinutricionales y proteínas solubles con reactividad cruzada a proteínas alérgicas de Lupino.
- No se encontraron taninos mediante la marcha fitoquímica y la determinación cuantitativa, en las muestras de aceite de Sacha inchi comercial y del INIA ecotipo Apangura.
- En la marcha fitoquímica se presentaron en el aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura comercial y del INIA indicativos de escasa presencia de saponinas (presencia de espuma estable en poca cantidad).
- En las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y de fuente del INIA, se encontró los siguientes valores respectivamente de: esterés de forbol (0.0398 ± 0.0004 mg/ml de aceite; 0.0240 ± 0.0107 mg/ml de aceite), fitatos (3.909 ± 0.402 mg/g de aceite; 3.356 ± 0.808 mg/g de aceite) y glicósidos cianógenicos (6.058 ± 0.444 mg de HCN/kg; 6.294 ± 0.299 mg de HCN/kg); valores por debajo de los límites permitidos para el ser humano.
- En la marcha fitoquímica se encontró una presencia escasa de proteínas, y en la posterior cuantificación de proteínas solubles se encontró cantidades traza en aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura: de fuente comercial (por método de Bradford: 0.099 ± 0.002 mg/ml de aceite, por método de Lowry: 0.289 ± 0.346 mg/ml de aceite) y en aceite de fuente del INIA (por método de Bradford: 1.385 ± 0.003 mg/ml de aceite, por método de Lowry: 0.322 ± 0.063 mg/ml de aceite),

valores que indican que el proceso de tratamiento de las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente comercial y del INIA es eficiente en la remoción de estos analitos o estos se encuentran en cantidades traza en la semilla.

- No se encontró lectinas en las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente Comercial y del INIA.
- Se encontraron valores reducidos de inhibidores de tripsina en las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente Comercial (0.833 ± 2.059 UTI/mg de aceite) y de fuente del INIA (4.017 ± 6.053 UTI/mg de aceite), valores muy por debajo a los asociados a aceites de consumo común en cocina como el de Palma, lo cual sugiere no se encuentren estos antinutrientes en valores que sobrepasen los límites permitidos para el ser humano.
- Las muestras de aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura, de fuente Comercial y de fuente del INIA no presentan alérgenicidad para las personas alérgicas a las proteínas de lupino, debido a que se encontró límites muy bajos de reactividad cruzada entre los anticuerpos que reconocen proteínas alérgicas de Lupino y las proteínas solubles de las muestras de aceite de Sacha inchi
- Las muestras de Aceite de Sacha inchi ecotipo Apangura de fuente del INIA y fuente Comercial no presentan diferencia significativa al nivel de significancia de 0.05 en los valores encontrados en compuestos antinutricionales y proteínas solubles con reactividad cruzada a anticuerpos que reconocen proteínas alérgicas de Lupino, por lo que se puede decir que el proceso de extracción del aceite virgen de Sacha inchi no es una variable influyente en el contenido de estos analitos.

VI. RECOMENDACIONES

- En la marcha fitoquímica se pudo determinar una presencia ligera de saponinas en las muestras de aceite de Sacha Inchi, por lo cual se sugieren posteriores estudios de identificación de saponinas en el aceite de Sacha Inchi, por espectrometría de masa o espectroscopia infrarrojo, con el fin de determinar si poseen toxicidad.
- A pesar de que las muestras de aceite de Sacha Inchi no muestran una presencia significativa de glicósidos cianogénicos en la forma de HCN liberado, se recomendaría hacer estudios con animales para determinar las dosis letales correspondientes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, W; Salimon, J. 2009. Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. *Europe Journal Science Research* 31:429-436.
- Aliaga, P; Gómez, B. 2007. Efecto del desgrasado sobre la actividad del inhibidor de tripsina en raíces de camote. *Anales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina* 68(2) s.p.
- Arevalo, G. 1996. El Cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia Volúbilis L.*) en la amazonía. Instituto de Investigación Agraria (Proyecto Suelos Tropicales). Lima, Perú. 68 p.
- AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical, United States of America). 2012. Appendix M: validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods (Community guidance and best practices). *Food Allergen Community Guidance*.
- AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical, United States of America). 2000. Chapter 41: oils and fats (Association of official analytical chemist).
- Ayala, R; Machaca, M. 2007. Estudio Farmacognóstico y determinación de la Actividad Antituberculosa de *Spergularia media (L.) Griseb.* Choquetacarpo. Tesis Lic. Lima, Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 100 p.
- Akiyama, H; Toida, T; Sakai, S; Amakura, Y; Kondo, K; Sugita-Konishi, Y; Maitani, T. 2006. Determination of cyanide and thiocyanate in Sugihirata ke mushroom using HPLC method with fluorometric detection. *Journal Health Science* 52:73-77.
- Bernardini, E. 1981. *Tecnología de aceites y grasa*. Madrid, España. 1ed. Alhambra. p. 234-239.
- Bolhuis, G. 2003. The toxicity of cassava roots. *Journal Agriculture Science* 2(3):176-185.
- Bondioli, P; Dela-Bella, L. 2006. Alpha linolenic acid rich oils. Composition of *Plukenetia Volubilis* (Sacha Inchi) oil from Perú. *Revista Italiana Delle Sostanze Grasse* 31:120-12.

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Breiteneder, H; Mills, C. 2005. Plant Food Allergens: structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances* 23(2005):395-399.
- Burns, A; Bradbury, H; Cavagnaro, T; Gleadow, R. 2012. Total cyanide content of cassava food products in Australia. *Journal of Food Composition and Analysis* 25(2012):79-82.
- Crevel, Q; Kerhoff, M; Koning, M. 2000. Allergenicity of Refined Vegetable Oils. *Food and Chemical Toxicology* 38(2000):385-393.
- Codex Alimentarius. 1999. Codex standard for named vegetable oils: codex stan 210.1999.
- Comisión de normalización y de fiscalización de barreras comerciales no arancelarias-INDECOPI (2009). Norma técnica peruana NTP 151.400. 2009. Aceite de Sacha Inchi: requisitos. 1ed.
- Devappa, R; Makkar, H; Becker, K. 2010. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass and bioenergy* 30(2010):1-9.
- Devappa, R; Makkar, H; Becker, K. 2011. Localisation of antinutrients and qualitative identification of toxic components in *Jatropha curcas* seed. *Journal Science Food Agriculture* 92:1519–1525.
- Donnersberger, A; Lesak, A. 2002. Libro de laboratorio de anatomía y fisiología. 1ed. Paidotribo. p. 385.
- Eleazu, O; Eleazu, K; Kolawole, S. 2014. Use of indigenous technology for the production of high quality cassava flour with similar food qualities as wheat flour. *Technology food* 13(3):249-256.
- Fabre, R; Truhaht, R. 1986. Tratado de toxicología. Madrid, España. Paraninfo 1:311-332.
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations); WHO (World Health Organization). 2011. Evaluation of certain food additives and contaminants: expert Committee on Food Additives (WHO technical report, 966).
- Febles, C. 1998. Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en Canarias. Tesis Dr. Santa Cruz de Tenerife, España, Universidad de La Laguna. 100 p.
- Francis, G; Oliver, J; Sujatha, M. 2013. Non-toxic *jatropha* plants as a potential multipurpose multi-use oilseed crop. *Industrial Crops and Products* 42(2013):397-401.

- Franco-Fraguas, L; Pla, A; Ferreira, F; Massaldi, H; Suarez, N; Batista-Viera, F. 2003. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of chromatography B* 790(1):365-372.
- Guillén, M; Ruiz, A; Cabo, N; Chirinos, R; Pascual, G. 2003. Characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*): oil by FTIR spectroscopy and H NMR (comparison with Linseed oil). *JAOCS* 80(8):755-762.
- Goel, G; Puniya, A; Aguilar, C; Singh, K. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92:497-503.
- Gorriti, A; Arroyo, J. 2010. Toxicidad oral a 60 días del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*) y Linaza (*Linum usitatissimum L.*) y determinación de la dosis letal 50 en roedores. *Revista Peru Medicina Experimental Salud Pública* 27(3):352-360.
- Hamaker, B; Valles, C; Gilman, R; Hardmeir, MR; Clark, D; Garcia, H; Gonzales, A; Kohlsted, I; Castro, M; Valdivia, R; Rodriguez, T; Lezcano, M. 1992. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia Volubilis*). *Cereal Chemistry* 69(4).
- Hurtado, A. 2013. Análisis composicional de la torta y semillas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) cultivada en Colombia. Tesis Mg. Palmira, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 100 p.
- Inuwa, H; Aina, V; Gabi, B; Aiomolaa, I; Amao, T. 2011. Comparative determination of Antinutritional Factors in Groundnut Oil and Palm Oil. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3(4):275-279.
- Jain, A; Kumar, S; Panwar, J. 2009. Antinutritional factors and their detoxification in pulses-A review. *Agricultural Research Communicarion Center* 30:64-70.
- Köhle, H; Kauss, H. 1979. Improved Analysis of Hemagglutination Assays for Quantification of Lectin Activity. *Analytical Biochemistry* 103:227-229.
- Kumar, R; Singh, M. 1984. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. *Journal Agriculture Food Chemistry* 32 (1984):447-453.
- Lastra, H; Rodríguez, E; Ponce De León, H; González, M. 2000. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. *Revista Cubana PLANT MED* 5(1):17-22.
- Lázaro, R. 2015. Determinación de la presencia de sustancias antinutricionales y alérgenos en semilla y torta de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Tesis Ing. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 120 p.

- Leal, A; Goncalvez, C. 2010. Avaliação da concentração de minerais e dos fatores antinutricionais fitato e oxalato em multimisturas da Região Metropolitana de Belo Horizonte: MG Evaluation of mineral concentration and anti-nutritional factors phytate and oxalate in Multimix from the. CEP 31270:901.
- López, P. 2008. Alternativa para la detoxificación de tortas de *Jatropha curcas* a escala laboratorio para su empleo en alimentación animal. Medellin, Colombia. Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT.
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 193: 265-275.
- Lucas, B; Sotelo, A. 1984. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. *Nutrition Report International* 29(3):711-719.
- Makkar, H; Becker, K; Sporer, F; Wink, M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *jatropha curcas*. *Journal Agriculture Food Chemistry* 45:3152-3157.
- MAKKAR, H; ADERIBIGBE, A; BECKER, K. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha Curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Institute for animal production in the tropics and subtropics. *Journal Agriculture Food Chemistry* 62(2):207.
- Martinez, A. 2001. Saponinas Esteroidales. Antioquía, Colombia. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía.
- Martínez, J; Jimenez, C; Martinez, A; Garduño, L; Mora, R; Davila, G; Chamorro, G; Makkar, H; Francis, G; Becker, K. 2012. Evaluation of the nutritional quality of nontoxic kernel flour from *Jatropha Curcas* in rats. *Journal of Food Quality* 35(2012):152-158.
- Martínez-Herrera, J; Siddhuraju, P; Francis, G; Dávila-Ortiz, G; Becker, K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry* 96(2006):80-89.
- Matson, K; Ricklefs, R; Klasing, K. 2005. A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental and Comparative Immunology* 29(3):275-286.
- Mehlembacher, VC; Hopper, TH; Salle, EM; Link, WE; Walker, RO; Walker, RC; Firestone, D. 1994. Official methods and recommended practices of the American oil chemist society. AOACS Press.

- Mendoza, WG; Ponce, L; Novello, J; Marangon, S. 2007. Estudios, estructura y función de una lectina aislada de semillas de *caesalpinia spinosa* kuntze (tara).
- Muzquiz, M; Burbano, C. 1999. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*: environmental and varietal differences. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement* 3(4):210-216.
- Muñoz, I. 2011. Evaluación de los contenidos metanólicos en cultivos de células de *Petiveria alliacea* L. Tesis Mg. Medellín, Colombia, Universidad Nacional de Colombia.
- Novak, K; Haslberger, A. 2000. Substantial Equivalence of Antinutrients and Inherent Plant Toxins in Genetically Modified Novel Foods. *Food and Chemical Toxicology* 38:473-483.
- O'brien, R; Jones, L; King, C; Wakelyn, P; Wan, P. 2007. Cottonseed oil in shahidi f (Ed.) bailey's industrial oil and fat products: edible oils. John Wiley & Sons s.p.
- Pariona, N. 2008. Obtención de los ácidos grasos del aceite de la *Plukenetia volubilis* L. "Sacha inchi" para la utilización en la industria y estudio fitoquímico cualitativo de la almendra. Tesis Lic. Lima, Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.105 p.
- Parker, JL. 2005. Obtención y Caracterización de la Harina Integral de Quinoa Orgánica. Tesis Ing. Santiago, Chile, Universidad de Chile. 110 p.
- Pascual, MJ; Correal, E. 1992. La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. *Revista Grasas y Aceites* 43(1):39-44.
- Pascual, G; Mejía, M. 2000. Extracción y caracterización de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Anales de la Facultad de Imndustria Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina* 42(2000):146-160.
- Peach, M; Marsh, N; Macphee, D. 2012. Protein Solubilization: attend to the Choice of Lysis Buffer. *Methods in Molecular Biology* v. 869.
- R-Biopharm, AG. 2003. Ridascreen Fast Lupine: enzyme Immunoassay for the quantitative analysis of sweet lupine proteins.
- Rolland, J; Apostolou, E; De Leon, M; Stockley, C; Hehir, R. 2008. Specific and Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Analysis of Residual Allergenic Food Proteins in Commercial Bottled Wine Fined with Egg White, Milk, and Nongrape-Derived Tannins. *Journal Agriculture Food Chemistry* 56:349-354.
- Sánchez, A; Ramírez, J. 1998. Detección de inhibidores de proteasas en extractos de leguminosas y su efecto sobre proteasas endógenas del musculo de pescado. *CYTA- Journal of Food* 2(1):12-19.

- Sathe, S; Kshirsagar, H; Sharma, G. 2012. Solubilization, Fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis L.*) Proteins. *Plant Foods Human Nutrition* 67:247–255.
- Schlemmer, U; Frolich, W; Prieto, R; Grases, F. 2009. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition Food Research* 53:330-375.
- Singleton, VL. 1981. Naturally Occurring Food Toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Advances Food Research* 27(1981):149-242.
- Tava, A; Annicchiarico, P. 2000. Spectrophotometer-aided Evaluation of Cyanogenic Potential in White Clover (*Trifolium repens L.*). *Phytochemical analysis* 11:169-173.
- ThermoFisher Scientific. s.f. Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit: instructions.
- ThermoFisher Scientific. 2015. Overview of ELISA: pierce protein methods (en línea). United States of America. Consultado 2 mar. 2015. Disponible en <https://www.thermoFisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>
- Vetter, J. 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38(2000):11-36.
- Vigo, C; Narita, E. 2003. Validación de una metodología de cuantificación espectrofotométrica de las saponinas de *Puffia glomerata* (Spreng) Pedersen *Amaranthaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognósia* 14(1):46-49.
- Vonka, C. 2006. Contribución a la composición fitoquímica del *Maytenus vitis-idaea* Griseb "tala salado" (Celastráceas) (en línea). Argentina. Consultado 4 may. 2015. Disponible en <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-056.pdf>
- Watzl, B; Leitzmann, C. 1995. *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag, Stuttgart.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODO BRADFORD PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES

1. Preparación de muestra

- Se retiró 100 µl de muestra de aceite por cada muestra y sus repeticiones.
- Se preparó 900 µl de solución de NaCl 2M de acuerdo a Sathe et al (2012) para cada muestra de aceite.
- Se agitó en vortex por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se sedimentó por 10 minutos.
- Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 25 °C.
- Se colectó los sobrenadantes.
- Se dispensó 5ml de cada muestra en tubos de diálisis SnakeSkin.
- Se preparó un buffer PBS 10x y se llevó a pH 7.4 con HCl (Peach et al, 2012).
- Se utilizó 1 L de buffer PBS 1X para suspender los tubos de diálisis.
- Se dejó en los tubos de diálisis por 24 horas en refrigeración bajo agitación (Rolland et al, 2008).
- Se retiró los tubos de diálisis del buffer PBS 1X.
- Se lavó los tubos con solución PBS 1X.
- Se concentró en una cama de Polietilenglicol 6000 los tubos de diálisis con muestra por 1 hora en refrigeración.

2. Soluciones y Reactivos

- Solución de NaCl 2M
- Solución Buffer PBS 1X

- Preparación de Estándares de Albúmina diluida (BSA)

Se usó la Cuadro1 para preparar los estándares proteicos.

Cuadro 1: Esquema de dilución para método de Bradford

Esquema de dilución para rango de trabajo de 100 a 500 µg/ml			
Vial	Volumen de diluyente	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA
A	0	300 µl de stock	2000 µg/ml
B	125 µl	375 µl de stock	1500 µg /ml
C	325 µl	325 µl de stock	1000 µg /ml
D	175 µl	175 µl de dilución del vial B	750 µg /ml
E	325 µl	325 µl de dilución del vial C	500 µg /ml
F	325 µl	325 µl de dilución dell vial E	250 µg /ml
G	325 µl	325 µl de dilución del vial F	125 µg /ml
H	400 µl	100 µl de dilución del vial G	25 µg /ml
I	400 µl	0	0 µg /ml = Blanco
Esquema de dilución para rango de trabajo de 1 a 25 µg/ml			
Vial	Volumen de diluyente	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA
A	2370 µl	30 µl de stock	25 µg /ml
B	4950 µl	50 µl de stock	20 µg /ml
C	3970 µl	30 µl de stock	15 µg /ml
D	2500 µl	2500 µl de dilución del vial B	10 µg /ml
E	2000 µl	2000 µl de dilución del vial D	5 µg /ml
F	1500 µl	1500 µl de dilución del vial E	2.5 µg /ml
G	5000 µl	0	0 µg /ml = Blanco

Fuente: Thermo Scientific, (s.f.).

3. Protocolo

3.1. Protocolo estándar para micropozos (Rango de trabajo = 100-1500 µg/ml)

- Se pipeteó 5 µl de cada estándar y muestra en los pozos adecuados.
- Se agregó 250 µl de Reactivo de Coomassie a cada pozo y mezcló con el agitador de platos por 30 segundos.
- Se removió el plato del agitador. Se incubó el plato por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se midió la absorbancia a 595nm por el lector de placas.
- Se preparó la curva estándar ploteando el blanco promedio corregido a 595 nm para cada estándar de BSA vs. Su concentración en µg/ml.
- Se usó la curva estándar para determinar la concentración proteica de cada muestra (Thermo Scientific, s.f.)

3.2. Protocolo estándar para micropozos (Rango de trabajo = 1-25 µg/ml)

- Se pipeteó 150 µl de cada estándar y muestra en los pozos adecuados.
- Se agregó 150 µl de Reactivo de Coomassie a cada pozo y mezcló con el agitador de platos por 30 segundos.
- Se removió el plato del agitador. Se incubó el plato por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se midió la absorbancia a 595 nm por el lector de placas.
- Se preparó la curva estándar ploteando el blanco promedio corregido a 595 nm para cada estándar de BSA vs. Su concentración en ug/ml.
- Se usó la curva estándar para determinar la concentración proteica de cada muestra (Thermo Scientific, s.f.).

ANEXO 2: MÉTODO LOWRY PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

1. Preparación de muestra

- Se retiró 100 µl de muestra de aceite por cada muestra y sus repeticiones.
- Se preparó 900 µl de solución de NaCl 2M de acuerdo a Sathe *et al.* (2012) para cada muestra de aceite.
- Se agitó en vortex por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se sedimentó por 10 minutos.
- Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos a 25 °C.
- Se colectó los sobrenadantes.

2. Preparación de Soluciones y Reactivos

- Reactivo A:
 - Se preparó una solución de NaOH 0.1 M.
 - Se preparó una solución de Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 2%.
 - Para 30 ml de reactivo A se pesó 0,12 g de NaOH y 0.6 g de Carbonato de sodio.
- Reactivo B:
 - Se preparó una solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 0.5 %.
 - Reactivo B2: Se preparó una solución de Tartrato de Sodio al 1%
 - Reactivo C: Se combinó las soluciones A, B1, B2 en proporción 100:1:1.
 - Reactivo de Folin 1N: Se diluyó con agua destilada a partir de una solución 2N.
 - Solución BSA (0.5 mg/ml): Se pesó 50 mg de BSA y disolvió en 100 ml de suero fisiológico.
 - Preparación de Estándares de Albúmina diluida (BSA)

Se preparó una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) a partir de una solución de trabajo 0.5 mg/ml la siguiente manera:

Cuadro 1: Esquema de dilución para método lowry

Concentración de BSA (mg/ml)	Volumen de solución de trabajo (µl)	Volumen de H₂O desionizada (µl)
0.50	400	-
0.40	300	100
0.25	200	200
0.125	100	300
0.062	50	350
0.031	25	375
0= Blanco	-	400

2. Protocolo

- Se agregó 2 ml del reactivo C e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Se agregó 200 µl de reactivo de Folin 1N, agitó bien e incubó a temperatura ambiente.
- Se leyó la absorbancia a 550 nm.
- Se realizó una curva colocando las absorbancias en el eje Y y la concentración en el eje X.
- Se colocó 400 µl de muestra a analizar y se siguió de acuerdo a los pasos de 2 a 4.
- Se calculó la concentración de proteína de las muestras mediante la ecuación de la recta.

ANEXO 3: PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PARA MARCHA FITOQUÍMICA

1. Preparación de soluciones y reactivos

- Solución metanol/agua (80:20 v/v)
- Solución NaCl 2M

2. Preparación de extractos

2.1. Extracto metanólico

- Se extrajo 10 g de aceite 4 veces con 10 g de metanol (grado técnico) cada uno.
- Los extractos combinados fueron centrifugados por 10 minutos a 3 500 rpm (28 °C) y transferidos a un frasco de 100 ml, que fue llenado con metanol (Ahmed y Salimon, 2009).

2.2. Extracción con sales

- 10 g de aceite se dispersaron en 90 ml de solución NaCl 2M.
- Se agitó la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 1500 g por 30 minutos a 4 °C.
- Se colectó el sobrenadante.
- Se filtró a través de papel filtro *Whatman* número 4.
- Se reservó en refrigeración (4 °C) (Sathe *et al.*, 2012).

ANEXO 4: MÉTODO PARA LAS REACCIONES DE MARCHA FITOQUÍMICA

1. DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES

1.1. Reacción de Dragendorff

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se agregó 1 ml de HCl 1%.
- Se calentó suavemente en baño maría por 5 minutos.
- Se enfrió.
- Se añadió 3 gotas de reactivo de Dragendorff.
- Resultado positivo: Presencia de precipitado rojo ladrillo (+++), presencia de turbidez definida (++) u opalescencia (+).

1.2. Reacción de Wagner

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se agregó 1ml de HCl 1%.
- Se calentó suavemente en baño maría por 5 minutos.
- Se enfrió.
- Se añade 3 gotas del reactivo de Wagner.
- Resultado positivo: Presencia de precipitado rojo ladrillo (+++), presencia de turbidez definida (++) u opalescencia (+).

1.3. Reacción de Mayer

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se agregó 1 ml de HCl 1%.
- Se calentó suavemente en baño maría por 5 minutos.
- Se enfrió.
- Se añadió una pisca de NaCl.
- Si precipitó, filtró y añadió luego 3 gotas del Reactivo de mayer.
- Resultado positivo: Presencia de precipitado coposo amarillento (+++), presencia de turbidez definida (++) u opalescencia (+).

1.4. Reacción de Erdman

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se agregó 1 ml de HCl 1%.
- Se calentó suavemente en baño maría por 5 minutos.
- Se añadió 3 gotas de reactivo de Erdman.

- Resultado positivo: Presencia de coloración roja y otros colores (+++), presencia de turbidez definida (++) u opalescencia (+).

1.5. Reacción de Marquis

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se añadió 3 a 4 gotas del reactivo de Marquis.
- Resultado positivo: Presencia de coloración naranja, violeta o púrpura.

2. DETERMINACIÓN DE FENOLES

2.1. Reactivo de FeCl₃

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se adicionó 3 gotas de FeCl₃.
- Se agitó.
- Resultado positivo: Color rojo vivo (presencia de compuestos fenólicos en general), color verde intenso (presencia de taninos pirocatecolicos).

2.2. Reactivo de gelatina salada

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se adicionó 3 gotas de gelatina salada.
- Se agitó.
- Resultado positivo: La solución se torna opaca, turbia en presencia de fenoles.

3. DETERMINACIÓN DE SAPONINAS

3.1. Saponinas

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se adicionó agua hasta la mitad del tubo.
- Se agitó fuertemente por 2 minutos.
- Resultado positivo: Formación de espuma que permanece por 1 minuto o más.

3.2. Sapogeninas

- Se utilizó 1ml de muestra.
- Se adicionó 1mL de solución al 25% de SbCl₃ en HClO₄ al 60%.
- Resultado positivo: Presencia de coloración rosada.

3.3. Reacción de Roshentaler

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se adiciona 1 mL de solución etanólica de vainillina al 1%.

- Se adiciona 1 gota de ácido clorhídrico concentrado.
- Resultado positivo: Colores varios

3.4. Ácido tricloroacético

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se añade 1 ml de ácido tricloroacético.
- Se calienta la mezcla 5 minutos en baño maría.
- Resultado positivo: Presencia de coloración rojo oscuro o naranja.

4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

4.1. Reacción de Millon's

- Se utilizó 1 ml de extracto metanólico y salino.
- Se añade 1 ml de reactivo de Millon's.
- Se calienta suavemente en baño maría por 5 minutos.
- Resultado positivo: Formación de un precipitado melón o salmón.

ANEXO 5: MÉTODO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TANINOS

1. Preparación de reactivos y soluciones

- Solución de ácido tánico
- Solución de Folin-Denis
- Solución de Na_2CO_3
- solución de NaCl saturado y acidificado con HCl y 0.75 g de caolín
- Preparación de la curva estándar.

Se utilizó el siguiente esquema de soluciones estándares.

Cuadro 1: Esquema de soluciones estándares para determinación de taninos

Tubo	Extracto de muestra	Sol. Ac. Tánico (μL)	Sol. Folin denis (μL)	Sol Na_2CO_3 (μL)	Agua destilada (μL)	Total (μL)
1	-	50	100	50	1050	1250
2	-	100	100	50	1000	1250
3	-	200	100	50	900	1250
4	-	300	100	50	800	1250
5	-	400	100	50	700	1250
6	-	500	100	50	600	1250
7	-	600	100	50	500	1250
B	-	-	100	50	1100	1250
Muestra	300	-	100	50	800	1250

- En tubos eppendorf de 1,5 mL, se añadió 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 μL de solución de ácido tánico.
- Se añadió 100 μL de solución de folín-Denis, agitó y dejó reposar por 5 min.
- Se añadió 50 μL de solución de Na_2CO_3 a cada tubo eppendorf, agitó y enrasó con agua destilada.
- Se homogenizó y dejó reposar por 2 min.
- Se leyó en el espectrofotómetro a 726 nm.

1.1. Preparación del Blanco

- En un tubo eppendorf se colocó 100µL de solución de folín denis.
- Se añadió 50 µL de solución de Na₂CO₃ y enrasó con agua destilada, agitó y dejó reposar por 2 min.
- Se leyó en el espectrofotómetro a 700 nm.

2. Protocolo

2.1. Determinación de Polifenoles A

- Se tomó 100 µl de extracto de la muestra.
- Se enrasó a 10 mL con agua destilada.
- Se tomó 300 µL y colocó en tubo eppendorf de 1.5 mL
- Se añadió 100 µL de solución de Folín denis, agitó y dejó reposar 5 min.
- Se añadió 50 µL de Na₂CO₃, enrasó con agua destilada hasta 1250 µL, agitó y homogenizó.
- Se dejó reposar por 2 min y leyó al espectrofotómetro a 700 nm.

2.2. Determinación de Polifenoles B

- Se tomó 100 µL y enrasó a 10 mL.
- Se tomó 1.5 mL y colocó en tubo, luego se adicionó 4.5 mL de agua , 3.75 mL de gelatina al 10 % y 7.5 mL de solución de NaCl saturado y acidificado con HCl y 0.75 g de caolín
- Se tapó, agitó durante 1 hora, posteriormente se filtró
- Se tomó 750 µL y transfirió a un tubo y adicionó 3 mL de agua destilada, de este mismo se tomó 300 µL y añadió 100 µL de solución de Folín Denis, agitó y dejó reposar por 5 min.
- Se añadió 50 µL de Na₂CO₃, agitó, enrasó con 800 uL de agua destilada, agitó y enrasó con agua destilada hasta 1250 µL, homogenizó y dejó reposar 2 min.
- Se leyó al espectrofotómetro a 726 nm. Utilizando 170 microlitros en microplaca en Lector de micropozos.

El contenido de taninos se obtuvo restando el contenido de Polifenoles A menos el contenido de Polifenoles B y se expresó en mg.ac.tanico/ml.

ANEXO 6: MÉTODO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Método: Aliaga (2001); Aliaga (2007).

1. Preparación de las muestras de aceite de sachá inchi

- Se dispersó 0.5 g de aceite en 25 ml de NaOH 10 mM (0.01 M).
- Se agitó a una velocidad de 400 rpm por 6-7 minutos.
- Se reguló el pH a 9.4 a 9.6 con NaOH o HCl 1M.
- Se refrigeró 12 a 16 horas en matraz tapado.
- Se filtró con papel *whatman* n° 2.
- Se recogió el filtrado y utilizó 12.5 ml del filtrado.
- Se enrasó con agua destilada fría a 25ml. (Se debe lograr una dilución tal que 1 ml del mismo alcance en el ensayo enzimático un grado de inhibición entre 30 a 70 %).

2. Preparación de Reactivos

- Buffer Triz 50 mM (0.05M). Se pesó 0.6067 g de buffer tris. Enrasó a 100 ml y reguló pH a 8.2.
- Solución Stock de tripsina. Se pesó 10mg de tripsina porcina cristalina (tipo IX, sigma) en 50 ml de HCl 1 mM, conteniendo 2.5 mM CaCl₂. La solución se mantuvo en refrigeración. Para preparar la solución estándar se tomó 0.8 ml de la solución stock agregándose la solución de HCl con CaCl₂ hasta completar un volumen de 10 ml.
- BAPNA. Es el Benzoil-DL-Arginina-Nitroanilide Hydrochloride, sustrato sintético utilizado para la reacción enzimática. Se pesó 4 mg disolviéndose en 0.1 ml de Dimetil Sulfoxido y completando el volumen a 10 ml con buffer TRIZ de 50 mM a pH 8.2.

3. Determinación de la actividad del inhibidor

Se adaptó la metodología de Aliaga (2001) para realizar el ensayo enzimático en micro pozos.

- Se realizó el diagrama de distribución de muestras en la microplaca, ubicando el blanco estándar (BE), estándar (E), repetición del estándar (RE), blanco muestra (BM), muestras y repetición de las muestras en los micropozos.
- Se adicionó 100 ul de BAPNA a todos los micropozos.
- Se adicionó 50 ul del filtrado diluido (muestra) para analizar las muestras y el BM, y 50 ul de agua para el BE, E, y RE.
- Se colocó a 37 °C por 5 min en el lector de micropozos, y agitó.
- Se colocó 25 ul de estándar tripsina a 37 °C y agitó.
- Se dejó incubar por 13 min.
- Se leyó absorbancia a 410 nm.

*Nota: La absorbancia del estándar después de restar el blanco debe ser a 0.42 ± 0.05 . el CV del estándar y las muestras, realizadas con repetición, debe ser menor de 5 %.

Para calcular el grado de inhibición se consideró las UE, obtenidas en el tubo estándar como

100% de actividad y a partir de este se determina el % correspondiente para la muestra. La resta de ambos representa el grado de inhibición (GI). El GI debe ser entre 30-70 % de lo contrario se repite el ensayo diluyendo la muestra hasta lograr el valor indicado.

Se consideró una unidad de tripsina como un incremento de absorbancia de 0.01 a 410 nm, en las condiciones del ensayo. La actividad del inhibidor de tripsina (AIT) se expresó en unidades de tripsina inhibida (UTI) por miligramo de muestra seca y se calculó de la siguiente manera (Liu y Markakis, 1989; citados por Aliaga, 2007):

$$UTI / mg \text{ muestra} = \frac{(A_{st} - A_m) \times 100 / ml \text{ filtrado diluido}}{mg \text{ muestra} / ml \text{ filtrado diluido}}$$

A_{st} = absorbancia promedio de tubo estándar (después de restar blanco)

A_m = absorbancia de muestra (después de restar blancos)

mg muestra = cantidad de muestra de harina que se encuentra en cada ml de filtrado diluido.

ANEXO 7: MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD DE LECTINA

Método: Adaptado de Franco- Fraguas, L. *et al.* (2003) y Matson *et al.* (2005).

1. Preparación de las muestras de aceite

- Se pesó 19.5 gramos de aceite, se agregó NaCl 0.15 M hasta enrasar a 90 ml. Se preparó la soya y ricin, como controles positivos, utilizando 19.5 g en 90 ml de NaCl 0.15 M.
- Se agitó por 2 horas a temperatura ambiente en agitador orbital.
- Se centrifugó a 2 500 g por 1 hora a 4 °C. se conservó el sobrenadante y se centrifuga este a 8 500 g (10 000 RPM) por 30 minutos a 4 °C.
- Se descartó el precipitado.
- Se agregó al sobrenadante solución saturada de sulfato de amonio hasta llegar a un 75 % de saturación.
- Se dejó sedimentar las proteínas por toda la noche en refrigeración a 4 °C.
- Se centrifugó a 4 500 RPM por 20 minutos a 4 °C.

Matson *et al.* (2005) indica que se conservan las muestras que presenten precipitado, utilizando el precipitado y disolviéndolo en 7 ml de 0.15 M de NaCl, debido a que ninguna de las muestras mostró precipitado no se continuó con el método, descartando la presencia de lectinas.

- Se conservan las muestras que presentaron precipitado, utilizando el precipitado y disolviéndolo en 7 ml de 0.15 M de NaCl.
- Se centrifuga a 10 000 RPM por 5 minutos a 4°C. se conserva el sobrenadante para la prueba de hemaglutinación.

2. Evaluación de la Actividad Hemaglutinante utilizando eritrocitos de conejo

- Una muestra de 2 ml de sangre se extrajo de un conejo, dicha muestra es recogida en una jeringa conteniendo igual volumen de solución Alsever (50 % sangre y 50 % solución de Alsever's -Sigma). Inmediatamente se homogeneizo la muestra suavemente por 30 minutos.

- En un tubo de prueba de 3 ml de capacidad conteniendo la mezcla de sangre con solución Alsever's, (Sigma), se dejó toda la noche a 4 °C y luego se centrifuga a 1300 RPM durante 5 minutos para obtener los eritrocitos compactos de conejo.
- Luego, se agregó 1 ml de buffer fosfato 0.11M pH 7.4 (PBS 1X). Repetir esta operación dos veces más a fin de obtener cuatro lavados consecutivos. Cada vez que se agrega 1ml se mide los eritrocitos en capilares llegando hasta 3 % de eritrocitos
- Después de los tres lavados con PBS 0.11M, se le agrego 1 ml de PBS 0.11M a los eritrocitos compactos, y se midió el nivel de hematocritos dando como resultado 21 %.
- Se le agrego 4 ml a la muestra anterior y se midió el nivel de hematocritos dando como resultado 21 %.
- Finalmente, se obtuvo 5 ml a un 3 % (0.3 ml de eritrocitos en 10 ml de PBS).
- Siguiendo la metodología de Matson *et al.* (2004), en una Placa de 96 micropozos se usó el esquema de diluciones seriadas.

Cuadro 1: Distribución de diluciones en la placa de micropozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diluciones de muestra	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	SOLO PBS

- Luego en cada pocillo, colocar 25 ul de solución de eritrocitos al 3 % en PBS. Sellar la placa con Parafilm y colocar luego la tapa de la placa. Agitar por 10 segundos suavemente. Se incubo en Baño María por 37 °C durante 90 minutos (Por flotación). Inclinar el eje más largo de cada placa unos 45 °C durante 20 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de facilitar la visualización de la aglutinación.
- Luego se escaneo la placa. Settings en scanner 300 dpi (Transparencias). Los resultados se registran como el \log_2 negativo de la última dilución de plasma exhibiendo el comportamiento (Matson *et al.*, 2004).

ANEXO 8: MÉTODO PARA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ESTERES DE FORBOL

1. Preparación de la muestra

10 g de aceite de sacha inchi fueron mezclados con metanol en una proporción (1/1 P/V) en un recipiente tapado y los contenidos fueron agitados a temperatura ambiente (23 °C) por 15 minutos utilizando un agitador magnético a 300 rpm. Los extractos combinados fueron centrifugados por 10 minutos a 3 500 rpm (28 °C) Haas y Martin Mittelbach (2000), citados por Ahmed y Salimon (2009) para obtener la fase metanólica superior y separar en las fases inferiores el aceite. La fase oleosa fue extraída tres veces más con solvente fresco en proporción 1/1 P/V Devappa *et al.* (2010).

El filtrado fue secado bajo vacío a 40 °C. El residuo seco fue disuelto en 5 ml de tetrahidrofurano y luego pasado por un filtro de vidrio de 0.2 μ m y se inyectaron 20 μ l en el HPLC (Makkar *et al.*, 1998).

2. Acondicionamiento del equipo HPLC:

Se utilizaron los siguientes solventes:

- Solvente A: Se diluyó 1.75ml de ácido o-fosforico al 85 % en 1L de agua destilada grado HPLC (filtrada previamente).
- Solvente B: Acetonitrilo HPLC
- Solvente C: Tetrahidrofurano Grado analítico

Luego se filtró utilizando filtros de jeringa Acrodisc y sonicó cada solvente.

Se utilizaron los siguientes gradientes en el HPLC:

- 60% solvente A y 40 % solvente B al inicio por 8min
- 50% solvente A y 50 % solvente B durante 10 min.
- 25% solvente A y 75 % solvente B durante 30 min.
- 100% solvente B durante 15 min
- Lavar con 100 % C durante 15 min.
- Regresar a las condiciones iniciales 60 % solvente A y 40 % solvente B.

Los parámetros de operación del equipo HPLC fueron:

- Temperatura: 22 °C
- Volumen de inyección: 20 ul
- Tasa de Flujo: 1.3ml/min
- Longitud de onda: 280 nm
- Duración de la corrida: 70 min.
- Tiempo de retención: entre los 41 y 48 min (Aparecen cuatro picos)

3. Preparación de estándares:

Se creó una secuencia de estándares utilizando el estándar phorbol-12-myristate 13 acetato, Sygma USA.

Los resultados fueron expresados como equivalente de phorbol-12-myristate 13 acetato, cuyos picos aparecen entre los 52 y 53 minutos.

Se estabilizó la columna con las condiciones iniciales del método durante 30 min.

4. Análisis en HPLC

Los análisis con HPLC se llevan a cabo con un instrumento Packard Hewlett equipado con una bomba quaterny, un desgasificador al vacío, un automuestreador, una estación química un detector de longitud de onda variable. La columna cromatográfica de fase reversa, 125 x 4 mm, usando octadecyl como grupo funcional, de tamaño de partícula 5 um. La columna es térmicamente controlada a 25 °C usando como eluente una mezcla de acetonitrilo (grado HPLC) y agua (grado HPLC) en la proporción de 80/20 V/V se usa a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El detector de longitud de onda fue establecido a 280 nm. Un total de muestras de 20 ul fueron inyectadas (Haas y Martin Mittelbach, 2000)

ANEXO 9: METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE FITATOS

Método: AOAC 986. 11: Método de intercambio aniónico

1. Preparación de las soluciones a utilizar

- HCl al 2.4 %. - Se adicionaron 54 ml de HCl a un matraz volumétrico de 1L y se aforó con agua desionizada.
- Solución de NaCl al 0.1 M.- En una balanza analítica se pesa 5.84 de sal de NaCl, después se disuelve con 100ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 250 ml, posteriormente se transfirió a un matraz de 1L y se aforó con agua desionizada.
- Solución de NaCl al 0.7 M.- En una balanza analítica se pesa 40.9 g de sal de NaCl, se disolvió con 400ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 500 ml, posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 1L y se aforó con agua desionizada.
- Solución estándar de fosfato.- Se pesaron 0.350 g de fosfato de potasio dibásico en una balanza analítica después de disolvió con agua desionizada en un vaso de precipitados de 500 ml, posteriormente se transfirió a un matraz volumétrico de 1L, se le adicionaron 10 ml de 10 N de H₂SO₄ y se aforó con agua desionizada.
- Solución de molibdato al 2.5 %.- Molibdato de amonio tetrahidrato cristal en 1N de H₂SO₄.- En una balanza analítica se pesaron 12.5 g de molibdato de amonio, posteriormente se disuelven con 200 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 250 ml. Después se transfiere a un matraz volumétrico de 500 ml, se adicionaron 10 N de H₂SO₄ y se afora con agua desionizada. La solución es estable.
- Ácido sulfónico.- En una balanza analítica se pesan 0.16 g de ácido 4-Amino-3-Hidroxi-1 Nephthalenosulfónico (Sigma), 1.92 g de bisulfito de sodio granular (NaSO₃) y 9.60 g de Sulfito de sodio anhidro (Na₂SO₃), se colocaron en un vaso de precipitados de 100ml y se diluyen con 80 ml de agua desionizada (se calienta para lograr la disolución), posteriormente se transfiere a un matraz volumétrico de 100 ml y se afora con agua desionizada. Se almacenó en el refrigerado en un frasco color ámbar, esta solución es estable por una semana.
- Na₂EDTA-NaOH.- Se pesa 10.23 g de sal disódica del ácido etilendiaminotetracético- EDTA 0.11M y 7.5 g de NaOH 0.75 M, en una balanza analítica, posteriormente en un vaso de precipitados de 250 ml se disuelve con

200ml de agua desionizada, se transfirió a un matraz volumétrico de 250 ml y se aforó con agua desionizada. La solución es estable (AOAC, 1998).

2. Preparación de la curva estándar de fosfato

- Se ajustó el lector de micropozos a 640 nm.
- Se pipeteó 1, 3 y 5 ml de solución estándar fosfato en fiolas de 50 ml.
- Se adicionó a cada fiola 20 ml de agua destilada nanopura.
- Se mezcló.
- Se adicionó 2ml de solución de molibdato.
- Se mezcló.
- Se adicionó 1ml de solución de ácido sulfónico.
- Se mezcló.
- Se enrasó a 50 ml con agua destilada nanopura.
- Se esperó 15 minutos y se lee a 640 nm.

3. Preparación de la muestra

- Se pesó 1 g de muestra.
- Se adicionó 20 ml de HCl al 2.4%.
- Se agitó por 3 horas a 100 rpm a temperatura ambiente.
- Se filtró por papel Whatman #1.
- Si el extracto es translucido se utiliza, si es opaco se centrifuga a 10000rpm por 10 minutos a 8°C.
- Se utilizó 1ml de extracto translúcido.
- Se agregó 1ml de Na₂EDTA-NaOH.
- Se agitó suavemente.
- Se enrasó a 25ml con agua destilada nanopura.

4. Preparación de la columna

- Se adicionó 3ml de agua destilada nanopura a la columna.
- Se pesó 0.5 g de resina de intercambio aniónico (Dowex).
- Se solubilizó la resina en 500 ul de agua destilada nanopura.
- Se formó el lecho poroso, agregando la resina hidratada a la columna.
- Se adicionó lentamente 15 ml de solución de NaCl 0.7M.

5. Lavado de la muestra

- Se adicionó a la columna los 25 ml del extracto preparado.
- Se desechó el líquido de lavado.
- Se adicionó 15 ml de NaCl 0.1M.
- Se desechó el líquido de lavado.
- Se adicionó 15 ml de NaCl 0.7 M.
- Se reservó el líquido de lavado.

6. Digestión

- Se colocó el líquido de lavado reservado (muestra) en el balón de microkhejda.
- Se adicionó 0.5 ml de H₂SO₄ concentrado.
- Se agitó suavemente.
- Se adicionó 3 ml de HNO₃.
- Se digirió por 15 minutos, hasta que el hervor cese y una nube de amarillo espeso desaparezca.
- Se dejó enfriar en el balón.

7. Preparación de la muestra para la lectura

- Se adicionó 10 ml de agua destilada nanopura a cada balón.
- Se llevó a baño maría hasta disolver.
- Se trasladó a una fiola de 50 ml.
- Se adicionó 2ml de solución de molibdato al 2.5 %.
- Se mezcló.
- Se adicionó 1ml de solución de ácido sulfónico.
- Se enrasó a 50 ml con agua destilada nanopura.
- Se mezcló y dejó reposa por 15 minutos.
- Se colocó 170ul de cada muestra en cada micropozo.

8. Lectura de la muestra

Finalmente se leyó la absorbancia a 640 nm y se calculó la concentración de fitatos con la siguiente ecuación:

Para calcular la cantidad de fitatos en mg por g de muestra se siguió la siguiente ecuación:

$$\text{Fitatos} \frac{\text{mg}}{\text{g de muestra}} = \frac{\text{media } K \times A \times 20}{0.282 \times 1000}$$

Dónde:

A= Absorbancia

$$\text{Media } K = \frac{\text{Estandar P (ug)}}{\frac{A}{n} \text{ (estadares)}}$$

Fitato = 28.2% P (AOAC, 1998).

ANEXO 10: MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLICÓSIDOS CIANOGENICOS

Método: Fabre y Truhaht (1976); Lucas y Sotelo (1984).

1. Preparación de Soluciones

- **Reactivo de Guignard:** Se disuelve en agua destilada 1 g de ácido pícrico y a continuación 5 g de carbonato de sodio, enrasándose a un volumen de 200 ml con agua destilada, se lleva a baño maría a 60°C.
- **Solución patrón de cianuro de potasio:** se pesa exactamente 12.5 mg de KCN y se lleva a 50 ml de agua destilada y coloca en baño de hielo después de preparada.
- **Ácido clorhídrico 0.5 N.**

2. Procedimiento

2.1. Preparación de la tira reactiva

Se cortó papel filtro en tiras exactamente de 2x10 cm (se preparó 1 tira por muestra), se sumergió en el reactivo de Guignard, dejándose escurrir. Se introdujo las tiras en una estufa a una temperatura estable de entre 50-55 °C, donde se dejaron por aproximadamente 10 min (las tiras reactivas preparadas quedaron ligeramente humedecidas para ser utilizadas).

2.2. Preparación de las muestras

Se pesó 3 g de muestra, se colocó en un matraz erlenmeyer de 250 mL, y se midió 25 mL de agua destilada y se agregó al matraz. A continuación se añadió 2 gotas de cloroformo y 1 mL de HCl 0.5 N. Se colocó con cuidado la tira de papel reactivo humedecida con mucho cuidado sin mojar con la solución de la muestra.

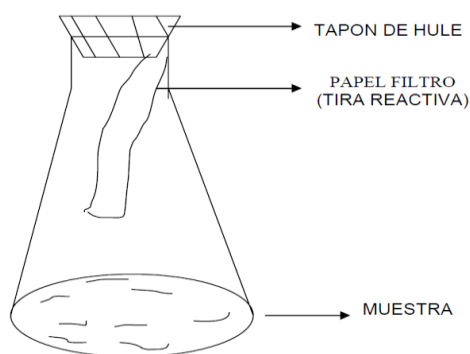


Figura 1: Sistema de extracción de glicósidos cianogénicos

Se colocó el matraz Erlenmeyer en la estufa a 40 °C por espacio de 1 h, agitando suavemente a intervalos de 15 min, teniendo precaución de que el contenido del matraz no tenga contacto con la tira reactiva de papel filtro, se metió simultáneamente a la estufa los matraces con las diferentes concentraciones de la curva estándar de HCN. (El gas de HCN liberado reacciona con el reactivo de Guignard de la tira reactiva, formando un complejo NO TÓXICO).

2.3. Preparación de la curva estándar

La curva estándar de HCN se preparó colocando en fioles volumétricas de 25 mL en volúmenes de acuerdo a la siguiente tabla y completar cada uno con agua destilada.

Cuadro 1: Concentraciones de curva estándar de HCN

Alícuota de la solución patrón (mL)	Concentración (ug/mL)
0,0	Blanco
0,1	1,0
0,2	2,0
0,3	3,0
0,4	4,0
0,5	5,0

Una vez preparadas las soluciones de la curva patrón, pasarlas inmediatamente a matraces erlenmeyer de 250 ml, debidamente etiquetados.

Colocar la tira reactiva en el matraz, agregar a cada matraz 1 ml de la solución de HCl 0.5 N y dos gotas de cloroformo y tapar cuidadosamente e Incubar por una hora a 40°C con agitación cada 15 minutos.

2.4. Tratamiento de las muestras problema, curva estándar y blanco

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los matraces se sacaron de la estufa y se dejaron enfriar. Se observan las tiras reactivas de las muestras problema y curva estándar, presentan una coloración café-rojiza indicando la presencia glucósido cianógeno.

Se retiraron las tiras reactivas e introdujeron en tubos de ensayo etiquetados y se adicionó 20 ml de agua destilada, se tapó y agitó vigorosamente con el fin de extraer el pigmento colorido; se procede a filtrar (con papel Whatman No. 40) para eliminar residuos de la tira de papel. Se determinó la absorbancia de las muestras y de la curva patrón en el espectrofotómetro a 520 nm, utilizando como blanco el primer punto de la curva.

ANEXO 11: MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS ALÉRGICAS

1. Preparación de extracto salino concentrado del aceite

- Se retiró 100 ul de muestra de aceite por cada muestra y sus repeticiones.
- Se preparó 900 ul de solución de NaCl 2M de acuerdo a Sathe *et al.* (2012) para cada muestra de aceite.
- Se agitó en vortex por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se sedimentó por 10 minutos.
- Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos a 25 °C.
- Se colectó los sobrenadantes.
- Se dispensó 5 ml de cada muestra en tubos de diálisis SnakeSkin.
- Se preparó un buffer PBS 10x y se llevó a pH 7.4 con HCl (Peach *et al.*, 2012).
- Se utilizó 1 L de buffer PBS 1X para suspender los tubos de diálisis.
- Se dejó en los tubos de diálisis por 24 horas en refrigeración bajo agitación (Rolland *et al.*, 2008).
- Se retiró los tubos de diálisis del buffer PBS 1X.
- Se lavó los tubos con solución PBS 1X.
- Se concentró en una cama de Polietilenglicol 6 000 los tubos de diálisis con muestra por 1 hora en refrigeración.
- Se obtuvo extractos concentrados de aceite de semilla de sacha inchi.

2. Preparación de la muestra para kit de alérgenos

- 62 ml de Buffer de extracción de alérgenos se diluyeron en baño maría a 37 °C.
- Se adicionó 558 ml de agua destilada al Buffer de extracción y se mezcló.
- Se llevó a calentamiento la mezcla de buffer de extracción y agua destilada en baño maría a 60 °C.
- Se mezcló 1 g de muestra de extracto salino de aceite concentrado 10 veces con 20 ml de la mezcla de buffer de extracción con agua destilada, durante 10 minutos en baño maría a 60 °C.
- Se dejó enfriar.
- Se centrifugó durante 10 minutos a 2 500 g.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se colectó 100ul del sobrenadante por triplicado.

3. Preparación del anticuerpo conjugado de enzima

- Se utilizó 0.7 ml de anticuerpo conjugado de enzima.
- Se llevó a calentamiento a temperatura ambiente en baño maría a 25 °C
- Se diluyó el anticuerpo conjugado con 7 ml de agua destilada.
- Se conservó en refrigeración a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

4. Preparación del tampón de lavado

- Se utilizó 50 ml de tampón de lavado.
- Se diluyó el tampón de lavado en baño maría a 37 °C.
- Se diluyó el tampón de lavado con 450 ml de agua destilada.
- Se conservó en refrigeración a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

5. Procedimiento de ensayo

- Se adicionó 250 ul de tampón de lavado a cada pocillo a utilizar de la placa de micropozos.
- Se adicionó 100 ul de cada estándar (0, 1, 3, 9 y 27 ppm de proteína de lupino en solución acuosa) y de las muestras de aceite por triplicado a los micropozos con tampón de lavado.
- Se incubó en la placa de micropozos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se vertió el contenido de la placa y volteó la placa al revés tres veces agitando vigorosamente la parte superior contra un papel absorbente.
- Se agregó 250 ul de tampón de lavado en cada micropozo.
- Se vertió el contenido de los micropozos contra un papel absorbente.
- Se repitió la adición de 250 ul de tampón de lavado y vertido del contenido contra un papel absorbente 4 veces más.
- Se adicionó 100 ul de anticuerpo conjugado diluido a cada micropozo y se agitó suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se vertió el contenido de la placa y volteó la placa al revés tres veces agitando vigorosamente la parte superior contra un papel absorbente.
- Se agregó 250 ul de tampón de lavado en cada micropozo.
- Se vertió el contenido de los micropozos contra un papel absorbente.

- Se repitió la adición de 250 ul de tampón de lavado y vertido del contenido contra un papel absorbente 4 veces más.
- Se adicionó 100 ul de sustrato cromógeno y agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se adicionó 100 ul de solución de parada y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se leyó la placa en el lector de micropozos a una longitud de onda de 450 nm.

El software especial, RIDA® SOFT Win (Art. N ° Z9999), se utilizó para la evaluación del kit de RIDASCREEN® inmunoensayo enzimático. El cálculo del contenido de proteínas alérgicas se realizó usando una función spline cúbica dada por el software.

ANEXO 12: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Cuadro 1: Características fisicoquímicas de aceite de Sacha inchi de fuente comercial

Característica Fisicoquímica	Densidad	Índice de Refracción a 20 °C	Índice de Yodo (g de I₂/100g aceite)	Índice de Acidez (mg KOH/g aceite)	Índice de Peróxidos (meq. Oxígeno activo/1000g grasa)
Repetición 1	0.930	1.481	190.904	1.256	3.898
Repetición 2	0.931	1.481	192.955	1.252	3.914
Repetición 3	0.929	1.480	191.371	1.249	4.032
PROMEDIO	0.930	1.481	191.743	1.252	3.948
Desviación estándar	0.001	0.0004	1.075	0.004	0.073

Cuadro 2: Características fisicoquímicas de aceite de Sacha inchi de fuente del INIA

Parámetro	Densidad	Índice de Refracción a 20°C	Índice de Yodo (g de I₂/100g aceite)	Índice de Acidez (mg KOH/g aceite)	Índice de Peróxidos (meq. O₂/1000g grasa)
Repetición 1	0.928	1.480	189.136	1.277	3.330
Repetición 2	0.930	1.481	189.614	1.272	3.303
Repetición 3	0.927	1.480	189.671	1.274	3.351
PROMEDIO	0.928	1.480	189.474	1.274	3.328
Desviación estándar	0.002	0.0001	0.294	0.003	0.024

Cuadro 3: ANOVA para densidad por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.17E-06	1	4.17E-06	2.500	0.189	7.709
Dentro de los grupos	6.67E-06	4	1.67E-06			
Total	1.08E-05	5				

Cuadro 4: ANOVA para índice de refracción por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.75E-07	1	3.75E-07	0.688	0.453	7.709
Dentro de los grupos	2.18E-06	4	5.45E-07			
Total	2.56E-06	5				

Cuadro 5: ANOVA para índice de yodo por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.726	1	7.726	12.444	0.243	7.709
Dentro de los grupos	2.484	4	0.621			
Total	10.210	5				

Cuadro 6: ANOVA para índice de acidez por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.26E-04	1	7.26E-04	77.7857	0.0009	7.7086
Dentro de los grupos	3.73E-05	4	9.33E-06			
Total	7.63E-04	5				

Cuadro 7: ANOVA para Índice de Peróxido por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	57.6104	1	57.6104	195.2818	0.0002	7.7086
Dentro de los grupos	1.1800	4	0.2950			
Total	58.7905	5				

ANEXO 13: RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

Cuadro 1: Alcaloides en fuente comercial de aceite de sachá inchi

Reacción	Aceite de Sachá Inchi de Fuente Comercial					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Dragendorf	-	-	-	-	-	-
Wagner	-	-	-	-	-	-
Mayer	-	-	-	-	-	-
Erdman	-	-	-	-	-	-
Marquis	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 2: Alcaloides en fuente del INIA de aceite de sachá inchi

Reacción	Aceite de Sachá Inchi de Fuente del INIA					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Dragendorf	-	-	-	-	-	-
Wagner	-	-	-	-	-	-
Mayer	-	-	-	-	-	-
Erdman	-	-	-	-	-	-
Marquis	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 3: Saponinas en fuente comercial de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente Comercial					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Formación de Espuma	+	+	+	-	-	-

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 4: Saponinas en fuente estación del INIA de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente del INIA					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Formación de Espuma	+	+	+	-	-	-

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 5: Sapogeninas en fuente comercial de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente Comercial					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
De Ácido Tricloroacético	-	-	-	-	-	-
De Rosentaler	-	-	-	-	-	-
De deltasapogeninas	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 6. Sapogeninas en fuente estación del INIA de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente del INIA					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
De Ácido Tricloroacético	-	-	-	-	-	-
De Rosentaler	-	-	-	-	-	-
De deltasapogeninas	-	-	-	-	-	-

Legenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 7. Taninos en fuente comercial de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente Comercial					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Reacción de FeCl₃	-	-	-	-	-	-
Prueba de Gelatina salada	-	-	-	-	-	-

Legenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 8: Taninos en fuente estación del INIA de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente INIA					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Reacción de FeCl ₃	-	-	-	-	-	-
Prueba de Gelatina salada	-	-	-	-	-	-

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 9: Proteínas en fuente comercial de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente Comercial					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
De Millon's	+	+	+	+	+	+

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

Cuadro 10: Proteínas en fuente del INIA de aceite de sacha inchi

Prueba	Aceite de Sacha Inchi de Fuente del INIA					
	Extracto Metanólico			Extracto Salino		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
De Millon's	+	+	+	+	+	+

Leyenda: (-) No detectado, (+) Poco o escaso, (++) Moderado, (+++) Abundante

ANEXO 14: RESULTADOS DE TANINOS

Cuadro 1: Curva de calibración con ácido tánico

mg/ml de ácido tánico	µl de ácido tánico	Repeticion 1	Repeticion 2	Repeticion 3	Abs. Promedio	Abs. Corregida	Desv. Estándar
0.024	600	0.693	0.683	0.684	0.687	0.646	0.006
0.020	500	0.625	0.624	0.626	0.625	0.584	0.001
0.016	400	0.510	0.516	0.521	0.516	0.475	0.006
0.012	300	0.390	0.388	0.397	0.392	0.351	0.005
0.008	200	0.283	0.285	0.288	0.285	0.244	0.003
0.004	100	0.159	0.160	0.160	0.160	0.119	0.001
0.002	50	0.105	0.105	0.110	0.107	0.066	0.003
0.000	0	0.040	0.043	0.040	0.041	0.000	0.002

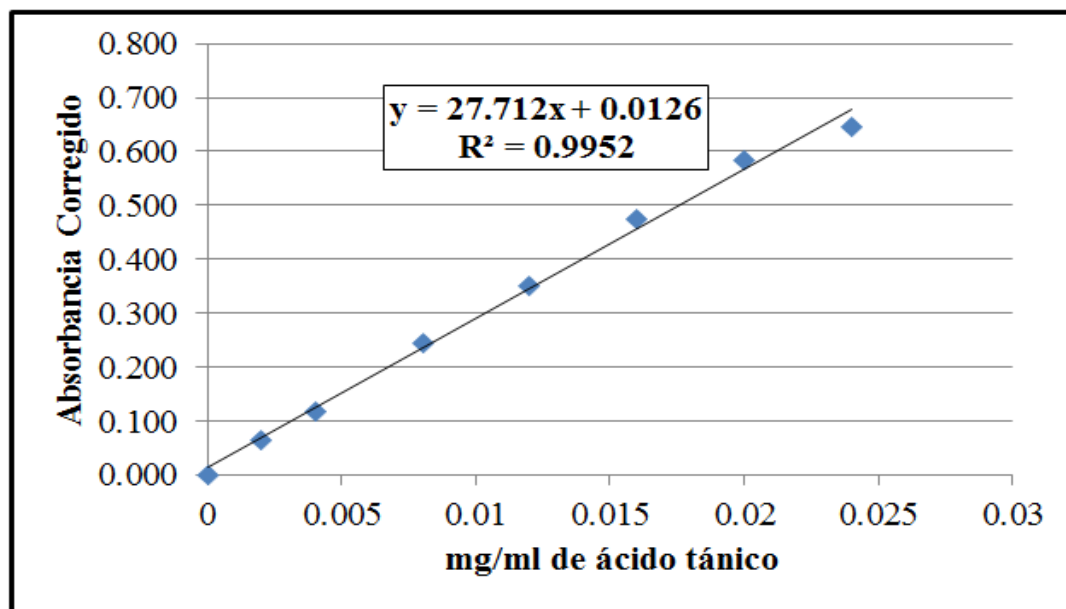


Figura 1: Curva de calibración con ácido tánico

Cuadro 2: Polifenoles b en muestras de aceite de sachu inchi

Fuente de Aceite de Sachu Inchi	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Abs. promedio	Desv. Estándar
Fuente Comercial	0.080	0.079	0.084	0.081	0.003
Del INIA	0.080	0.074	0.079	0.078	0.003

Cuadro 3: Polifenoles a en muestras de aceite de sachu inchi

Fuente de Aceite de Sachu Inchi	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Abs. promedio	Desv. Estándar
Fuente Comercial	0.039	0.039	0.039	0.039	0.000
Del INIA	0.040	0.039	0.039	0.039	0.001

Cuadro 4: Taninos en muestras de aceite de sachu inchi

Fuente	Repetición	Polifenoles A	Polifenoles B	A-B	mg. Acido tánico/ml	Promedio	Desv. Estándar
Comercial	Repetición 1	0.039	0.080	-0.041	-0.002	-	0.000 1
	Repetición 2	0.039	0.079	-0.04	-0.002		
	Repetición 3	0.039	0.084	-0.045	-0.002		
INIA	Repetición 1	0.040	0.080	-0.04	-0.002	-	0.000 1
	Repetición 2	0.039	0.074	-0.035	-0.002		
	Repetición 3	0.039	0.079	-0.04	-0.002		

ANEXO 15: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

Cuadro 1: Inhibidores de tripsina en muestras de aceite de sachá inchi

	Fuente de Aceite de Sacha Inchi						Estándar
	Fuente Comercial			Fuente INIA			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
Repetición 1	0.591	0.695	0.895	0.746	0.564	1.024	0.591
Repetición 2	0.617	0.693	0.896	0.764	0.566	1.042	0.617
Blanco	0.202	0.296	0.531	0.401	0.147	0.736	0.202
Prom.	0.604	0.694	0.896	0.755	0.565	1.033	0.604
Desviación estándar	0.018	0.001	0.001	0.013	0.001	0.013	0.018
CV%	0.030	0.002	0.001	0.017	0.003	0.012	0.030
Promedio - Blanco	0.402	0.398	0.365	0.354	0.418	0.297	0.402
% Actividad respecto al blanco	101%	100%	92%	89%	105%	75%	101%
% Inhibición	-1%	0%	8%	11%	-5%	25%	-1%
UTI/mg	-0.550	-0.150	3.200	4.250	-2.150	9.950	-0.550
Promedio	0.833			4.017			
Desviación estándar	2.059			6.053			

Cuadro 2: ANOVA para Inhibidores de Tripsina por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	15.2004	1	15.2004	0.7436	0.4371	7.7086
Dentro de los grupos	81.7683	4	20.4421			
Total	96.9688	5				

ANEXO 16: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ESTERES DE FORBOL

Cuadro 1: Área de picos de esteres de forbol en muestras de aceite de sachá inchi

Aceite de Sachá Inchi	Repetición	ECUACION DE FORMA C=AX+B		Área						
		Ax	B	Pico A	Pico B	Pico C	Pico D	Pico E	Pico STD	TOTAL
Del INIA	Repetición 1	2.50E-07	3.41E-02	0.00E+00	6.98E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.98E+03
	Repetición 2	2.50E-07	3.41E-02	0.00E+00	6.21E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.21E+03
	Repetición 3	2.50E-07	3.41E-02	0.00E+00	1.55E+05	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.55E+05
Comercial	Repetición 1	2.50E-07	3.41E-02	2.25E+04	2.00E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.25E+04
	Repetición 2	2.50E-07	3.41E-02	1.66E+04	3.07E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.73E+04
	Repetición 3	2.50E-07	3.41E-02	1.70E+04	3.06E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.76E+04

«Continuación»

Aceite de Sacha Inchi	Repetición	Concentración del Vial (mg/ml)							Cantidad de muestra del vial (g/ml)
		Pico A	Pico B	Pico C	Pico D	Pico E	Pico STD	TOTAL	
INIA	Repetición 1	0.00E+00	3.58E-02		0.00E+00			3.58E-02	0.00E+00
	Repetición 2	0.00E+00	3.56E-02		0.00E+00			3.56E-02	0.00E+00
	Repetición 3	0.00E+00	7.28E-02		0.00E+00			7.28E-02	0.00E+00
Comercial	Repetición 1	3.97E-02	3.91E-02		0.00E+00			7.88E-02	3.97E-02
	Repetición 2	3.82E-02	4.18E-02		0.00E+00			8.00E-02	3.82E-02
	Repetición 3	3.83E-02	4.17E-02		0.00E+00			8.01E-02	3.83E-02

«Continuación»

Aceite de Sacha Inchi	Repetición	Concentración en la Muestra (mg/ml)							Promedio	Desv. Estándar
		Pico A	Pico B	Pico C	Pico D	Pico E	Pico STD	Total (mg/ml)		
INIA	Repetición 1	0.00E+00	1.79E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.79E-02	2.40E-02	0.0107
	Repetición 2	0.00E+00	1.78E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.78E-02		
	Repetición 3	0.00E+00	3.64E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.64E-02		
Comercial	Repetición 1	1.99E-02	1.95E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.94E-02	3.98E-02	0.0004
	Repetición 2	1.91E-02	2.09E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.00E-02		
	Repetición 3	1.92E-02	2.09E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.00E-02		

Cuadro 2: ANOVA para Esteres de Forbol por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0004	1	0.0004	6.4949	0.0634	7.7086
Dentro de los grupos	0.0002	4	0.0001			
Total	0.0006	5				

ANEXO 17: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE FITATOS

Cuadro 1: Curva estándar de fosfato

mL estándar	µg de P	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Abs. Prom.	Desv. Estándar	Abs. Corregida	Abs. Prom/ µg de P
5mL	400	0.349	0.348	0.357	0.351	0.005	0.307	779.221
3mL	240	0.228	0.230	0.230	0.229	0.001	0.185	1046.512
1 mL	80	0.100	0.106	0.102	0.103	0.003	0.058	1138.520
Blanco	0	0.043	0.048	0.042	0.044	0.003	0.000	-
SUMA (Media K)								988.08

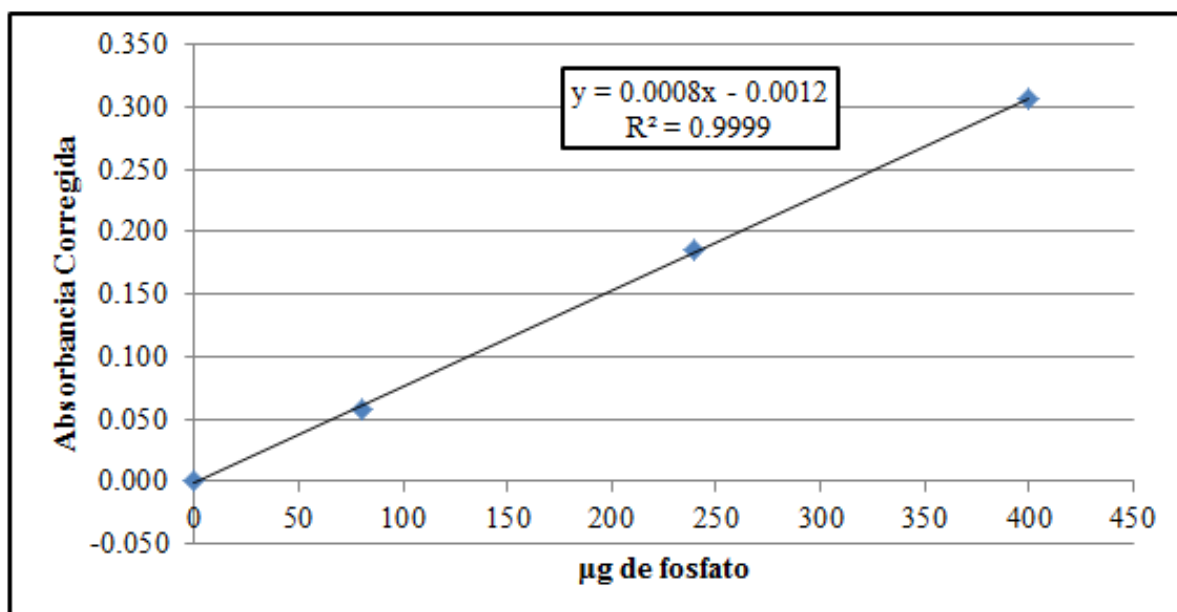


Figura 1: Curva estándar de fosfato

Cuadro 2: Fitatos en muestras de aceite de sachá inchi

Fuente de Aceite de Sachá Inchi	Repetición	Absorbancia	Concentración de fitatos (mg/g de aceite de Sachá Inchi)	Promedio	Desviación Estándar
Comercial	Repetición 1	0.058	4.041	3.909	0.402
	Repetición 2	0.049	3.457		
	Repetición 3	0.060	4.228		
INIA	Repetición 1	0.061	4.275	3.356	0.808
	Repetición 2	0.043	3.037		
	Repetición 3	0.039	2.756		

Cuadro 3: ANOVA para Fitatos por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.4582	1	0.4582	1.1245	0.3487	7.7086
Dentro de los grupos	1.6298	4	0.4075			
Total	2.0880	5				

ANEXO 18: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GLICOSIDOS CIANOGENICO

Cuadro 1: Valores de curva estándar de HCN

Concentración (µg/mL) de HCN	Repetición n 1	Repetición n 2	Repetición n 3	Abs. Promedio	Desv. Estándar	Abs. Corregida
5	0.209	0.205	0.205	0.206	0.002	0.098
4	0.185	0.189	0.186	0.187	0.002	0.078
3	0.158	0.158	0.165	0.160	0.004	0.052
2	0.14	0.14	0.143	0.141	0.002	0.033
1	0.134	0.119	0.124	0.126	0.008	0.017
0	0.119	0.102	0.104	0.108	0.009	0.000

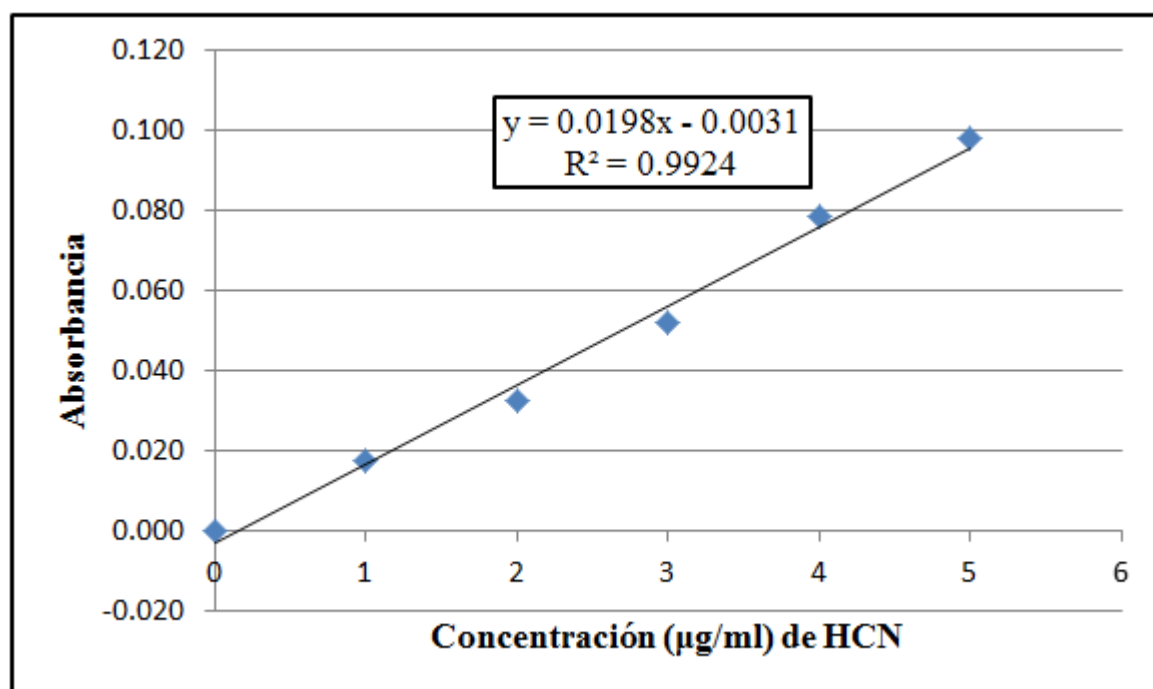


Figura 1: Curva estándar de HCN.

Cuadro 2: Glicósidos cianogénicos (HCN) en muestras de aceite de sachá inchi

Fuente	Repetición	Absorbancia	µg de HCN/ml	mg de HCN/kg	Promedio	Desviación Estándar
Aceite de Sachá Inchi Comercial	Repetición 1	0.100	5.224	5.617	6.058	0.444
	Repetición 2	0.117	6.049	6.504		
	Repetición 3	0.108	5.628	6.052		
Aceite de Sachá Inchi del INIA	Repetición 1	0.108	5.611	6.046	6.294	0.299
	Repetición 2	0.119	6.150	6.626		
	Repetición 3	0.111	5.763	6.210		

Cuadro 3: ANOVA para Glicósidos Cianogénicos por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0838	1	0.0838	0.5857	0.4868	7.7086
Dentro de los grupos	0.5722	4	0.1431			
Total	0.6560	5				

ANEXO 19: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROTEÍNAS SOLUBLES

Cuadro 1: Valores de la curva standard de BSA para 1-25 ug/ml para Bradford

Concentración final de BSA (µg/ml)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Absorbancia Promedio	Absorbancia Corregida
0	0.349	0.341	0.337	0.342	0
2.5	0.416	0.43	0.416	0.421	0.078
5	0.473	0.343	0.505	0.440	0.098
10	0.553	0.5	0.52	0.524	0.182
15	0.608	0.6	0.61	0.606	0.264
20	0.74	0.76	0.752	0.751	0.408
25	0.774	0.77	0.768	0.771	0.428

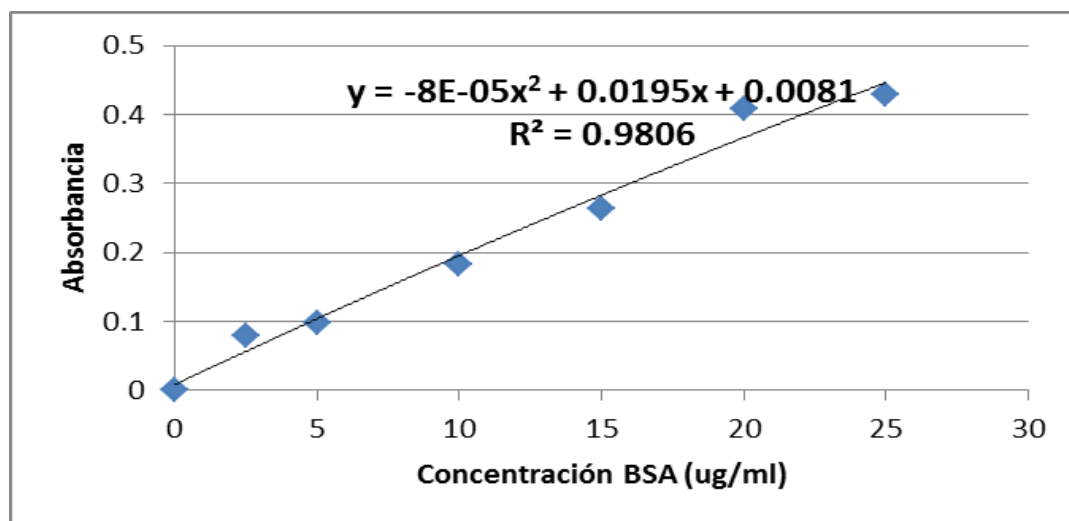


Figura 1: Curva standard de BSA para 1-25 ug/ml para Bradford.

Cuadro 2: Resultados para las muestras de aceite provenientes de fuente comercial para Bradford

Repetición	Ecuación				Raíz 1	Raíz 2	Concentración (mg/ml)	Promedio	Desv. Estándar
	y(abs)	x ² (a)	x(b)	#(c)	x ₁ (µg/ml)	x ₂ (µg/ml)			
1	0.428	-0.00008	0.020	-0.420	-98.023	97.984	0.098	0.099	0.002
2	0.414	-0.00008	0.020	-0.406	-98.912	98.873	0.099		
3	0.380	-0.00008	0.020	-0.372	-101.038	100.999	0.101		

Cuadro 3: Valores para la curva standard de BSA para 100-1500 ug/ml para Bradford

Concentración final de BSA (µg/ml)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Absorbancia Promedio	Absorbancia corregida
2000	1.296	1.233	1.3	1.276	0.884
1500	1.141	1.13	1.24	1.170	0.778
1000	1.032	1.023	1.019	1.025	0.632
750	0.918	0.875	0.900	0.898	0.505
500	0.717	0.735	0.727	0.726	0.334
250	0.553	0.586	0.561	0.567	0.174
125	0.471	0.476	0.481	0.476	0.084
25	0.405	0.412	0.397	0.405	0.012
0	0.379	0.4	0.398	0.392	0

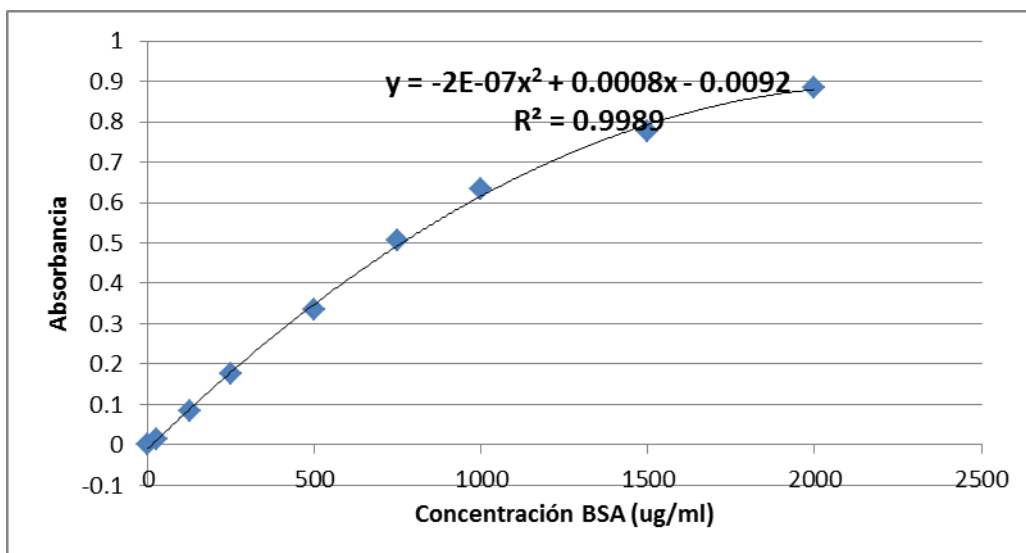


Figura 2: Curva estándar de bsa para 100-1500 ug/ml para Bradford.

Cuadro 4: Resultados para muestras de aceite de sachá inchi de fuente del INIA para Bradford

Repetición	Ecuación				Raíz 1	Raíz 2	Concentración (mg/ml)	Promedio	Desv. Estándar
	y(abs)	x ² (a)	x(b)	#(c)	x ₁ (µg/ml)	x ₂ (µg/ml)			
1	0.406	- 0.0000 002	0.0008	-0.415	- 1387.0 84	1387.0 82	1.387	1.385	0.003
2	0.408	- 0.0000 002	0.0008	-0.417	- 1383.4 75	1383.4 73	1.383		
3	0.982	- 0.0000 002	0.0008	-0.991	-	-	-		

Cuadro 5: ANOVA para Proteínas Solubles por método de Bradford por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.98353	1	1.9835	469782.600	6.85E-09	10.128
Dentro de los grupos	1.27E-05	3	0.0000			
Total	1.98354	4				

Cuadro 6: Valores de la curva estándar para la determinación proteica con método de lowry

Concentración final de BSA (mg/ml)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Absorbancia Promedio	Absorbancia corregida
0	0.079	0.071	0.07	0.073	0
0.031	0.099	0.090	0.089	0.093	0.019
0.062	0.119	0.125	0.114	0.119	0.046
0.25	0.231	0.222	0.232	0.228	0.155
0.4	0.283	0.283	0.278	0.281	0.208
0.5	0.331	0.340	0.339	0.337	0.263

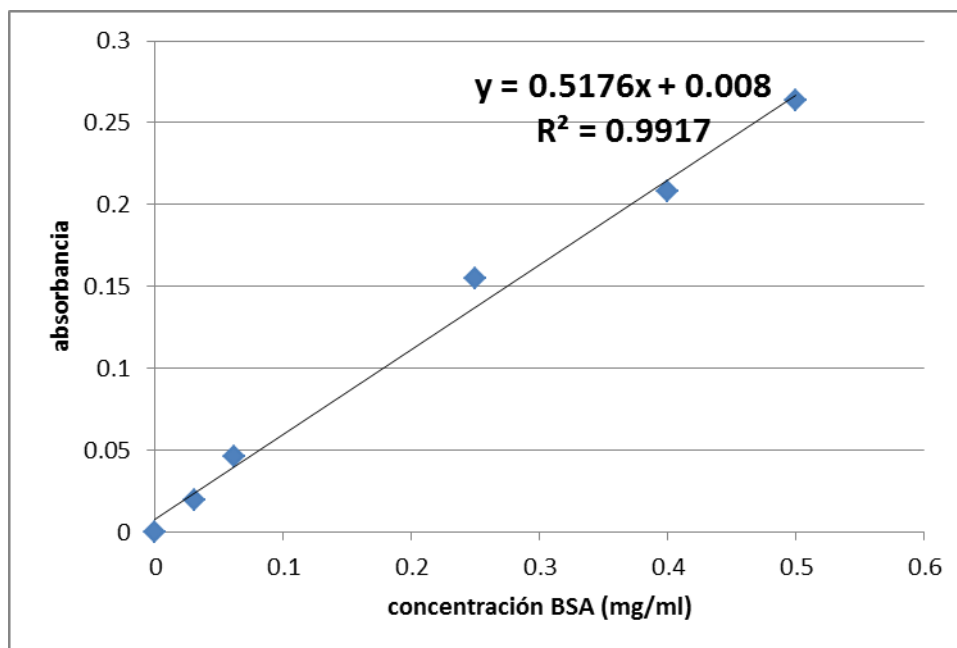


Figura 3: Curva estándar de BSA para método de lowry.

Cuadro 7: Resultados para aceites de sachá inchi de fuente del INIA y comercial para método de lowry

Fuente	Repetición	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Promedio	Desviación Estándar
Aceite de Sachá Inchi Comercial	Repetición 1	0.000	Nd	0.289	0.346
	Repetición 2	0.044	0.044		
	Repetición 3	0.533	0.533		
Aceite de Sachá Inchi del INIA	Repetición 1	0.307	0.307	0.322	0.063
	Repetición 2	0.392	0.392		
	Repetición 3	0.269	0.269		

*nd= no detectado

Cuadro 8: ANOVA para Proteínas Solubles por método de Lowry por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001	1	0.001	0.033	0.868	10.128
Dentro de los grupos	0.127	3	0.042			
Total	0.129	4				

ANEXO 20: RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROTEÍNAS CON REACTIVIDAD CRUZADA A PROTEÍNAS ALÉRGICAS DE LUPINO

Cuadro 1: Valores de la curva estándar de proteínas de lupino

Estándar	Ppm	Repetición 1	Repetición 2	Promedio	Desv. Estándar
1	0	0.047	0.047	0.047	0.000
2	1	0.077	0.074	0.076	0.002
3	3	0.283	0.290	0.287	0.005
4	9	0.802	0.745	0.774	0.040
5	27	1.176	0.975	1.076	0.142

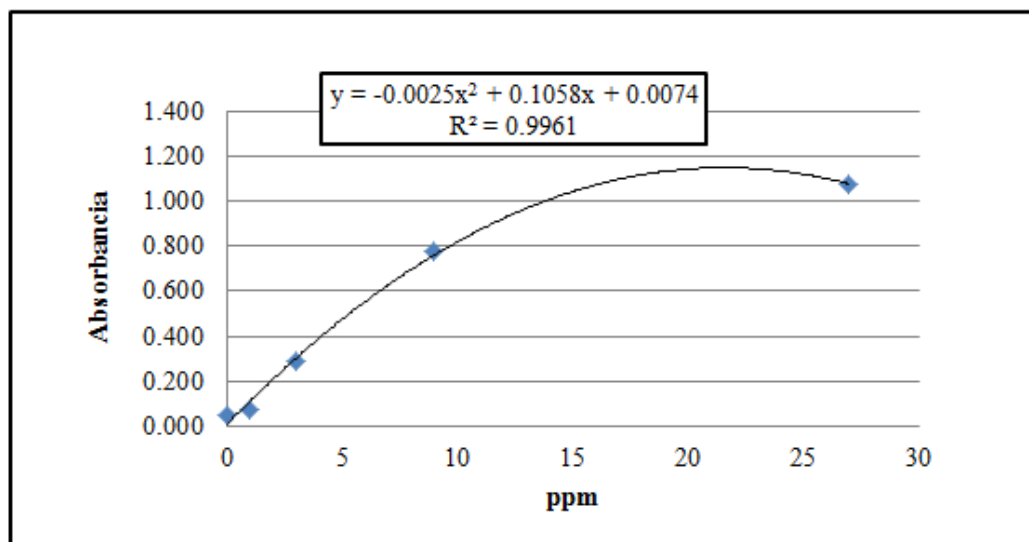


Figura 1: Curva estándar de proteínas de lupino.

Cuadro 2: Proteínas con reactividad cruzada a anticuerpos de proteínas alergénicas de lupino

Fuente	Repetición	Absorbancia	ppm (curva polinomial)	g. de proteína de lupino /ml de extracto salino concentrado de aceite	g de proteína de lupino / ml de aceite de Sacha Inchi	Promedio	Desviación Estándar
Aceite de Sacha Inchi Comercial	Repetición 1	0.048	0.387	3.873E-07	2.069E-06	2.121E-06	5.147E-08
	Repetición 2	0.049	0.397	3.969E-07	2.121E-06		
	Repetición 3	0.050	0.407	4.066E-07	2.172E-06		
Aceite de Sacha Inchi del INIA	Repetición 1	0.048	0.387	3.873E-07	1.620E-06	1.620E-06	2.593E-22
	Repetición 2	0.048	0.387	3.873E-07	1.620E-06		
	Repetición 3	0.048	0.387	3.873E-07	1.620E-06		

Cuadro 3: ANOVA para proteínas con reactividad cruzada a anticuerpos de proteínas alergénicas de lupino por tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.76E-13	1	3.76E-13	283.52 4	7.29E-02	7.709
Dentro de los grupos	5.30E-15	4	1.33E-15			
Total	3.81E-13	5				