

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS



**DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE OXIDACIÓN DE
LÍPIDOS EN ALFAJORES**

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

SEVILLANO VELA, Juan Adrián

TINGO MARIA – PERU

2012



Q04

S45

Sevillano Vela, Juan Adrian

Determinación de la cinética de oxidación de lípidos en alfajores . Tingo María, 2012

48 páginas; 08 cuadros; 07 fgrs.; 31 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero en Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

1. CINÉTICA

2. METODO FOX

3. ALFAJORES

4. OXIDACIÓN

5. LIPIDOS

6. PEROXIDOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Tingo María

FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156

Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 13 de Julio de 2012, a horas 8:30 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bach. **SEVILLANO VELA, Juan Adrián**, titulada:

“DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN ALFAJORES”

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO** en consecuencia el Bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 13 de Julio de 2012

Ing. Mg. Pedro A. Vejarano Jara
Presidente

Ing. Mg. Jorge Castro Gracey
Miembro

Ing. Williams Roldán Carbajal
Miembro

Ing. Jaime E. Basilio Atencio
Asesor

DEDICATORIA

A mis padres **Luis y Teresa** con todo mi amor, estima y respeto, ya que gracias a ellos que con su cariño y comprensión supieron guiarme e inculcarme valores para salir airoso durante el transcurso de mi carrera profesional.

A mis hermanos **Luis, Vanessa y Toba** por su cariño y unión, a mis tíos **Leyden y Juanita** por ser mis segundos padres, y apoyarme en todo momento.

AGRADECIMIENTO

- Al Ing° Jaime Basilio Atencio, asesor por su constante apoyo incondicional durante la ejecución y redacción de la presente tesis.
- A la Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez, Co-asesora por su apoyo durante la ejecución de la tesis.
- A los técnicos Juan Soto, Lucas y Yacha por las facilidades y apoyo para la realización de los análisis que se requerían para la ejecución de la tesis.
- A los docentes de la facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por sus consejos y enseñanzas impartidas a lo largo de mi carrera como profesional.
- A mis amigos y ahora colegas: Pierina Hurtado, Omar Camasca, Frank Mejía, Roberto del castillo, por esos gratos momentos de estudio y apoyo incondicional, a todas las personas que de manera directa e indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Generalidades de las grasas y aceites.....	3
2.1.1. Definición.....	3
2.1.2. Ácidos grasos.....	4
2.1.2.1. Ácidos grasos saturados	5
2.1.2.2. Ácidos grasos insaturados	5
2.1.2.2.1. Ácidos grasos trans	5
2.1.2.2.2. Ácidos grasos cis.....	6
2.2. Conceptos básicos generales sobre la oxidación de lípidos	6
2.2.1. Oxidación lipídica	6
2.2.1.1. Iniciación por vía no enzimática.....	8
2.2.1.2. Descomposición de los hidroperóxidos lipídicos (HPL).....	9
2.2.1.3. Termooxidación	10
2.2.2. Usos de las grasas en panadería y pastelería	10
2.2.3. Margarina	11
2.2.3.1. Definición.....	11
2.2.3.2. Características	11

2.2.4.Manteca	11
2.2.4.1.Definición.....	11
2.2.4.2.Características	12
2.2.5.Grasa fraccionada	12
2.2.5.1.Definición.....	12
2.2.5.2.Características	12
2.2.6.Oxidación lipídica en productos de panadería.....	13
2.2.7.Métodos para la cuantificación de oxidación de grasas	14
2.2.7.1.Índice de peróxido	14
2.2.7.2.Metodo de oxidacion ferrosa en xilenol naranja o FOX.....	14
2.2.7.3.Valor de peroxido	15
2.2.7.4.TBAR.....	16
2.2.7.5.TBARS	16
2.2.7.6.Dienos conjugados.....	17
2.3.Cinética de oxidación de lípidos	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1.Lugar de ejecución	21
3.2.Materiales y equipos.....	21
3.2.1.Materiales de vidrio	21
3.2.2.Equipos	22

3.3.Preparación de soluciones y reactivos	22
3.3.1.Método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX)	22
3.3.1.1.Solución indicadora de xilenol naranja a 10mM	22
3.3.1.2.Solución cloroformo/metanol 7:3 (v/v)	22
3.3.1.3.Solución de cloruro de hierro (II)	22
3.3.1.3.Solución de cloruro de hierro (III)	23
3.4.Metodología experimental	23
3.4.1.Determinación del valor de peróxido por el método yodométrico.....	23
3.4.2.Evaluación del cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.....	24
3.4.2.1.Elaboración de los alfajores	24
3.4.2.2.Preparación del extracto lipídico	25
3.4.2.3.Evaluación del extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
4.1. Estandarización y evaluación del método de oxidación ferrosa en xienol naranja (FOX).....	28
4.1.1.Estandarización del método	29
4.2. Evaluación del cambio oxidativo por el método (FOX) en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento	30
4.3. Determiación del efecto del tiempo y tipo de grasa en la estabilidad	35

4.4. Determinación del orden de reacción de la formación de peróxidos	36
4.5. Comparación estadística de los parámetros de cinética de formación de peróxidos de los diferentes tipos de grasa	39
4.6. Predicción del comportamiento de oxidación de lípidos durante el almacenamiento de alfajores.....	40
VI. CONCLUSIONES.....	42
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA	44
IX. ANEXO.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro:	Página
1. Datos de las lecturas de las diferentes concentraciones de hierro III, necesario para la construcción de la curva estándar.	29
2. Índice de peróxidos determinados en los alfajores durante el almacenamiento mediante el método FOX.....	32
3. Análisis de varianza del efecto de tiempo y tipo de grasa en la oxidación de lípidos en los alfajores.....	35
4. Efecto del tipo de grasa en la estabilidad de oxidación de lípidos en los alfajores.....	36
5. Valores de coeficiente de reacción; usados para la determinación del orden de reacción	38
6. Análisis de varianza de las constantes de velocidad de reacción (k) de formación de peróxidos de los diferentes tipos de grasa.....	39
7. Comparación de medias de las constantes de velocidad de reacción para los diferentes tipos de grasa.....	40
8. Predicción de la oxidación de lípidos de alfajores durante el almacenamiento.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA:	Página
1. Diseño Experimental de la distribución de los tratamientos.....	25
2. Diseño Experimental del cambio oxidativo durante el almacenamiento de los alfajores.....	27
3. Comportamiento de la curva estándar de Cl_3Fe / mL vs Absorbancia por el método FOX.....	30
4. Comportamiento de la oxidación lipídica de los alfajores durante el almacenamiento (método FOX).....	33
5. Variación de índice de peróxido en almacenamiento de alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, ajustado a orden de reacción 0.....	36
6. Variación del Ln (índice de peróxido) en almacenamiento de alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, ajustado a orden de reacción 1.....	37
7. Variación de $1/(\text{índice de peróxido})$ en almacenamiento de alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, ajustado a orden de reacción 2.....	37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO:	Página
A - I. Absorbancias obtenidas durante el cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.....	49
A - II. Valores de peróxido en almacenamiento de alfajores, para el ajuste al orden de reacción 0 para cada tipo de grasa.....	50
A - III. Valores de Ln de peróxido en almacenamiento de alfajores, para el ajuste al orden de reacción 1 para cada tipo de grasa	51

RESUMEN

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María - Perú. Los objetivos fueron: Determinar los parámetros cinéticos que describan el proceso de oxidación lipídica en alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, evaluar la oxidación lípidos por el método de oxidación de hierro (FOX) en el extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento, determinar la grasa más estable durante el almacenamiento de los alfajores. Los alfajores fueron elaborados con tres grasas diferentes: manteca comercial, margarina sello de oro y grasa fraccionada producido en Palmas del Espino. Los alfajores obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente en promedio a 24°C y se evaluó el contenido de peróxidos por el método de oxidación de hierro (FOX) cada 4 días durante 20 días. Los resultados obtenidos fueron ajustados a los modelos de cinética, y analizados estadísticamente para determinar cuál de las grasas es más estable en el almacenamiento. Se obtuvo que el orden de reacción para la oxidación de lípidos es de orden cero, y las constante de velocidad de reacción para las diferentes grasas son: $K_{\text{Manteca}} = 0.0094$; $K_{\text{Margarina}} = 0.0096$ y $K_{\text{Grasa fraccionada}} = 0.0075$. Existiendo diferencia altamente significativa en la estabilidad oxidativa del tipo de grasa empleada en la elaboración de alfajores ($P_{\text{valor}}=0.0$) siendo las más estable la grasa fraccionada.

I. INTRODUCCION.

Desde tiempos remotos los aceites vegetales y las grasas han sido utilizados como alimentos en la industria alimentaria, así como materia prima en la elaboración de otros productos. Una de las insuficiencias que presentan los aceites vegetales y las grasas es su poca estabilidad con el tiempo; pues se oxidan con relativa facilidad. Debido a esto, numerosas investigaciones se han realizado para el establecimiento de técnicas analíticas que permitan caracterizar y evaluar su calidad. Entre los métodos volumétricos más utilizados se encuentran los índices de peróxidos (IP), de acidez y de yodo. Otro método es muy utilizado para evaluar el grado de descomposición de los aceites comestibles es el espectrofotométrico de oxidación ferrosa en xilenol naranja, el cual permite medir de forma selectiva los hidroperóxidos totales formados en los lípidos.

La autooxidación de los lípidos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, que tiene las fases de iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación el radical lipídico se forma a partir del lípido usualmente por el ataque de radicales, luz, calor, irradiaciones o por trazas de metales. El radical lipídico formado reacciona rápidamente con oxígeno para dar un radical peroxilo, el cual ataca otra molécula de lípido y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un

hidroperóxido lipídico, y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación.

Los productos de pastelería son ricos en grasa ya que en la mayoría de las formulaciones el contenido de grasa se encuentra alrededor del 50 % de la formulación, esto permite que el producto sea muy susceptible a los daños oxidativos, bajo este marco se plateó realizar la investigación considerando los siguientes objetivos:

- Determinar los parámetros cinéticos que describan el proceso de oxidación lipídica en alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa.
- Evaluar el cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.
- Determinar que grasa es más estable durante el almacenamiento de los alfajores.

II. MARCO TEORICO.

2.1. Generalidades de las grasas y aceites.

2.1.1. Definición.

Las grasas y aceites son predominantemente triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente como triglicéridos, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, son menos densos que el agua y a temperatura ambiente varían de consistencia desde líquidos a sólidos (ZILLER, 1996).

Existen grasas y aceites de origen animal o vegetal en función de su estructura química se clasifican en saturadas e insaturadas (estas últimas se dividen en monoinsaturadas y poliinsaturadas). Los alimentos de origen animal, casi siempre contienen más grasas saturadas, y a temperatura ambiente son sólidas, a diferencia de las grasas de origen vegetal o insaturadas, que a temperatura ambiente son líquidas y se conocen genéricamente como aceites (ESKIN, 2007).

Las grasas de origen vegetal, son esenciales para el organismo porque éste no puede producirlas. Además, los aceites vegetales suelen tener gran cantidad de grasas monoinsaturadas, cuya ingestión favorece el aumento de lo que en medicina se conoce como colesterol bueno o de alta densidad (HDL) y reduce la concentración de colesterol malo o de baja densidad (LDL), lo cual contribuye a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, pues se evita que se depositen en las arterias y las obstruyan (BERNARDINI, 1981).

No sólo por su estructura química las grasas vegetales son más digeribles y tienden a acumularse menos en el organismo. Sin embargo, existe, una categoría diferente de grasas vegetales (producto del ingenio humano) denominadas parcialmente hidrogenadas o trans, que en la actualidad están en la mira de las autoridades sanitarias de buena parte del mundo por los riesgos que con lleva su ingestión (NOUROOZ-ZADEH, 1995).

2.1.2. Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son componentes básicos de las grasas, los cuales intervienen en la constitución de los lípidos complejos (triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol). Son compuestos orgánicos formados por una larga cadena hidrocarbonada y un grupo terminal carboxílico (-COOH). Entre ellos agrupamos a los ácidos carboxílicos que contienen desde 4 átomos de carbono con una sola función ácido. Las cadenas de los ácidos grasos pueden ser saturadas, cuando contienen la máxima cantidad de átomos de hidrógeno unidos a los átomos de carbono, ó insaturados, en caso que existan enlaces dobles ó triples entre los átomos de carbono, lo cual disminuye la cantidad de hidrógenos que dichos átomos son capaces de ligar con átomos de oxígeno. Los dobles enlaces entre los átomos de carbono pueden tener distintas configuraciones según la orientación espacial de los átomos de hidrogeno enlazados a estos carbonos. Estas configuraciones son las llamadas Cis o Trans, de acuerdo a que los dos átomos de hidrogeno estén del mismo lado ó de lados opuestos al plano delimitado por el doble enlace $C = C$. (RATNAYAKE, 1993).

2.1.2.1. Ácidos grasos saturados.

Se denominan así a los ácidos grasos que poseen enlaces simples de carbono – carbono, y contiene saturados todos sus enlaces, no contienen dobles enlaces, lo que les confiere una gran estabilidad y la característica de ser sólidos a temperatura ambiente. Predominan en los alimentos de origen animal, aunque también se encuentran en grandes cantidades en algunos alimentos de origen vegetal como los aceites de coco, palma y palmiste, etc. (CHRISTIE, 1986).

2.1.2.2. Ácidos grasos insaturados.

Se denominan así a los ácidos grasos que poseen al menos un enlace doble de carbono – carbono, que pueden reaccionar con el oxígeno del aire aumentando la posibilidad de enranciamiento de la grasa, son líquidos a temperatura ambiente. Se los puede encontrar en pescados, legumbres, etc. (DEVLIN, 2004).

2.1.2.2.1. Ácidos grasos trans.

Los ácidos grasos trans (AGT) son ácidos grasos no saturados con al menos un doble enlace en configuración trans, que se caracteriza porque los dos átomos de hidrógeno de los carbonos adyacentes al doble enlace se encuentran en direcciones opuestas. Son, por tanto, isómeros geométricos, cuya estructura molecular resulta más rígida y les confiere diferentes propiedades físicas, fundamentalmente un punto de fusión más elevado y una mayor estabilidad. La fuente más común de AGT son las margarinas y los shortenings. Así como su larga

lista de derivados, como galletitas, tortas, panes, alfajores, etc. Todos ellos contienen aceites vegetales parcialmente hidrogenados. (FAO, 2003).

2.1.2.2.2. Ácidos grasos cis.

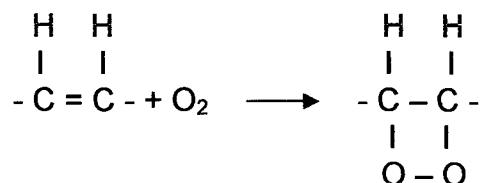
Los ácidos grasos cis (AGC) son ácidos grasos insaturados que posee los grupos semejantes o idénticos (generalmente grupos –H) en el mismo lado de un doble enlace. Los ácidos grasos cis son isómeros de los ácidos grasos trans, en los que los –H se disponen uno a cada lado del doble enlace. Los ácidos grasos con dobles enlaces cis no son cadenas rectas sino que poseen un codo en el punto donde está el doble enlace; por el contrario, los trans son rectilíneos; los dobles enlaces cis son mucho más comunes en los seres vivos que los trans. (FAO, 2003).

2.2. Conceptos básicos generales sobre la oxidación de lípidos.

2.2.1. Oxidación lipídica.

BAILEY (1961) reporta que el primer paso en la oxidación de una grasa es la adición de oxígeno al enlace doble de la cadena de un ácido graso para formar compuestos inestables que se designan, generalmente con el nombre de peróxidos.

La reacción de acuerdo con las ideas clásicas es la siguiente:



El desarrollo de la oxidación tiene dos fases distintas; durante la inicial la oxidación se efectúa a un ritmo lento y uniforme, una vez alcanzado un grado de oxidación crítico la oxidación entra a una segunda fase caracterizada por un ritmo

rápidamente acelerado, muchas veces más que el observado en la fase inicial. El punto en el que la grasa comienza a tener olor a rancio coincide con el comienzo de la primera parte de la segunda fase. El período inicial de la oxidación relativamente lento se llama período de inducción; los aceites más saturados se alteran poco en la primera fase de la oxidación y el comienzo del enranciamiento es súbito y definido. En condiciones de ensayo que aceleren el ritmo de la oxidación los aceites muy insaturados también absorben más oxígeno y desarrollan más altos índices de peróxido, antes del final del período de inducción. Las grasas con alto contenido en ácido oleico y bajo en ácidos linoléico o poliinsaturados se enrancian con menor absorción de oxígeno que aquellas en que la relación de estos ácidos es inversa. Si se prosigue la oxidación hasta una fase avanzada el índice de peróxido alcanzará un máximo y luego disminuirá. El ritmo de absorción de oxígeno se acelera por el calor y por la exposición de la grasa a la acción de la luz. (GUARDIOLA, 2002).

La oxidación lipídica es uno de los mecanismos responsables de la degradación de los lípidos y de la alteración de los productos que los contienen. La oxidación lipídica es un proceso que implica la participación de los ácidos grasos Insaturados (AGI) y el oxígeno, formándose hidroperóxidos de los ácidos grasos que acaban por descomponerse (con el tiempo, por la acción de altas temperaturas o por la acción de ciertas enzimas) en compuestos de oxidación secundaria, que suelen tener menos peso molecular y contener grupos carboxílicos, lo que los hace responsables de sabores desagradables (FRANKEL, 1998).

2.2.1.1. Iniciación por vía no enzimática.

La oxidación por vía no enzimática puede tener lugar mediante dos mecanismos que implican diferentes formas del oxígeno: la autooxidación, con la participación del oxígeno triplete (3O_2 , estado fundamental y más estable del oxígeno), y la fotooxidación, con la participación del oxígeno singulete (O_2 , estado excitado y más reactivo del oxígeno). En ambos mecanismos se forman Hidroperóxidos Lipídicos (HPL) pero lo hacen de forma distinta ya que la reacción directa de los Ácidos Grasos Insaturados (AGI) con el oxígeno triplete está termodinámicamente impedida. Así, para que tenga lugar la auto oxidación debe formarse un radical alquilo del AGI, el cual ya puede reaccionar con el oxígeno triplete. En cambio, en la fotooxidación, al reaccionar el oxígeno triplete con un fotosensibilizador en estado excitado pasa a oxígeno singulete, el cual puede reaccionar directamente con el AGI sin necesidad de formar radicales alquilo. Aunque ambos mecanismos pueden tener lugar de forma simultánea, la autooxidación es la más habitual y es la responsable primera de la alteración de las características nutritivas y sensoriales de los alimentos (NAVAS, 2006).

La iniciación en la autooxidación tiene lugar mediante la formación de un radical alquilo a partir del ácido graso insaturado, reacción que requiere la aportación de energía o la acción catalítica de metales prooxidantes en estado libre como el hierro o el cobre. Los radicales al tener un electrón desaparejado son especies muy reactivas y tienden a reaccionar con otras moléculas para estabilizarse. Así, el radical alquilo formado podrá reaccionar con el oxígeno triplete para dar un radical alcoxilo, el cual tenderá a estabilizarse reaccionando con otros cercanos formando hidroperóxido lipídico. Para que tenga lugar la fotooxidación en

un alimento, el oxígeno triplete debe pasar a oxígeno singlete mediante ácidos Grasos Insaturados la reacción con un fotosensibilizador en estado excitado en el alimento. Estas sustancias fotosensibilizadoras son moléculas con un elevado número de dobles enlaces en su estructura (clorofila, hematóporfirinas, flavinas), que pueden pasar a un estado excitado mediante la absorción de la luz (principalmente UV, aunque también la visible) (GRACIANI, 2006).

2.2.1.2. Descomposición de los hidroperóxidos lipídicos (HPL).

Los diferentes mecanismos de inicio de la oxidación dan lugar a la producción de HPL. Estos son bastante inestables y se degradan por diferentes vías dando lugar a una gran variedad de compuestos de tipo monomérico, polimérico y, compuestos de bajo peso molecular muchos de ellos volátiles que suelen contener grupos carbonílicos, los cuales son responsables del flavor de deterioración de las grasas. La descomposición de los HPL suele cursar mediante su fragmentación por hemólisis, favorecida en presencia de calor, radiaciones o iones metálicos, formando radicales libres del tipo peróxido ($\text{LOO}\cdot$), alcoxilo ($\text{LO}\cdot$) o hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que a su vez pueden reaccionar con otros radicales, con el oxígeno o atacar a otros HPL, AG e incluso a otros productos de oxidación formados y dar nuevos radicales propagando así la cadena y dando lugar a una gran variedad de compuestos. (NIKI, 2005).

Así, puede obtenerse una gran variedad y cantidad de productos de oxidación a raíz de la degradación de los HPL como consecuencia de la gran variedad de radicales formados y de interacciones que pueden haber entre ellos y con otras moléculas no radicalarias. El tipo de productos formados y por lo tanto el

flavor de degradación de grasas dependen tanto de las condiciones en que tiene lugar la oxidación (temperatura, O₂, etc.) como de la cantidad y tipo de AG oxidables (BOU, 2005).

2.2.1.3. Termooxidación.

La oxidación de los AG, principalmente la auto oxidación, se acelera considerablemente cuando tiene lugar a temperaturas muy altas, como por ejemplo las usadas en un proceso de fritura, ya que la temperatura es uno de los factores que pueden iniciar la reacción radicalaria y que favorecen la descomposición de los HPL. Pero además, al calentar una grasa o aceite a alta temperatura se reduce la concentración de oxígeno porque se reduce su solubilidad, siendo este limitante, lo que modifica el tipo de reacciones radicalarias que tienen lugar. Los HPL formados se descomponen rápidamente debido a la temperatura. Además la Termooxidación de ácidos grasos poliinsaturados favorece la isomerización, dando lugar a una aparición de AG trans y dobles enlaces conjugados. Así se forman un gran número de compuestos volátiles y no volátiles por oxidaciones térmicas, hidrólisis y ciclación, entre los cuales se encuentran los monómeros cíclicos, destacables por sus efectos nocivos para la salud. La formación de AG trans del ácido linolénico en aceites ha sido descrita al ser estos calentados por encima de 180 °C (JUANEDA, 2003).

2.2.2. Usos de las grasas en panadería y pastelería.

Las grasas y aceites tienen una gran variedad de aplicaciones en panadería y pastelería. Ellas son las responsables de que las migas o parte interior de los productos de panadería sean tiernos y fáciles de morder. Proveen lubricidad

en el proceso de manufactura (por ejemplo, al retirar el producto de sus recipientes) y en la sensación de humedad que se siente en la boca cuando el producto es consumido. Las grasas y aceites son decisivos en la estructura de los productos horneados, contribuyendo a factores tan importantes como flexibilidad, levantado, hojaldrado, solidez y aireado del producto durante su fabricación, así como también contribuyen a la frescura luego de su manufactura. (HAMILTON, 1986)

2.2.3. Margarina.

2.2.3.1. Definición.

La margarina es un producto elaborado a partir de la hidrogenación parcial de aceites vegetales que es un proceso industrial que permite convertir un aceite vegetal en una sustancia sólida, estable y untable. Este proceso de hidrogenación convierte las grasas insaturadas en saturadas y además produce ácidos grasos trans, (FAO, 2003).

2.2.3.2. Características.

La margarina tiene una composición de mínimo 80% de materia grasa y como máximo 16% de agua, deberá conservarse sólida a 20°C. Presenta un punto de fusión de 45°C, (FAO, 2003).

2.2.4. Manteca.

2.2.4.1. Definición.

La manteca vegetal es un producto obtenido de la hidrogenación parcial de aceites vegetales, lo cual le brinda su consistencia sólida. Su olor y sabor neutros

son el resultado de un estricto control en los procesos de refinación, blanqueo, hidrogenación y deodorización. Su característica consistencia y color blanco la hacen un producto superior para procesar alimentos de calidad libres de olores y sabores extraños. Es utilizada en la preparación de alimentos, especialmente productos horneados. La manteca vegetal a menudo tiene 100% de materia grasa, en comparación con alrededor del 80% para la mantequilla y la margarina (FAO, 2003).

2.2.4.2. Características.

La manteca vegetal tiene una composición de mínimo 82% de grasa vegetal y como máximo 16% de agua. Presenta un punto de fusión de 45°C y la fase grasa de la manteca está compuesta mayoritariamente por ácidos grasos saturados (FAO, 2003).

2.2.5. Grasa fraccionada.

2.2.5.1. Definición.

La grasa fraccionada se obtiene a través de un proceso de fraccionamiento en seco que consiste en que la grasa o aceite se funde completamente, tras lo que es enfriada, formándose cristales de los triglicéridos de mayor punto de fusión, que se separan por filtración (GIRON, 2009).

2.2.5.2. Características.

La grasa fraccionada es recomendada para su uso en panificación y repostería, cuyos componentes de su formulación, corresponden a subproductos del

aceite de palma fraccionado, tales como oleína y estearinas de diferente punto de fusión. Así mismo cabe indicar que una grasa que al estar compuesta casi en su totalidad de ácidos grasos saturados tiende a oxidarse menos durante el transcurso del tiempo y presenta un punto de fusión de 50°C (CALVO, 2010).

2.2.6. Oxidación lipídica en productos de panadería.

El desarrollo de la oxidación en la fracción lipídica de los alimentos es una de las principales reacciones de deterioración, ya que reduce su vida útil y su calidad nutritiva y sensorial. La oxidación puede suponer una pérdida de AG y vitaminas del alimento. Estas pérdidas adquieren más importancia cuando se trata de AG esenciales (linolénico y linoléico) o con efectos beneficiosos para la salud (EPA y DHA especialmente) (FRANKEL, 1998).

Desde el punto de vista sensorial, la oxidación lipídica está relacionada con la oxidación de los pigmentos. Este hecho es muy importante en productos de panadería y derivados ya que influye en la compra del producto por parte del consumidor. Además, el flavor y aroma de los alimentos, y en particular de los panes, pueden estar también alterados por los productos secundarios de oxidación que aparezcan, los que a su vez dependerán de los procesos que tengan lugar en los panes, del balance entre prooxidantes y antioxidantes, y de los sustratos oxidables. Algunos compuestos volátiles de oxidación que aportan aromas y sabores extraños en los alimentos difieren según el tipo de AG que se oxida. Desde el punto de vista nutricional, la oxidación lipídica implica una disminución en el aporte de AG esenciales, y de vitaminas antioxidantes sensibles a este proceso, Además, la oxidación puede producir una pérdida de aminoácidos esenciales, ya

que los productos de oxidación pueden interaccionar con ellos. Estas interacciones pueden resultar también en cambios sensoriales, afectando a la textura, disminuyendo la solubilidad de proteínas y produciendo cambios de color (SPITELLER, 2006).

2.2.7. Métodos para la cuantificación de oxidación de las grasas.

2.2.7.1. Índice de peróxido.

MEHLEMBACHER (1970) menciona que el índice de peróxido de una grasa es una medida de su contenido de oxígeno reactivo, expresada en términos de miliequivalentes de oxígeno por Kg de grasa, o como milimoles de peróxido por kilogramo de grasa (1 milimol = 2 miliequivalentes).

Los peróxidos formados durante la oxidación de la grasa son de carácter variable, dependiendo de las condiciones bajo las que se formaron. Así mismo se observó que los peróxidos formados a altas temperaturas se reducían con más dificultad que los formados a temperaturas moderadas. Cuando en una grasa existen peróxidos es que ha tenido lugar una oxidación.

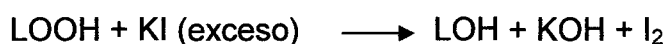
2.2.7.2. Método de oxidación ferrosa en xilenol naranja o FOX.

NOUROOZ-ZADEH (1995) menciona que el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja o método FOX, es una determinación en medio ácido, basada en la oxidación del Fe II a Fe III por reacción con los peróxidos lipídicos y posteriormente la formación de un complejo (Fe III - naranja de xilenol), que origina un color púrpura y que presenta un máximo de absorbancia entre 560-590 nm.; aunque su estequiometría no es exactamente conocida, algunos autores indican que

3 moles del complejo [Fe III - Xilenol Naranja] son formados a partir de un mol de peróxido.

2.2.7.3. Valor de peróxido.

NAVARRO (2002) menciona que la formación de los peróxidos tiene lugar en las primeras etapas de la oxidación, una de las formas para determinar se basa en la capacidad que tienen estos compuestos de liberar I₂ cuando reaccionan con yoduro potásico. En la técnica los lípidos se disuelven en un solvente orgánico apropiado adicionándose un exceso de KI.



Al final de la reacción el yodo liberado se titula con una solución de tiosulfato de sodio utilizando almidón como indicador. La cantidad de tiosulfato consumida es proporcional a la cantidad de peróxidos presentes en la muestra.



A pesar de ser uno de los métodos más utilizados en el control de la oxidación de los lípidos, este presenta la desventaja que durante la reacción de oxidación de los peróxidos se descomponen para dar paso a los productos secundarios de la oxidación, por lo que bajos valores de este indicador pueden encontrarse tanto al inicio como al final de la reacción, otra desventaja particular es su alta dependencia de las condiciones experimentales entre ellas la temperatura.

2.2.7.4. TBAR.

Una de las técnicas más utilizadas para medir el incremento de productos secundarios de oxidación es la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA). El TBA se considera una técnica relativamente simple y presenta una elevada correlación con los resultados de la evaluación sensorial. Este método se basa en la relación de una molécula de malonaldehído con 2 moléculas de TBA para formar un complejo coloreado malonaldehído – TBA, que puede ser cuantificado

Las limitaciones que se han señalado a esta técnica son que es poco sensible a bajas concentraciones de malonaldehído, además otras sustancias pueden reaccionar (sustancias reactivas al TBA) como sacáridos y otros aldehídos lo que puede interferir con la reacción malonaldehído – TBA. De igual forma el malonaldehído puede reaccionar con las proteínas encontrándose menos niveles a los que corresponden con la oxidación presente. Esta técnica se considera especialmente útil cuando se requiere determinar el incremento de la oxidación en el tiempo (NAVARRO, 2002).

2.2.7.5. TBARS

La sensibilidad para medir las sustancias reactivas del ácido Tiobarbitúrico (TBARS) ha hecho de este análisis el método de la opción para la investigación y supervisión de los peróxidos en los lípidos, un indicador importante de la tensión oxidativa. Este procedimiento rápido, fácil de utilizar ha sido modificado por los investigadores para el uso con muchos tipos de muestras incluyendo los productos alimenticios y los tejidos finos biológicos humanos y animales. El análisis

ha proporcionado información importante con respecto a la actividad del radical libre y se ha utilizado para la medida de la actividad antioxidante de varios compuestos.

Aunque mucha controversia ha aparecido en la literatura con respecto a la especificidad de TBARS hacia compuestos con excepción de MDA, sigue siendo el análisis lo más extensamente posible empleado usado para determinar el peroxidación del lípido. Si las fracciones de la lipoproteína son primer ácido precipitado de la muestra, se reducen al mínimo TBARS solubles que interfieren. No obstante, si se aumentan TBARS, se recomienda que un análisis más específico tal como HPLC esté realizado (NAVARRO, 2002).

2.2.7.6. Dienos Conjugados

Al comienzo de la oxidación, posterior a la formación de los peróxidos, el reordenamiento de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados ($C=C-C-C=C$), da lugar a la aparición de dienos conjugados ($C=C-C=C-C$).

La determinación de estos compuestos se fundamenta en que estos absorben la radiación ultravioleta en la longitud de onda de 233nm. Las muestras se disuelven en un solvente orgánico como el isooctano y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible. A medida que la reacción avanza, la absorbancia disminuye, ocasionado por el paso de los dienos conjugados a productos secundarios de oxidación, los que presentan una baja absorción a la radiación de 233nm (NAVARRO, 2002).

2.3. Cinética de oxidación de lípidos

Los sustratos de estas reacciones son, principalmente, los ácidos grasos no saturados, cuando están libres se oxidan, por lo general, más rápidamente que cuando son parte de moléculas de triglicéridos o fosfolípidos. Pero es sobre todo el grado de insaturación el que influye en la velocidad de oxidación.

Los ácidos grasos saturados sólo se oxidan a temperaturas superiores a 60 °C, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan incluso durante el almacenamiento de los alimentos en estado congelado (CHEFTEL y CHEFTEL, 2000).

Según LABUZA y RIBOTH (1995), la pérdida de calidad de productos alimenticios, puede ser expresada mediante la siguiente ecuación.

$$\pm \frac{dA}{dt} = kA^n$$

Dónde:

A: Factor de calidad medible.

t: Tiempo.

k: Constante que depende de la temperatura y de la actividad de agua.

n: Factor de potencia llamado orden de reacción, define si la velocidad es dependiente de la calidad presente de A.

dA/dt: Velocidad de cambio de A con el tiempo. El signo negativo se usa si el deterioro es una pérdida de A y un signo positivo si existe la formación de un producto indeseable.

LABUZA y RIBOTH (1995), menciona que existen reacciones llamadas de orden cero, en la que la cinética de pérdida de vida útil por día es constante para condiciones de temperatura y actividad de agua definida. En la ecuación básica, n es cero, estas reacciones son: Degradación enzimática, pérdida de humedad y pardeamiento no enzimático en cereales secos, productos lácteos deshidratados. Quedando la ecuación básica como sigue:

$$A_e = A_o - kt_s$$

Dónde:

A_o : Valor inicial de calidad.

A_e : Valor de A al final de la vida útil o valor límite permitido (puede ser cero o cualquier otro valor).

T_s : Vida útil en días, meses, años, etc.

Según NÚÑEZ Y CHUMBIRAY (1991), muchos alimentos siguen un modelo de pérdida de calidad de primer orden, que implica un decrecimiento exponencial de la cinética de deterioro del factor de calidad, de ahí que presenten una mayor vida útil que aquellos alimentos con velocidad de pérdida constante. El valor de n es uno. LABUZA y RIBOTH (1995), menciona que en este tipo de reacción están las reacciones de crecimiento microbiano en carnes y pescado fresco, destrucción térmica de microorganismos, rancidez de aceites, vegetales secos y productos cárnicos, pérdida de vitaminas en alimentos envasados y secos y pérdida de calidad proteica en alimentos secos. Quedando la ecuación básica como sigue:

$$\ln \frac{A_e}{A_0} = -kt_s$$

Dónde:

A_e : Cantidad remanente al final de la vida útil o valor límite permitido (diferente de cero).

A_0 : Valor inicial de calidad.

K : Constante de velocidad en unidades recíprocas del tiempo.

T_s : Vida útil en días, meses, años, etc.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Lugar de ejecución.

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de análisis de Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Latitud Oeste ,con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24 °C.

3.2. Materiales y equipos.

3.2.1 Materiales de vidrio.

- Matraces (100 mL) Kimax USA, Schott Duran Germany.
- Probetas (50 mL) Brand Germany.
- Pipeta (5 mL) Pyrex USA.
- Vasos de precipitación (50, 100 mL) Pyrex USA.
- Tubos de ensayo .Pyrex USA.
- Cubetas de vidrio (1cm x 1cm x 3.5cm).
- Micropipetas (1 – 1000 µL), (100 – 1000 µL), (20 – 200 µL).
- Tips (50 – 1000 µL).

3.2.2 Equipos.

- Balanza analítica (OHAUS Analytical plus. Serie N° 1113032314).
- Cocina eléctrica de plataforma.
- Espectrofotómetro (Genesys 6 Thermo Spectronic N° SG8100405).
- Agitador magnético.
- Rotavapor.
- Congeladora.
- Horno a gas.

3.3. Preparación de soluciones y reactivos.

3.3.1. Método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX).

3.3.1.1. Solución indicadora de Xilenol Naranja a 10mM.

Pesar el xilenol naranja y luego disolver en alcohol metílico y aforar a 10ml en una fiola de color oscuro y guardarlo lejos del alcance de la luz solar.

3.3.1.2. Solución cloroformo / metanol 7:3 (v/v).

En una fiola mezclar 7 volúmenes de cloroformo en 3 volúmenes de metanol, agitar hasta que se hayan unido.

3.3.1.3. Solución de cloruro de Hierro (II).

Disolver 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua. En un matraz por separado, disolver 0,4 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua. Agregue lentamente la solución de cloruro de bario al hierro (II) con solución de sulfato de agitación constante y a continuación 2 ml de HCl 10M. Eliminar por filtración el sulfato de bario precipitado por gravedad mediante n° 1 Whatman papel de filtro. Almacenar <1 mes en botella marrón en la oscuridad a temperatura ambiente.

3.3.1.4. Solución patrón cloruro de hierro (III).

Disolver 0,5 g FeCl_3 en 50 ml de HCL 10 M, añadir 1 a 2 ml de 30% (v/v) de H_2O_2 . Hervir unos 5 minutos para eliminar el exceso de H_2O_2 y dejar enfriar a temperatura ambiente. Diluir hasta 500 ml con agua y la transferir una alícuota de 1 ml a un matraz aforado de 100 ml. Diluir hasta la marca con solución cloroformo / metanol (7:3) a la solución (final 10 μg / ml Cl_3Fe) el tiempo de almacenamiento máximo por 3 semanas a temperatura ambiente.

3.4. Metodología experimental.

3.4.1. Estandarización del método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX).

3.4.1.1. Estandarización del método.

- Pesar de 0,01 a 0,30 g de aceite o extracto lipídico de la muestra en un tubo de ensayo.
- Añadir 9,9 ml de solución cloroformo / metanol (7:3). Agitar la muestra 2 a 4 seg.
- Encender el espectrofotómetro y establecer la longitud de onda de 560 nm. Dejar que el instrumento se caliente ≥ 30 min antes de tomar cualquier lectura.
- Espectrofotómetro a cero con un solvente (por ejemplo, el cloroformo / metanol solución) el blanco con una cubeta.
- Añadir 50 μl de 10 mM xilenol muestra de solución de naranja y agitar 2 a 4 segundos, y luego añadir 50 μl de solución de cloruro de hierro (II) y agitar de nuevo.

- Dejar reposar la solución exactamente 5 minutos a temperatura ambiente y después se determina es la absorbancia a 560 nm.
- Construir una curva estándar mediante la repetición de los pasos anteriores. No debe de existir un aceite de uso o extracto lipídico de la muestra. En lugar de la muestra, se agregan a una serie de tubos de vidrio, diferentes alícuotas de solución patrón (10ug/ml) cloruro de hierro (III), 50ul de solución al 10 mM de naranja xilenol, y lo restante de solución cloroformo / metanol (7:3) a un volumen final de 10 ml.

3.4.2. Evaluación del cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.

3.4.2.1. Elaboración de los alfajores.

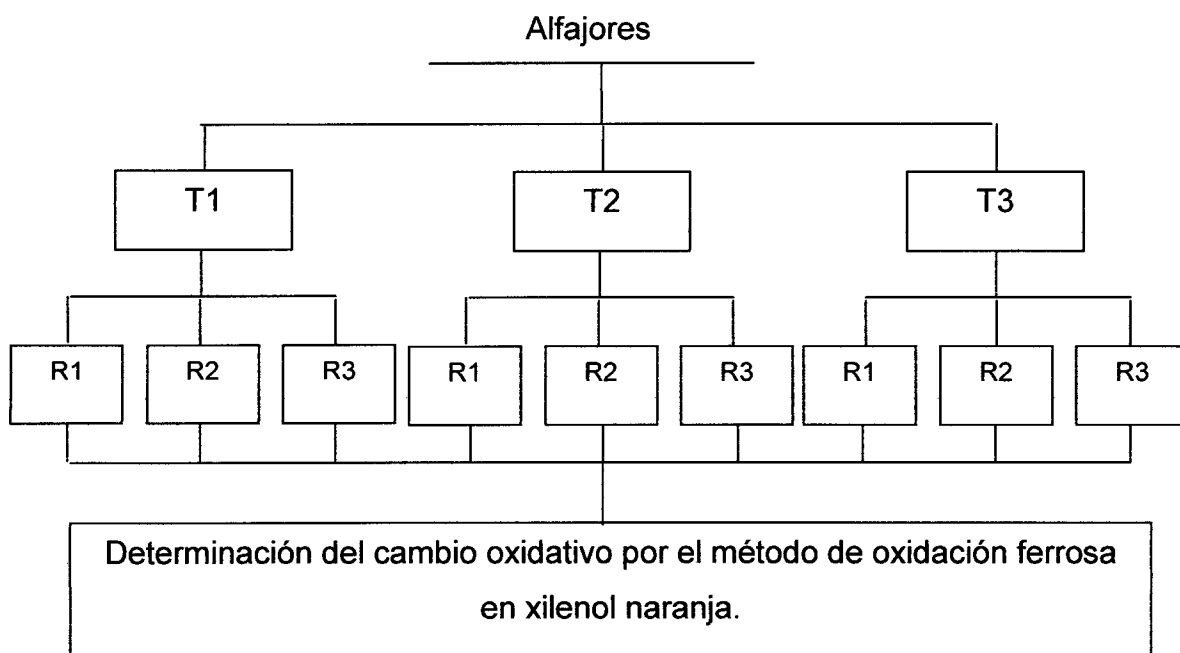
Para la elaboración de los alfajores se usaron los siguientes ingredientes 300 gramos de harina de trigo, 150 gramos de maicena, 85 gramos de azúcar impalpable y 175 gramos de manteca comercial (T1), margarina sello de oro (T2) y grasa fraccionada producido en palmas del espino (T3), cada tratamiento se trabajó con tres repeticiones (Figura 1).

Se mezcla la harina con la maicena, se incorpora el azúcar impalpable y se adiciona la manteca, margarina o grasa fraccionada según el tratamiento, y se soba hasta obtener la consistencia de una masa arenosa, luego se deja reposar la masa en refrigeración por 10 minutos, se retira de la reposo a la masa y se procede a extender sobre una mesa con la ayuda de un rodillo hasta que la lamina alcance un espesor de 0,5 cm aproximadamente y se procede a cortar discos de 3 cm de diámetro aproximadamente con la ayuda de un molde, se coloca los discos en

fuentes previamente engrasadas y enharinadas, y se lleva a un horno a 180°C por 15 minutos, se retira del horno y se deja enfriar; una vez estén fríos los alfajores se procede al envasado en bolsas de polietileno y se almacena hasta el día de su análisis.

3.4.2.2. Preparación del extracto lipídico.

Se extrajeron los lípidos de los alfajores moliendo (30g) y macerando por 30 min con éter de petróleo con agitación en condiciones ambientales. Después se filtró y se separó la fracción lipídica, se elimina el disolvente por evaporación utilizando un rotavapor, en la grasa extraída se procedió a realizar los análisis. La distribución de los tratamientos se presenta en la Figura 1.



Donde: T1= Manteca, T2= Margarina, T3= Grasa fraccionada, R1, R2, R3 = Repeticiones.

Figura 1. Diseño Experimental de la distribución de los tratamientos.

3.4.2.3. Evaluación del extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.

- Pesar de 0,01 a 0,30 g de aceite o extracto lipídico de la muestra en un tubo de ensayo.
- Añadir 9,9 ml de solución cloroformo / metanol (7:3). Agitar la muestra.
- Encender el espectrofotómetro y establecer la longitud de onda de 560 nm. Dejar que el instrumento se caliente ≥ 30 min antes de tomar cualquier lectura.
- Espectrofotómetro a cero con un solvente (por ejemplo, el cloroformo / metanol solución) el blanco con una cubeta.
- Añadir 50 μ l de 10 mM xilenol muestra de solución de naranja y agitar 2 a 4 segundos, y luego añadir 50 μ l de solución de cloruro de hierro (II) y agitar de nuevo.
- Dejar reposar la solución exactamente 5 minutos a temperatura ambiente y después se determina la absorbancia a 560 nm.

El valor de peróxidos se determina utilizando la siguiente ecuación.

$$PV = [(A_S - A_B) M_i] / W \times 55.84 \times 2$$

A_S = Absorbancia de la muestra.

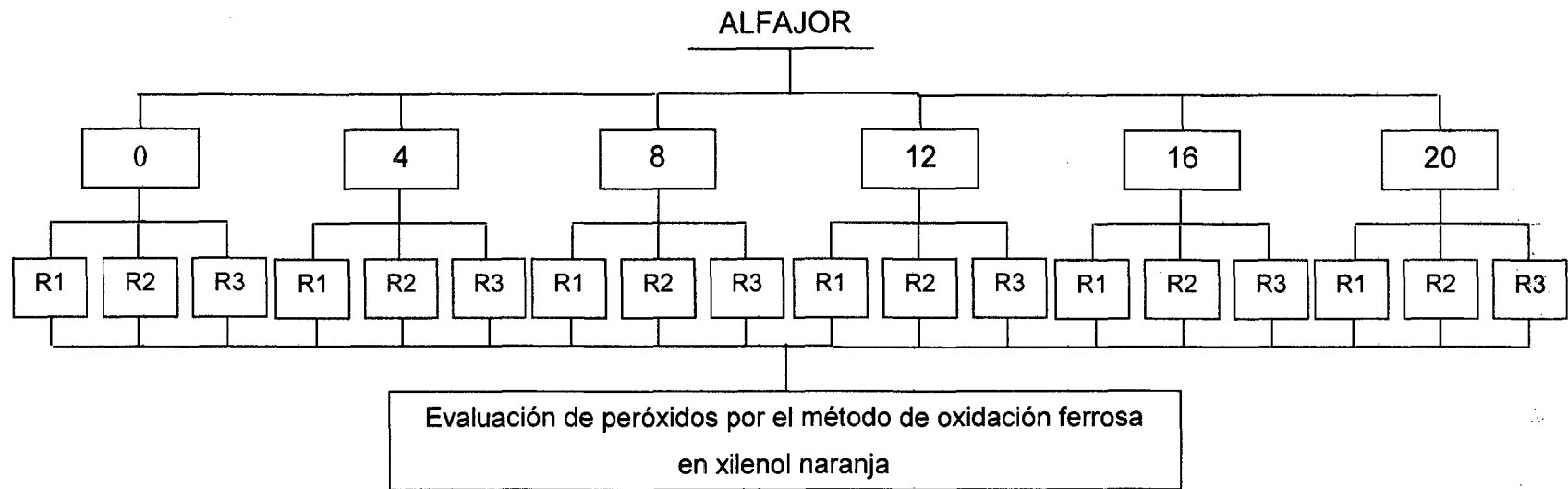
A_B = Absorbancia del blanco.

M_i = 1 / pendiente.

W = Peso de la muestra.

55.84 = Peso atómico del hierro.

Se repite este mismo procedimiento durante 20 días tal como se presenta en el diseño experimental de la Figura 2.



Donde: 0, 4, 8, 12, 16 y 20 = Días de evaluación; R1, R2, R3 = Repeticiones.

Figura 2. Diseño Experimental del cambio oxidativo durante el almacenamiento de los alfajores.

IV. RESULTADO Y DISCUSIONES.

4.1. Estandarización y evaluación del método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX).

4.1.1. Estandarización del método.

La estandarización se realizó con el Hierro III, las concentraciones consideradas fueron 0,5; 1; 1,5 y 2 ml, la lectura se realizó a 560 nm debido a las características del cromóforo que se forma; los resultados de las lecturas espectrofotométricas se presentan en el Cuadro 1. Las alícuotas para levantar la curva estándar fueron 0,5 a 2 ml, se realizó con tres repeticiones por cada concentración y con los promedios se levantó la curva patrón. Según NOUROOZ-ZADEH (1995) el método del naranja de xilenol o método FOX, es una determinación en medio ácido, basada en la oxidación del Fe II a Fe III por reacción con los peróxidos lipídicos y posteriormente la formación de un complejo (Fe III - naranja de xilenol), que origina un color púrpura y que presenta un máximo de absorbancia entre 560-590 nm.; aunque su estequiometría no es exactamente conocida, algunos autores indican que 3 moles del complejo [Fe III - Xilenol Naranja] son formados a partir de un mol de peróxido.

Cuadro 1. Datos de las lecturas de las diferentes concentraciones de hierro III, necesario para la construcción de la curva estándar.

Ug de Cl_3Fe / mL	Abs R1	Abs R2	Abs R3	Promedio
0,5	0,022	0,021	0,023	0,022
1	0,045	0,048	0,046	0,046
1.5	0,075	0,073	0,072	0,073
2	0,098	0,099	0,100	0,099

En la Figura 3 se presenta las concentraciones de Fe III y los resultados de la absorbancia, en ella se observa que existe una correlación positiva ya que un incremento en el nivel de concentración (x = concentración de Hierro III) se relaciona con un incremento en el nivel de absorbancia (Y = resultados de absorbancia). MURRAY (1969) indica que si "Y" tiende a incrementarse cuando de incrementa "X" la correlación se dice positiva o correlación directa. Este comportamiento dio como resultado un valor de $r^2=0,9991$; al respecto WEBSTER (2000), menciona que entre mayor sea el valor absoluto de "r" mas fuerte será la relación entre "x" y "y". Así mismo, HERNANDEZ *et.al.*, (2001) indica valores cercanos a 1 se considera ajustes casi perfectos, esto indica que tiene una buena estimación de ajuste de los datos.

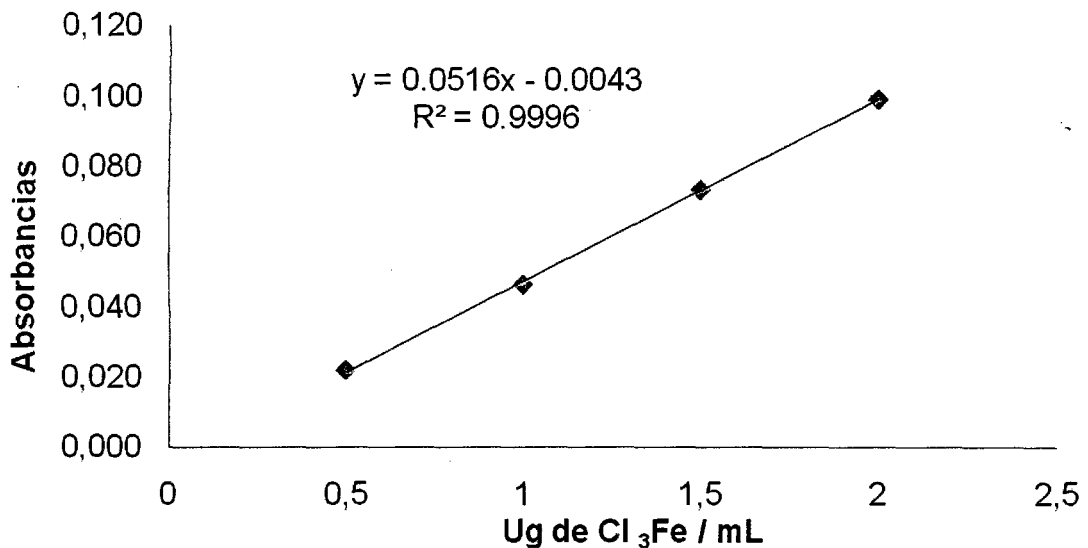


Figura 3. Comportamiento de la curva estándar de Cl₃Fe / mL vs Absorbancia por el método FOX.

4.2. Evaluación del cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.

En los alfajores que fueron elaborados con manteca, margarina y grasa fraccionada y almacenados por un periodo de 20 días se evaluó el cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico, los resultados se presentan en el Cuadro 2, la Figura 4 y Anexo A-I.

En el día cero: Los resultados del cálculo nos indican que entre las tres muestras se puede apreciar que al alfajor elaborado con manteca fue el que tuvo el menor valor 0,024 mmoles de O₂ / Kg de grasa (Cuadro 2 , la Figura 4 y Anexo A-I), Según GUSTONE (2004) indica que la manteca vegetal tiene una composición de

mínimo 82% de grasa vegetal y como máximo 16% de agua. Presenta un punto de fusión de 45°C y la fase grasa de la manteca está compuesta mayoritariamente por ácidos grasos saturados. Por otro lado los alfajores elaborados con margarina y grasa fraccionada fueron similares 0,035 mmoles de O₂ / Kg de grasa y 0,043 mmoles de O₂ / Kg de grasa, respectivamente. Según el reporte de MADRID (1997), la margarina es un producto obtenido por hidrogenación de un aceite, que consiste en la adicción de hidrógeno en los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados de los triglicéridos esto aumenta su grado de saturación y consecuentemente su punto de fusión que es 40°C, obteniendo una grasa sólida y la grasa fraccionada se obtiene a través de un proceso de fraccionamiento en seco que consiste en que la grasa o aceite se funde completamente, tras lo que es enfriada, formándose cristales de los triglicéridos de mayor punto de fusión, que se separan por filtración (GIRON, 2009).

Cuadro 2. Índice de peróxidos determinados en los alfajores durante el almacenamiento mediante el método FOX.

Días	0	4	8	12	16	20
Manteca	0,028	0,049	0,085	0,125	0,167	0,217
	0,021	0,054	0,090	0,128	0,165	0,208
	0,023	0,052	0,094	0,123	0,170	0,210
	0,024	0,051	0,090	0,126	0,167	0,212
Margarina	0,038	0,069	0,116	0,158	0,182	0,226
	0,033	0,066	0,121	0,151	0,186	0,224
	0,035	0,064	0,118	0,156	0,189	0,229
	0,035	0,067	0,119	0,155	0,186	0,226
Grasa Fraccionada	0,040	0,066	0,095	0,121	0,156	0,191
	0,043	0,059	0,090	0,120	0,158	0,193
	0,045	0,062	0,094	0,125	0,161	0,189
	0,043	0,062	0,093	0,122	0,158	0,191

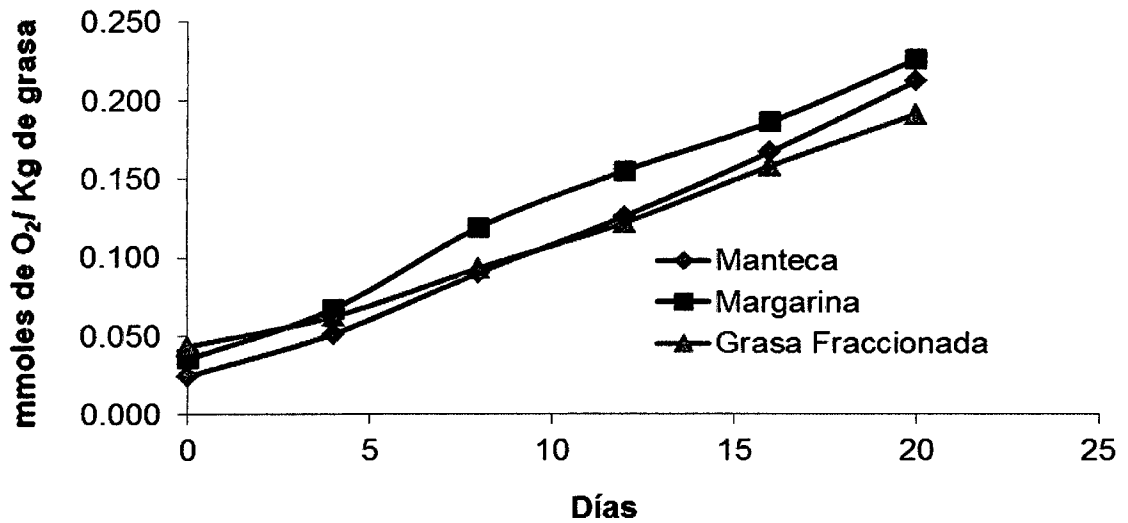


Figura 4. Comportamiento de la oxidación lipídica de los alfajores durante el almacenamiento (método FOX).

En el día cuatro: de las evaluaciones realizadas presentadas en el cuadro 2 y figura 4 se puede apreciar que las nuestras tienen un comportamiento similar al día cero, nuevamente el alfajor elaborado con manteca tuvo el menor índice de peróxido con un valor de 0,051 mmoles de O₂ / Kg de grasa, esto puede deberse a lo reportado por GUSTONE (2004) que indica que la manteca tiene un grado de resistencia frente a la oxidación lipídica durante los primeros días de elaborado un alimento, e incrementándose de manera progresiva a partir de la segunda semana de almacenamiento.

En el día ocho: Se aprecia que la manteca es la que tiene el menor contenido 0,090 mmoles de O_2 / Kg de grasa. Y el mayor índice de peróxido correspondió a la margarina 0,119 mmoles de O_2 / Kg de grasa. Este comportamiento puede explicarse con la información reportada por BADUI (1988) que indica que la margarina es la emulsión de agua (20%) en aceite que se obtiene por hidrogenación e intersterificación de aceites refinados en la que se satura cierta cantidad de ácidos grasos insaturados para mejorar su estabilidad frente a la oxidación.

Del día doce al veinte: En el mismo cuadro se puede apreciar que el comportamiento entre el día doce al veinte fue similar y en cada una de las evaluaciones se encontró que existe diferencia significativa. Durante este tiempo el menor índice de peróxido se encontró en los alfajores elaborados con manteca y grasa fraccionada, esto puede deberse a lo que reporta ZAMBRANO (2009) que los productos que son elaborados con manteca vegetal presentan una reducción de la oxidación lipídica de esta debido a que al estar compuesta en menor proporción de ácidos grasos insaturados estos se van a tender a estabilizar lo cual genera una oxidación constante después de la segunda semana de elaborado el producto; y en cuanto a los alfajores elaborados con grasa fraccionada esto puede ser explicado por qué la grasa fraccionada es recomendada para su uso en panificación y repostería, cuyos componentes de su formulación, corresponden a subproductos del aceite de palma fraccionado, tales como oleína y estearinas de diferente punto de fusión. Así mismo cabe indicar que una grasa que al estar compuesta casi en su totalidad de ácidos grasos saturados tienda a oxidarse menos durante el transcurso del tiempo, CALVO (2010).

4.3. Determinación del efecto del tiempo y tipo de grasa en la estabilidad.

Para determinar el efecto de tiempo y tipo de grasa en la estabilidad de oxidación de lípidos se realizó el análisis de varianza de los resultados el cual se muestra en el cuadro 3, y la comparación de medias en el cuadro 4.

Cuadro 3. Análisis de varianza del efecto de tiempo y tipo de grasa en la oxidación de lípidos en los alfajores.

Fuente	Suma de cuadrados	GF	Cuadrado medio	Relación F	P Valor	Significancia
Tiempo	0,199187	5	0,0398375	587,37	0.0000	**
Tipo de grasa	0,004602	2	0,0230106	33,93	0.0000	**
Error	0,003119	46	6,78237E-05			
Total	0,206861	53				

Del cuadro 3, se encuentra que existe diferencia altamente significativa para el tiempo de almacenamiento y tipo de grasa ($P_{\text{valor}} = 0,00$), lo que indica el deterioro de la grasa en el tiempo, y la influencia del tipo de grasa, esto se debería a características como es el grado de insaturación, tamaño de cadena, como lo reportado por LABUZA Y RIBOTH (1995).

Para determinar cuál de las grasas tiene mejor comportamiento se realizó la prueba de comparación de medias el cual se reporta en el cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto del tipo de grasa en la estabilidad de oxidación de lípidos en los alfajores.

Tipo de grasa	cantidad	Promedio de índice de peróxidos	Grupos Homogéneos
G.Fraccionada	18	0,111556 ^a	x
Manteca	18	0,111611 ^a	x
Margarina	18	0,131167 ^b	x

Los valores representan el promedio, los datos provienen del experimento (n=18), los valores con superíndice diferentes son significativos ($p < 0.05$), por tukey.

4.4. Determinación del orden de reacción de la formación de peroxidos.

Los resultados de la evaluación de índice de peróxido por FOX, evaluados en almacenamiento para los diferentes tipos de grasas mostradas en el cuadro 2, fueron acondicionados para el ajuste a los diferentes órdenes de reacción, los cuales se muestran en las figuras 5, 6 y 7 respectivamente.

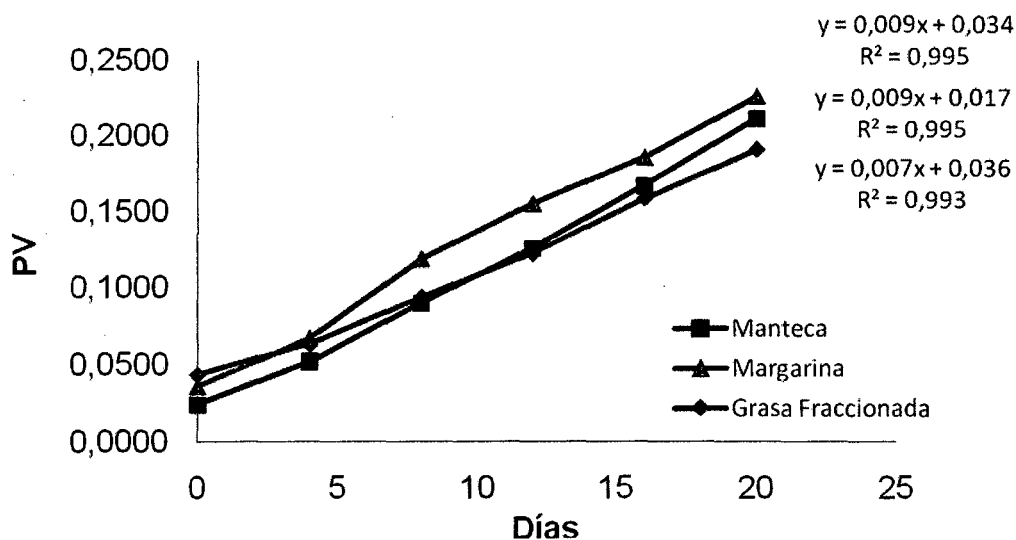


Figura 5. Variación de índice de peróxido en almacenamiento de alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, ajustado a orden de reacción 0

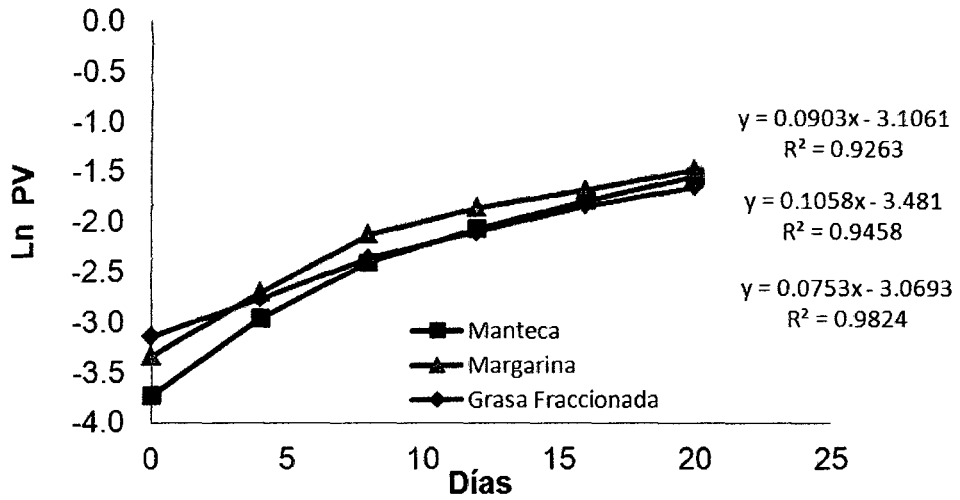


Figura 6. Variación del Ln (índice de peróxido) en almacenamiento de alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, ajustado a orden de reacción 1

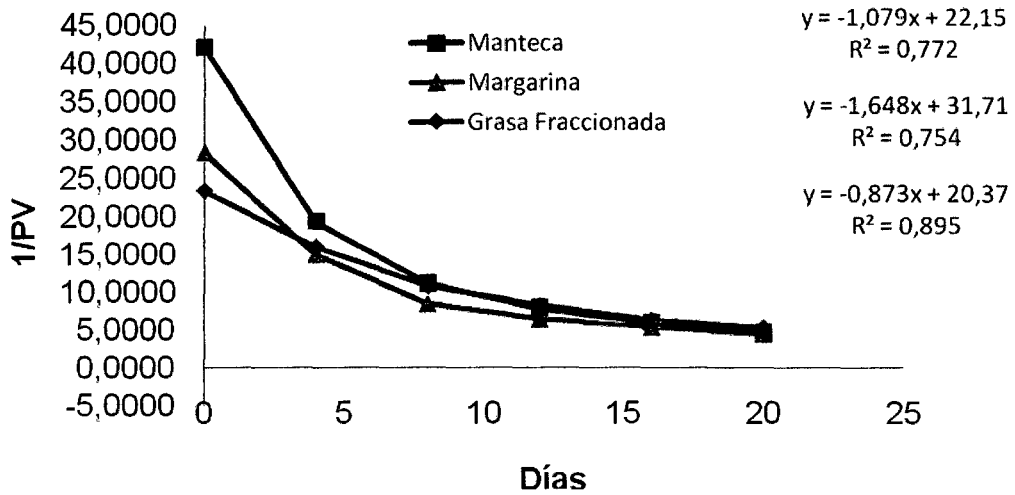


Figura 7. Variación de 1/(índice de peróxido) en almacenamiento de alfajores elaborados con diferentes tipos de grasa, ajustado a orden de reacción 2

De las figuras 5, 6 y 7 se obtiene por regresión lineal los valores de la constante de velocidad de reacción y su coeficiente de correlación, como lo reportado por LABUZA Y RIBOTH (1995), el cual se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Valores de coeficiente de reacción; usados para la determinación del orden de reacción.

Tipo de Grasa	Orden 0		Orden 1		Orden 2	
	k	R ²	k	R ²	k	R ²
Manteca	0,0096	0,9862	0,1026	0,9733	-1,4609	0,8303
	0,0093	0,9985	0,1088	0,9203	-1,8355	0,6999
	0,0094	0,9956	0,1070	0,9333	-1,7169	0,7301
Margarina	0,0094	0,9945	0,0863	0,9338	-0,9845	0,7902
	0,0096	0,9935	0,0921	0,9137	-1,1447	0,7502
	0,0099	0,9951	0,0925	0,9295	-1,1084	0,7800
Grasa Fraccionada	0,0075	0,9964	0,0761	0,9695	-0,9115	0,8501
	0,0077	0,9870	0,0764	0,9888	-0,8848	0,9170
	0,0075	0,9823	0,0736	0,9819	-0,8321	0,9075

El mejor modelo de cinética que describe el comportamiento de formación de peróxidos en alfajores para los diferentes tipos de grasa es de orden 0, con un valor de r^2 de 0.9823 como mínimo y de 0.9985 como máximo.

4.5. Comparación estadística de los parámetros de cinética de formación de peróxidos de los diferentes tipos de grasa.

Los valores de la constante de velocidad de reacción (k) para los diferentes tipos de grasa, fueron tratados estadísticamente para evaluar si existe diferencia entre ellos, el análisis de varianza se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Análisis de varianza de las constantes de velocidad de reacción (k) de formación de peróxidos de los diferentes tipos de grasa.

Fuente	Suma de cuadrados	GF	Cuadrado medio	Relación F	P Valor	Significancia
K	7,79556E-06	2	3,89778E-06	116,93	0,0000	**
Error	0.0000002	6	3,333E-08			
TOTAL	7,99556E-06	8				

Del cuadro 6, se puede notar que existe diferencia altamente significativa entre los valores de K, para los diferentes tipos de grasa, por lo que se realizó la comparación de medias el cual se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Comparación de medias de las constantes de velocidad de reacción para los diferentes tipos de grasa.

Tipo de grasa	cantidad	Promedio de índice de peróxidos	Grupos Homogéneos
G.Fraccionada	3	0,00756667 ^a	x
Manteca	3	0,00943333 ^b	x
Margarina	3	0,00963333 ^b	x

Los valores representan el promedio, los datos provienen del experimento (n=3), los valores con superíndice diferentes son significativos ($p < 0.05$), por tukey.

Del cuadro 6 y 7, se puede notar que la mejor grasa es la grasa fraccionada esto se debería al grado de saturación que tiene este tipo de grasa; a lo que reporta CALVO (2010), que la grasa fraccionada es recomendada para su uso en panificación y repostería, cuyos componentes de su formulación, corresponden a subproductos del aceite de palma fraccionado, tales como oleína y estearinas de diferente punto de fusión. Así mismo cabe indicar que una grasa que al estar compuesta casi en su totalidad de ácidos grasos saturados tienda a oxidarse menos durante el transcurso del tiempo.

4.6. Predicción del comportamiento de oxidación de lípidos durante el almacenamiento de alfajores.

Con los valores de la cinética de primer orden, se obtuvo la predicción del comportamiento de la oxidación de lípidos para las diferentes tipos de grasa en los alfajores, el cual se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8. Predicción de la oxidación de lípidos de alfajores durante el almacenamiento.

Tiempo	Manteca		Margarina		Grasa Fraccionada	
	IP evaluado	IP predecido	IP evaluado	IP predecido	IP evaluado	IP predecido
Días						
0	0,023716	0,023716	0,035284	0,035284	0,042804	0,042804
4	0,051481	0,061512	0,066520	0,073808	0,062471	0,073015
8	0,089657	0,099309	0,118579	0,112332	0,093128	0,103226
12	0,125520	0,137105	0,155020	0,150856	0,122050	0,133436
16	0,167167	0,174902	0,185677	0,189379	0,158491	0,163647
20	0,211707	0,212698	0,226168	0,227903	0,190883	0,193858

Los valores de índice de peróxido (IP) se determinan mediante la siguiente fórmula:

$$IP = IP_0 + kt$$

IP: Índice de peróxidos.

IP₀: Índice de peróxidos inicial.

K: Constante de velocidad de reacción.

t: Tiempo.

VI. CONCLUSIONES.

- El mejor modelo de cinética que describe el comportamiento de formación de peróxidos en alfajores para los diferentes tipos de grasa es de orden 0, con un valor de $r^2 > 0.9823$.
- Los valores de constante de velocidad de reacción obtenidos; con el orden de reacción cero a temperatura ambiente de 24°C son: $K_{\text{Manteca}} = 0.0094$; $K_{\text{Margarina}} = 0.0096$ y $K_{\text{Grasa fraccionada}} = 0.0075$.
- El cambio oxidativo en alfajores elaborados con manteca fue: 0,024 mmoles de O_2 / Kg de aceite (0 días) y 0,212 O_2 / Kg de aceite (20 días); con margarina 0,035 mmoles de O_2 / Kg de aceite (0 días) y 0,226 O_2 / Kg de aceite (20 días) y grasa fraccionada 0,043 mmoles de O_2 / Kg de aceite (0 días) y 0,191 O_2 / Kg de aceite (20 días).
- Existe diferencia altamente significativa en la estabilidad oxidativa del tipo de grasa empleada en la elaboración de alfajores ($P_{\text{valor}}=0.00$)
- La grasa más estable durante el almacenamiento de los alfajores fue la grasa fraccionada.

VII. RECOMENDACIONES.

Según los resultados obtenidos en el estudio, se recomienda:

- Promover la aplicación del método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX) para medir la cinética de oxidación de lípidos en alimentos.
- Estudiar la vida útil de los alfajores que son elaborados para exportación.
- Realizar estudios de cinética de oxidación de lípidos en alimentos en sistemas alimentarios utilizando el método FOX.
- Realizar estudios utilizando antioxidantes naturales y evaluar la estabilidad de las grasas mediante método de oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX).

ABSTRACT

The research was conducted at the Laboratory of Food Analysis, the National University Agraria de la Selva, Tingo María-Perú. The objectives were to determine the kinetic parameter that describes the process of lipid oxidation in alfajores made with different types of fat, to assess the iron oxidation method (FOX) in the lipid extract of the alfajores during storage, and to determine which fat is more stable during storage of the alfajores. The alfajores were made with three different fats: butter, commercial margarine, Golden Seal, and fractionated fat produced in Palmas del Espino. The alfajores obtained were stored at room temperature on average 24 °C and were evaluated for the content of peroxides using the iron oxidation method (FOX) every 4 days for 20 days. The results obtained were adjusted to the kinetic model, and statistically analyzed to determine which is more stable in fat storage. It was found that the order of reaction for the oxidation of lipids is of order zero, and the reaction rate constants for the different fats are $K_{\text{butter}} = 0.0094$; $K_{\text{Margarine}} = 0.0096$ and $K_{\text{fractionated fat}} = 0.0075$. Existing highly significant differences in the oxidative stability of the type of fat used in the preparation of alfajores ($P_{\text{value}} = 0.0$) being the most stable fractionated fat.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- BADUI, S. 1988. Diccionario de tecnología de los alimentos. Edit. Alhambra Mexicana, S.A. D.F México – México. P. 283.
- BAILEY, E. 1961. Aceites y Grasas Industriales. Edit. Reverte s.a. México. P. 51.
- BERNARDINI, E. (1981). Tecnología de aceites y grasas. Edit Alhambra. Madrid - España. P. 97.
- BOU, E. 2005. Effect of dietary fish oil, alpha-tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. Poultr Sci, 83(2). Londres, Inglaterra. P. 282-292.
- CALVO, Z. 2010. Fraccionamiento de estearina de palma a nivel de planta piloto en la empresa industrias del espinoso S.A. Tingo María – Perú. P. 75.
- CHEFTEL, J y CHEFTEL, H. 2000. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol 1. Editorial Acribia. P 266-267pp.
- CHRISTIE, H. 1986. The positional distribution of Fatty Acids in Triglycerides. Hannah Research Institute, Ayr, Scotland UK, P. 35.
- DEVLIN, T. 2004. Bioquímica. 4ª edición. Edit. Reverte, Barcelona - España, P. 63.
- ESKIN, M. 2007. Propiedades y características fisicoquímicas de las grasas y aceites. Componentes menores y su relación con la estabilidad de los aceites vegetales. Tomo XVII. Vol 02. Madrid, España. P. 310 – 313.

- FAO. 2003. Documento de debate sobre una definición de ácidos grasos trans y cis. Informe Técnico OMS, serie 916. Bonn, Alemania. P. 35.
- FRANKEL, E. 1998. La oxidación lipídica. La prensa aceitosa LTD. Londres, Inglaterra. P. 30 - 37.
- GIRON, G. 2009. Comercialización de la Oleína en la Industria Panificadora en Guatemala. Atlantic International University, Guatemala. P. 15.
- GRACIANI, E. 2006. Los aceites y grasas: Composición y propiedades. AMV Ediciones. Sevilla - España. P. 85 - 90.
- GUARDIOLA, F 2002. Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects. AOCS. Londres, Inglaterra. P. 70.
- GUSTONE, D: 2004. Química De Aceites Y Grasas. Ed. CRC. Madrid, España. P. 252.
- HAMILTON, R. 1986. Analysis of oils and fats. Ed. Royal. Elsevier, England. P. 156.
- HERNANDEZ, R. FERNÁNDEZ, C. BAPTISTA, L. (2001). Metodología de la investigación. Edit. McGraw – Hill interamericana de editores, S.A Mexico. P. 503.
- JUANEDA, C. 2003. Influence of Heat and Refining on Formation of CLA Isomers in Sunflower Oil. JAOCS J Am Oil Chem Soc. Londres, Inglaterra. P. 937-940.
- LABUZA, T. RIBOTH, M. 1995. Metodología para la determinación de la vida útil en alimentos. Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de ingeniería de alimentos. 132p.
- MADRID, A. 1997. Manual de grasas y aceites comestibles. Ed. Madrid. Madrid, España. P. 12.

- MEHLENBACHER, V. 1970. Análisis de Aceites y Grasa. Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo VI. Edit. Umo. Bilbao, España. P. 180.
- MURRAY, R. 1969. Estadística. Teoría y 875 problemas resueltos. Edit. McGraw – Hill de México. Colombia. P. 241.
- NAVARRO, G. 2002. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Edit. Sonora – México. P. 24.
- NAVAS, T. 2006. Método de oxidación ferrosa en xilenol naranja para determinar hidroperóxidos de lípidos en frituras. Nutrición y Ciencia de los Alimentos CeRTA Departamento, Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, Barcelona, España. P. 16.
- NIKI, R. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Commun, 338(1). Londres, Inglaterra. P. 668-676.
- NOUROOZ-ZADEH, M. 1995. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation-xilenol orange assay. J. Agric. Food Chem. Londres, Inglaterra. P. 17–21.
- NUÑEZ, C y CHUMBIRAY, F. (1991). Determinación de la vida en anaquel de productos alimenticios procesados mediante pruebas aceleradas (ASLT). Editorial Universidad de Lima. 47p.
- RATNAYAKE, W. 1993. Fatty acids in some common food items in Canada. Rev. Nutritional. Quebec – Canada. P. 651-660.
- SPIPELLER, G. 2006. Radicales peroxil: inductores de desastres inflamatorios neurodegenerativos y otros. Su origen y cómo se transforman colesterol, fosfolípidos, pasmalogenes, ácidos grasos poliinsaturados, los azúcares y las

proteínas en los productos nocivos. *biol med radicales libres*, 41 (3). Londres, Inglaterra. P. 362 - 387.

WEBSTER, A. 2000. *Estadística aplicada a los negocios y a la economía*. Edit. McGraw – Hill interamericana de editores, Colombia. P. 345.

ZAMBRANO, A. 2009. *Oxidación lipídica en biscochos*. Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad de Bogota, Bogota. P. 10.

ZILLER, S. 1996. *Grasas y aceites alimentarios*. Edit. Acribia. Zaragoza – España. 34 p.

ANEXOS.

A-I. Absorbancias obtenidas durante el cambio oxidativo por el método FOX en extracto lipídico de los alfajores durante el almacenamiento.

Días	0	4	8	12	16	20
Manteca	0,016	0,028	0,049	0,072	0,096	0,125
	0,012	0,031	0,052	0,074	0,095	0,120
	0,013	0,030	0,054	0,071	0,098	0,121
Margarina	0,014	0,030	0,052	0,072	0,096	0,122
	0,022	0,040	0,067	0,091	0,105	0,130
	0,019	0,038	0,070	0,087	0,107	0,129
	0,020	0,037	0,068	0,090	0,109	0,132
	0,020	0,038	0,068	0,089	0,107	0,130
Grasa	0,023	0,038	0,055	0,07	0,090	0,110
	0,025	0,034	0,052	0,069	0,091	0,111
Fraccionada	0,026	0,036	0,054	0,072	0,093	0,109
	0,025	0,036	0,054	0,070	0,091	0,110

A-II. Valores de peróxido en almacenamiento de alfajores, para el ajuste al orden de reacción 0 para cada tipo de grasa.

Tiempo	Manteca				Margarina				Grasa fraccionada			
	Días	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3
0	0,0278	0,0208	0,0226	0,0237	0,0382	0,033	0,0347	0,0353	0,0399	0,04338	0,04512	0,0428
4	0,0486	0,0538	0,0521	0,0515	0,0694	0,0659	0,0642	0,0665	0,0659	0,05900	0,06247	0,0625
8	0,085	0,0902	0,0937	0,0897	0,1163	0,1215	0,11800	0,1186	0,0954	0,09024	0,09371	0,0931
12	0,1249	0,1284	0,1232	0,1255	0,1579	0,151	0,1562	0,1550	0,1215	0,11974	0,12494	0,1220
16	0,1666	0,1649	0,1701	0,1672	0,1822	0,1857	0,1891	0,1857	0,1562	0,15791	0,16138	0,1585
20	0,2169	0,2082	0,2100	0,2117	0,2256	0,2239	0,2291	0,2262	0,1909	0,19262	0,18915	0,1909

A-III. Valores de Ln de peróxido en almacenamiento de alfajores, para el ajuste al orden de reacción 1 para cada tipo de grasa.

Tiempo		Manteca				Margarina				Grasa fraccionada			
Días	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	
0	-3,5840	-3,8717	-3,7916	-3,74161	-3,2655	-3,4121	-3,3608	-3,34431	-3,2211	-3,1377	-3,0985	-3,15112	
4	-3,0244	-2,9226	-2,9554	-2,96655	-2,6677	-2,7190	-2,7457	-2,71025	-2,7190	-2,8302	-2,7731	-2,77306	
8	-2,4648	-2,4053	-2,3676	-2,41176	-2,1519	-2,1081	-2,1371	-2,13218	-2,3492	-2,4053	-2,3676	-2,37378	
12	-2,0799	-2,0525	-2,0939	-2,07529	-1,8457	-1,8907	-1,8568	-1,86420	-2,1081	-2,1225	-2,0799	-2,10333	
16	-1,7922	-1,8027	-1,7716	-1,78876	-1,7026	-1,6837	-1,6652	-1,68375	-1,8568	-1,8457	-1,8240	-1,84206	
20	-1,5283	-1,5691	-1,5608	-1,55255	-1,4890	-1,4968	-1,4738	-1,48648	-1,6561	-1,6470	-1,6652	-1,65609	

A-IV. Valores de 1/ peróxido en almacenamiento de alfajores, para el ajuste al orden de reacción 2 para cada tipo de grasa.

Tiempo		Manteca				Margarina				Grasa fraccionada			
Días	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	R1	R2	R3	PROM.	
0	36,0168	48,0224	44,3284	42,1660	26,1940	30,3299	28,8134	28,4458	25,0552	23,0508	22,1642	23,3622	
4	20,5810	18,5893	19,2090	19,4248	14,4067	15,1650	15,5748	15,0488	15,1650	16,9491	16,0075	16,0075	
8	11,7606	11,0821	10,6716	11,1536	8,6010	8,2324	8,4745	8,4360	10,4776	11,0821	10,6716	10,7379	
12	8,0037	7,7874	8,1165	7,9668	6,3326	6,6238	6,4030	6,4531	8,2324	8,3517	8,0037	8,1934	
16	6,0028	6,0660	5,8803	5,9820	5,4883	5,3857	5,2869	5,3869	6,4030	6,3326	6,1964	6,3095	
20	4,6102	4,8022	4,7626	4,7235	4,4328	4,4672	4,3657	4,4219	5,2388	5,1916	5,2869	5,2388	