

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE
SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*) EN CEPAS ATCC DE *Listeria monocytogenes* y
*Shigella flexneri***

ELIZABETH FERNANDA ABAHONZA CRIOLLO

JOHANNA MILENA YAMA MORA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

SAN JUAN DE PASTO

2021

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE
SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis*) EN CEPAS ATCC DE *Listeria monocytogenes* y
*Shigella flexneri***

ELIZABETH FERNANDA ABAHONZA CRIOLLO

JOHANNA MILENA YAMA MORA

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación presentado como requisito parcial para
optar al título de Ingeniera Agroindustrial**

Asesor:

FRANCISCO EMILIO ARGOTE VEGA Ing. Esp. MSc.

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO**

2021

Nota de Responsabilidad

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

Fecha sustentación: 26-Nov-2021

Puntaje:

Esp. MSc. Francisco Emilio Argote Vega
Asesor

MSc. Zully Jimena Suarez Montenegro
Jurado

Ph.D. Andrés Mauricio Hurtado Benavides
Jurado

Agradecimientos

Damos gracias a Dios por permitirnos vivir la experiencia de ser estudiantes de Ingeniería Agroindustrial y permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas con éxito.

Gracias a MSc. Francisco Emilio Argote Vega, MSc. Zully Jimena Suarez Montenegro, Ph.D. Andrés Mauricio Hurtado Benavides y a Ph.D. Ana María Rey Obando por ayudarnos a hacer de este proyecto una realidad con su asesoría tan necesaria.

A la Universidad de Nariño y la Facultad de Ingeniería Agroindustrial por darnos todas las herramientas y bases tanto académicas como humanas para convertirnos en unas profesionales idóneas.

Al Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y a sus integrantes por apoyarnos en todo momento.

Agradecemos también a todos nuestros compañeros y amigos de clase por el apoyo moral y la buena actitud frente a nuestro trabajo.

Por último, y no menos importante, damos gracias a nuestros familiares quienes fueron nuestro soporte desde el inicio de la carrera hasta su culminación.

Dedicatoria

Este trabajo de investigación lo dedicamos a nuestras familias, si no fuera por ellas no podría ser posible el sueño de ser egresadas de la Universidad de Nariño.

Resumen

En la industria alimentaria existe un considerable interés en los productos naturales de origen vegetal, principalmente debido a su propiedad de reducir el crecimiento de microorganismos patógenos. *Plukenetia volubilis*, también conocida como Sacha Inchi, se considera un cultivo prometedor debido a su alto contenido de macronutrientes y compuestos bioactivos. Sin embargo, escasas investigaciones orientadas a evaluar la actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi han sido reportadas hasta la fecha. En este trabajo se investigó el potencial efecto antibacteriano del aceite de Sacha Inchi obtenido mediante extracción supercrítica con CO₂, frente a dos bacterias patógenas, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*. El perfil de ácidos grasos del aceite se determinó mediante cromatografía de gases y la cuantificación del contenido total de fenoles (CTF) se realizó empleando el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en disco (1), macrodilución (2) y microdilución en caldo (3), con una emulsión estable cuyo diámetro promedio de gota estuvo entre 0,87 y 1,63 μm.

Los resultados de inhibición fueron analizados mediante un diseño unifactorial aleatorizado y las diferencias estadísticas se compararon con un análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey ($p < 0,05$) (método 1 y 2). Para el método 3, las diferencias estadísticas se compararon con la prueba de Kruskal Wallis ($P < 0,05$). Como resultados, se obtuvo un rendimiento de extracción de $32,95 \pm 0,92\%$. La caracterización química del perfil de ácidos grasos del aceite de Sacha Inchi arrojó como resultado que el ácido linolénico fue el compuesto mayoritario con un 49,76 %, seguido del ácido linoleico (33,59 %); otros ácidos grasos identificados en menor proporción fueron el ácido oleico (8,29 %), el ácido palmítico (5,89 %) y el ácido esteárico (2,47 %). El CTF fue de $0,11 \pm 0,02$ mg GAE/100 g de extracto de

aceite. En los tres métodos, el aceite no presentó actividad *in vitro* frente a *S. flexneri*.

Únicamente en el método 2, mostró un comportamiento bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, obteniendo su mayor porcentaje inhibitorio a 95 µL/mL ($19,21 \pm 0,02\%$). Este estudio sugiere continuar investigando la capacidad antibacteriana de los quimiotipos de *P. volubilis*, para así, tener un marco de referencia comparativo que permita consolidar su potencial como una opción confiable en la preservación de la calidad e inocuidad alimentaria.

Palabras clave: Sacha Inchi, *Plukenetia volubilis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*

Abstract

In the food industry, there is considerable interest in natural products of plant origin, mainly due to their property of reducing the growth of pathogenic microorganisms. *Plukenetia volubilis*, also known as Sacha Inchi, is considered a promising crop due to its high content of macronutrients and bioactive compounds. However, little research aimed at evaluating the antibacterial activity of Sacha Inchi oil has been reported to date. In this work, the potential antibacterial effect of Sacha Inchi oil obtained by supercritical CO₂ extraction was investigated against two pathogenic bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri*. The fatty acid profile of the oil was determined by gas chromatography and the quantification of the total phenol content (CTF) was carried out using the Folin-Ciocalteu method. The antibacterial activity is evaluated using the disk diffusion method (1), broth macrodilution (2), and broth microdilution (3), with a stable emulsion whose average drop diameter was between 0.87 and 1.63 μm. Inhibition results were analyzed using a randomized unifactorial design and statistical differences were compared with an analysis of variance and Tukey's multiple range test ($p < 0.05$) (method 1 and 2).

For method 3, statistical differences were compared with the Kruskal Wallis test ($P < 0.05$). As a result, an extraction yield of $32.95 \pm 0.92\%$ was obtained. The chemical characterization of the fatty acid profile of Sacha Inchi oil showed that linolenic acid was the majority compound with 49.76%, followed by linoleic acid (33.59%); other fatty acids identified to a lesser extent were oleic acid (8.29%), palmitic acid (5.89%) and stearic acid (2.47%). The CTF was 0.11 ± 0.02 mg GAE / 100 g of oil extract. In the three methods, the oil did not show *in vitro* activity against *S. flexneri*. Only in method 2, showed a bacteriostatic behavior on *L. monocytogenes*, obtaining its highest inhibitory percentage at 95 μL/mL ($19.21 \pm 0.02\%$). This

study suggests continuing to investigate the antibacterial capacity of *P. volubilis* chemotypes, to have a comparative frame of reference that allows consolidating their potential as a reliable option in the preservation of food quality and safety.

Keywords: Sacha Inchi, *Plukenetia volubilis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*

Contenido	pág.
Introducción	19
1. Marco teórico y estado del arte.....	21
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	21
1.2 Cepas bacterianas investigadas en este estudio	22
1.2.1 Listeria monocytogenes	22
1.2.2 Shigella flexneri	24
1.3 Prevención de enfermedades causadas por patógenos bacterianos.....	25
1.4 Aceites vegetales.....	25
1.5 Características agroecológicas del Sacha Inchi	26
1.5.1 Taxonomía	27
1.6 Composición química	27
1.7 Usos actuales y potenciales.....	29
1.7.1 Usos cosméticos.....	29
1.7.2 Usos alimenticios	29
1.7.3 Usos medicinales	30
1.7.4 Otras aplicaciones	31
1.8 Mercado nacional e internacional del Sacha Inchi	31
1.9 Métodos de extracción del aceite de Sacha Inchi	32
1.9.1 Estudios realizados con el método de extracción de fluidos supercríticos (FSC) en Sacha Inchi.....	33
1.10 Propiedades fisicoquímicas del aceite de Sacha Inchi	34

1.11 Emulsiones.....	37
1.12 Actividad antimicrobiana.....	38
1.12.1 Actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi.....	39
2. Planteamiento del problema.....	41
3. Justificación	44
4. Objetivos	46
4.1 Objetivo general.....	46
4.2 Objetivos específicos	46
5. Metodología	47
5.1 Localización.....	47
5.2 Material vegetal	47
5.3 Determinación de humedad	48
5.4 Adecuación del material vegetal	48
5.5 Análisis granulométrico	49
5.6 Extracción del aceite de Sacha Inchi utilizando CO ₂ supercrítico.....	50
5.6.1 Determinación del rendimiento del aceite de Sacha Inchi	52
5.7 Caracterización fisicoquímica del aceite de Sacha Inchi	52
5.8 Identificación de ácidos grasos por cromatografía de gases (GC).....	52
5.9 Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	53
5.9.1 Extracción de compuestos fenólicos	53
5.9.2 Determinación del contenido total de fenoles.....	54
5.10 Determinación de los parámetros de formación de la emulsión	56
5.10.1 Preparación de las emulsiones	56

5.10.2 Análisis microscópico	57
5.10.3 Evaluación del pH.....	57
5.11 Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de la emulsión.....	57
5.11.1 Microorganismos	57
5.11.2 Medición del crecimiento bacteriano por espectrofotometría	58
5.11.3 Criopreservación de cepas bacterianas	58
5.11.4 Activación de cepas	58
5.11.5 Método de difusión en disco	59
5.11.6 Determinación del tiempo mínimo de inhibición (macrodilución en caldo)	60
5.11.7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caja de Elisa .	61
5.11.8 Análisis estadístico.....	62
6. Resultados y discusión	63
6.1 Contenido de humedad	63
6.2 Resultados del análisis granulométrico.....	63
6.3 Rendimiento del aceite de Sacha Inchi extraído con CO ₂ supercrítico	64
6.4 Resultados de la caracterización fisicoquímica del aceite de Sacha Inchi.....	65
6.4.1 Densidad	67
6.4.2 Índice de refracción.....	67
6.4.3 Índice de acidez.....	68
6.4.4 Índice de saponificación	69
6.4.5 Índice de yodo.....	70
6.4.6 Índice de peróxidos	71
6.5 Análisis del perfil de ácidos grasos.....	72

6.6 Contenido total de compuestos fenólicos	75
6.7 Optimización de la formulación de la emulsión	78
6.7.1 Análisis del diagrama de efectos principales	81
6.7.2 Análisis del modelo de optimización superficie de respuesta	86
6.7.3 Influencia del pH en la estabilidad de las emulsiones a las 48 h	88
6.8 Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de la emulsión	91
6.8.1 Crecimiento bacteriano por espectrofotometría.....	91
6.8.2 Difusión en disco	93
6.8.3 Tiempo mínimo de inhibición (macrodilución en caldo)	100
6.8.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caja de Elisa .	107
7. Conclusiones	111
8. Recomendaciones	112
Referencias.....	113
Anexos	148

Lista de tablas

	pág.
Tabla 1 Composición química de la semilla y el aceite de Sacha Inchi	28
Tabla 2 Propiedades fisicoquímicas del aceite de Sacha Inchi	35
Tabla 3 NTC para el análisis fisicoquímico del aceite de Sacha Inchi	52
Tabla 4 Resultados de soluciones patrones de ácido gálico para la prueba Folin-Ciocalteu..	55
Tabla 5 Variables independientes y sus correspondientes niveles.....	56
Tabla 6 Análisis granulométrico de la almendra molida de Sacha Inchi	63
Tabla 7 Extracción con FSC del aceite de Sacha Inchi.....	64
Tabla 8 Propiedades fisicoquímicas del aceite de Sacha Inchi	66
Tabla 9 Comparación de densidades entre aceites con diferentes grados de insaturación	67
Tabla 10 Comparación de IR entre aceites con diferentes grados de insaturación	68
Tabla 11 Índice de saponificación de aceites con diferente composición en ácidos grasos	70
Tabla 12 Composición relativa de ácidos grasos (%) en aceite de semillas de Sacha Inchi....	72
Tabla 13 Aceites vegetales con mayor impacto por sus bondades nutricionales.....	74
Tabla 14 Nuevas fuentes de aceites vegetales.....	75
Tabla 15 Contenido total de fenoles de 14 extractos de aceite comestible	76
Tabla 16 Resultados del diseño central compuesto para el tamaño de gota de la emulsión	78
Tabla 17 ANOVA para el tamaño de gota a las 0 h y 48 h.....	80
Tabla 18 Resultados de pH de las emulsiones de aceite de Sacha Inchi a la hora 48	90
Tabla 19 Porcentajes de inhibición del aceite frente a <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. flexneri</i>	103
Tabla 20 Resumen de los resultados de CMI obtenidos después del cultivo de las cepas bacterianas después de 20 horas de incubación	110

Lista de figuras

	pág.
Figura 1 Frutos de Sacha Inchi	47
Figura 2 Molino triturador forrajero TRF 400 Trapp Basic	48
Figura 3 Harina de Sacha Inchi empacada al vacío.....	48
Figura 4 Tamizadora modelo PS-35 serie 1182 con la serie de tamices 10- 80 A.S.T.M.E. ...	49
Figura 5 Diagrama de proceso de extracción con FSC	51
Figura 6 Curva de calibración para determinación de fenoles totales	55
Figura 7 Cromatograma perfil ácidos grasos.....	73
Figura 8 Diagrama de efectos principales para el tamaño de gota a las 0 h	82
Figura 9 Diagrama de efectos principales para el tamaño de gota a las 48 h	82
Figura 10 Diagrama de interacción para el tamaño de gota a las 48 h	83
Figura 11 Superficie de respuesta y contorno para el tamaño de gota a las 48 h	88
Figura 12 Variación del potencial zeta en función del pH	89
Figura 13 Curvas de crecimiento en caldo BHI suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa de L. monocytogenes y S. flexneri	91
Figura 14 Actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi sobre L. monocytogenes por difusión en disco	94
Figura 15 Actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi sobre S. flexneri por difusión en disco	95
Figura 16 Curva de crecimiento de L. monocytogenes a diferentes concentraciones de aceite	101

Figura 17 Curva de crecimiento de <i>S. flexneri</i> a diferentes concentraciones de aceite	104
Figura 18 Actividad antibacteriana del aceite sobre <i>L. monocytogenes</i> por microdilución en caldo	108
Figura 19 Actividad antibacteriana del aceite sobre <i>S. flexneri</i> por microdilución en caldo...	109

Lista de anexos**pág.**

Anexo A. Formato control de extracción supercrítica 148

Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una de las mayores preocupaciones de los consumidores, la industria alimentaria y las autoridades de seguridad alimentaria. En los últimos años se ha producido un aumento en la aparición de brotes de enfermedades causadas por microorganismos patógenos en los alimentos. El mal uso y la mala manipulación de los antimicrobianos químicos han dado lugar no sólo a virus, bacterias y parásitos más tolerantes y resistentes a los agentes químicos, sino también a peligros para la salud de los seres humanos, incluidas las alergias respiratorias, y el aumento de carcinógenos y sustancias tóxicas. Además, los consumidores están preocupados por los efectos adversos del uso de antimicrobianos sintéticos y preferirían alimentos tratados con agentes antibacterianos seguros y naturales (Asensio *et al.*, 2020).

Estas preocupaciones y la creciente demanda de alimentos más saludables están impulsando un mayor interés por los antimicrobianos naturales, que exhiben un efecto antagonista eficaz contra una amplia gama de microorganismos no deseados en los alimentos (Bouarab *et al.*, 2019). Los productos naturales han sido la principal fuente de antimicrobianos durante siglos y las plantas se han utilizado con éxito para tratar varias enfermedades (Mattio *et al.*, 2019).

Desde el comienzo de la civilización humana, las plantas y los productos vegetales se utilizan como medicinas. Debido a la gran cantidad de pruebas documentadas, las plantas medicinales serían la mejor fuente para obtener una variedad de constituyentes activos para ser utilizados como agentes antimicrobianos. Incluso hoy en día, hasta el 80% de la población mundial depende de la etnomedicina para sus fines medicinales (Manikkuwadura *et al.*, 2019).

El Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*), también conocido como maní inca, es una planta nativa que se encuentra en la selva amazónica de Perú, Ecuador, Brasil y otras partes de Sudamérica. Las semillas de Sacha Inchi se caracterizan por ser ricas en aceite y proteínas con aminoácidos como cisteína, tirosina, treonina y triptófano. El aceite de Sacha Inchi contiene importantes macronutrientes; compuestos bioactivos; sustancias termolábiles; y un contenido inusualmente alto de ácidos grasos esenciales, es decir, ácidos grasos C18:3 omega-3 y C18:2 omega-6, que representan alrededor del 82% del contenido total de aceite. Además de los ácidos grasos esenciales, también están presentes tocoferoles, carotenos, fitoesteroles y polifenoles, compuestos responsables de los beneficios para la salud y las bioactividades atribuidas al Sacha Inchi (Elgegren *et al.*, 2019).

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo investigar el potencial efecto antibacteriano del aceite de Sacha Inchi frente a dos bacterias patógenas, *L. monocytogenes* y *S. flexneri* para encontrar estrategias alternativas que permitan asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos.

1. Marco teórico y estado del arte

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las ETA son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos, incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de población (Subdirección de Salud Nutricional Alimentos y Bebidas, 2017).

Con estudios realizados durante varios años por la OMS, la Organización Panamericana de Salud (OPS) y el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ); se ha demostrado que las ETA pueden manifestarse en tres formas diferentes, ya sea como infecciones alimentarias, intoxicaciones alimentarias o toxiinfecciones (Morales, 2015).

Las infecciones alimentarias son las ETA producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas (Guerrero, 2016).

Las intoxicaciones alimentarias son las ETA producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo (Guerrero, 2016). Y las toxiinfecciones alimentarias son una combinación de las anteriores, en las cuales los patógenos contaminantes del alimento, producen toxinas en el intestino luego del consumo de éste (Ulloa, 2016).

De hecho, en los últimos 15 años, varias enfermedades importantes de causa desconocida han resultado ser complicaciones de infecciones transmitidas por los alimentos, a pesar que la mayoría de las ETA se resuelven a los pocos días con o sin la intervención médica, algunas evolucionan hacia secuelas médicas más severas (Powell, 2018), trayendo consigo perjuicios no solo para la salud pública, sino también para la salud animal y la industria alimentaria (Jorquera *et al.*, 2015). En cuanto a qué causa una ETA, se ha logrado identificar alrededor de 250 agentes, entre los que se incluyen agentes químicos, físicos y biológicos, siendo los agentes biológicos de origen bacteriano, particularmente *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 los mayormente involucrados en brotes (Jorquera *et al.*, 2015).

1.2 Cepas bacterianas investigadas en este estudio

1.2.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo Gram positivo, patógeno facultativo intracelular y no formador de esporas (Soto *et al.*, 2016). Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollarse a temperaturas de refrigeración, lo cual le diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *S. aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas (Morales, 2015).

También, es uno de los microorganismos más resistentes al calor (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [INSHT], 2016), puede llegar a sobrevivir a temperaturas de 45 °C, con una temperatura óptima de 30-37 °C. Además, puede crecer en un amplio rango de pH de 4,0-9,6 con un crecimiento óptimo entre 6,0 y 8,0 y tolerar altas concentraciones de cloruro de sodio (13-14%), lo cual le permite crecer en alimentos procesados listos para el

consumo, conservados y refrigerados (Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria [ACHIPIA], 2017).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua ampliamente difundida en la naturaleza. Suele encontrarse en el agua, el suelo, los efluentes, las heces humanas y animales, la vegetación, los ensilados y en el entorno de procesamiento de alimentos (Red de Seguridad Alimentaria del CONICET, 2017; Velasco, 2018).

En la industria alimentaria, *L. monocytogenes* puede persistir durante meses o incluso años en suelos y equipos y en desagües de instalaciones de procesamiento de alimentos (Rodríguez *et al.*, 2018). Su capacidad para formar biopelículas protege a esta bacteria contra la desinfección y favorece su supervivencia en las superficies que están en contacto con los alimentos; lo cual aumenta la contaminación cruzada de estos y los convierte en un vehículo para llegar al hombre y causar la enfermedad (Soto *et al.*, 2016).

Bajo estas condiciones, el consumo de alimentos o líquidos contaminados con *Listeria* puede causar listeriosis, una enfermedad relativamente rara pero potencialmente fatal (Jordan y McAuliffe, 2018). La listeriosis presenta el riesgo más alto para las personas con una condición predisponente que daña su inmunidad mediada por células T, incluidas las mujeres embarazadas, los recién nacidos y los adultos inmunocomprometidos (Saldivar *et al.*, 2018).

Sus manifestaciones clínicas se pueden agrupar en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva (OMS, 2018). La forma no invasiva se manifiesta por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, y su periodo de incubación es corto. Por otro lado, la listeriosis invasiva se produce cuando la infección ocasionada por las células bacterianas cruzan la barrera intestinal, la barrera hematoencefálica y la barrera fetoplacentaria, y

alcanza sistemas y órganos que son blanco de infección, como son el sistema nervioso central y el útero en la mujer embarazada (Londoño y Núñez, 2015). Entre sus afecciones se encuentra la septicemia, encefalitis, endocarditis, meningitis, abortos y mortinatos, entre otros (Jordan y McAuliffe, 2018; Londoño y Núñez, 2015; Rodríguez *et al.*, 2018).

1.2.2 *Shigella flexneri*

El género *Shigella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae e incluye cuatro especies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *Shigella boydii*. Cada especie tiene características epidemiológicas únicas, a pesar de tener propiedades patógenas similares y un patrón de distribución diverso en diferentes regiones geográficas (Puzari *et al.*, 2018).

Se caracteriza por ser un patógeno entérico Gram-negativo (Wallace *et al.*, 2016), no formador de esporas, inmóvil, aerobio facultativo (Cunha *et al.*, 2017) y por ser el responsable de cerca de 165,000 muertes por shigelosis en el mundo cada año (Toapanta *et al.*, 2018) afectando principalmente a niños menores de cinco años, ancianos y personas inmunocomprometidas (Vélez *et al.*, 2015).

La shigelosis es una enfermedad diarreica aguda de tipo inflamatorio que afecta el intestino grueso y la porción distal del intestino delgado (Bonifaz, 2016). Se caracteriza por la presencia de diarrea acompañada de fiebre, malestar general, calambres abdominales y mialgia (Dekker y Frank, 2015). En los casos típicos las deposiciones contienen sangre y moco (disentería), sin embargo muchos casos tienen como cuadro inicial el de diarrea acuosa cuya complicación más importante es la deshidratación (León, 2001). Su principal reservorio es el intestino del ser humano. En países desarrollados, el modo de transmisión más frecuente es de persona a persona. Se considera el enteropatógeno bacteriano más transmisible por esta vía. De forma esporádica se describen brotes asociados al consumo de agua o alimentos contaminados.

La dosis infectiva de *Shigella* es muy baja, ya que menos de 100 microorganismos viables son suficientes para producir la enfermedad, lo que facilita enormemente la diseminación en ausencia de medidas adecuadas de control (González y Alós, 2015).

1.3 Prevención de enfermedades causadas por patógenos bacterianos

Existen diversas tecnologías que son empleadas para disminuir la carga de patógenos bacterianos en alimentos. En carnes y subproductos cárnicos, por ejemplo, la medida de control bacteriano más empleada es la aplicación de un tratamiento térmico previo al consumo. Si bien esta es una medida efectiva cuando se aplica en forma apropiada, la incorrecta cocción o el contacto posterior al tratamiento con alimentos crudos contaminados, potencialmente podría re-contaminar ese producto, siendo factible que sea el responsable de una ETA (Jorquera *et al.*, 2015).

Por otro lado, en la industria alimentaria se utilizan conservantes químicos tales como agentes antimicrobianos sintéticos para prevenir el crecimiento de microorganismos que disminuyen la vida útil del alimento o aquellos causantes de enfermedades. Sin embargo, las preocupaciones sobre la seguridad de estos productos químicos han aumentado junto con la demanda del consumidor de alimentos mínimamente procesados. Es por eso, que existe un creciente interés en los antibacterianos naturales provenientes de plantas, animales y microorganismos, donde a menudo participan en los mecanismos de defensa. Ejemplos típicos de estos antibacterianos son bacteriocinas, ácidos orgánicos, aceites esenciales, quitosanos (Briceño, 2017), y últimamente aceites vegetales (Sánchez y Mesa, 2018).

1.4 Aceites vegetales

Los aceites vegetales son extractos gramos de origen botánico, obtenidos de semillas oleaginosas o frutos, cuya composición es variable (Donat, 2017) al existir diferencias

importantes en el aporte de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, particularmente en la parte de ácidos grasos omega-6 y omega-3, asociado a la fuente de origen (Durán *et al.*, 2015).

Adicional a esto, dependiendo de las condiciones de procesamiento y de almacenamiento los aceites vegetales varían sustancialmente en su fracción no glicerídica (Ramos *et al.*, 2016). Fundamentalmente, esta fracción contiene fenoles y esteroles, que muestran múltiples bioactividades, con capacidades antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales o antirradicales libres, entre otras (Donat, 2017).

Los aceites vegetales más comunes utilizados en la preparación de alimentos provienen principalmente de semillas de soja, cacahuetes, semillas de colza, girasol, maíz, semilla de algodón y cártamo. Sin embargo, los nuevos cultivos alternativos de semillas oleaginosas se han convertido en un interés creciente para su utilización (Rawdkuen *et al.*, 2016). Entre estos cultivos alternativos se destaca el Sacha Inchi, el cual emerge como recurso interesante por su composición particular y sus beneficios potenciales para la salud (Ramos *et al.*, 2016).

1.5 Características agroecológicas del Sacha Inchi

Sacha Inchi, maní inca, maní silvestre o maní de montaña son algunos de los nombres comunes de la planta *Plukenetia volubilis*, que pertenece a la familia de las euforbiáceas (Superintendencia de Industria y Comercio [SIC], 2017). Es una planta oleaginosa silvestre, trepadora y cultivada (PeruBioInnova, 2017), nativa del Amazonas peruano, colombiano y ecuatoriano (SIC, 2017); descrita por primera vez como especie en el año 1753 por el Naturalista Linneo; de ahí su nombre científico *Plukenetia volubilis* Linneo (Colquehuanca, 2017).

Es una planta que se adapta a suelos arcillosos y ácidos (pH entre 5,5 y 7,8) y se desarrolla mejor en climas cálidos, específicamente en altitudes superiores a los 1500 metros

sobre el nivel del mar (PeruBioInnova, 2017; SIC, 2017).

Sus hojas tienen forma corazonada y sus flores son pequeñas, blancas y crecen en racimo; su fruto, que normalmente posee cuatro lóbulos pero puede presentar hasta siete, es de color marrón oscuro cuando está maduro (al igual que sus semillas), tiene forma ovalada y ocupa entre 3 cm y 5 cm de diámetro (mientras que las semillas en forma de almendra situadas en su interior miden entre 1,5 cm y 2 cm de diámetro aproximadamente) (SIC, 2017).

1.5.1 Taxonomía

De acuerdo al análisis realizado para la cadena de valor del Sacha Inchi en 2016 la definición botánica de la planta es la siguiente (PeruBioInnova, 2017):

- Orden: Euphorbiales
- Familia: Euphorbiaceae
- Género: *Plukenetia*
- Especie: *volubilis* Linneo
- Nombre científico: *Plukenetia volubilis* L.
- Cultivo: Sacha Inchi

1.6 Composición química

Hay muchos compuestos químicos valiosos distribuidos por las distintas partes de la planta de Sacha Inchi. Las semillas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, fitoesteroles y tocoferoles. Los principales compuestos encontrados en estas tres categorías químicas son el ácido α -linolénico, el β -sitosterol y los γ y δ -tocoferoles, respectivamente (Tabla 1) (Wang *et al.*, 2018).

El lípido es el principal componente encontrado en las semillas, con cantidades que oscilan entre el 33 y el 54% (Tabla 1). El contenido de aceite de las semillas es comparable al de

las semillas de lino (34-45%), amapola (50%), perilla (40%), cártamo (30-40%), canola (38-44%) y cacahuetes (44-56%) (Wang *et al.*, 2018)

Tabla 1

Composición química de la semilla y el aceite de Sacha Inchi.

	Semilla	Aceite de semilla		
		Escala laboratorio	de	Disponible en el mercado
Composición aproximada (%)				
Humedad	3,3-8,32	4,3-3,3	N.A	
Lípido	33,4-54,3	99,3-100,0	99,8	
Proteína	24,2-27,0	N.A	N.A	
Carbohidrato	13,4-30,9	N.A	N.A	
Fibra dietética (% carbohidratos)	72,4	N.A	N.A	
Ceniza	2,7-6,46	N.A	N.A	
Ácidos grasos (g/100 g de muestra o % de aceite)				
Ácidos grasos saturados totales	7,9-9,1	6,74-7,70	6,19-7,4	
Ácido palmítico (C16:0)	1,6-2,1	4,67-6,30	3,65-4,8	
Ácido esteárico (C18:0)	1,1-1,3	2,96-3,81	2,54-3,4	
Ácidos grasos monoinsaturados totales	8,4-13,2	7,50-10,71	8,28-10,1	
Ácido oleico (C18:1, ω 9)	3,5-4,7	8,41-10,45	8,28	
Ácido vaccénico (C18:1, ω 11)	0,23-0,29	N.A	N.A	
Ácido gadoleico (C20:1)	N.A	0,16		
Total de ácidos grasos poliinsaturados	77,5-84,4	78,15-84,49	80,9-85,41	
Ácido linoleico (C18:2, ω 6)	12,4-14,1	32,66-36,80	36,80-37,7	
Ácido α-Linolénico (C18:3,ω3)	12,8-16,0	45,20-50,41	42,4-48,61	
Relación ω-6/ω-3	0,81-1,12	0,72-0,76	N.A	
Tocoferoles (mg/100 g)				
α-Tocoferol	1,13-1,27	0,08	N.A	
β-Tocoferol	0,67-0,95	0,02	N.A	
γ-Tocoferol	56,8-81,4	127,6-149,0	N.A	
δ-Tocoferol	29,2-67,8	60,0-84,0	N.A	
Tocoferol total	78,6-137,0	209-211,8	N.A	
Fitoesteroles (mg/100 g)				
Campesterol	7,1-8,8	15,3	N.A	
Estigmasterol	21,2-26,9	34,61-58,7	N.A	
β-Sitosterol	45,2-53,2	43,46-127,4	N.A	

Nota. La tabla resume la composición química de semillas crudas (o procesadas) y del aceite de semilla comercialmente disponible en un mercado local en Lima, Perú. Tomado de “Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses” (p. 324), por S.

Wang *et al.*, 2018, *Food Chemistry*, 265.

El aceite de semilla de Sacha Inchi contiene lípidos neutros (97,2%), ácidos grasos libres (1,2%) y fosfolípidos (0,8%). Los lípidos son altamente insaturados y sólo el 6,8-9,1% de los ácidos grasos son saturados. El ácido α -linolénico (ALA, ω -3, 46,8-50,8%) es el principal ácido graso que se encuentra en el aceite de Sacha Inchi, seguido del ácido linoleico (ω -6, 33,4-36,2%) y del ácido oleico (ω -9, 8,7-9,6%) (Wang *et al.*, 2018).

1.7 Usos actuales y potenciales

Actualmente, las semillas de Sacha Inchi se usan para la producción de aceites y harinas proteicas, y como insumo de alta calidad para las industrias cosmética, alimentaria y medicinal (PeruBioInnova, 2017).

1.7.1 Usos cosméticos

En la industria cosmética, el aceite actúa como un agente ligador y ayuda a la producción de espuma para el jabón. También tiene un efecto nutricional en la piel, por lo que es muy utilizado como emoliente, hidratante y para la prevención en la aparición arrugas, principalmente en rostro, cuello y contorno de ojos (PeruBioInnova, 2017; Torres, 2016).

1.7.2 Usos alimenticios

En la industria alimentaria, investigaciones recientes indican la importancia nutricional de su consumo, al ser un alimento alternativo para disminuir las carencias nutricionales de macro y micronutrientes en la dieta diaria (Fernandez, 2014). De acuerdo a un estudio realizado por Vanegas y Gutiérrez (2018), Sacha Inchi podría usarse junto con β -glucanos de *Ganoderma lucidum* (BGGL) como ingrediente natural para mejorar el valor nutricional de yogures y leches fermentadas.

Igualmente, otras investigaciones reportaron su uso como una opción para mejorar los componentes nutricionales de hamburguesas (Baldeón *et al.*, 2015) y como una alternativa al consumo de leche de origen animal (Valles *et al.*, 2017).

También se ha reportado la utilización de la harina de Sacha Inchi obtenida de la torta residual, como una alternativa para incrementar el valor nutricional de galletas en cuanto al porcentaje de proteína (Vásquez *et al.*, 2017) y el desarrollo de películas comestibles a partir de proteínas extraídas de la torta de Sacha Inchi (González *et al.*, 2017).

Del mismo modo, varios estudios reportan su uso potencial en la suplementación proteica animal (Henao y Barreto, 2016; Macas, 2016; Guevara *et al.*, 2016; Araújo *et al.*, 2018).

1.7.3 Usos medicinales

Tomando en consideración su alto nivel de compuestos bioactivos, es esperable que Sacha Inchi se encuentre asociada con propiedades muy benéficas para la salud. De hecho, varios estudios destacan la importancia de estos compuestos en el correcto desarrollo y funcionamiento, tanto del sistema nervioso como del cerebro, en su intervención para la formación del tejido nervioso (mielinización), del ocular y de la estructura de las membranas celulares, en su capacidad para disminuir el riesgo de ciertos tipos de cáncer y su capacidad de mejorar los perfiles lipídicos, de reducir el colesterol en la sangre y de prevenir enfermedades cardiovasculares, cardíacas, coronarias y de hipertensión (Agencia Iberoamericana para la difusión de la Ciencia y la Tecnología, 2014; Alayón y Echeverri, 2016; Chandrasekaran y Liu, 2015; Reina, 2018; Zanqui *et al.*, 2016)

Igualmente, la evidencia actual disponible indica que este tipo de fruto presenta un efecto hipocolesterolémico, hipolipidémico (Alayón y Echeverri, 2016), antiinflamatorio, inmunoestimulante, hipotensor (Puentes y Hurrell, 2015), a lo que se suma su capacidad para

evitar la peroxidación de lípidos y de lipoproteínas dado su contenido en tocoferoles, tocotrienoles, β -caroteno y diferentes compuestos fenólicos con potente acción antioxidante (Alayón y Echeverri, 2016).

1.7.4 Otras aplicaciones

Lakkhana *et al.* (2017) estudiaron las condiciones óptimas de producción de gas combustible a partir de la gasificación de la cáscara de Sacha Inchi estableciendo la posibilidad de su aplicación a escala industrial como una forma de gestionar los desechos agrícolas y producir gas de calidad que puede usarse como fuente de energía renovable para muchas aplicaciones de calor y energía como calderas, motores y turbinas de gas.

Por otro lado, Kumar *et al.* (2016), desarrollaron una metodología simple y rentable para obtener nanopartículas de oro (AuNP) utilizando aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) en presencia de luz solar. El enfoque experimental fue prometedor, los AuNP sintetizadas mostraron una descomposición fotocatalítica notable del azul de metileno (>75%), un colorante cuya exposición aguda puede causar algunos efectos nocivos para los seres humanos y el medio acuático.

1.8 Mercado nacional e internacional del Sacha Inchi

En la actualidad la producción de Sacha Inchi continua en aumento por la demanda en los mercados internacionales; siendo el aceite extraído de las semillas, el principal producto por su alto contenido de ácidos grasos esenciales, además del snack y harina de la torta (Valles *et al.*, 2017).

El reconocimiento que ha empezado a tener este producto en el mercado internacional ha hecho que grandes empresas cosméticas y farmacéuticas como YANBAL, KEM'S, LA SANTE VITAL, VHERA LUCCI, AMG NATURALLY; lleven a cabo un proceso de incursión y/o

modificación de sus productos, agregándoles Sacha Inchi por los grandes beneficios y efectivos resultados que se han generado en el público (Torres, 2016).

En Colombia en los últimos años ha existido un aumento en el interés por la implementación de este cultivo. Las cosechas nacionales actuales tienen dos destinos principales: el primero para la exportación de la semilla sin cáscara hacia el Perú, en donde es utilizada como materia prima para productos derivados que posteriormente son exportados a Europa y Estados Unidos; y el segundo para ser utilizada en la producción nacional (Molano *et al.*, 2016), como una alternativa agroindustrial para sustituir los cultivos ilícitos de marihuana, coca y amapola (Periódico La Campana, 2016).

Según un informe presentado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural [Minagricultura] (2019), Colombia ha logrado alcanzar una producción agrícola en número de hectáreas sembradas igual a 1.100 y una producción nacional que supera las 2400 toneladas de semilla de Sacha Inchi; hecho que ha logrado reconvertir la economía en algunas regiones tales como Putumayo, Valle del Cauca, Caquetá, Antioquia, Meta, Cauca, Guaviare, Arauca, Vichada, el Sur de Bolívar, el Sur de Córdoba y Tumaco donde durante muchos años fueron afectados por la presencia de cultivos ilícitos (Minagricultura, 2019; Presidencia de la República de Colombia, 2018).

1.9 Métodos de extracción del aceite de Sacha Inchi

Para extraer la fracción lipídica de las semillas de Sacha Inchi, diversos autores han empleado métodos tradicionales que implican el uso de solventes orgánicos como el hexano (Gutiérrez *et al.*, 2011; Hincapié, 2016) o como el éter de petróleo (Castaño *et al.*, 2012). Sin embargo, el uso de algunos solventes se ha cuestionado debido a su toxicidad (Acacio y Zumalacárregui de Cárdenas, 2017), a su capacidad de generar un deterioro de los ácidos grasos

poliinsaturados, así como también por provocar rancidez oxidativa, sabores y olores indeseables (Pantoja *et al.*, 2017).

Recientemente, para suplir la creciente demanda de productos con menor o nula inclusión de sustancias químicas adversas a la salud (Tofiño *et al.*, 2017), se han estudiado nuevas técnicas de extracción, entre las cuales se encuentra la extracción con fluidos supercríticos, específicamente CO₂ supercrítico (Garmus *et al.*, 2019).

Un fluido supercrítico es cualquier substancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Velasco *et al.*, 2007).

El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, es económico, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar (T=31 °C, P=73.86 bar) y se consigue con diferentes grados de pureza (Velasco *et al.*, 2007).

1.9.1 Estudios realizados con el método de extracción de fluidos supercríticos (FSC) en Sacha Inchi

Existe un gran número de estudios que se pueden citar en los que se aplica esta tecnología en esta materia prima como el de Follegatti *et al.* (2009), quienes emplearon dióxido de carbono supercrítico (SC- CO₂) para extraer aceite rico en omega-3 de las semillas de Sacha Inchi. Igualmente Zanabria (2012), aplicó dicha técnica para extraer el aceite de las semillas de Sacha

Inchi, y obtuvo un aceite crudo sin ninguna contaminación, con sabor y olor característicos del ecotipo.

Triana *et al.* (2017), estudiaron la extracción con CO₂ supercrítico a escala de laboratorio y a escala piloto del aceite y de un concentrado de omega 3 a partir de semillas de Sacha Inchi provenientes de Antioquia, Colombia. En este estudio se logró obtener una recuperación máxima del 58% y 60% a escala de laboratorio y a escala piloto respectivamente, sin afectar la composición de los ácidos grasos del aceite; siendo este el primer informe sobre la ampliación a 12 L de extracción de aceite de Sacha Inchi usando CO₂ Supercrítico.

1.10 Propiedades fisicoquímicas del aceite de Sacha Inchi

En la Tabla 2 se presenta un resumen realizado por Wang *et al.* (2018) de las propiedades fisicoquímicas de los aceites de Sacha Inchi que han sido extraídos en laboratorios de investigación o en instalaciones comerciales.

De las propiedades fisicoquímicas enumeradas cabe destacar que el aceite de Sacha Inchi presenta densidades ligeramente más altas (0.920-0.930 g / cm³ a 25 °C) que el aceite de maíz, el aceite de semilla de algodón y el aceite de soja. Esto se debe a que la densidad aumenta a medida que aumenta el grado de insaturación. Igualmente, este tipo de aceite presenta índices de refracción más altos (aproximadamente 1.480 a 25 °C) que el aceite de maíz, el aceite de soja y el aceite de girasol. El índice de refracción aumenta a medida que aumenta el número de dobles enlaces (Wang *et al.*, 2018).

Tabla 2*Propiedades fisicoquímicas del aceite de Sacha Inchi*

Propiedad	Tipo	No	País de Origen	Valor	Referencias
Rendimiento (%, W/W)	R	1	Perú	35,4	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
	R	1	Colombia	18.8 (Extracción Soxhlet), 30.0 (Extracción subcrítica con n-propano)	Zanqui <i>et al.</i> , 2016
Color (CIELAB)	R	1	Perú	L* (77.73), a* (-0.43), b* (42.1), C (4.47), H° (96.34)	Paucar-Menacho, <i>et al.</i> , 2015
Densidad	R	14	Perú	0.920–0.930 g/cm ³ , 25 °C	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
	R	1	Perú	0.928 (Densidad relativa)	Paucar-Menacho <i>et al.</i> , 2015
	C	1	Perú	0.9207 g/cm ³ , 20 °C	Vicente <i>et al.</i> , 2015
	R	1	Colombia	0.9187 g/cm ³ , 25 °C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2011
Viscosidad	R	14	Perú	38.9–44.0 mm ² /s, 20 °C	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
	R	1	Colombia	34.5 mPa·s, 20 °C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2011
Índice de Refracción	R	14	Perú	1.480–1.481, 1.481–1.482	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
	R	1	Perú	1.475, 20 °C	Paucar-Menacho <i>et al.</i> , 2015
	C	1	Perú	1.475, 20 °C	Vicente <i>et al.</i> , 2015
	R	1	Colombia	1.479, 25 °C	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2011
Peso Molecular Promedio	C	1	Perú	863.5 g/mol	Vicente <i>et al.</i> , 2015
Índice de Estabilidad Oxidativa	R	1	Perú	20.512, 4.645, 1.590, 0.493 h a 80, 90, 100, 110 °C, respectivamente (flujo de aire, 15 L/h)	Rodriguez <i>et al.</i> , 2011
	R	14	Perú	2.0–3.4 h	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
Vida Útil	R	1	Perú	3.29, 1.79, y 0.79 años a 20, 25 y 30 °C, respectivamente	Rodriguez <i>et al.</i> , 2011
Energía de Activación	R	1	Perú	137.9 kJ/mol	Rodriguez <i>et al.</i> , 2011

Propiedad	Tipo	No	País de Origen	Valor	Referencias
Índice de Acidez	R	1	Perú	0.37 mg/g	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
	C	14	Perú	0.5–4.7; 0.5–4.7	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
	C	1	Perú	2.4 mg KOH/g	Vicente <i>et al.</i> , 2015
Ácido (%)	R	1	Perú	1.08% (ácido oleico)	Paucar-Menacho <i>et al.</i> , 2015
	C	1	Perú	1.19% (ácido linolénico)	Vicente <i>et al.</i> , 2015
Índice de Peróxido	R	1	Perú	2.90 meq O ₂ /kg	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
	C	1	Perú	3.4 meq O ₂ /kg	Maurer <i>et al.</i> , 2012
	R	1	Perú	4.3 meq O ₂ /kg	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
	R	14	Perú	1.5–19.1, 2.1–5.6 meq O ₂ /kg	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
	C	1	Perú	7.36 (meq/kg)	Vicente <i>et al.</i> , 2015
Índice de P-Anisidina	R	1	Perú	1.41	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
K ₂₇₀	R	Perú		0.29	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
Ácidos Grasos	R	14	Perú	0.10–0.28, 0.14–0.23	Chasquibol <i>et al.</i> , 2014
Libres	R	1	Perú	0.19% ácido oleico	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
Dienos	C	1	Perú	0.36% ácido oleico	Maurer <i>et al.</i> , 2012
Conjugados	R	1	Perú	10.3	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
Trienos	R	1	Perú	1.22	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
Conjugados	R	1	Perú	0.28	Chirinos <i>et al.</i> , 2015
Índice de Yodo	C	1	Perú	192.5 g I ₂ /100 g	Vicente <i>et al.</i> , 2015
	R	1	Colombia	193.1 g I ₂ /100 g	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2011
	R	1	Perú	198 g I ₂ /100 g	Follegatti <i>et al.</i> , 2009
Índice de Saponificación	C	1	Perú	190.5 mg KOH/g	Vicente <i>et al.</i> , 2015
	R	1	Colombia	185.2 mg KOH/g	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2011
	R	1	Perú	193 mg KOH/g	Follegatti <i>et al.</i> , 2009

Nota. La tabla resume las propiedades fisicoquímicas de los aceites de Sacha Inchi que se extrajeron en laboratorios de investigación o en instalaciones comerciales. Tipo: tipo de muestra, C: aceite disponible comercialmente, R: aceite producido en una escala de laboratorio de investigación; No: cantidad de cultivares analizados en el estudio. Tomado de “Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses” (p. 324), por S. Wang *et al.*, 2018, *Food Chemistry*, 265.

Además de estas propiedades, el índice de acidez, los ácidos grasos libres, el índice de yodo (IY), el índice de peróxido (el cual mide los productos de oxidación primaria), el índice de p-anisidina (el cual mide los productos de oxidación secundaria) y el índice de saponificación, han servido como indicadores oxidativos para este aceite, por poseer atributos químicos que incluyen el perfil de ácidos grasos y la estabilidad oxidativa. En cuanto al IY (el cual mide el grado de insaturación del aceite de Sacha Inchi) se ha reportado valores más altos que el de la soja (131.5 g I₂/100 g), maíz (115.5 g I₂/100 g), el girasol (126.5 g I₂/100 g), la semilla de algodón (109 g I₂/100 g) y la linaza (177 g I₂/100 g), y valores similares a la del aceite de canola (191.5 g I₂/100 g) (Wang *et al.*, 2018).

1.11 Emulsiones

El interés en torno al aceite de Sacha Inchi aumenta constantemente gracias a sus propiedades biológicas explotables en varios campos, desde la industria farmacéutica hasta la alimentaria (Norma y Echeverri, 2016). Sin embargo, su uso y aplicación pueden verse limitados por varios aspectos, principalmente por su baja solubilidad, inestabilidad frente a las condiciones ambientales y susceptibilidad a la degradación oxidativa (Fu *et al.*, 2016; G. Rodríguez *et al.*, 2015).

Por el momento, el enfoque más adecuado para superar tales limitaciones se basa en el desarrollo de procesos de microencapsulación que involucra la incorporación de compuestos bioactivos en pequeñas cápsulas. Varias técnicas han sido utilizadas para encapsular compuestos bioactivos las cuales incluye secado por pulverización, enfriamiento por pulverización, extrusión, cubertura de lecho fluidizado, liposomas, coacervación y emulsión. Uno de los sistemas que ha merecido especial atención para la encapsulación de aceites ha sido el uso de emulsiones; las emulsiones son particularmente adecuadas para este propósito porque se pueden

usar para encapsular compuestos de naturaleza hidrófoba, hidrófila y anfifílica en un solo sistema (López *et al.*, 2017; McClements y Jafari, 2018). Además, se les han atribuido diversas ventajas sobre otros tipos de sistema con respecto a la liberación y el incremento de la biodisponibilidad de los componentes bioactivos (López *et al.*, 2017).

Las emulsiones son un caso particular de sistemas líquido-líquido, considerados como sistemas heterogéneos en el que al menos un líquido inmiscible se encuentra disperso en otro líquido en forma de gotas cuyo diámetro generalmente está entre 0,1 y 100 μm (Villar *et al.*, 2007). Desde el punto de vista termodinámico, las emulsiones son sistemas inestables que tienden, con el tiempo, a separarse en sus fases individuales iniciales. Entre los principales mecanismos que favorecen la desestabilización de una emulsión se incluyen: la separación gravitatoria (sedimentación o cremado), la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald (Alvarez, 2013; Wang *et al.*, 2020).

En la práctica, todos estos mecanismos pueden actuar simultáneamente y pueden influir unos sobre otros. No obstante, por lo general uno de estos mecanismos puede ser dominante, lo que facilita su identificación y permite desarrollar métodos más eficaces para controlar y mejorar la estabilidad de una emulsión (Alvarez, 2013).

1.12 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se puede definir como un término colectivo para todos los principios activos (agentes) que inhiben el crecimiento de bacterias, previenen la formación de colonias microbianas y pueden destruir microorganismos. En otras palabras, la actividad antimicrobiana se refiere a una situación en la que un agente activo tiene un efecto negativo sobre la vitalidad de los microorganismos. Si el agente activo solo afecta a bacterias u hongos, esto se conoce como actividad antibacteriana o antimicótica, respectivamente. El grado del

efecto se indica por -cida (o letal) cuando hay una actividad germicida significativa o -estático donde la sustancia activa sirve para inhibir el crecimiento de bacterias. En consecuencia, el término bacteriostático hace referencia a un agente que inhibe temporalmente el crecimiento de una población bacteriana específica sin destruir esta población o sin poder multiplicarse de manera significativa (Elmogahzy, 2020).

Desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos (Calvo y Martínez, 2009).

1.12.1 Actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi

Escasas investigaciones orientadas a evaluar la actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi han sido reportadas hasta la fecha. Entre estos estudios están los de Gonzalez *et al.* (2015), Xuan *et al.* (2018) y Moet *et al.* (2020).

Gonzalez *et al.* (2015), realizaron una investigación cuyo objetivo fue verificar el efecto del aceite de Sacha Inchi sobre el crecimiento de *S. aureus* y su adherencia en células de la piel. Los resultados revelaron la nula actividad bactericida del aceite frente a *S. aureus* y su eficiente capacidad de inhibir la adherencia del microorganismo en las células. Los autores sugieren que estos resultados se deben a que los ácidos grasos insaturados tales como el ácido linoleico (presente en alta concentración en el aceite de Sacha Inchi), aumentan la fluidez de la membrana en *S. aureus*, interfiriendo directamente con la adherencia del microorganismo en la piel.

Xuan *et al.* (2018) analizaron la actividad antimicrobiana de catorce aceites vegetales comestibles comercializados en Japón (aceite de girasol, cártamo, canola, soja, algodón, uva, lino, perilla, aguacate, chia, Inca Inchi o Sacha Inchi, perillartina, sésamo y salvado de arroz) por

el método de difusión en agar. Todos los aceites mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *E. coli*, y los niveles inhibitorios fueron proporcionales a las dosis aplicadas. En el ensayo con *S. aureus*, a la dosis máxima de 0,10 mg/mL, Sacha Inchi ejerció la menor inhibición ($10,333 \pm 0,577$ mm), en comparación con la de otros aceites (algodón ($17,667 \pm 1,155$ mm), uva ($16,667 \pm 6,807$ mm), chía ($16,000 \pm 1,732$ mm), sésamo ($16,000 \pm 6,557$ mm), salvado de arroz ($20,333 \pm 2,082$ mm)) y el control positivo ($20,000 \pm 1,000$ mm).

En *E. coli*, aunque los aceites mostraron una actividad antimicrobiana significativamente menor que el control positivo ($23,000 \pm 1,000$ mm), todos incluido Sacha Inchi ($12,333 \pm 1,528$ mm) fueron notablemente mayores que el control negativo ($6,000 \pm 0,001$ mm) a la mayor concentración de 0,10 mg/mL, a excepción del aceite de girasol, algodón y perilla.

Moet *et al.* (2020) estudiaron la actividad antimicrobiana de 7 extractos crudos de semilla, en diferentes concentraciones (0,1 μ L a 0,5 μ L) frente a *E. coli* y *S. aureus* por el método de pozos en agar. El extracto acuoso 0,5 μ L presentó la mayor actividad frente a *E. coli* y *S. aureus* (halo de inhibición de 22 y 24 mm respectivamente) en comparación con los otros extractos crudos evaluados.

2. Planteamiento del problema

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud pública de mayor importancia a nivel mundial (Forero *et al.*, 2017). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud [OMS] (2020), se estima que una de cada diez personas enferma cada año por la ingestión de alimentos contaminados y 420.000 mueren por esta misma causa; afectando con mayor severidad a los lactantes, los niños pequeños, las mujeres embarazadas, los ancianos y las personas enfermas.

En los últimos diez años se han registrado brotes de enfermedades graves transmitidas por los alimentos en todos los continentes, a menudo amplificados por la globalización del comercio (OMS, 2020). En Colombia, según datos del Instituto Nacional de Salud, en la semana epidemiológica 53 de 2020, se reportaron 483 brotes que involucraron 4550 casos, de los cuales, el grupo de edad de mayor afectación fue el de 20 a 49 años seguido de los grupos de 10 a 19 y 5 a 9 años, con 49,4 % (2 249), 25,3 % (1 154) y 8,6 % (391) respectivamente (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2021).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran *L. monocytogenes* y *Shigella spp.* (Zúñiga y Caro, 2017). *L. monocytogenes* es una bacteria patógena causante de listeriosis, una enfermedad rara pero severa con una alta tasa de mortalidad (20 al 30%) (Gallegos *et al.*, 2007; OMS, 2018). La listeriosis es una enfermedad relativamente rara con 0,1 a 10 casos por 1 millón de personas por año, dependiendo de los países y regiones del mundo. Aunque el número de casos de listeriosis es pequeño, la alta tasa de muerte asociada con esta infección la convierte en un importante problema de salud pública (OMS, 2018).

Por otra parte, *Shigella* spp. es la causa más común de diarrea aguda y sanguinolenta (disentería) y es la responsable de una proporción significativa de morbilidad y mortalidad asociadas con la enfermedad diarreica (Holmgren y Lundgren, 2018). A nivel mundial, se estima que *Shigella* spp. causa entre 80 y 165 millones casos de enfermedad diarreica y 600 mil muertes al año afectando en la mayoría de los casos a niños menores de 5 años (Holmgren y Lundgren, 2018; Instituto de Salud Pública de Chile, 2016)

Aunque existen varios métodos de conservación para garantizar la inocuidad alimentaria, así como los valores nutricionales y las características sensoriales de los alimentos (Quinto *et al.*, 2019), la preocupación por los aditivos alimentarios ha aumentado en las últimas dos décadas, en parte debido a los estudios que documentan cada vez más las alteraciones endocrinas y otros efectos adversos para la salud (Trasande *et al.*, 2018).

Por otro lado, el deterioro microbiano de los alimentos es también un área de inmensa preocupación para la industria alimentaria (Bondi *et al.*, 2017). En términos económicos, el Banco Mundial estima que, a nivel mundial, cada año los alimentos no inocuos causan pérdidas de 95 billones de dólares sólo en los países de ingresos bajos y medios (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2019).

Si bien el crecimiento de la microbiota de deterioro en los alimentos no es perjudicial para la salud humana, tiene un impacto negativo en la vida útil, las características de textura y la calidad general de los productos terminados, afecta a las opciones del consumidor y da lugar a importantes pérdidas comerciales. Por ello, la prevención o inhibición del crecimiento microbiano en los alimentos es de suma importancia para la actual producción globalizada de alimentos (Bondi *et al.*, 2017).

Por lo anterior, el presente estudio planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿el aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) presenta potencial efecto antibacteriano frente a dos bacterias patógenas, *L. monocytogenes* y *S. flexneri* presenta actividad antibacteriana?

3. Justificación

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una preocupación importante para los consumidores, la industria alimentaria y las autoridades de seguridad alimentaria. En los últimos años, se ha realizado un esfuerzo considerable para encontrar antimicrobianos naturales que puedan inhibir el crecimiento bacteriano y mejorar la seguridad y vida útil de los alimentos (Gyawali y Ibrahim, 2014).

Del mismo modo, los consumidores se han preocupado por la seguridad de los conservantes sintéticos utilizados en los alimentos. Como resultado, existe una creciente demanda de productos naturales que puedan servir como conservantes alternativos de los alimentos (Gyawali y Ibrahim, 2014).

Hoy en día, la mayoría de los consumidores prefieren incluir productos naturales dentro de sus dietas, en lugar de sintéticos, lo cual es visto por la industria alimentaria como un desafío y una oportunidad para encontrar productos inocuos, novedosos y más eficientes, al mismo tiempo reducir el uso de aditivos, produciendo productos mínimamente procesados (Carocho *et al.*, 2015)

Los beneficios de los productos naturales son infinitos, su sinergia y potencia supone un gran salto frente a los aditivos sintéticos que realizan, en la mayoría de los casos, un solo efecto sobre el alimento (Carocho *et al.*, 2015). Su notable potencial, probado por la cantidad de artículos que describen un número considerable de nuevos compuestos bioactivos cada año, no debe ignorarse (Soares *et al.*, 2019).

Es así como las plantas, utilizadas en todo el mundo como medicina alternativa y/o complementaria han demostrado ser una de las principales fuentes de productos naturales antimicrobianos (Álvarez *et al.*, 2020). Desde su aparición, las plantas han sobrevivido,

evolucionado y adaptado a todo tipo de ecosistemas y condiciones adversas. Este proceso adaptativo les ha llevado a desarrollar complejos y eficaces sistemas de defensa frente a las agresiones externas: depredadores, estrés abiótico y, por supuesto, infecciones. Al ser organismos sésiles que no pueden escapar a sus amenazas, las plantas han desarrollado un espléndido arsenal químico en forma de metabolitos secundarios capaces de hacer frente a los patógenos más peligrosos (Álvarez *et al.*, 2020).

Por ello, resulta lógico que las plantas desempeñen un papel determinante en la investigación experimental y, por tanto, sirvan como punto de partida para la innovación y el desarrollo de agentes antimicrobianos (Pabon *et al.*, 2017).

En este orden de ideas, en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios, este estudio investigó el potencial antimicrobiano del Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*), un cultivo infrautilizado pero con un elevado potencial agro tecnológico y aplicaciones en las industrias alimentarias humanas y animales, así como cosméticas (Alayón y Echeverri, 2016; Kodahl, 2020).

El Sacha Inchi es uno de los cultivos promisorios en Colombia, es una planta oleaginosa trepadora perteneciente a la familia Euforbiáceas, que en los últimos años ha tomado importancia económica e industrial en el mercado internacional, debido a su contenido en ácidos grasos esenciales (ácido linolénico, linoleico y oleico) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), que la semilla de Sacha Inchi concentra en cantidades elevadas, con respecto a otras oleaginosas (Alayón y Echeverri, 2016; Hurtado, 2013). En la visión de algunos Sachicultores, Colombia podría convertirse en pocos años en el mayor productor de Sacha Inchi del mundo, dado su gran potencial para la agricultura y la agroindustria de esta especie (Ecosistema Empresarial Agroindustrial Inclusivo en Red SumaSach'a, 2018).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar *in vitro* la actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) en cepas ATCC de *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas del aceite vegetal de semillas de Sacha Inchi extraído mediante la tecnología de fluidos supercríticos.
- Determinar los parámetros de formación de la emulsión a partir del aceite de semillas de Sacha Inchi requeridos para el estudio de la actividad antibacteriana.
- Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de la emulsión en las cepas ATCC de *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*.

5. Metodología

5.1 Localización

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Fluidos Supercríticos e Ingredientes Naturales del Grupo de Investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria-TEA y en el Laboratorio de Microbiología del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño Sede Torobajo, en la ciudad de San Juan de Pasto Latitud 1°14'13'' Norte, longitud 77°17'7'' Oeste, a una altitud de 2.540 msnm, temperatura promedio de 20°C y humedad relativa del 70%.

5.2 Material vegetal

Los frutos de Sacha Inchi empleados en este estudio (Figura 1) fueron adquiridos en el corregimiento de Pance ubicado en el municipio de Cali, departamento del Valle del Cauca, Colombia. Los frutos seleccionados pertenecieron a un lote cultivado a una altitud de 1600 m.s.n.m., temperatura media anual de 26 °C y humedad relativa del 83%.

Figura 1

Frutos de Sacha Inchi



5.3 Determinación de humedad

Se midió la humedad de las almendras de acuerdo al método descrito por Cerqueira (2018), con ayuda de un determinador de humedad KERN DBS 60-3. Los ajustes de prueba fueron: peso de la muestra 2 g, temperatura de secado 105 °C, hasta peso constante. Este procedimiento fue realizado por triplicado.

5.4 Adecuación del material vegetal

Con el fin de reducir el tamaño de partícula de las almendras se realizó un proceso de molienda empleando un Molino triturador forrajero TRF 400 Trapp Basic (Figura 2). La harina resultante se empacó al vacío y refrigeró a 4 °C para su posterior uso (Figura 3).

Figura 2

Molino triturador forrajero TRF 400 Trapp Basic



Figura 3

Harina de Sacha Inchi empacada al vacío



5.5 Análisis granulométrico

Para determinar el tamaño promedio de partícula empleado en las extracciones se siguió el procedimiento descrito por Aldaz (2018). Se realizaron 3 repeticiones y los cálculos respectivos para el análisis granulométrico se llevaron a cabo a partir del promedio de los datos. Las almendras molidas (100 g) se introdujeron en un juego de tamices de la serie de tamices 10 a 80 A.S.T.M.E. La distribución granulométrica se realizó a través de una tamizadora eléctrica modelo PS-35 serie 1182, por espacio de 10 minutos (Figura 4).

Figura 4

Tamizadora modelo PS-35 serie 1182 con la serie de tamices 10- 80 A.S.T.M.E.



Para el análisis granulométrico se calculó el porcentaje retenido en cada malla (% R), porcentaje acumulado (% A), porcentaje pasante (% P), diámetro medio de las partículas en el incremento (\bar{D}_{pi}) y el diámetro medio de masa (\bar{D}_w) calculado a partir de la ecuación 1.

$$\bar{D}_w = \sum x_i \bar{D}_{pi} \quad (1)$$

En donde:

- i , es el número del tamiz comenzando por el fondo de la batería.
- x_i , es la fracción de masa de la muestra total que es retenida sobre el tamiz i .
- \bar{D}_{pi} , es el diámetro medio de las partículas en cada incremento.

5.6 Extracción del aceite de Sacha Inchi utilizando CO₂ supercrítico

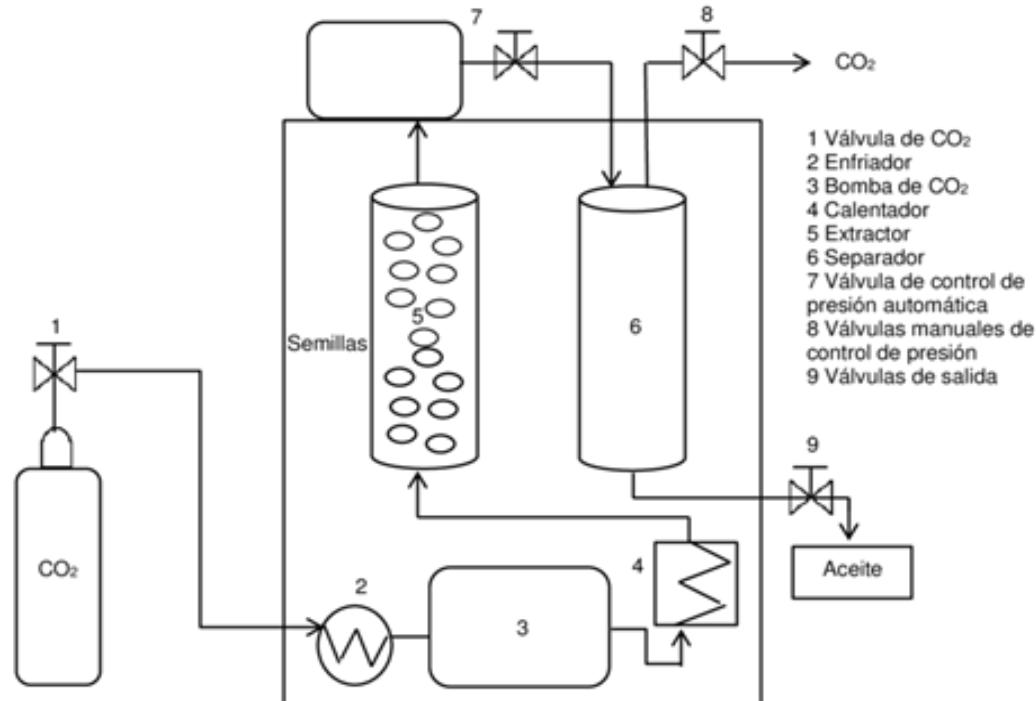
El proceso de extracción del aceite de Sacha Inchi se realizó por triplicado utilizando la tecnología de fluidos supercríticos, con CO₂ supercrítico al 99,9% de pureza (Cryogas, Colombia) como solvente, en un equipo SFE 500 (Waters, USA). El diagrama de proceso de la Figura 5 ilustra de forma simplificada el funcionamiento del equipo en cuestión. El aceite fue obtenido de acuerdo al método descrito por Figueroa *et al.*, (2016), con algunas modificaciones. Para ello, se colocaron 200 g de almendras de Sacha Inchi molidas en la celda de extracción más 35 g de perlas de vidrio, seguidamente se hizo pasar el CO₂ empleando una bomba de desplazamiento positivo de alta presión, modelo P-50 (Thar, USA) hasta alcanzar 381 bar. La temperatura dentro del recipiente se elevó y se mantuvo a 64 °C con una camisa de calefacción. Una vez alcanzadas las condiciones de operación (presión y temperatura) en la columna de extracción, se inició el proceso ajustando el flujo de CO₂ a 30 g/min por un tiempo de 150 min. Finalmente, se despresurizó el equipo, el CO₂ en estado gaseoso circuló hasta el escape y el aceite extraído se recogió en un vial ámbar estéril y se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Las condiciones de extracción se establecieron teniendo en cuenta algunos estudios relacionados con la extracción de aceites de semillas de frutas (Cardoso *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009, citados por Dorado *et al.*, 2016). El tiempo de extracción se fijó en 150 min, ya que bajo este tiempo se alcanza una cantidad aceptable de aceite sin tener un gasto excesivo de CO₂ (0,0081 g aceite/g CO₂ a 381 bar). El flujo se estimó en 30 g CO₂/min, obteniendo una relación

solvente/materia prima de 22,5 g CO₂/g semilla, cuyo valor, se encuentra dentro del rango recomendado en literatura (Ibañez *et al.*, 2002; De Melo *et al.*, 2014, citados por Dorado *et al.*, 2016).

Figura 5

Diagrama de proceso de extracción con FSC



Nota. Tomado de “Evaluación del Rendimiento, Composición y Actividad Antioxidante de Aceite de Semillas de Mora (*Rubus glaucus*) Extraído con CO₂ Supercrítico” (p. 37), por A. Pantoja *et al.*, 2017, *Informacion Tecnologica*, 28(1).

En cuanto a la presión y temperatura de trabajo, estas son el punto óptimo encontrado por Sosa y Hurtado (2016). El rendimiento en aceite alcanzado bajo estas condiciones es del 25%. El documento que reporta los resultados encontrados en dicho estudio está próximo a publicarse.

5.6.1 Determinación del rendimiento del aceite de Sacha Inchi

El rendimiento se determinó realizando el cálculo a partir de la cantidad de aceite de Sacha Inchi obtenido por unidad másica de materia prima en términos porcentuales (g de aceite/g de materia prima x 100).

5.7 Caracterización fisicoquímica del aceite de Sacha Inchi

Se determinaron diferentes propiedades fisicoquímicas del aceite teniendo en cuenta la norma técnica colombiana (NTC) vigente para el análisis de aceites como lo indica la Tabla 3.

Tabla 3

NTC para el análisis fisicoquímico del aceite de Sacha Inchi

Norma Técnica Colombiana (NTC)	Determinación
NTC 336	Densidad
NTC 289	Índice de refacción
NTC 218	Índice de acidez
NTC 335	Índice de saponificación
NTC 283	Índice de yodo
NTC 236	Índice de peróxidos

5.8 Identificación de ácidos grasos por cromatografía de gases (GC)

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Las muestras se derivatizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Christie (1998), con algunas modificaciones. A 0,2 mL de aceite se le adicionó una solución de metanol y ácido clorhídrico al 5% v/v y se sometió a un baño de agua a 49,85 °C durante 8 horas; los ésteres metílicos de ácidos grasos se separaron con 2 mL de n-hexano grado HPLC. Finalmente se adicionó sulfato de sodio anhidro para la inyección de las muestras en el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas. Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas Shimadzu QP2010S (Shimadzu Scientific Corporation, EE. UU.) equipado con detector selectivo de masas QP2010S, modo de operación

full scan (40-500 umas). Temperatura de la interfase 309,85 °C y del inyector a 299,85 °C. Para la separación de las muestras se utilizó una columna capilar DB-WAX (J & W de Agilent Scientific. 30 m * 0,25 μm ID* 0,25 mm) con fase estacionaria de polietilénglicol. La temperatura del horno se programó de 39,85 °C (5 min) hasta 249,85 °C a 5 °C/min. El gas portador y gas auxiliar empleado fue helio (99,99%, Linde) con un caudal de 1 mL/min. La identificación de los compuestos de las muestras de aceite de Sacha Inchi se realizó por comparación de los espectros de masas empleando la base de datos NIST. Por otra parte, la cuantificación se realizó por porcentaje relativo de área.

5.9 Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

5.9.1 Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de la fracción fenólica se utilizó el método de extracción líquido-líquido por ultrasonido (USE) reportado por Oliveira *et al.* (2017), con algunas modificaciones. Se pesaron 2 g de aceite y se agregaron 5 mL de hexano y 5 mL de una solución de metanol/agua (80:20 v/v). Después de agitar en un vortex por 10 s, la muestra se colocó inmediatamente en un baño ultrasónico (Fisherbrand FB11205, Thermo Fisher Scientific). La extracción se realizó a 37 kHz de frecuencia de ultrasonido y 60 W de potencia durante 60 min a 21 °C. Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 min y la fracción polar (fase inferior) fue separada y transferida a un recipiente ámbar. El proceso de extracción se repitió sobre el sobrenadante restante y los precipitados de ambas extracciones fueron combinados y concentrados utilizando un rotaevaporador EYELA N-1100 a 40 °C. Una vez eliminado el metanol, los extractos fueron destinados para la determinación del contenido de fenoles totales.

La extracción se realizó por triplicado.

5.9.2 Determinación del contenido total de fenoles

Para llevar a cabo la cuantificación del contenido total de fenoles se empleó el método de Folin–Ciocalteu descrito por Xuan *et al.* (2018). A 0,417 mL de extracto se le adicionaron 1,7 mL de agua destilada y 0,417 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu. Después de 6 minutos, se adicionó 4,167 mL de solución acuosa de Na₂CO₃ al 7,5% y la mezcla se ajustó hasta un volumen total de 10 mL con agua destilada. Se mezcló vigorosamente y se incubó por 90 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. Finalmente se midió la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific). La curva de calibración (Figura 6) se realizó con una solución patrón de ácido gálico (1 mg/mL), en un rango de concentración final de 0 a 5 mg/L (Tabla 4).

A partir de la curva de calibración de las soluciones patrones se determinó la ecuación de la recta calibrada (2).

$$Y = 0,1229x + 0,0084 \quad (2)$$

Dónde:

- Y=Absorbancia de la muestra
- X= ppm de ácido gálico
- 0,1229= pendiente
- 0,0084= intercepto

La ecuación de tendencia lineal presenta un excelente Valor de R cuadrado igual a 0,9983 validando su uso en la cuantificación de polí fenoles.

El contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico equivalente por gramo de extracto de aceite (GAE /g). El contenido fenólico total de los extractos se calculó usando la fórmula $C=C_1 \times V/m$ donde, C es el contenido fenólico total en mg/g, en GAE (equivalente de ácido gálico), C_1 es la concentración de ácido gálico obtenida a partir de la curva de calibración en mg / mL, V es el volumen de extracto en mL, y m es el peso del extracto en g (Siddiqui *et al.*, 2017). El análisis se realizó por triplicado y se tomó los valores medios.

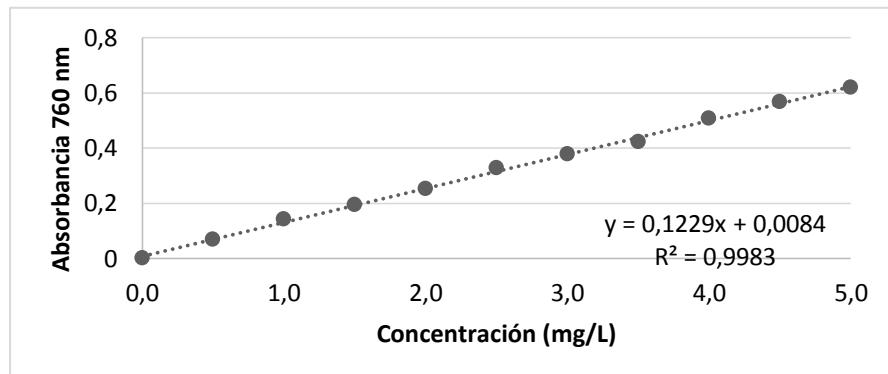
Tabla 4

Resultados de soluciones patrones de ácido gálico para la prueba Folin-Ciocalteu

Ácido gálico (mg/L)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	SD
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,5	0,068	0,067	0,070	0,068	0,002
1,0	0,141	0,144	0,142	0,142	0,002
1,5	0,189	0,193	0,196	0,193	0,004
2,0	0,252	0,253	0,249	0,251	0,002
2,5	0,328	0,331	0,326	0,328	0,003
3,0	0,377	0,380	0,378	0,378	0,002
3,5	0,421	0,424	0,420	0,422	0,002
4,0	0,509	0,506	0,508	0,508	0,002
4,5	0,563	0,566	0,568	0,566	0,003
5,0	0,616	0,620	0,618	0,618	0,002

Figura 6

Curva de calibración para determinación de fenoles totales



5.10 Determinación de los parámetros de formación de la emulsión

Se llevó a cabo un Diseño Central Compuesto 2³ (DCC) utilizando la metodología de superficie de respuesta, con el fin de determinar el efecto de las condiciones de temperatura (40 - 60 °C), tiempo de agitación (20 - 40 min) y relación del aceite respecto al Tween 20 (A-T) (1:1-1:2), sobre el tamaño de gota a las 0 y 48 horas. Para ello se emplearon 8 puntos del diseño factorial 2³, 6 puntos estrellas y 4 puntos centrales, para un total de 18 experimentos (Tabla 5). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y de manera aleatoria. El análisis de los resultados se realizó utilizando el software Statgraphics Centurión XVI (StatPoint Technologies, Inc., War-renton, VA, USA). La significancia de los factores fue determinada mediante un análisis de varianza (ANOVA). Aquellos factores con valores de p<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Tabla 5

Variables independientes y sus correspondientes niveles

Variable independiente	Niveles codificados				
	-a	-1	0	+1	+a
Temperatura (°C)	33,2	40,0	50,0	60,0	66,8
Tiempo de agitación (min)	13,2	20,0	30,0	40,0	46,8
Relación A-T	1:0,7	1:1	1:1,5	1:2	1:2,3

5.10.1 Preparación de las emulsiones

La preparación de las emulsiones se realizó de acuerdo al método descrito por Arteaga (2018). Para ello, se adicionó el medio de cultivo BHI y Tween 20 en tubos de ensayo esterilizados, se agitó durante cinco minutos a 2000 rpm en un agitador vortex RELAX top de Heidolph y se calentó a 60 °C en baño maría durante un minuto. Posteriormente, se agitó en vortex a 2000 rpm durante dos minutos y se adicionó el aceite vegetal calculado. Finalmente, se

calentó a la temperatura indicada en el tratamiento experimental a baño maría durante 5 minutos y se agitó en vortex durante el tiempo indicado en cada tratamiento.

5.10.2 Análisis microscópico

El tamaño de gota se midió usando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E100) acoplado a una cámara digital (SCMOS03000KPA 3.0MP) y un software de digitalización de imágenes (ToupTek ToupView versión x64.3.7.2270). Las muestras se colocaron en portaobjetos de vidrio y luego se cubrieron cuidadosamente con un cubreobjetos para minimizar la destrucción de las estructuras de la emulsión. Las imágenes se realizaron poco después de preparar cada sistema y al finalizar el periodo de almacenamiento (48 horas), utilizando un aumento de 40 × (Colucci *et al.*, 2020; Kowalska *et al.*, 2020). Las imágenes se emplearon para observar el tamaño de gota más pequeño, ya que la eficiencia de la operación de emulsificación está directamente relacionada con la reducción del tamaño de la gota que se logra al final de un proceso de mezcla y agitación (Salager *et al.*, 2002).

5.10.3 Evaluación del pH

Se determinó el pH usando un potenciómetro 3510 pH marca Meter calibrado con el fin de observar la variabilidad de las interacciones electroestáticas y la estabilidad de las emulsiones.

5.11 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de la emulsión

5.11.1 Microorganismos

Las cepas *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Shigella flexneri* ATCC 12022 fueron proporcionadas por el Instituto Departamental de Salud de Nariño y se mantuvieron almacenadas a temperatura de refrigeración (4 °C) previa a su activación.

5.11.2 Medición del crecimiento bacteriano por espectrofotometría

Cada una de las bacterias fue cultivada en 100 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI), suplementado con 0,5% glucosa, durante 12 horas a 37 °C (cultivo stock). Transcurrido este tiempo, se procedió a evaluar la curva de crecimiento para determinar la hora en la que se presentaban las fases exponencial y estacionaria; determinando de esta manera la hora aproximada en la cual se podrían realizar las lecturas de inhibición (Gutiérrez y Agudelo, 2009).

Para ello se adicionó 20 mL del cultivo stock compatible con el estándar de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) en 200 mL de caldo BHI, suplementado con glucosa 0,5% y en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific) se procedió a leer la absorbancia inicial a una longitud de onda de 620 nm. Posteriormente se incubó a 37 °C y durante la primera hora se realizó mediciones cada quince, treinta y sesenta minutos. Las siguientes mediciones se realizaron cada hora hasta completar las 18 horas. Finalmente se confirmó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram (Rojas, 2007).

5.11.3 Criopreservación de cepas bacterianas

Paralelamente, los cultivos bacterianos fueron conservados en criotubos de almacenamiento que contenían 1,5 mL con una relación v/v de 66,7% de glicerol (crioprotectante) y 33,3% del cultivo stock. Finalmente se procedió a colocar los criotubos en congelación a -70 °C para su posterior utilización (Ochoa y Sánchez-Rodríguez, 2017).

5.11.4 Activación de cepas

Las cepas crioconservadas fueron activadas adicionando un criotubo proveniente del cultivo stock en 50 mL de caldo BHI, suplementado con glucosa 0,5% e incubadas a 37° C durante 12 horas. Al terminar la incubación se realizó un repique de 1 mL del anterior preparado y se transfirió a 50 mL de caldo BHI, suplementado con glucosa 0,5% para incubar a 37 °C

durante el tiempo definido para realizar las lecturas de inhibición (6 horas para *L. monocytogenes* y 4 horas para *S. flexneri*). A partir de este subcultivo, se realizaron los diferentes ensayos con un inóculo bacteriano llevado a una concentración igual al estándar 0,5 de McFarlane.

La evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de cepas de *L. monocytogenes* y *S. flexneri* se desarrolló mediante tres métodos microbiológicos: difusión en disco, macrodilución y microdilución en caldo. Los tres métodos se ensayaron en el rango de concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

5.11.5 Método de difusión en disco

Se empleó el método de difusión en disco descrito por Corzo (2012) y Mantilla *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Para esta prueba se preparó agar BHI, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se sirvió en cajas de Petri de 100 mm dejando un espesor de 4 mm. Posteriormente, se sometió a una prueba de esterilidad la cual consistió en incubar los medios por 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se verificó que no hubiera crecimiento de colonias, lo que significaba que se podía utilizar para la prueba.

Finalizado el tiempo de incubación, 100 μL de cada suspensión bacteriana equivalente a $1,5 \times 10^8 \text{ UFC} / \text{mL}$ se sembraron en agar BHI, con la ayuda de un hisopo estéril por siembra masiva y en la superficie del medio se colocaron discos estériles de 6 mm de diámetro impregnados con 10 μL de cada emulsión de aceite a evaluar. Como control positivo se usó tetraciclina para *L. monocytogenes* y ciprofloxacina para *S. flexneri*, como control negativo se empleó Tween 20 para descartar inhibición del crecimiento por tensoactivo. Los medios fueron incubados a 37 °C por 24 horas y los ensayos se realizaron por triplicado.

Posterior a la incubación, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento (mm) y se calculó el porcentaje de inhibición mediante la ecuación 3 teniendo como referencia la

medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo de las emulsiones testeada (Corzo, 2012).

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\varnothing \text{ halo de emulsión}-\varnothing \text{ halo blanco}}{\varnothing \text{ halo control positivo}-\varnothing \text{ halo blanco}} \times 100 \quad (3)$$

5.11.6 Determinación del tiempo mínimo de inhibición (macrodilución en caldo)

El tiempo mínimo de inhibición se determinó de acuerdo al método descrito por Morón de Salim y Ramírez (2013), con algunas modificaciones. Para ello, se prepararon 22 viales ámbar de 40 mL y se dispensaron en cada uno 30 mL de caldo BHI suplementado con glucosa 0,5%, luego los viales se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 min. Una vez esterilizados, a cada uno se les agregó 1 mL de la emulsión a evaluar. En el número 1 se agregó 1 mL de la emulsión con concentración de 5 μ L/mL, al número 2, 1 mL de la emulsión con concentración de 10 μ L/mL y así sucesivamente siguiendo el mismo procedimiento para las demás emulsiones.

Seguidamente se preparó el control positivo adicionando 1 mL del antibiótico en los 30 mL del caldo de cultivo y como control negativo (control de crecimiento) se asignó el frasco restante que sólo contenía el caldo nutritivo. Cada uno de los frascos fue inoculado con 1 mL de suspensión (1,5 x 10⁸ UFC / ml) de *S. flexneri* y *L. monocytogenes* respectivamente.

Después de inocular, se procedió a medir la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 620 nm utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific). Los viales fueron incubados a 37 °C, a intervalos de una hora se realizaron mediciones de absorbancia posterior a las 12 horas desde la primera medición. Cada 30 minutos los viales fueron agitados durante 10 segundos para favorecer que las células estuvieran en suspensión y así minimizar el riesgo de sedimentación a lo largo de la incubación (Rodríguez, 2016).

Los porcentajes de inhibición se obtuvieron empleando la ecuación 4, reportada por Cusimano *et al.* (2020):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{OD control de crecimiento}-\text{OD muestra}}{\text{OD control de crecimiento}} \times 100 \% \quad (4)$$

A los valores negativos resultantes se les asignó un valor de cero y a los valores superiores a 100 se les asignó un valor de 100 (Green *et al.*, 2020).

5.11.7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caja de Elisa

Para la evaluación de la CIM del aceite de Sacha Inchi se utilizó el método colorimétrico de microdilución en caldo propuesto por Argote *et al.* (2017), con algunas modificaciones. Se empleó una caja de Elisa de 96 pozos con una capacidad en cada pozo de 200 μL .

Inicialmente se montaron cinco controles, el primero correspondía solamente al medio de cultivo, el segundo igual al primero más aceite, el tercero al medio de cultivo más el antibiótico, el cuarto al medio de cultivo más el inóculo bacteriano y el quinto a Tween 20 más inóculo. Los dos primeros se prepararon como controles de esterilidad, los dos siguientes como controles positivo y negativo respectivamente, y el último como control para descartar inhibición del crecimiento por tensoactivo.

Los pozos donde varía la concentración de aceite tuvieron un volumen final de 120 μL , de los cuales 10 μL corresponden al inóculo bacteriano más 100 μL de cada emulsión, posteriormente las cajas se incubaron a 37 °C durante 20 horas. Después del tiempo de incubación se adicionó 10 μL del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (5 mg/mL) a cada uno de los pozos y las placas se incubaron por 30 minutos con agitación (200 rpm) a 37 °C. Un cambio de color de amarillo a azul intenso indica crecimiento del microorganismo, por consiguiente, la CIM es la concentración mínima del aceite donde no se evidencia ningún cambio de color (Castaño *et al.*, 2010).

Para corroborar la ausencia de bacterias viables, se inoculó 10 μL de suspensión bacteriana de cada uno de los pozos que no presentó cambio de color en agar Muller Hilton y se incubó a 37 °C durante 18 horas (Argote *et al.*, 2017).

5.11.8 Análisis estadístico

Se realizó con la ayuda del programa Statgraphics Centurión XVII. Los resultados de inhibición fueron analizados mediante un diseño unifactorial aleatorizado y las diferencias estadísticas se compararon a un valor $P<0,05$ con análisis de varianza y prueba de múltiples rangos de Tukey (método de difusión en disco y macrodilución en caldo). Para el método de microdilución en caldo, las diferencias estadísticas se compararon con la prueba de Kruskal Wallis a un valor $P<0,05$.

6. Resultados y discusión

6.1 Contenido de humedad

La humedad de las almendras fue de $4,35 \pm 0,055\%$, valor similar a los reportados por Zuloeta (2014), quien en 16 cultivares encontró humedades entre 3,90 y 4,62 %, con un promedio de 4,33%. El contenido de humedad de las almendras se encuentra dentro del rango 4 a 8%, estado en el que el crecimiento de hongos no ocurre y la actividad de los insectos es reducida, además facilita su almacenamiento (FAO, 1987; Hurtado, 2013).

6.2 Resultados del análisis granulométrico

El diámetro de partícula es una variable que influye sobre la relación superficie/volumen de las partículas, con distintas implicaciones en lo referente a los mecanismos de extracción, como lo es la extracción con fluidos supercríticos.

De esta manera los diámetros de partícula pequeños favorecen el rendimiento de la extracción debido a que hay mayor superficie de contacto (Garcia, 2001). Después de realizar el análisis granulométrico (Tabla 6) se determinó un diámetro medio de partícula de $500,16\text{ }\mu\text{m}$ ($0,500\text{ mm}$), valor semejante al reportado por Sosa y Hurtado, (2016) ($0,46 \pm 0,14\text{ mm}$), que al mismo tiempo se encuentra entre los empleados por Follegatti y Cabral (2007) ($0,39$ a $0,84\text{ mm}$).

Tabla 6

Análisis granulométrico de la almendra molida de Sacha Inchi

Tamices ASTM (malla)	Abertura (μm)	$\bar{D}_{pi}\text{ }(\mu\text{m})$	x_i	% Retenido acumulado	% Pasante	$x_i, \bar{D}_{pi}\text{ }(\mu\text{m})$
10	2000	0	0,000	0,0	100,0	0,00
20	850	1425,0	0,117	11,7	88,3	166,73
30	600	725,0	0,095	21,2	78,8	68,88
40	425	512,5	0,208	42,0	58,0	106,60
80	212	318,5	0,454	87,4	12,6	144,60
Colector		106,0	0,126	100,0	0,0	13,36
Total			1,0			500,16

6.3 Rendimiento del aceite de Sacha Inchi extraído con CO₂ supercrítico

Empleando las condiciones óptimas de presión y temperatura reportadas por Sosa y Hurtado (2016) (64 °C y 381 bar), se obtuvieron rendimientos mayores al 25% (rendimiento óptimo reportado por estos autores), como se puede ver en la Tabla 7. La extracción se realizó por triplicado, se obtuvo un rendimiento promedio del 32,95 ± 0,92 %.

Tabla 7

Extracción con FSC del aceite de Sacha Inchi

Replica	Rendimiento (% v/m)
1	33,91
2	32,87
3	32,08
Promedio	32,95
SD	0,92

El rendimiento de la extracción empleando la tecnología de fluidos supercríticos se ve afectado por muchos factores entre ellos por la presión y temperatura de trabajo, el flujo de solvente, el tiempo de extracción y las características de la materia prima. Entre dichas características se encuentra el diámetro de partícula que según Follegatti y Cabral (2007) es inversamente proporcional al rendimiento; los autores reportaron que existe un pequeño aumento en el rendimiento de la extracción con CO₂ supercrítico a medida que el diámetro de partícula disminuye. Describieron dos períodos de extracción; el primer periodo se caracterizó por la extracción del soluto más accesible encontrado en la capa externa de la partícula y el segundo periodo por la extracción del soluto del interior de las partículas. A diferencia del segundo periodo, el primer periodo no se ve afectado por el diámetro de partícula. Entre más grande sea el diámetro de partícula el segundo periodo tendrá una velocidad de extracción más lenta.

En comparación con otros estudios el rendimiento encontrado es menor al reportado por Dávila del Carpio y Zanabria, (2013) con un valor de 39,42%; y mayor al alcanzado por Triana *et al.* (2017) que estuvo entre 26,81% y 30%.

En cuanto a la calidad del aceite, con FSC se obtiene un producto que cumple con las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas exigidas por el mercado para su libre comercialización. Cabe aclarar que Colombia aún no cuenta con una norma que establezca los parámetros de calidad para el aceite de Sacha Inchi, sin embargo, en esta investigación se ha optado por seguir la normatividad peruana que en este tema tiene bastante desarrollo. Una vez aclarado lo anterior se puede decir que el aceite extraído tuvo unas características organolépticas aceptables de acuerdo a la norma de referencia peruana NTP 151.400. El aceite tuvo un aspecto limpio, brillante, sin ninguna partícula suspendida, sin sedimentos y con ligero olor a almendra. En cuanto a su coloración esta fue amarillo claro. Además, su sabor fue agradable y característico a almendras frescas, propio de la variedad.

6.4 Resultados de la caracterización fisicoquímica del aceite de Sacha Inchi

Las características fisicoquímicas de un aceite permiten determinar su autenticidad, pureza y su estado de conservación. Aunque estas pueden variar de un estudio a otro las aproximaciones en sus valores, o el hecho de que se encuentren entre unos intervalos determinados por una norma legítima, hacen que este se pueda identificar y clasificar entre un producto con o sin calidad dependiendo del caso. En la Tabla 8 se presenta el resultado de las pruebas fisicoquímicas realizadas junto con los valores especificados en la NTP 151.400 y los reportados por otros estudios. Cabe aclarar que en este punto se ha tomado la norma técnica peruana, NTP 151.400, a manera de comparación.

Tabla 8*Propiedades fisicoquímicas del aceite de Sacha Inchi*

Propiedad	Este estudio	NTP 151.400, 2014		1 CO ₂ -SC	2. EX	3. PF	4. SLT
		Mínimo	Máximo				
Densidad (g/mL)	0,9145 ± 0,0161	0,9230	0,9281	0,935 ± 0,006	0,91	0,9276	0,92
Índice de refracción	1,4824 ± 0,0018	1,4797	1,4817			1,48	1,479
Índice de acidez (mg KOH/g)	1,60 ± 0,19			0,804 ± 0,214	0,38	1,11	0,03
Índice de saponificación (mg KOH/g)	195,64 ± 0,20	191,00	199,74	215,8 ± 5,5		189	185,20
Índice de yodo (I ₂ /100g)	200,54 ± 0,95	144,35	196,35	198,1 ± 2,2	192,5	190	171,40
Índice de peróxidos (meqO ₂ /Kg)	1,56 ± 0,18	No mayor a 10		2,1 ± 0,2	5,81	0,90	5,2

Nota. aceite extraído con CO₂ supercrítico (CO₂-SC); aceite extraído por extrusión (EX); aceite extraído por prensado en frío (PF); extracción soxhlet (SLT), 1. (Sosa y Hurtado, 2016); 2. (Hidalgo *et al.*, 2019); 3. (Aranda *et al.*, 2019); 4. (Castaño *et al.*, 2012).

6.4.1 Densidad

Como se puede observar en la Tabla 9, la densidad (ρ) del aceite ($0,9145 \pm 0,0161$ g/mL) a 20°C , a pesar de que está por debajo del intervalo señalado en la NTP 151.400 ($0,9230$ - $0,9281$), es similar a la reportada por Hidalgo *et al.* (2019) ($0,91$). El resultado de este parámetro está relacionado con el contenido de ácidos grasos insaturados, cuanto más insaturado es un aceite mayor tiende a ser su densidad (Aranda *et al.*, 2019), en la Tabla 9 se puede ver una breve comparación entre los aceites con alto y bajo contenido de insaturaciones. La densidad del aceite Sacha Inchi está en función de su composición en la que predominan el ácido α -linolénico (densidad = $0,916$ g/cm 3) y el ácido linoleico (densidad = $0,902$ g/cm 3) (IFA, 2020b, 2020a).

Tabla 9

Comparación de densidades entre aceites con diferentes grados de insaturación

Aceite	Densidad	Referencia
Sacha Inchi	$0,9145 \pm 0,0161$	Este estudio
Oliva	$0,910$ - $0,916$	CODEX STAN 33
Coco	$0,908$ - $0,921$	CODEX STAN 210
Palma	$0,891$ - $0,899$	CODEX STAN 210

6.4.2 Índice de refracción

El índice de refracción (IR) del aceite ($1,4824 \pm 0,0018$) está próximo a los valores especificados en la NTP 151.400 ($1,4797$ - $1,4817$) y al encontrado por Aranda *et al.* (2019), ($1,48$). En los aceites vegetales, el IR está relacionado con el grado de saturación, así como con los dobles enlaces cis/trans, y puede verse afectado por la luz incidente utilizada en el ensayo (Delgado *et al.*, 2016). Los ácidos grasos tienen valores de IR individuales y cuanto más larga sea la cadena carbonada, mayor será el IR. También se ha detectado que los valores de este parámetro son más altos cuando los ácidos grasos tienen dobles enlaces, incluso cuando tienen el mismo número de átomos de carbono (Jung *et al.*, 2016). Esto explica porque se encuentran

diferencias marcadas en IR entre aceites con mayor o menor contenido de ácidos grasos con dobles enlaces, como se puede ver en la Tabla 10.

Tabla 10

Comparación de IR entre aceites con diferentes grados de insaturación

Aceite	Índice de refracción	Referencia
Sacha Inchi	1,4824 ± 0,0018	Este estudio
Oliva	1,4677-1,4705	CODEX STAN 33
Coco	1,448-1,450	CODEX STAN 210
Palma	1,454-1,456	CODEX STAN 210

6.4.3 Índice de acidez

El índice de acidez (IA) encontrado para el aceite de Sacha Inchi ($1,60 \pm 0,19$ mgKOH/g) es superior a los valores reportados por Sosa y Hurtado (2016) ($0,804 \pm 0,214$ mgKOH/g), Hidalgo *et al.* (2019) ($0,38 \pm 0,02$ mgKOH/g) y Aranda *et al.* (2019), ($1,11$ mgKOH/g). Si el contenido de ácidos grasos libres (AGL) se expresa como porcentaje de ácido oleico da como resultado un valor de 0,8%, lo cual, en conformidad con la NTP 151,400, permite catalogar al aceite como extra virgen.

El contenido de AGL es un problema de calidad en el aceite, dado a que afecta directamente a su tiempo de vida útil. En semillas oleaginosas las enzimas lipasas, fosfolipasas y esterasas son una de las causas del contenido de ácidos grasos libres en sus aceites, Sánchez (2019), expone que las lipasas y las esterasas hidrolizan las uniones ésteres de los glicéridos y los liberan a partir de triglicéridos de ácidos grasos, de diglicéridos y de los monoglicéridos. De acuerdo al autor esas enzimas lipolíticas están situadas justo bajo la película de las nueces y granos oleaginosos y no pueden atacar los lípidos en las células no dañadas a causa de la estructura particular de los oleosomas (empaqueadura y protección de los lípidos de reserva). Sin embargo, la molienda de las semillas desencadena una rápida lipólisis, puesto que las

enzimas lipolíticas son puestas en contacto con los sustratos lipidíeos. De esta manera tanto los triglicéridos de reserva como los lípidos de las membranas pueden ser hidrolizados (Zamora *et al.*, 1991).

De acuerdo a Laskawy *et al.* (1983), el tostado reduce significativamente la actividad de las lipasas. Sin embargo, Messerli *et al.* (1983), reporta que las esterasas son estables al calor y pueden quedar activas incluso después del tostado. Lo anteriormente expuesto puede explicar el contenido de ácidos grasos libres en el aceite extraído (mayor al de los otros estudios citados), puesto que una de las etapas del proceso fue la molienda y posteriormente el almacenamiento a temperatura de refrigeración en un empaque al vacío. Además, las semillas no fueron sometidas a ningún tratamiento térmico previo así que la inactivación de las lipasas no tuvo lugar. Se dejó en contacto las enzimas con sus sustratos durante el almacenamiento y en consecuencia el nivel de ácidos grasos libres en el aceite aumentó.

Otra causa del aumento en el contenido de AGL pueden ser las condiciones de extracción (64°C , 381 bar, flujo de CO_2 30 g/min). Triana *et al.* (2017) encontraron que esta propiedad fisicoquímica, junto con el IY, se veía afectada por los cambio en la presión y principalmente por el flujo de CO_2 . Un flujo bajo de CO_2 generó un aumento en la acidez de hasta 0,2% y una disminución en el IY de 33 g $\text{I}_2/100\text{ g}$ de aceite, mientras que una presión mayor generó un aumento en la acidez de 0,1% y una disminución en el IY de 15 g $\text{I}_2/100\text{ g}$ de aceite.

6.4.4 Índice de saponificación

El índice de saponificación (IS) del aceite de Sacha Inchi extraído ($195,64 \pm 0,20\text{ mg KOH/g}$) fue menor al de Sosa y Hurtado (2016) ($215,8 \pm 5,5\text{ mg KOH/g}$) y estuvo dentro de los límites determinados por la NTP 151,400 ($191,00$ - $199,74\text{ mg KOH/g}$). El peso molecular de los ácidos grasos constituyentes tiene mucho que ver en la cantidad de miligramos de KOH

necesaria para saponificar un gramo de aceite de Sacha Inchi. Las grasas constituidas por ácidos grasos de cadena larga tienen valores bajos de IS porque tienen un número relativamente menor de grupos funcionales carboxílicos por unidad de masa que pueden reaccionar con la base para formar la sal correspondiente (De los Angeles, 2017). De acuerdo a lo anterior los ácidos grasos del aceite de Sacha Inchi tienen mayor peso molecular que el aceite de coco y menor al de los constituyentes del aceite de oliva y palma, como se puede ver en la Tabla 11.

Tabla 11

Índice de saponificación de aceites con diferente composición en ácidos grasos

Aceite	MgKOH/g	Referencia
Sacha Inchi	195,64 ± 0,20	Este estudio
Oliva	184-196	CODEX STAN 33
Coco	248-265	CODEX STAN 210
Palma	190-209	CODEX STAN 210

6.4.5 Índice de yodo

El índice yodo (IY) de un aceite está en función de su grado de insaturación, por consiguiente, es de esperar valores altos para el aceite de Sacha Inchi. En este estudio se encontró un IY ($200,54 \pm 0,95 \text{ I}_2/100\text{g}$) que supera el intervalo dado por la NTP-151,400 (144,35-196,35 $\text{I}_2/100\text{g}$) y está próximo al encontrado por Sosa y Hurtado (2016) ($198,1 \pm 2,2 \text{ I}_2/100\text{g}$). Pascual y Mejía (2000), citados por Adrianzén *et al.* (2011), explican que el alto índice de yodo encontrado se debe a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (entre ellos el α -linolénico). La disponibilidad de los dobles enlaces influye directamente sobre el IY durante el proceso de halogenación y también sobre otros parámetros fisicoquímicos como con el IR y la densidad: puesto que, a mayor IY, mayor IR y mayor densidad (Adrianzén *et al.*, 2011).

6.4.6 Índice de peróxidos

Se encontró un bajo índice de peróxidos (IP) ($1,56 \pm 0,18$ meqO₂/kg), lo cual es una característica de los aceites con alta resistencia a la oxidación. Se encuentra por debajo del límite dado por la NTP-151,400 (no mayor a 10 meqO₂/kg), de igual forma es menor a los reportado por Sosa y Hurtado (2016) e Hidalgo *et al.* (2019); $2,1 \pm 0,2$ meqO₂/kg y $5,81 \pm 0,5$ meqO₂/kg respectivamente. Este parámetro mide el grado de oxidación primaria de un aceite, con ello se puede concluir si hay una baja o alta cantidad de hidroperóxidos formados por las reacciones oxidativas, como son la auto oxidación, fotooxidación y las reacciones enzimáticas. Este bajo valor puede ser dado gracias a que el aceite fue almacenado en un frasco ámbar, protegiéndolo así de la luz, y en refrigeración evitando el aumento de su temperatura. También puede ser por la presencia de antioxidantes. Los aceites comestibles naturales tienen en su composición antioxidantes tales como tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, compuestos fenólicos y esteroles, que pueden bloquear la etapa de iniciación en la oxidación, minimizar la velocidad de oxidación, inactivar los radicales libres, controlar los metales de transición, eliminar al oxígeno singlete e inactivar la sensibilidad a la luz (Sánchez, 2012). Según Teran (2015), el contenido de tocoferoles totales en el aceite de Sacha Inchi es de 194,4 mg/100 g dc aceite, lo que corresponde a un 55,0, 41,5, 1,7 y 1,6 % de participación para el γ -, δ -, α - y β -tocoferol, respectivamente. Fanali *et al.* (2011), sostiene que la actividad antioxidante disminuye en el orden $\gamma > \delta > \beta > \alpha$ tocoferol.

En conclusión, al comparar el aceite obtenido mediante la técnica de fluidos supercrítico con la norma peruana (NTP 151.400) se encontró un aceite que no cumple con los requisitos en densidad, IR e IY. Con ello el aceite no es apto para su comercialización, sin embargo, esta norma está basada en estudios hechos con genotipos comercialmente empleados en dicho país,

para clasificar correctamente al aceite de Sacha Inchi como un producto de calidad hace falta una normatividad que considere las variables colombianas de producción. A falta de una norma colombiana también se encuentran las normas internacionales como la norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales CODEX 19-1969. Los parámetros analíticos utilizados comúnmente como medida de calidad de una grasa o aceite, como lo son el valor de ácidos libres y el IP, están en conformidad con la norma internacional. El IA evaluado en el aceite de Sacha Inchi ($1,60 \pm 0,19$ mgKOH/g) es menor al límite dado por el CODEX (4,0 mg de KOH/g), de igual forma el IS ($1,56 \pm 0,18$ meqO₂/kg) es menor al máximo establecido por la norma (hasta 15 miliequivalentes de oxígeno activo/kg de aceite).

6.5 Análisis del perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos del aceite de Sacha Inchi obtenido con CO₂-SC, se muestra en la Tabla 12 y en la Figura 7.

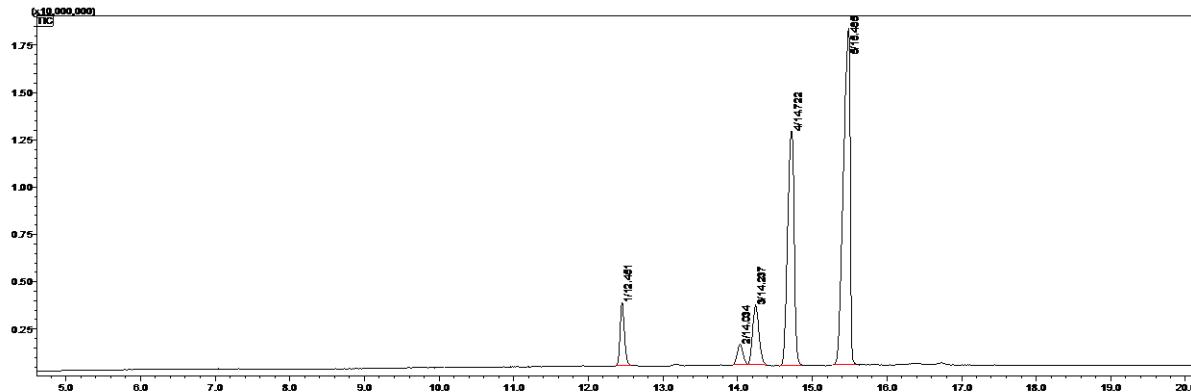
Tabla 12

Composición relativa de ácidos grasos (%) en aceite de semillas de Sacha Inchi

Ácido graso	Composición porcentual				
	Este estudio	1. CO₂-SC	2. CO₂-SC	3. SLT	4. PF
Ácido palmítico	5,89	4,24	4,08	3,60	4,31
Ácido esteárico	2,47	2,50	2,96	2,90	3,17
Ácido oleico	8,29	8,41	10,45	8,50	9,48
Ácido linoleico	33,59	34,08	35,34	33,90	34,34
Ácido linolénico	49,76	50,41	46,92	50,20	47,35

Nota. Aceite obtenido mediante extracción con CO₂ supercrítico (CO₂-SC); soxhlet (SLT); prensado en frío (PF). 1. (Follelli et al., 2009); 2. (Do Prado et al., 2011); 3. (Castaño et al., 2012); 4. (Aranda et al., 2019).

Figura 7

Cromatograma perfil ácidos grasos

Como se puede observar en la Tabla 12, el aceite contiene un alto grado de insaturaciones (91,64%) lo que explica su alto IY ($200,54 \pm 0,95 \text{ I}_2/100\text{g}$), además, los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), tales como los ácidos linolénico y linoleico, son sus principales constituyentes (83,35%). Estos resultados están de acuerdo con anteriores estudios que indican que el aceite de Sacha Inchi está conformado esencialmente por los ácidos α -linolénico ($\omega 3$), linoleico ($\omega 6$) y oleico ($\omega 9$), cuyos porcentajes varían en un rango de 42,18 – 57,22%, 27,8 – 38,72% y 8,22 – 10,68%, respectivamente (Benítez *et al.*, 2018).

Valores similares han sido encontrados por Sosa y Hurtado (2016) y Do Prado *et al.* (2011) para el aceite extraído con CO_2 supercrítico, con excepción del ácido linolénico, cuyo porcentaje fue más alto en este estudio (49,76%). El perfil de ácidos grasos también fue similar al reportado por Aranda *et al.* (2019), quien empleó el método de extracción por prensado en frío, sin embargo, el ácido linolénico aquí también fue la excepción dado a que el de este estudio fue más alto al encontrado por el autor (47,36%).

En comparación con otros aceites vegetales con mayor impacto por sus bondades nutricionales tales como el de argán, chía, oliva, linaza, soya, palta, uva y sésamo, se ha

reportado que el aceite de Sacha Inchi posee un contenido de PUFAs menor al de chía y mayor al de linaza; de acuerdo al contenido de la Tabla 13, reportada por Ramos *et al.* (2016), se puede decir que los aceites de chía y linaza tienen mayor porcentaje de ácido linolénico que el aceite de Sacha Inchi; por otra parte, el contenido de ácido linoleico en el aceite de Sacha Inchi es mayor al del aceite de chía y linaza. Los aceites de uva, soya, sésamo y argán tienen contenidos mayores de ácido linoleico que el aceite de Sacha Inchi.

Tabla 13

Aceites vegetales con mayor impacto por sus bondades nutricionales

Recursos	Ácidos grasos (%)					Referencias
	16:00	18:00	18:01	18:02	18:03	
Argán	12,7	5,8	45,6	34,6	0,34	Rueda <i>et al.</i> (2014)
Chía	7,1	3,4	7,0	18,2	62,8	Marineli <i>et al.</i> (2014)
Oliva	10,1	3,7	78,7	5,1	0,9	Ramos <i>et al.</i> (2015)
Linaza	5,8	3,1	20,5	15,0	55,2	Rueda <i>et al.</i> (2014)
Soya	9,2	3,8	24,4	54,0	8,0	Rueda <i>et al.</i> (2014)
Palta	16,3	1,5	60,6	14,7	0,7	Rueda <i>et al.</i> (2014)
Uva	8,1	4,5	20,5	66,5	0,4	Navas (2010)
Sésamo	10,4	5,4	40,9	42,7	0,6	Navas (2010)
Sacha Inchi	6,6	3,8	9,4	26,7	51,3	Chirinos <i>et al.</i> (2015)

Nota. La Tabla muestra el perfil de ácidos grasos de diferentes aceites vírgenes comestibles. Tomado de “Perfil de ácidos grasos de aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) en comparación con otros aceites virgenes combustibles” (p. 105), por F. Ramos, 2016, *Campus*, 21 (21).

En comparación con nuevas fuentes de aceites vegetales como lo son las semillas de maracuyá, lulo, mora y papaya (Tabla 14) se puede decir que el perfil lipídico del aceite de Sacha Inchi es similar al del aceite de mora, en el cual también son predominantes los ácidos grasos omega 3 y 6.

Tabla 14*Nuevas fuentes de aceites vegetales*

Ácido graso	Composición porcentual				
	1. Sacha Inchi	2. Maracuyá	2. Lulo	2. Mora	3. Papaya
Ácido palmítico	5,89	14,16	10,18	4,56	27,67
Acido esteárico	2,47	1,29	0,65	0,58	3,30
Ácido oleico	8,29	16,33	10,98	4,17	59,89
Ácido linoleico	33,59	67,53	76,06	56,11	7,58
Ácido linolénico	49,76	0,46	1,17	34,55	0,54
Palmitoleico	-	0,23	0,95	-	1,03

Nota. 1. Este estudio; 2. (Pantoja, 2016); 3. (Dorado *et al.*, 2017).

Los dos ácidos grasos más abundantes en el aceite de la semilla de *P. volubilis*, el ácido linoleico (LA) y el ácido α -linolénico (ALA), son los dos ácidos grasos esenciales que necesita el ser humano; son necesarios para la función biológica pero no pueden sintetizarse en el organismo debido a la falta de desaturases Δ -12 y Δ -15 y, por tanto, deben obtenerse a través de la dieta.

Se sabe que el ALA en el cuerpo humano se somete principalmente a la β -oxidación para obtener energía y carbono y se convierte en ácido eicosapentaenoico (EPA) y luego en ácido docosahexaenoico (DHA) utilizando la misma cascada enzimática que la conversión del LA en DPA. Se conocen muchas funciones e impactos en la salud del EPA y el DHA, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, un efecto protector en los trastornos del estado de ánimo y la función cognitiva en los niños (Kodahl, 2020).

6.6 Contenido total de compuestos fenólicos

Respecto al contenido de compuestos fenólicos, el valor obtenido ($0,11 \pm 0,016$ mg GAE/100 g de extracto de aceite), fue considerablemente menor a lo presentado por Xuan *et al.* (2018) ($13,29 \pm 0,05$ mg GAE/g de extracto), así como también con relación a los resultados obtenidos por estos mismos autores para otros aceites (Tabla 15).

Tabla 15

Contenido total de fenoles de 14 extractos de aceite comestible

Nombre	CTF (mg GAE/ g OE)
Girasol	4,39 ± 0,20
Cártamo	1,76 ± 0,29
Canola	3,01 ± 0,14
Soja	3,23 ± 0,08
Algodón	8,22 ± 0,39
Uva	15,56 ± 0,24
Lino	39,16 ± 1,03
Perilla	18,07 ± 1,11
Aguacate	11,31 ± 0,37
Chía	4,86 ± 0,30
Sacha Inchi	13,29 ± 0,05
Perillartina	20,38 ± 0,17
Sésamo	10,46 ± 0,50
Salvado de arroz	19,59 ± 1,25

Nota. La tabla muestra el contenido total de fenoles de 14 extractos de aceites vegetales comercializados en Japón. GAE: equivalente de ácido gálico; OE: extracto de aceite. Tomado de “An overview of chemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of commercial vegetable edible oils marketed in Japan” (p. 6), por Xuan *et al.*, 2018, *Foods*, 7(2).

La diferencia entre estos resultados, posiblemente se deba a que el CFT en el aceite varía en función de muchos factores, siendo principalmente dependiente del tipo de variedad, métodos de producción, almacenamiento de la semilla, así como por el método de extracción (Chirinos *et al.*, 2016).

Por otra parte, de acuerdo a Muñoz *et al.* (2013), el contenido de fenoles totales en la torta de Sacha Inchi es mayor que en el aceite ($67,64 \pm 0,12$ mg GAE/100g). Este mismo autor, tras evaluar los extractos de la semilla de Sacha Inchi, concluyó que existe una relación directa entre el contenido total de polifenoles y su capacidad antioxidante, dado a que el extracto hidrofílico de la torta presentó mayor contenido de polifenoles totales y mayor actividad

antioxidante. Según Sánchez (2010) los compuestos fenólicos son capaces de actuar como antioxidantes, ya que son capaces de suprimir la formación de inicio de las especies radicales por inhibición de las enzimas o quelante de iones metálicos (hierro y cobre) que participan en el inicio del libre radical en el proceso de producción.

Los resultados obtenidos por Chirinos *et al.* (2016), indican que la cáscara de la semilla de Sacha Inchi también es una fuente importante de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Los taninos condensados (93,1%) son la principal familia de compuestos fenólicos presentes en la cáscara. Según la investigación realizada por Zuloeta (2014), la almendra de Sacha Inchi tiene un contenido de compuestos fenólicos entre 64.6 y 80 mg GAE/100 g semilla.

La actividad antimicrobiana de un aceite depende en gran medida su fracción de compuestos fenólicos. Estudios recientes han documentado los efectos antibacterianos de los extractos ricos en fenol que se encuentran comúnmente en las plantas. Estos estudios han destacado el uso de compuestos fenólicos para controlar las bacterias patógenas, incluidas las que tienen un perfil comercial de resistencia a los antibióticos. Los efectos antibacterianos de los compuestos fenólicos también se han asociado principalmente con la presencia de grupos hidroxilo en sus moléculas. De hecho, el número y la posición de estos grupos hidroxilo, es decir, el patrón de hidroxilación en el anillo fenólico, parece estar asociado con la importancia de los efectos inhibidores ejercidos por los compuestos fenólicos sobre las bacterias diana (Boy *et al.*, 2021).

Por lo tanto, y como se explicará en la sección 6.8 el bajo contenido de compuesto fenólicos influye en gran medida en la actividad antimicrobiana del aceite de Sacha Inchi.

6.7 Optimización de la formulación de la emulsión

La Tabla 16 muestra las condiciones experimentales para la preparación de emulsiones de aceite de Sacha Inchi (en unidades codificadas y reales), así como el tamaño de gota obtenido para cada experimento a las 0 h y 48 h.

Tabla 16

Resultados del diseño central compuesto para el tamaño de gota de la emulsión

Exp.	Bloque	Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (min)	Relación A-T	Tamaño de gota a las 0 h (μm)	Tamaño de gota a las 48 h (μm)
1	1	40,0 (-1,0)	20,0 (-1,0)	1:1 (-1,0)	2,52	4,38
2	1	60,0 (+1,0)	20,0 (-1,0)	1:1 (-1,0)	2,81	5,21
3	1	40,0 (-1,0)	40,0 (+1,0)	1:1 (-1,0)	3,72	3,89*
4	1	60,0 (+1,0)	40,0 (+1,0)	1:1 (-1,0)	4,16	4,19*
5	1	40,0 (-1,0)	20,0 (-1,0)	1:2 (+1,0)	4,30	8,79
6	1	60,0 (+1,0)	20,0 (-1,0)	1:2 (+1,0)	5,01	8,50
7	1	40,0 (-1,0)	40,0 (+1,0)	1:2 (+1,0)	4,89	6,75
8	1	60,0 (+1,0)	40,0 (+1,0)	1:2 (+1,0)	5,47	6,07
9	1	33,2 (-1,68)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	6,23	7,00
10	1	66,8 (+1,68)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,54	6,44
11	1	50,0 (0)	13,2 (-1,68)	1:1,5 (0)	6,03	8,42
12	1	50,0 (0)	46,8 (+1,68)	1:1,5 (0)	4,62	5,89
13	1	50,0 (0)	30,0 (0)	1:0,7 (-1,68)	1,77	1,76*
14	1	50,0 (0)	30,0 (0)	1:2,3 (+1,68)	4,50	6,93
15	1	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,62	7,10
16	1	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,39	7,02
17	1	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,20	6,95
18	1	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,87	6,87
19	2	40,0 (-1,0)	20,0 (-1,0)	1:1 (-1,0)	2,44	4,30
20	2	60,0 (+1,0)	20,0 (-1,0)	1:1 (-1,0)	2,72	5,09
21	2	40,0 (-1,0)	40,0 (+1,0)	1:1 (-1,0)	3,80	3,79*
22	2	60,0 (+1,0)	40,0 (+1,0)	1:1 (-1,0)	4,06	4,28*
23	2	40,0 (-1,0)	20,0 (-1,0)	1:2 (+1,0)	4,01	8,57
24	2	60,0 (+1,0)	20,0 (-1,0)	1:2 (+1,0)	5,12	8,20
25	2	40,0 (-1,0)	40,0 (+1,0)	1:2 (+1,0)	4,99	6,57
26	2	60,0 (+1,0)	40,0 (+1,0)	1:2 (+1,0)	5,56	6,34
27	2	33,2 (-1,68)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	6,46	6,83

Exp.	Bloque	Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (min)	Relación A-T	Tamaño de gota a las 0 h (μm)	Tamaño de gota a las 48 h (μm)
28	2	66,8 (+1,68)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,49	6,72
29	2	50,0 (0)	13,2 (-1,68)	1:1,5 (0)	6,20	8,15
30	2	50,0 (0)	46,8 (+1,68)	1:1,5 (0)	4,77	6,09
31	2	50,0 (0)	30,0 (0)	1:0,7 (-1,68)	1,81	1,78*
32	2	50,0 (0)	30,0 (0)	1:2,3 (+1,68)	4,22	6,80
33	2	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,87	6,92
34	2	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,28	6,88
35	2	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	4,99	7,05
36	2	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	5,94	7,16

Nota. *emulsiones estables

La significancia estadística de los factores sobre las variables respuesta, se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la Tabla 17. La variable relación A-T (C) fue la única que influyó significativamente ($p \leq 0,05$) sobre las variables respuesta bajo estudio, tanto en su forma lineal como en su forma cuadrática. El efecto lineal del tiempo de agitación (B), el efecto cuadrático de la temperatura (AA), la interacción temperatura- relación A-T (AC) y la interacción tiempo de agitación- relación A-T (BC) solo ejercieron efecto significativo en el tamaño de gota a las 48 h. Los efectos restantes no mostraron efectos estadísticamente significativos ($p > 0,05$) sobre las variables respuesta en los niveles evaluados.

En el análisis de varianza se observa que el Valor-P de los bloques (0,974 y 0,385) fue superior a 0,05, indicado que la variación entre las repeticiones de cada experimento, no tuvo un efecto significativo en el tamaño de gota a las 0h y 48h, dando confiabilidad a los experimentos. La prueba de falta de ajuste (Tabla 17), diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería usar un modelo más complicado (Jiménez, 2015) resultó no significativa ($p > 0,05$), lo que indica que los modelos matemáticos

usados para las dos variables respuesta, son adecuados para describir los datos observados con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 17

ANOVA para el tamaño de gota a las 0 h y 48 h

Fuente de variabilidad	Tamaño de gota 0 h			Tamaño de gota 48 h		
	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0,077	0,520	0,499	0,003	0,230	0,647
B: Tiempo de agitación	0,317	2,140	0,194	13,050	1006,720	0,000
C: Relación A-T	17,343	117,020	0,000	63,962	4934,380	0,000
AA				0,327	25,240	0,002
AB						
AC				0,990	76,380	0,000
BB						
BC				1,891	145,850	0,000
CC	25,987	175,350	0,000	24,912	1921,870	0,000
Bloques	1,8E-04	0,000	0,974	0,011	0,880	0,385
Falta de ajuste	0,490	3,300	0,071	0,027	2,100	0,182
R^2		77,569			99,385	
R^2 ajustado		73,830			99,203	

De acuerdo con el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), los modelos explican el 73,83% y 99,20% de la variabilidad del tamaño de gota a las 0 h y 48 h, respectivamente, lo que sugiere un alto grado de correlación entre los valores observados y predichos ya que, para fines de predicción, se recomienda un R^2_{aj} de al menos 70% (Gutiérrez y De la Vara Salazar, 2008).

A partir de los datos experimentales se calcularon los coeficientes de la ecuación polinomial para predecir los valores de la variable respuesta. Las ecuaciones de regresión en términos de valores reales se muestran en la ecuación 5 para el tamaño de gota a 0 h y en la ecuación 6 para el tamaño de gota a las 48 h.

$$Y_1 = -6,37352 + 0,00530221 * x_1 + 0,0107774 * x_2 + 13,3065 * x_3 - 3,90426 * x_3^2 \quad (5)$$

$$Y_2 = -13,7687 + 0,184773*x_1 + 0,0340042*x_2 + 19,2545*x_3 - 0,00111198*x_1^2 - 0,04975*x_1*x_3 - 0,06875*x_2*x_3 - 3,88132*x_3^2$$

(6)

Donde Y_1 es el tamaño de gota a las 0 h, Y_2 es el tamaño de gota a las 48 h, x_1 es temperatura ($^{\circ}\text{C}$), x_2 es tiempo de agitación (min) y x_3 es relación A-T. Un valor positivo en la ecuación de regresión indica una relación directa mientras que un valor negativo indica una relación inversa entre el factor y la respuesta (Flores *et al.*, 2015).

6.7.1 Análisis del diagrama de efectos principales

En el diagrama de efectos principales (Figura 8), se puede observar un comportamiento no lineal de la relación A-T, comportamiento que es significativo debido a que su efecto cuadrático es el término que estadísticamente tuvo el mayor efecto sobre el tamaño de gota. Igualmente se puede evidenciar que, al incrementarse la relación A-T de 1:1 a 1:2 se obtiene un incremento en el tamaño de gota de $1,95 \mu\text{m}$, y posteriormente, una disminución de $0,34 \mu\text{m}$. Con relación a la tendencia observada en la relación A-T a las 48 h (Figura 9), se observa un comportamiento lineal más notable y de manera directamente proporcional, con un incremento del tamaño de gota del nivel bajo al alto de $3,11 \mu\text{m}$.

Con relación al tiempo de agitación, la Figura 8 contrasta con la Figura 9, ya que en la primera el tamaño de gota prácticamente no cambia al aumentar el tiempo de agitación de 20 min a 40 min. Mientras que, en la segunda, por la inclinación de la pendiente el tiempo de agitación influye considerablemente sobre el tamaño de gota y de manera inversamente proporcional. Igualmente se observa el efecto no significativo de la temperatura sobre el tamaño de gota a las 0h y 48h, lo cual es coherente con lo observando en el ANOVA de la Tabla 17.

Figura 8

Diagrama de efectos principales para el tamaño de gota a las 0 h

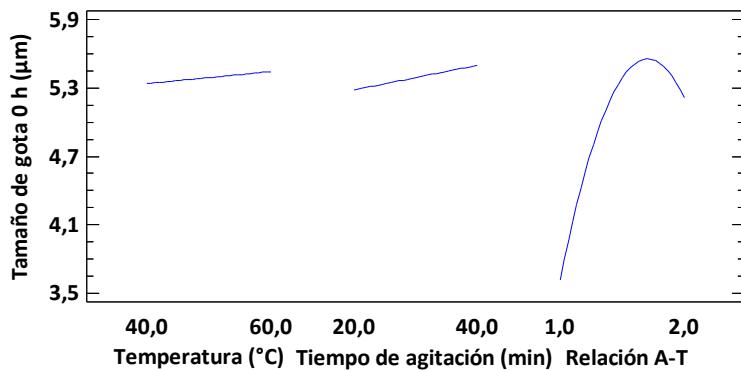
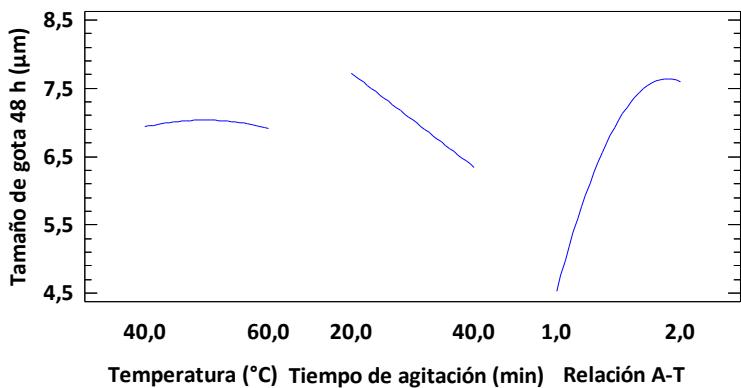
**Figura 9**

Diagrama de efectos principales para el tamaño de gota a las 48 h



Sin embargo, no se pueden sacar conclusiones basadas en los efectos principales de cada factor de forma aislada, ya que los efectos principales están presentes en interacciones significativas (BC y AC a las 48 h), por ende pasan a cobrar mayor importancia (Montgomery, 2003).

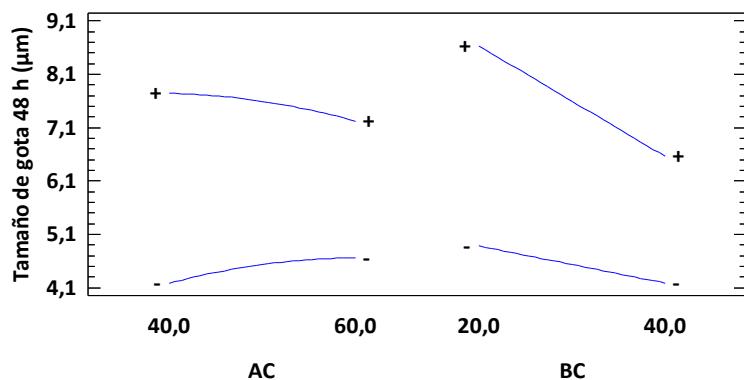
En la interacción BC (Figura 10), primera en importancia respecto al efecto sobre el tamaño de gota a las 48 h, se observa un tamaño de gota estrechamente relacionado con estas dos variables. A una relación A-T baja y tiempo de agitación alto, se evidencia una disminución

significativa del tamaño de gota, por el contrario, a una relación A-T alta se observa un incremento en el tamaño de gota cuando el tiempo de agitación cambia de 40 a 20 min.

De acuerdo con algunos autores, este comportamiento podría explicarse gracias a la naturaleza anfifílica del tensoactivo, a la estructura química del aceite seleccionado y al tiempo de duración de la energía disruptiva suministrada durante la homogeneización (McClements, 2015; Nikolovski *et al.*, 2016; Pavoni *et al.*, 2020).

Figura 10

Diagrama de interacción para el tamaño de gota a las 48 h



En lo referente al tiempo de agitación, varios estudios han informado la importancia de este factor en la formación de pequeñas gotas en una emulsión (Chen y Tao, 2005; Flores *et al.*, 2015; Li y Chiang, 2012; McClements, 2015; Salvia *et al.*, 2013; Sartomo *et al.*, 2020).

Según Li y Chiang (2012), el tiempo de emulsificación es un parámetro importante que está estrechamente relacionado con el equilibrio termodinámico en un sistema de emulsión O / W. Cuando la emulsión pasa un tiempo suficiente dentro de la zona de homogeneización, la distribución del emulsionante en la fase oleosa y la solubilización de este en la fase bicontinua se favorece y da como resultado glóbulos más pequeños (McClements, 2015; Moreira *et al.*, 2019). Dicho de otro modo, si una emulsión pasa a través de un homogeneizador con demasiada rapidez o si hay una distribución desigual de energía disruptiva dentro de la zona de homogeneización, es

posible que algunas de las gotas no se rompan (McClements, 2015). Por el contrario, si el tiempo de mezcla es prolongado, es factible que la eficacia del emulsionante disminuya y de lugar a que este se separe de la interfaz aceite-agua (Chen y Tao, 2005).

Por otra parte, en relación al tensoactivo, se ha informado una disminución significativa en el tamaño de las gotas y un aumento en la estabilidad de emulsiones de aceite de Sacha Inchi, con la adición de polisorbatos (Tweens) (Silva *et al.*, 2019). Saengsorn y Jimtaisong (2017) han reportado que es fundamental seleccionar emulsionantes no iónicos óptimos, para poder usar aceite de Sacha Inchi en emulsión, ya que esto asegurará la estabilidad de la emulsión.

De acuerdo a Jiménez *et al.* (2010) y McClements (2015), los tensoactivos al tener una porción hidrofílica y otra hidrofóbica en su estructura molecular, minimizan las interacciones termodinámicamente desfavorables entre las fases de aceite y agua y, por ende disminuyen la tensión interfacial; reduciendo así la cantidad de energía libre requerida para deformar y romper las gotas. Por otro lado, los polisorbatos al ser tensoactivos no iónicos de rápida adsorción (Silva *et al.*, 2019), pueden contribuir a la rápida saturación de la superficie de la gota y por ende determinar en gran medida la prevención de la agregación de las gotas (Pavoni *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019).

No obstante, para que las gotas no tiendan a fusionarse entre sí durante una colisión, es necesario tener en cuenta la concentración del tensioactivo (McClements, 2015). Por un lado, si las gotas no están protegidas por un recubrimiento interfacial suficientemente fuerte, es más probable que las nuevas gotas se fusionen con sus vecinas durante la homogenización (McClements, 2015). Por el contrario, si hay un exceso de tensioactivo en el sistema de emulsión, puede dar lugar a una menor velocidad de difusión del tensoactivo y por ende aun aumento en el tamaño de las gotas (Li y Chiang, 2012).

Si bien es cierto, que entre más bajo sea el porcentaje de la fase oleosa y entre más alta sea la relación surfactante:fase oleosa, mayor probabilidad hay de obtener emulsiones con menor tamaño de gota (Ramírez *et al.*, 2019); las condiciones de procesamiento de este estudio permitieron obtener emulsiones con una proporción de aceite no tan baja y además, con suficiente emulsionante para cubrir completamente las superficies de todas las gotas formada, lo cual es muy beneficioso para el estudio de la actividad antimicrobiana.

Por último, es preciso mencionar que la estructura química de la fase oleosa, es decir, la longitud de la cadena de los ácidos grasos, la configuración molecular y el número de enlaces insaturados, al igual que sus propiedades físico-químicas (viscosidad, tensión interfacial, polaridad, densidad e IR) son parámetros cruciales para la formación y estabilidad de la emulsión (Nikolovski *et al.*, 2016; Pavoni *et al.*, 2020; Salvia *et al.*, 2017).

Con relación a la interacción AC (Figura 10), segunda en importancia, se evidencia una disminución en la variable respuesta cuando la relación A-T es igual a 1:1 y la temperatura cambia de su nivel alto al bajo. Por el contrario, existe un incremento en la variable respuesta, cuando la temperatura decrece (cambia) de 60 a 40 °C y la relación A-T es igual a 1:2. En otras palabras, el factor de la temperatura tiene un efecto positivo o negativo sobre el tamaño de gota, dependiendo del nivel de C.

La temperatura, de acuerdo con McClements (2015) puede influir de diferentes formas en el tamaño de las gotas durante la homogeneización. Para empezar, la viscosidad de la fase oleosa y la fase acuosa depende de la temperatura, por lo tanto, una variación en la relación entre las viscosidades de la gota y la fase continua (η_D / η_C) puede alterar el tamaño mínimo de gota de la emulsión. Usualmente, la viscosidad de los aceites disminuye más rápidamente al aumentar la temperatura que la viscosidad del agua; por tanto, η_D / η_C para una emulsión de aceite en agua

tendería a disminuir, facilitando así la rotura de las gotas a temperaturas más altas. Además, calentar una emulsión suele provocar una ligera reducción de la tensión interfacial entre las fases de aceite y agua, lo cual podría contribuir a la formación de pequeñas gotas.

Además, la temperatura es un factor clave que incide directamente en la solubilidad de los tensoactivos en soluciones acuosas, y cuyo efecto ha sido observado principalmente en soluciones micelares de tensoactivos no iónicos (Jiménez *et al.*, 2010). Cuando una solución de surfactante se calienta por encima de cierta temperatura, conocida como punto de nube (PN), la solubilidad de los tensoactivos decrece gradualmente a causa de la deshidratación progresiva de los grupos de cabeza hidrofílica de las moléculas del tensioactivo, dando lugar a que las moléculas no solubles rompan el equilibrio existente entre las del tensoactivo y las del agua, formando superagregados de tensoactivo, lo cual provoca un cambio de fase y genera la turbidez (Jiménez *et al.*, 2010; McClements, 2015).

En el caso del surfactante Tween 20, se ha informado un punto de nube mayor a 70 °C (Dave y Joshi, 2018; Montoya, 2019), valor que no ha sido superado en los ensayos experimentales de este estudio. Sin embargo, se ha logrado observar un efecto sobre la tasa de coalescencia de la emulsión, al aumentar la temperatura y la concentración de los diferentes componentes que conforman la emulsión. Por tanto, es preciso señalar, la importancia de la interacción de los diferentes factores al momento de formular emulsiones estables.

6.7.2 Análisis del modelo de optimización superficie de respuesta

La Figura 11, muestra la superficie de respuesta y contorno para el tamaño de gota a las 48 h, variando dos de las variables independientes dentro del rango experimental y manteniendo la otra constante en el punto central.

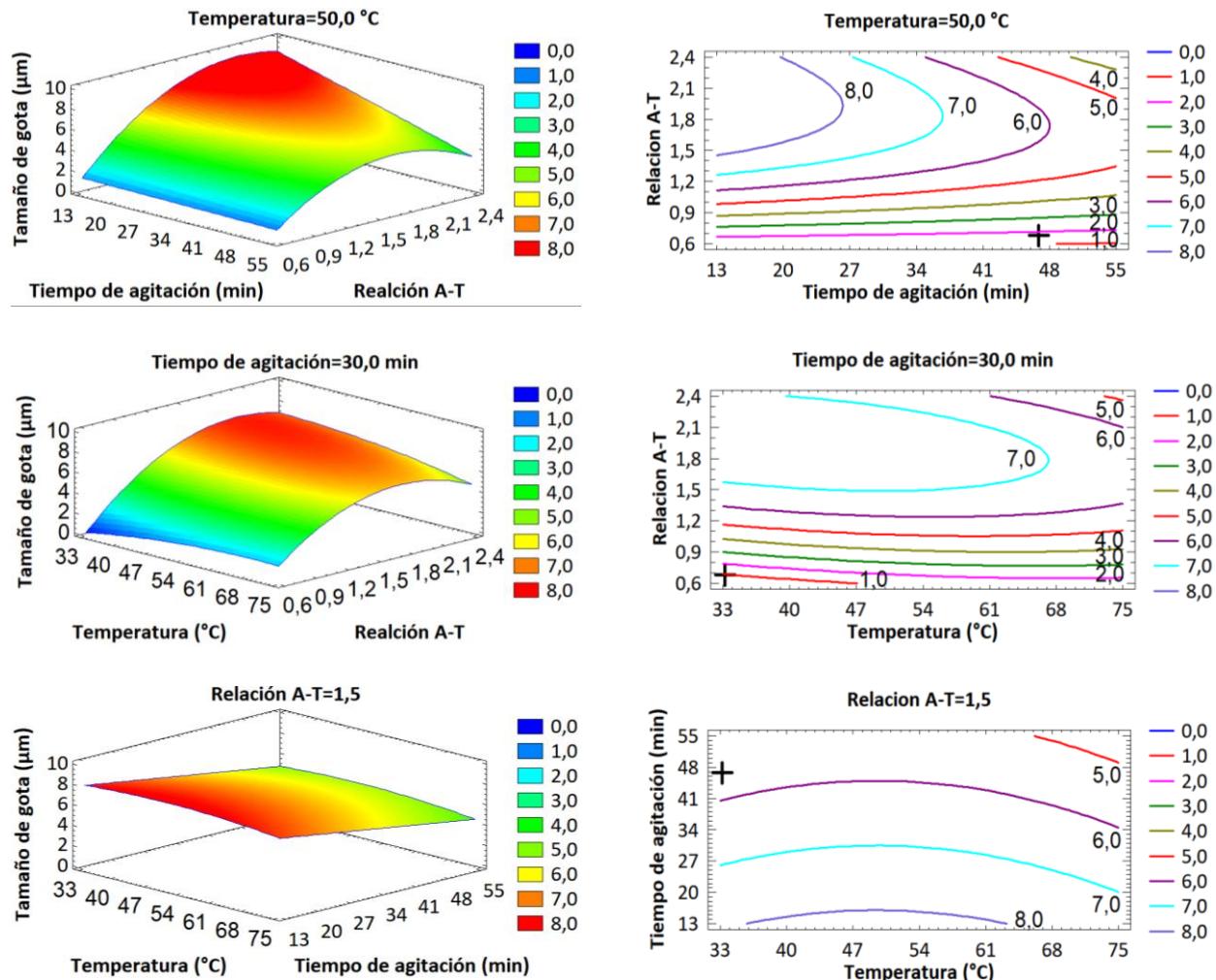
Al analizar la Figura 11, se puede observar que las condiciones óptimas para minimizar el tamaño de gota se encuentran alrededor de los puntos axiales de los tres factores en el estudio experimental. El modelo matemático estimó una temperatura de 33,2 °C, un tiempo de agitación de 46,82 min y una relación A-T de 1:0,68 como valores óptimos para obtener un tamaño mínimo de gota de 0,73 μm .

Para validar la capacidad predictiva del modelo se realizaron tres experimentos a las condiciones óptimas previstas. En los ensayos de validación, el tamaño de gota promedio fue de 1,29 μm con una desviación estándar de 0,18, un coeficiente de variación de 13,77 %, con un mínimo de 0,87 μm y un máximo de 1,63 μm . Estos valores confirman que el tamaño de gota obtenido experimentalmente está en buena correspondencia con el predicho (0,73 μm), corroborando la validez del modelo propuesto para la optimización.

Los resultados obtenidos estuvieron por debajo de los reportados por Arteaga (2018), cuyos valores estuvieron entre 4,11 y 6,96 μm . Las diferencias posiblemente se deban al aceite estudiado (aceite vegetal de semillas de papaya *Carica papaya*) y a los parámetros de optimización de la emulsión (temperatura de 60 °C, tiempo de agitación de 33,73 minutos y relación A-T 1:1).

Figura 11

Superficie de respuesta y contorno para el tamaño de gota a las 48 h



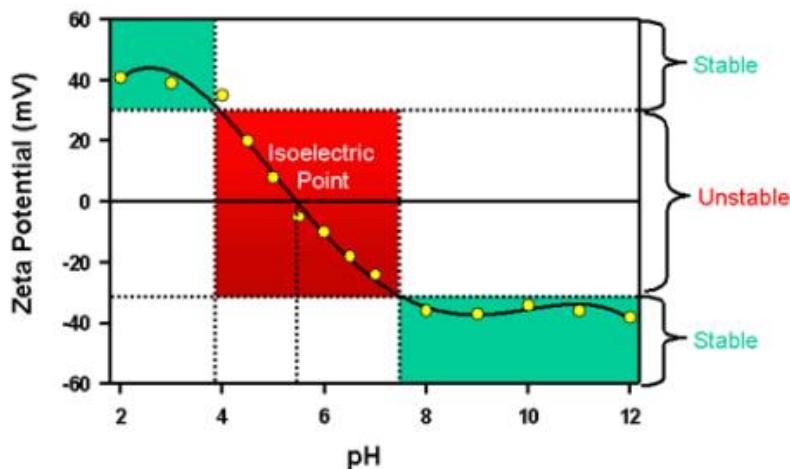
6.7.3 Influencia del pH en la estabilidad de las emulsiones a las 48 h

El valor de pH es un parámetro crítico que influye en la estabilidad de las emulsiones O/W (Lin *et al.*, 2016). Un cambio significativo en su valor puede afectar drásticamente la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas (potencial zeta) y por tanto, la estabilidad de la emulsión (Kosegarten y Jiménez, 2012; Malvern Panalytical, 2021).

Tal como se observa en la Figura 12, la línea divisoria entre emulsiones estables e inestables se toma generalmente en +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales zeta más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV, normalmente tienen suficiente fuerza repulsiva para lograr una mejor estabilidad física coloidal. Por otro lado, un valor de potencial zeta pequeño pueden resultar en la agregación y floculación de partículas debido a que las fuerzas de atracción de van der Waals actúan sobre ellas (Joseph y Singhvi, 2019; Malvern Panalytical, 2015).

Figura 12

Variación del potencial zeta en función del pH



Nota. La figura muestra la posición del punto isoeléctrico y los valores de pH en los sectores verdes donde se espera que la dispersión sea estable. Tomado de Malvern Panalytical, 2015, Zeta potential - An introduction in 30 minutes.

Bajo esta perspectiva, los resultados de la determinación del pH se muestran en la Tabla 18. De los 18 sistemas emulsionados, 15 (83,3%) presentaron un valor de pH por debajo de 7,5, mientras que 3 (16,7%) mostraron valores de pH por encima de este. Teniendo en cuenta que los problemas de estabilidad se dan generalmente a valores de pH entre 4 y 7,5 (+30 y -30 mV), se

puede inferir que las emulsiones correspondientes a los experimentos 13, 3 y 4 son los únicos sistemas estables en donde sus componentes no se alteraron significativamente durante el período de tiempo analizado.

De hecho, si se compara los valores de pH (Tabla 18) con los valores de tamaño de gota reportados en la Tabla 16, se observa que, en general las corridas experimentales con un valor de pH inferior a 7,5 son las mismas que presentaron fenómenos de inestabilidad con un tamaño de gota entre $4,34 \pm 0,06$ y $8,68 \pm 0,16 \mu\text{m}$.

Tabla 18

Resultados de pH de las emulsiones de aceite de Sach inchi a la hora 48

Exp.	Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (min)	Relación A-T	pH
1	40,0 (-1,0)	20,0 (-1,0)	1:1 (-1,0)	$7,29 \pm 0,05$
2	60,0 (+1,0)	20,0 (-1,0)	1:1 (-1,0)	$7,19 \pm 0,11$
3	40,0 (-1,0)	40,0 (+1,0)	1:1 (-1,0)	$7,58 \pm 0,04$
4	60,0 (+1,0)	40,0 (+1,0)	1:1 (-1,0)	$7,57 \pm 0,11$
5	40,0 (-1,0)	20,0 (-1,0)	1:2 (+1,0)	$6,19 \pm 0,07$
6	60,0 (+1,0)	20,0 (-1,0)	1:2 (+1,0)	$6,28 \pm 0,06$
7	40,0 (-1,0)	40,0 (+1,0)	1:2 (+1,0)	$7,26 \pm 0,09$
8	60,0 (+1,0)	40,0 (+1,0)	1:2 (+1,0)	$7,33 \pm 0,04$
9	33,2 (-1,68)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	$7,07 \pm 0,15$
10	66,8 (+1,68)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	$7,27 \pm 0,09$
11	50,0 (0)	13,2 (-1,68)	1:1,5 (0)	$6,54 \pm 0,08$
12	50,0 (0)	46,8 (+1,68)	1:1,5 (0)	$7,24 \pm 0,13$
13	50,0 (0)	30,0 (0)	1:0,7 (-1,68)	$7,62 \pm 0,03$
14	50,0 (0)	30,0 (0)	1:2,3 (+1,68)	$6,31 \pm 0,06$
15	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	$6,83 \pm 0,10$
16	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	$6,94 \pm 0,10$
17	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	$6,78 \pm 0,19$
18	50,0 (0)	30,0 (0)	1:1,5 (0)	$6,25 \pm 0,13$
Óptimo	33,2	46,82	1:0,68	$7,62 \pm 0,03$

6.8 Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de la emulsión

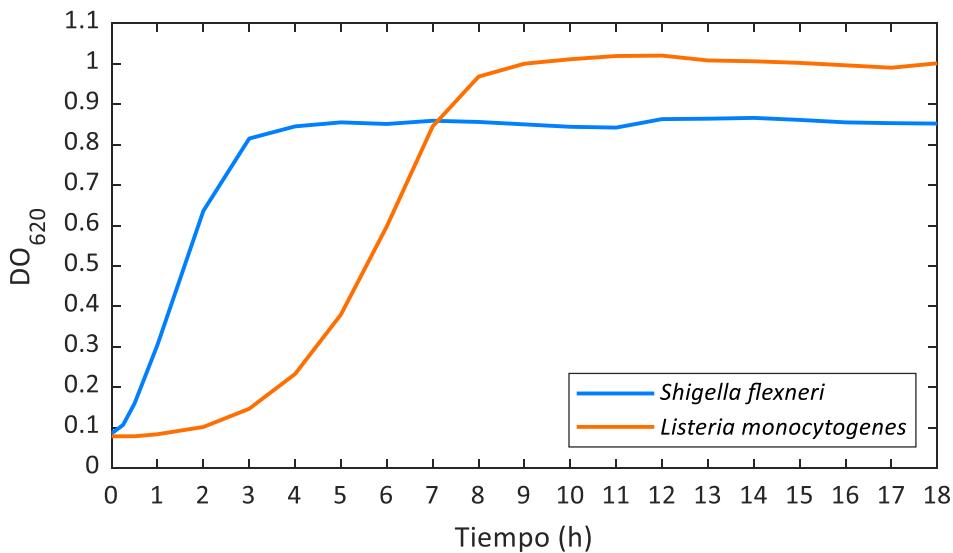
6.8.1 Crecimiento bacteriano por espectrofotometría

La Figura 13, presenta la curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en condiciones óptimas de crecimiento (37 °C en caldo BHI, suplementado con glucosa al 0.5%). Se observa que *L. monocytogenes* presenta una fase de latencia de aproximadamente 2 horas, seguida de una fase exponencial hasta las 9 horas y una fase estacionaria que no registra variaciones significativas hasta las 18 horas.

La cepa *S. flexneri* (Figura 13), bajo las mismas condiciones de cultivo, exhibe una fase de latencia más breve (25 minutos) y alcanza el máximo de población a las 4 horas de incubación sin registrar cambios significativos en la densidad celular hasta las 18 horas.

Figura 13

*Curvas de crecimiento en caldo BHI suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa de *L. monocytogenes* y *S. flexneri**



Resultados similares han sido reportados por Astorga (2015), Molina *et al.* (2009) y Rojas (2007), quienes señalaron una fase exponencial para *L. monocytogenes* entre la hora 2 y 8 de incubación y una fase estacionaria a partir de las 10 y 12 horas bajo las mismas condiciones de este estudio.

De acuerdo con Molina *et al.* (2009), los datos de las curvas obtenidas podrían estar asociados al caldo BHI suplementado con glucosa al 0.5% (p/v). A diferencia de otros estudios donde la fase estacionaria se alcanza a las 24 horas de incubación y donde se utiliza el caldo BHI sin suplementar con glucosa al 0,5%, la tasa de duplicación de *L monocytogenes* fue mayor; posiblemente debido a que la glucosa permite una mayor tasa de crecimiento al ser una fuente importante de carbono fácilmente metabolizable (Roberts *et al.*, 2020). Así mismo, el elevado contenido de nutrientes del caldo BHI pudo haber favorecido el rápido crecimiento de este patógeno, permitiéndole mantener sus características de antigenicidad, virulencia, toxicidad y termoresistencia (Molina *et al.*, 2009).

Por su parte, *S. flexneri* gracias a los antecedentes del inóculo, las condiciones de crecimiento y la naturaleza del medio, evidenció un crecimiento propio de enterobacterias caracterizado por una fase de latencia corta, una fase exponencial con una duración aproximada de 3 horas y media a 4 y una fase estacionaria donde no se produce un aumento o disminución neta del número de células (Madigan *et al.*, 2015; Martínez, 2010). De allí que, los resultados obtenidos evidencien una curva de crecimiento típica para un cultivo discontinuo obtenido en condiciones óptimas de crecimiento (Abdel, 2002).

Por otro lado, es importante destacar que el estudio de la dinámica del crecimiento de las poblaciones bacterianas a menudo resulta útil para probar el efecto positivo o negativo de cualquier agente antimicrobiano sobre un microorganismo (Abdel, 2002). Si bien es cierto, la

susceptibilidad de los microorganismos a agentes antimicrobianos varía significativamente (Madigan *et al.*, 2015) también es verdad que los microorganismos generalmente son mucho más sensibles a las condiciones adversas durante la fase logarítmica de crecimiento. Tal es el caso de la radiación y muchos fármacos antimicrobianos (p. ej., el antibiótico penicilina) que ejercen su efecto al interferir en algunos pasos importantes del proceso de crecimiento y por lo tanto son más perjudiciales para las células durante esta fase (Tortora *et al.*, 2007).

En este sentido, transferir las células de un cultivo que este en la fase exponencial al mismo medio y en las mismas condiciones de crecimiento, permitiría en primer lugar establecer el efecto del agente antimicrobiano sobre el microorganismo y en segundo lugar, haría que las bacterias inicien su crecimiento exponencial en un menor tiempo (Madigan *et al.*, 2015). Por ello, tomar un inóculo en esta fase (en el caso de *L. monocytogenes* a las 6 horas y en el caso de *S. flexneri* a las 4 horas) sería lo indicado para realizar los diferentes estudios que se mencionan a continuación.

Por otra parte, los resultados de pureza de la cepa *L. monocytogenes* durante el estudio evidenciaron al igual que Rojas (2007) y Tobo (2009) la presencia de bacilos Gram positivos, en algunos casos en forma de Y o V. Asimismo, los resultados de *S. flexneri* confirmaron la pureza del cultivo y la morfología microscópica característica de la bacteria (bacilos Gram negativos), coincidiendo con lo reportado por Weng *et al.* (2013).

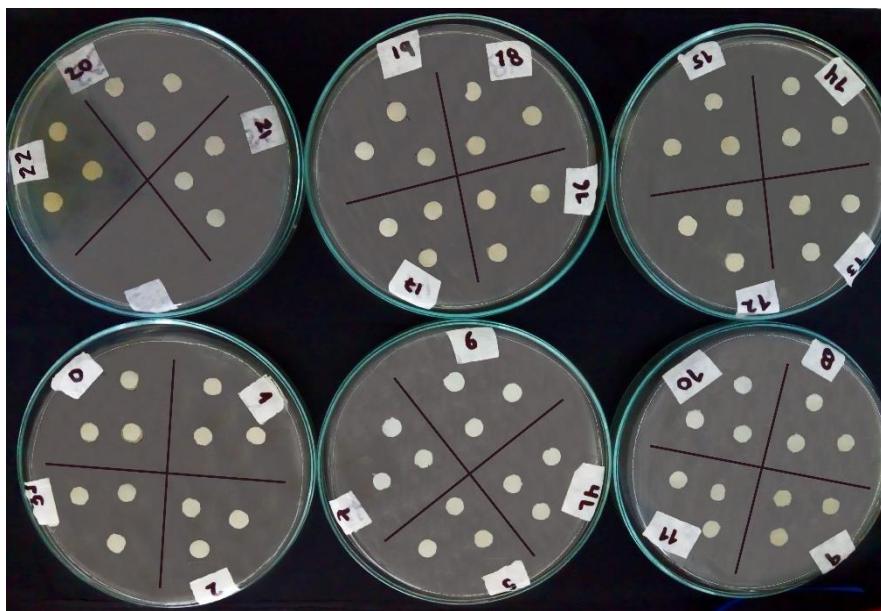
6.8.2 Difusión en disco

La actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi frente a *L. monocytogenes* y *S. flexneri* por el método de difusión en disco se muestra en las Figuras 14 y 15 respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos, ninguna de las emulsiones ensayadas presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los patógenos evaluados; puesto que no se evidenció la

presencia de halos de inhibición después de 24 horas de incubación. Los antibióticos por su parte, presentaron alta actividad antimicrobiana, lo cual demuestra que la concentración de microorganismos, la cantidad de medio de cultivo, la consistencia del agar y el grado de difusión fueron los apropiados y no interfirieron de forma adversa la acción de las emulsiones evaluadas (Salama y Solano, 2001). En el caso del Tween 20, no se evidenció efecto inhibitorio sobre las dos bacterias, por lo que se descartó su interferencia en los resultados obtenidos.

Figura 14

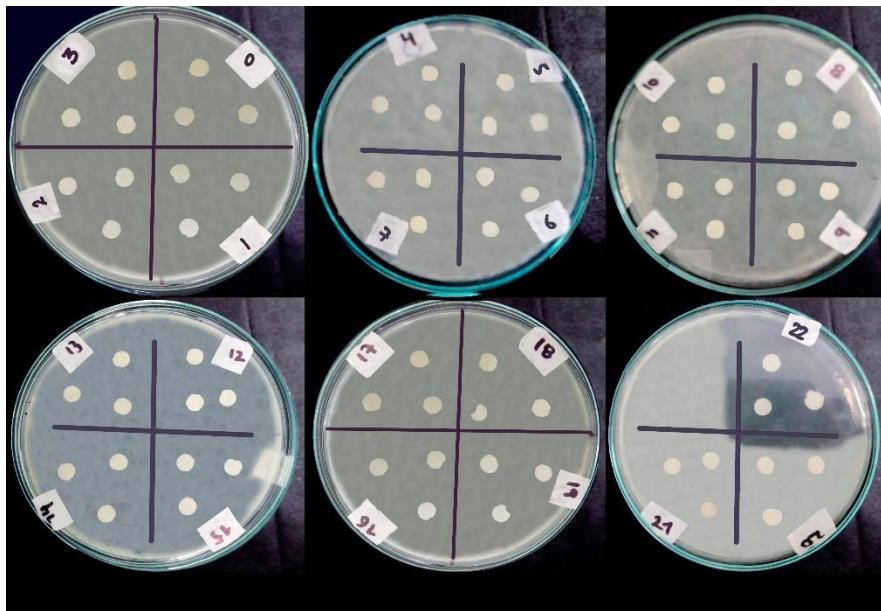
Actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi sobre L. monocytogenes por difusión en disco



Nota. Las muestras codificadas desde el número 0 hasta el 19 corresponden a las emulsiones aplicadas en orden ascendente de 5 en 5 desde la concentración 5 $\mu\text{L/mL}$ hasta la concentración 100 $\mu\text{L/mL}$. Los números 20, 21 y 22 hacen referencias al aceite puro, el control de Tween 20 y el control del antibiótico respectivamente.

Figura 15

Actividad antibacteriana del aceite de Sacha Inchi sobre S. flexneri por difusión en disco



Nota. La codificación es igual a la descrita en *L. monocytogenes*.

De acuerdo a la literatura revisada, la falta de actividad antimicrobiana no siempre significa la ausencia de compuestos bioactivos en la planta o que la planta no tenga actividad antimicrobiana contra los microorganismos (Manikkuwadura *et al.*, 2019). La polaridad de los disolventes de extracción puede influir en el rendimiento de la extracción y en el contenido de los compuestos bioactivos, lo que afecta significativamente la actividad biológica del aceite (Truong *et al.*, 2019). Igualmente, la presencia de cantidades inadecuadas de constituyentes activos o de otros componentes que ejerzan efectos antagónicos o anulen los efectos positivos de los principios activos, pueden ser la razón de los resultados negativos (Manikkuwadura *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2001).

Estudios como el de Xuan *et al.* (2018), en donde se analiza la actividad antimicrobiana de catorce extractos metanólicos obtenidos de aceites vegetales comercializados en Japón (aceite

de girasol, cártamo, canola, soja, algodón, uva, lino, perilla, aguacate, chia, inca Inchi o Sacha Inchi, perillartina, sésamo y salvado de arroz), demuestran el efecto inhibitorio de todos los aceites, incluido Sacha Inchi, sobre el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. La diferencia entre los resultados obtenidos en este experimento y aquellos obtenidos por estos autores pueden ser atribuidos en parte, a la presencia y/o concentración de los compuestos fenólicos.

De acuerdo con lo reportado por Walsh *et al.* (2019), los fenólicos constituyen una clase extensa de compuestos que han demostrado presentar propiedades antimicrobianas contra una amplia gama de bacterias. Se considera que estos componentes tienen muchos sitios de acción a nivel celular (Bouarab *et al.*, 2019). Existen al menos tres mecanismos en los que varios autores coinciden: i) modificación de la permeabilidad de las membranas celulares, formación de gránulos citoplasmáticos y ruptura de la membrana citoplasmática; ii) cambios en varias funciones intracelulares inducidas por los enlaces de hidrógeno de los compuestos fenólicos a enzimas a través de sus grupos OH; y iii) pérdida de rigidez e integridad de la pared celular inducida por diferentes interacciones con las membranas celulares (Bouarab *et al.*, 2019).

En estudios realizados por Fanali *et al.* (2011) y Ramos (2014) se ha logrado identificar diecisiete compuestos fenólicos en el aceite de Sacha Inchi; entre ellos se encuentran derivados secoiridoides como la oleuropeína aglicona (tres isómeros), ligustrósido aglicona (cinco isómeros), decarboximetil aglicona de la oleuropeína forma dialdehíca (3,4-DHPEA-DEDA) y otro compuesto estructuralmente relacionado a la oleuropeína como el ácido oleuropeico; fenil-alcoholes (hidroxitirosol y tirosol); isocoumarina (bergenina); lignano (pinoresinol) y flavonoides (isoramnetina glucósido, luteolina y apigenina). Entre los compuestos fenólicos, los secoiridoides alcanzaron el 47%, del contenido de fenoles totales, mientras que los flavonoides, lignanos y fenil-alcoholes ocuparon el 44%. De igual forma, Xuan *et al.* (2018) identificaron en

el aceite de Sacha Inchi la luteolina y reportaron la presencia de dos ácidos fenólicos (ácido vanílico y ácido benzoico) y un flavonoide (miricetina) que no habían sido identificados previamente por Fanali *et al.* (2011) y Ramos (2014).

Algunos de los compuestos anteriormente mencionados muestran actividades biológicas importantes. Se ha demostrado que la oleuropeína aglicona pueden inhibir o retrasar la tasa de crecimiento de una variedad de bacterias y microhongos (Bisignano *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 1973). La aglicona se compone de un ácido elenólico unido a través de un enlace éster a β -3,4-dihidroxifeniletilalcohol; dado que el alcohol por sí solo no presenta inhibición, el ácido elenólico parece ser el causante de la actividad antimicrobiana de la aglicona (Fleming *et al.*, 1973).

Asimismo, se ha demostrado que el micro hongos hidroxitirosol se presenta como un buen candidato para ser empleado como agente antimicrobiano contra bacterias patógenas en seres humanos, obteniéndose concentraciones mínimas inhibitorias que van de 1,90 - 15,60 $\mu\text{g/mL}$ para *Haemophilus influenzae*, 1,90 - 7,80 $\mu\text{g/mL}$ para *Salmonella* spp., 3,9 - 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* y 0,97 $\mu\text{g/mL}$ *Vibrio parahaemolyticus* siendo en ocasiones efectivo a menor concentración que la eritromicina y la ampicilina (Poza *et al.*, 2004). Igualmente, en estudios como el de Medina (2008) se ha identificado a las formas dialdehídicas del ácido elenólico unido a hidroxitirosol y tirosol como los compuestos con mayor actividad bactericida del aceite de oliva.

La bergenina por su parte, tiene una amplia posibilidad de actividades biológicas entre ellas actividad antioxidante y antifúngica frente a hongos de la especie Cándida (Muniz, 2013). No presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y negativas como *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo, los estudios muestran que la

actividad biológica de la bergenina puede ser optimizada mediante la modificación selectiva de su estructura (Nazir *et al.*, 2011).

La luteolina, uno de los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas, ha demostrado presentar efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Trueperella pyogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli* y *Salmonella Infantis*, al igual que potentes propiedades antimicrobianas sobre las células planctónicas y de biopelículas, y la formación de biopelículas de *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Guo *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2020; Skroza *et al.*, 2019).

En vista de lo anterior, y dado que el contenido total de fenoles del aceite fue menor ($0,11 \pm 0,016$ mg GAE/100 g de extracto de aceite) en comparación con el reportado por Xuan *et al.* (2018) ($13,29 \pm 0,05$ mg GAE/g de extracto de aceite); podría plantearse la posibilidad de que la acción de estos componentes a nivel celular fue muy baja como para mostrar una inhibición significativa frente a los patógenos evaluados.

Otros estudios como el de Moet *et al.* (2020), en donde se evalúa la actividad antimicrobiana de siete extractos de semilla de Sacha Inchi frente a *S. aureus* y *E. coli*, evidencian al igual que Xuan *et al.* (2018), un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de las dos bacterias, obteniendo incluso mayores halos de inhibición (24 mm y 22 mm; *S. aureus* y *E. coli* respectivamente) que los reportados por estos autores a la mayor concentración evaluada ($10,333 \pm 0,577$ mm y $12,333 \pm 1,528$ mm).

Estos resultados posiblemente también se deban, a que el contenido de compuestos fenólicos en la semilla en comparación con el aceite ha demostrado ser mucho mayor. Según lo reportado por Muñoz *et al.* (2013), gran parte de los compuestos fenólicos presentes en la semilla han sido identificados en la torta ($67,64 \pm 0,12$ mg GAE/kg en la fase hidrofílica y $12,83 \pm 0,60$

mg GAE/kg en la fase lipofílica:) mientras que la cantidad restante ha sido atribuida al aceite ($2,79 \pm 0,14$ mg GAE/kg en la fase hidrofílica y $15,50 \pm 0,36$ mg GAE/kg en la fase lipofílica).

No obstante, es importante tener en cuenta que la presencia y/o concentración de los principios activos puede variar de una planta a otra en función de diferentes situaciones tales como: ambientales (clima, estaciones y posición geográfica), variaciones genéticas, el estado nutricional de la planta, el tiempo de la cosecha, el sitio de muestreo, el momento de la recolección del material vegetal y el método de extracción (Argote *et al.*, 2017; Ben *et al.*, 2017).

Por otro lado, es preciso señalar que la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos además de depender de la dosis, también depende de la cepa bacteriana (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019; Ouerghemmi *et al.*, 2017). Estudios como el de Bouarab-Chibane *et al.* (2019) en donde se evaluó el efecto antimicrobiano de 35 polifenoles sobre el crecimiento de seis cepas bacterianas; tres Gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*) y tres Gram negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella Enteritidis*), demostraron que los efectos de los compuestos fenólicos pueden llegar a ser muy heterogéneos (desde la estimulación del crecimiento bacteriano hasta la actividad antibacteriana) dado que el mismo polifenol puede ser eficaz en un tipo de cepa Gram positiva (o Gram negativa) pero ineficaz en las otras.

Igualmente, es importante resaltar que los resultados obtenidos también pueden estar influenciados por la capacidad de difusión de los principios activos a través del agar (Eloff, 2019; Schumacher *et al.*, 2018). Si bien, el método de difusión en disco tiene claros beneficios en términos de ser relativamente rápido, fácil y económico, no está exento de presentar inconvenientes importantes. Una crítica comúnmente planteada es que debido a que el agar es una preparación acuosa, es posible que los compuestos antimicrobianos no polares o los

compuestos antimicrobianos con altos pesos moleculares, no se difundan fácilmente a través del agar (Green *et al.*, 2020).

En este contexto y dado que el dióxido de carbono supercrítico es intrínsecamente no polar y es un excelente disolvente para la extracción de compuestos no polares (Alara *et al.*, 2021; Týskiewicz *et al.*, 2018), resulta interesante y, a la vez, relevante considerar que un tamaño de zona de inhibición más pequeño o la ausencia del mismo no necesariamente equivale a un compuesto menos activo y que los tamaños de zona obtenidos para diferentes compuestos no siempre son directamente comparables (Green *et al.*, 2020).

6.8 3 Tiempo mínimo de inhibición (macrodilución en caldo)

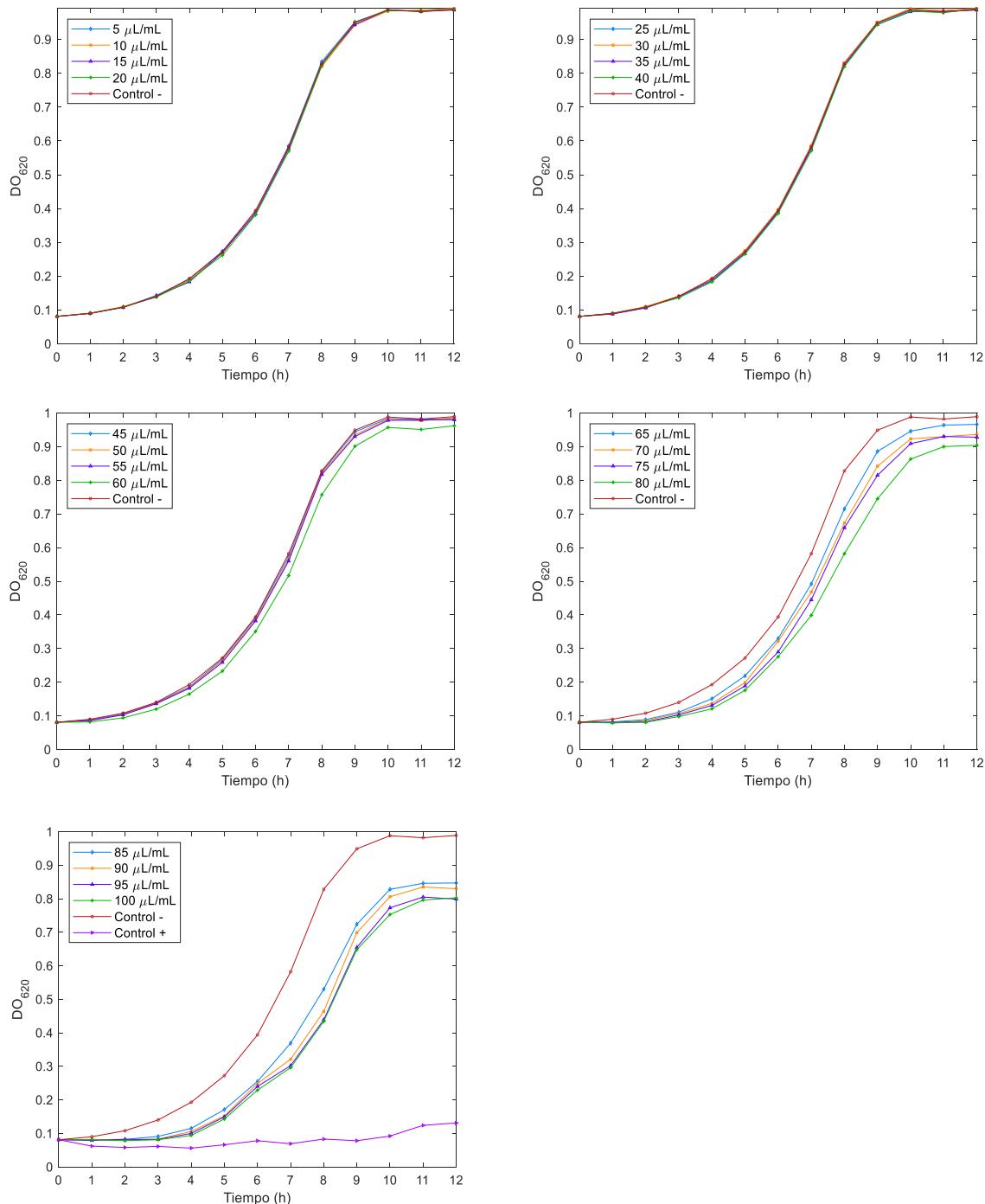
Las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* a diferentes concentraciones de aceite se muestran en la Figura 16. En ausencia de aceite (control negativo), *L. monocytogenes* muestra el comportamiento esperado: una fase de latencia o adaptación durante las 2 primeras horas, una segunda fase que va desde las 2 horas hasta las 10 horas de fermentación correspondiente a la fase exponencial y una tercera fase que va hasta las 12 horas en donde no se diferencia un aumento significativo en los valores de absorbancia.

Por otro lado, las curvas resultantes de la aplicación del aceite a sus diferentes concentraciones (5-100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) evidencian un patrón de crecimiento que sigue la tendencia de fase de latencia que, para las concentraciones de aceite de 5 a 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ finaliza a las 2 horas, mientras que para las concentraciones de 65 a 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se prolonga de 3 a 4 horas de incubación; la fase logarítmica o exponencial se mantiene desde las 2 horas hasta las 10 horas para las concentraciones de 5 a 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y a partir de este momento se mantiene en fase estacionaria hasta el final de las mediciones realizadas. Por otro lado, para las concentraciones de 65 a 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ la fase exponencial comienza después de 3-4 horas de incubación y se mantiene

hasta las 11 horas, con una declinación leve del crecimiento alcanzando un efecto máximo de inhibición de $19.21 \pm 0.02\%$ a una concentración de $95 \mu\text{L/mL}$ (Tabla 19).

Figura 16

*Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* a diferentes concentraciones de aceite*



En el caso de *S. flexneri*, todas las curvas muestran un patrón de crecimiento similar a la curva control, presentando una fase exponencial entre las 0 y 5 horas y una fase estacionaria que se mantiene sin cambios significativos hasta el final de las mediciones (Figura 17).

En cuanto al análisis de varianza, hubo diferencias estadísticamente significativas de la actividad antibacteriana entre las diferentes dosis evaluadas para cada una de las bacterias estudiadas ($p<0,05$). Por lo que se refiere a *L. monocytogenes*, en la prueba de múltiples rangos de Tukey (Tabla 19), todas las dosis a excepción de 5, 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ registraron diferencias significativas con respecto al control negativo. Aunque el control positivo tuvo la mayor actividad antibacteriana, se observó una inhibición significativa en el crecimiento de *L. monocytogenes*, principalmente a concentraciones iguales o superiores a 85 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

En relación con *S. flexneri* las comparaciones de media de Tukey (Tabla 19) mostraron los mayores valores de porcentajes de inhibición, bajo las dosis de 65 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($0,87 \pm 0,05 \%$) y 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($0,65 \pm 0,01 \%$). Sin embargo, es importante tener en cuenta que una acción antibacteriana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición relativo es $>70 \%$, intermedia entre el 50-70 % y baja cuando es $<50 \%$ (Ramírez y Díaz, 2007 como se citó en Cruz *et al.*, 2010). En consecuencia, en ambas pruebas, el aceite presentó baja actividad antibacteriana.

Tabla 19

*Porcentajes de inhibición del aceite frente a *L. monocytogenes* y *S. flexneri**

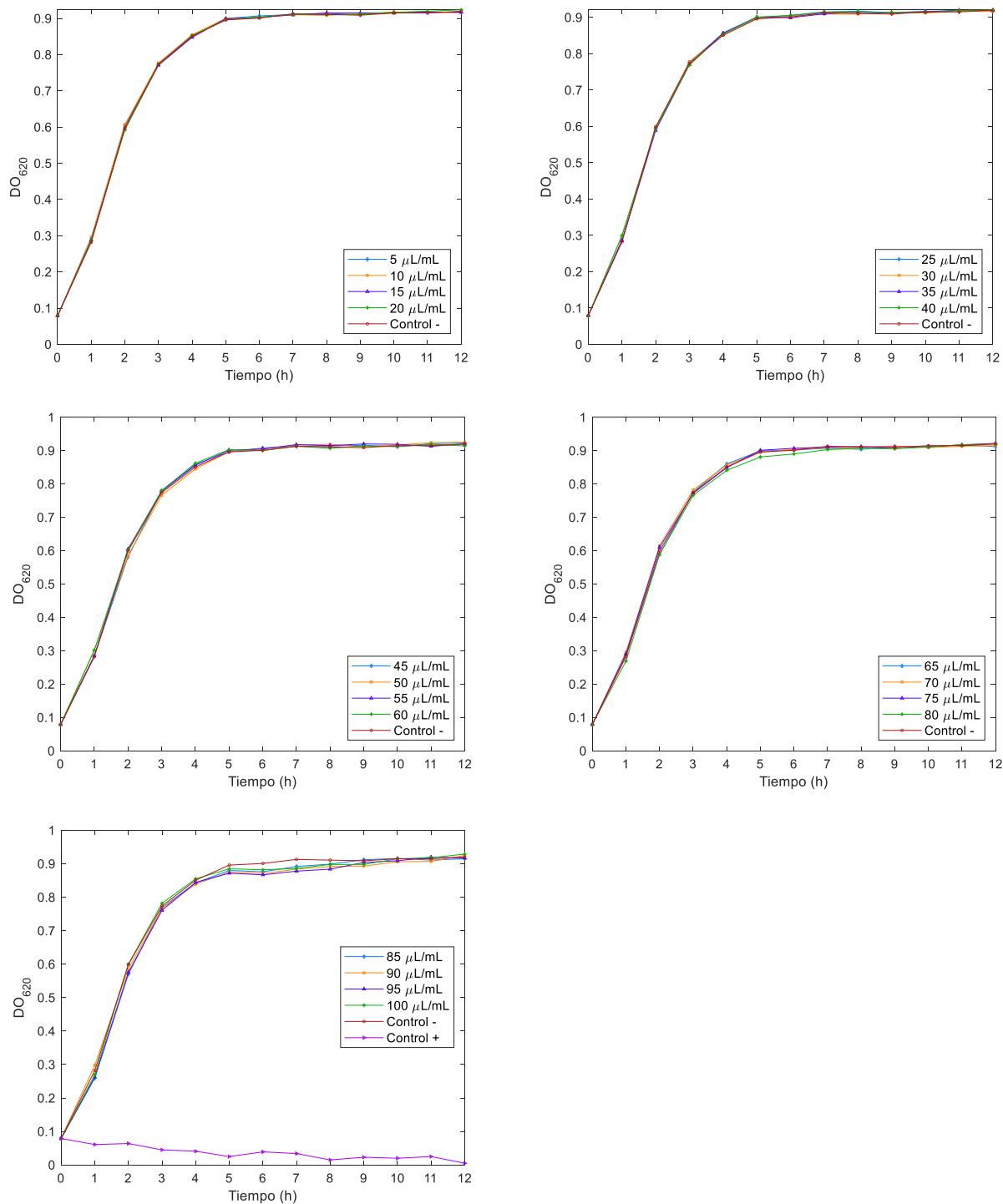
Concentración de aceite (μ L/mL)	% Inhibición	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. flexneri</i>
5	0,00 ± 0,00 ^a	0,22 ± 0,03 ^c
10	0,00 ± 0,00 ^a	0,43 ± 0,02 ^e
15	0,20 ± 0,02 ^c	0,33 ± 0,03 ^d
20	0,10 ± 0,03 ^{a,b,c}	0,00 ± 0,00 ^a
25	0,10 ± 0,03 ^{b,c}	0,22 ± 0,01 ^c
30	0,00 ± 0,00 ^{a,b}	0,43 ± 0,02 ^e
35	0,20 ± 0,01 ^c	0,11 ± 0,02 ^b
40	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
45	0,61 ± 0,04 ^e	0,00 ± 0,00 ^a
50	0,30 ± 0,05 ^d	0,00 ± 0,00 ^a
55	0,91 ± 0,03 ^f	0,00 ± 0,00 ^a
60	2,73 ± 0,04 ^h	0,65 ± 0,01 ^g
65	2,33 ± 0,05 ^g	0,87 ± 0,05 ^h
70	5,36 ± 0,04 ⁱ	0,54 ± 0,03 ^f
75	6,17 ± 0,03 ^j	0,00 ± 0,00 ^a
80	8,59 ± 0,02 ^k	0,00 ± 0,00 ^a
85	14,36 ± 0,03 ^{l*}	0,54 ± 0,04 ^f
90	16,08 ± 0,05 ^{m*}	0,00 ± 0,00 ^a
95	19,21 ± 0,02 ^{o*}	0,33 ± 0,02 ^d
100	18,81 ± 0,04 ^{n*}	0,00 ± 0,00 ^a
Control negativo	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Control positivo	86,75 ± 0,06 ^{p*}	99,46 ± 0,04 ⁱ

Nota. Los valores representan las medias ± desviación estándar (n = 3). Letras distintas en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey (p<0,05). Control negativo: medio de cultivo + inóculo; Control positivo: antibiótico + inóculo;

*Altamente significativo.

Figura 17

Curva de crecimiento de S. flexneri a diferentes concentraciones de aceite



De acuerdo con los resultados obtenidos, *L. monocytogenes* muestra mayor sensibilidad al aceite de Sacha Inchi que *S. flexneri*. En términos generales, la diferencia puede estar adscrita a que las bacterias Gram negativas presentan una membrana fosfolípida exterior que las hace casi impermeables a los compuestos lipofílicos, mientras que, las bacterias Gram positivas al no contar con esta barrera, permiten que los compuestos de los aceites interaccionen con la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, causando un incremento en la permeabilidad de la célula o unión en sitios específicos de transporte (López de Ávila *et al.*, 2013; Yousefi *et al.*, 2020).

Estudios en donde se ha evaluado el impacto del aceite de Sacha Inchi en el crecimiento y adherencia de *S. aureus* en la piel, han señalado que el aceite a pesar de no presentar ninguna actividad bactericida frente a este microorganismo, ha demostrado evitar su adherencia en la piel posiblemente por la presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico, que ha evidenciado aumentar la fluidez de la membrana celular (Gonzalez *et al.*, 2015).

Otros estudios como el de Mazzarrino *et al.* (2015) en donde se evalúa veintiún aceites esenciales frente a diez cepas de *Salmonella enterica* y diez de *L. monocytogenes*, también evidencian mayor resistencia por parte de las bacterias Gram negativas en comparación con las bacterias Gram positivas frente a los aceites estudiados. Sin embargo, cabe destacar que entre las *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* SE 44/06 fue la más sensible a los aceites esenciales, lo cual confirma, que incluso dentro de la misma especie, la biodiversidad de las cepas tiene crucial importancia en la resistencia a los antimicrobianos y, en consecuencia, es importante examinar mayor cantidad de cepas cuando se vaya a evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites.

Ahora bien, en lo referente a *L. monocytogenes* las concentraciones más altas de aceite dieron como resultado una fase de latencia más larga y una tasa de crecimiento específica más baja. De acuerdo con lo descrito por Mazzarrino *et al.* (2015) y Silva *et al.* (2015), un retraso en

el crecimiento de *L. monocytogenes* derivado de la extensión de la fase de latencia, es un resultado alentador que sugiere una especie de efecto bacteriostático. Según lo indicado por Li *et al.* (2016), una fase de latencia prolongada puede estar estrechamente asociada con el potencial de una cepa o una comunidad bacteriana para desarrollar tolerancia y persistencia frente a un agente antimicrobiano. Si bien, no se conoce exactamente cómo las bacterias pueden detectar las condiciones extracelulares y desencadenar la extensión de la fase de latencia, si se ha observado un proceso dinámico, organizado, adaptativo y evolutivo que permite a las bacterias responder al estrés provocado por los agentes antimicrobianos (Bertranda, 2019).

De hecho, varios autores han señalado que la exposición a los aceites o a extractos donde existe la presencia de compuestos fenólicos, puede ser un evento estresante para las células bacterianas por lo que un alargamiento en la fase de latencia puede considerarse como el tiempo necesario para que las bacterias reparen los daños celulares y restauren las condiciones fisiológicas óptimas (Mazzarrino *et al.*, 2015; Serio *et al.*, 2010; Serio *et al.*, 2014).

Así pues, teniendo presente que una fase de latencia prolongada ofrece ventajas para la supervivencia de las bacterias y promueve su recrecimiento tras la eliminación del agente antimicrobiano (Li *et al.*, 2016), es posible confirmar la hipótesis de que los halos de inhibición probablemente fueron influenciados por la capacidad de difusión de los compuestos y las características propias de cada cepa bacteriana. Igualmente, el haber evidenciado un posible efecto bacteriostático y no un efecto bactericida podría estar relacionado con el hecho de que no todos los metabolitos con actividad antimicrobiana presentes en la semilla se extraen fácilmente con dióxido de carbono supercrítico (Alara *et al.*, 2021).

Sin embargo, es importante mencionar que la limitación de los fluidos supercríticos no polares se puede superar fácilmente por adición de pequeñas cantidades de disolvente orgánico

polar, el cual recibe el nombre de modificador, codisolvente, segundo disolvente o cosolvente.

La adición de este modificador provoca cambios en las propiedades del fluido supercrítico, presentando cierta polaridad, lo que permitirá aumentar su capacidad disolvente y extraer de forma eficaz compuestos polares como la mayoría de los polifenoles que han demostrado tener un papel central en la inhibición de *L. monocytogenes* (Alara *et al.*, 2021; Román *et al.*, 2016; Týskiewicz *et al.*, 2018; Zamuz *et al.*, 2021).

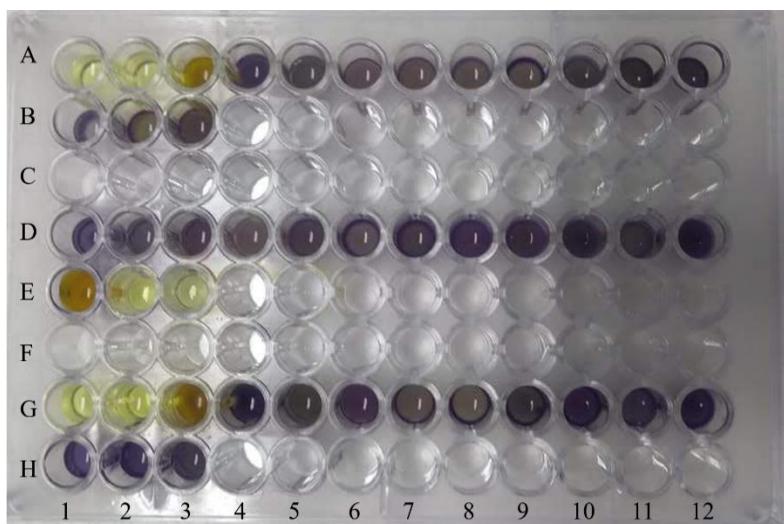
6.8.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caja de Elisa

En la Figura 18 y 19 se muestran los resultados de la prueba de inhibición bacteriana a través de microdilución en caja de Elisa. Los pozos donde no se observa ningún cambio de color indican la ausencia de bacterias viables (Argote *et al.*, 2017).

En la Tabla 20 se resume los resultados obtenidos de la CMI del aceite frente a las dos cepas bacterianas. Se observa que el aceite de Sacha Inchi no presenta actividad antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* y *S. flexneri* en las concentraciones estudiadas. También se observa un crecimiento abundante en el control negativo y en el control de Tween 20, y un crecimiento nulo en el control positivo y en los dos controles de esterilidad, lo cual valida los resultados obtenidos.

Figura 18

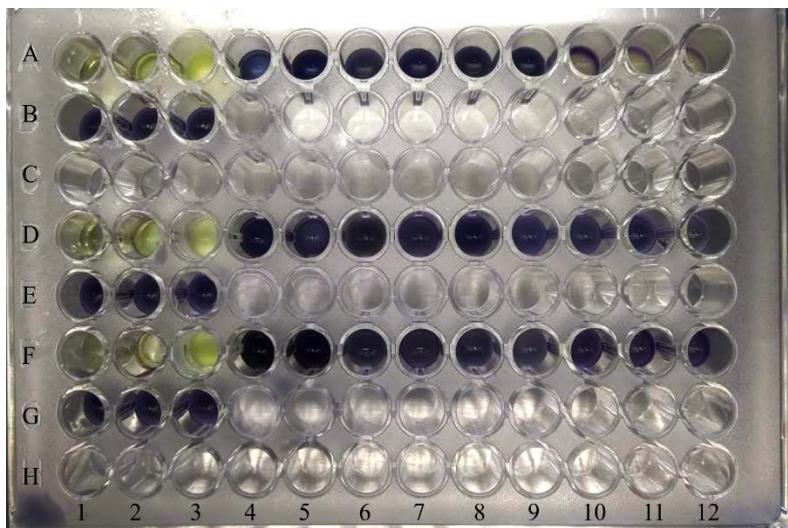
Actividad antibacteriana del aceite sobre L. monocytogenes por microdilución en caldo



Nota. Línea A y G (Columna 1: Control de esterilidad del medio de cultivo BHI, Columna 2: Control de esterilidad del aceite, Columna 3: Control positivo, Columna 4: Control negativo, Columna 5: Control de Tween 20, Columna 6 - 12: Emulsiones aplicadas en orden ascendente de 10 en 10 desde la concentración 10 μ L/mL hasta la concentración 70 μ L/mL; Línea B y H- Columna 1-3: Continuación de las emulsiones desde la concentración 80 μ L/mL hasta la concentración 100 μ L/mL; Línea D (Columna 1: Control negativo, Columna 2: Control de Tween 20, Columna 3 -12: Emulsiones aplicadas en orden ascendente de 10 en 10 desde la concentración 10 μ L/mL hasta la concentración 100 μ L/mL; Línea E (Columna 1: Control positivo, Columna 2: Control de esterilidad del aceite, Columna 3: Control de esterilidad del medio de cultivo BHI).

Figura 19

Actividad antibacteriana del aceite sobre S. flexneri por microdilución en caldo



Nota. Línea A, B y F (Columna 1: Control de esterilidad del medio de cultivo BHI, Columna 2: Control de esterilidad del aceite, Columna 3: Control positivo, Columna 4: Control negativo, Columna 5: Control de Tween 20, Columna 6 -12: Emulsiones aplicadas en orden ascendente de 10 en 10 desde la concentración 10 μ L/mL hasta la concentración 70 μ L/mL; Línea B, E y G- Columna 1-3: Continuación de las emulsiones desde la concentración 80 μ L/mL hasta la concentración 100 μ L/mL.

Tabla 20

Resumen de los resultados de CMI obtenidos después del cultivo de las cepas bacterianas después de 20 horas de incubación

Cepa bacteriana	Controles					Concentración de aceite por pocillo ($\mu\text{L/mL}$)								
	A	B	C	D	E	10	20	30	40	50	60	70	80	90
<i>L. monocytogenes</i>														
	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réplica del ensayo	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. flexneri</i>														
	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réplica del ensayo	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota. A: Control de esterilidad del medio de cultivo BHI, B: Control de esterilidad del aceite, C: Control positivo, D: Control negativo, E: Control de Tween 20.

De acuerdo a estos resultados, es posible considerar que el aceite de Sacha Inchi no causó una disminución notoria en la supervivencia celular de las cepas evaluadas; sin embargo, es importante considerar que la microdilución en caldo colorimétrico al igual que muchas pruebas de susceptibilidad (difusión en disco), no permiten monitorear el crecimiento microbiano a lo largo del tiempo y se limitan únicamente a determinar el punto final del crecimiento (Wilkinson, 2006). De allí que los resultados obtenidos, precisen menor información que los reportados por turbidimetría, donde el seguimiento del crecimiento de las células bacterianas proporciona información valiosa sobre su fisiología nutricional y energética, así como una comprensión de las condiciones de supervivencia y proliferación de diferentes especies en diferentes condiciones (Maia *et al.*, 2016).

7. Conclusiones

Las pruebas fisicoquímicas revelaron que el aceite extraído con dióxido de carbono supercrítico presentó un grado de insaturación alto y que es apto para su comercialización. Se encontró la siguiente relación a mayor índice de yodo ($200,54 \pm 0,95 \text{ I}_2/100\text{g}$), mayor índice de refracción ($1,4824 \pm 0,0018$) y mayor densidad ($0,9145 \pm 0,0161 \text{ g/mL}$). Presentó, además, un bajo índice de peróxidos ($1,56 \pm 0,18 \text{ meqO}_2/\text{kg}$), lo cual es una característica de los aceites con alta resistencia a la oxidación.

El aceite de Sacha Inchi extraído con dióxido de carbono supercrítico presentó como ácido graso mayoritario el ácido linolénico, seguido del linoleico y en menor proporción el ácido oleico, palmítico y esteárico.

El aceite de Sacha Inchi presentó un bajo contenido en compuestos fenólicos totales ($0,11 \pm 0,016 \text{ mg GAE}/100 \text{ g de extracto de aceite}$), con respecto a otros aceites vegetales.

Para la obtención de una emulsión estable, las condiciones óptimas estimadas por el método superficie respuesta fueron una temperatura de $33,2^\circ\text{C}$, tiempo de agitación de 46,82 min y relación A-T de 1:0,68.

El aceite no presentó actividad antibacteriana sobre *S. flexneri* a las dosis estudiadas, pero mostró un porcentaje máximo de inhibición de $19,21 \pm 0,02\%$ frente a *L. monocytogenes*, a $95 \mu\text{L/mL}$ en el método de macrodilución en caldo.

8. Recomendaciones

Para determinar mejor la estabilidad de las emulsiones, se recomienda medir la atracción o repulsión electrostática entre partículas (potencial zeta) para entender más en profundidad la propensión de las partículas a agregarse, dispersarse o flocular.

Se recomienda complementar el método de microdilución colorimétrico en caldo, con técnicas cuantitativas que permitan controlar y monitorear el crecimiento de los microorganismos en tiempo real.

Referencias

- Abdel, S. M. A. (2002). *Studies on the mechanism of zinc pyrithione resistance in Pseudomonas aeruginosa PAO1* [Tesis de doctorado] University of Abertay Dundee. Abertay University's research portal. <https://rke.abertay.ac.uk/en/studentTheses/studies-on-the-mechanism-of-zinc-pyrithione-resistance-inpseudomo>
- Acacio, N. J. & Zumalacárregui de Cárdenas, L. M. (2017). Procesos tecnológicos para la obtención de β-caroteno y glicerol a partir de Dunaliella sp.en la Salina “Las Cumaraaguas.” *Rev. Cubana Quím.*, 29(3), 341–361.
- Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria (2017). *Listeria monocytogenes* [archivo pdf]. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-04-Listeria-v01.pdf>
- Adrianzén, N., Rojas, C., & Linares, G. (2011). Effect of temperature and time of thermal treatment of crushed almonds Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) on the performance and physical-chemical characteristics of oil obtained by cold mechanical pressing. *Agroindustrial Science*, 2, 46–55. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2011.02.01>
- Agencia Iberoamericana para la difusión de la Ciencia y la Tecnología. (2014). *Sacha inchi, aceite indígena con valor medicinal*. <https://www.dicyt.com/noticias/sacha-inchi-aceite-indigena-con-valor-medicinal>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Alayón, A. N., & Echeverri, I. (2016). Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo): ¿una experiencia ancestral desaprovechada? evidencias clínicas asociadas a su consumo. *Revista*

- Chilena de Nutrición*, 43(2), 167–171. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000200009>
- Aldaz, A. (2018). *Diseño del proceso de obtención de harina apartir de las semillas del fruto del árbol de pan (Artocarpus Communis)* [Tesis de pregrado] Escuela Superior Politecnica de Chimborazo. <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/10533>
- Álvarez, F. J., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2020). Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. *Biomedicines*, 8(10), 405. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>
- Alvarez, M. S. (2013). *Estabilidad de emulsiones y encapsulación de aceites con propiedades nutraceuticas* [Tesis de Doctorado]. Universidad de Buenos Aires, http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5363_AlvarezCerimedo
- Aranda, J., Villacrés, J., & Rios, F. (2019). Composición química, características físico-químicas, trazas metálicas y evaluación genotóxica del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi). *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 4(1), 4–14. <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2019.41.103>
- Araújo, T. B., Chaves, F. C. M., & Dairiki, J. K. (2018). Seeds of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*, Euphorbiaceae) as a feed ingredient for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characidae). *Acta Amazonica*, 48(1), 32–37. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201700753>
- Argote, F. E., Suarez, Z. J., Tobar, M. E., Perez, J. A., Hurtado, A. M., & Delgado, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 52–60. [https://doi.org/https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\).593](https://doi.org/https://doi.org/10.18684/bsaa(15).593)
- Arteaga, E. H. (2018). *Estudio in vitro de la actividad antibacteriana del aceite vegetal de*

- semilla de papaya (Carica papaya) frente a microbiota bacteriana de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)*. [Tesis de pregrado, Universidad de Nariño]. Respositorio Institucional de la Universidad de Nariño.
- Asensio, C. M., Quiroga, P. R., Al-Gburi, A., Huang, Q., & Gross, N. R. (2020). Rheological behavior, antimicrobial and quorum sensing inhibition study of an argentinean oregano essential oil nanoemulsion. *Frontiers in Nutrition*, 7, 569913.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.569913>
- Astorga, L. E. (2015). *Evaluación de la sensibilidad a agentes germicidas y antibióticos en cepas de Listeria monocytogenes aisladas a partir de hortalizas* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. Repositorio Institucional - UNSAAC
- Baldeón, D., Velásquez, F., & Castellanos, J. E. (2015). Utilización de plukenetia volubilis (Sacha Inchi) para mejorar los componentes nutricionales de la hamburguesa. *Enfoque UTE*, 6(2), 59–76. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v6n2.60>
- Ben, M., Bel Hadj Salah-Fatnassi, K., Ncibi, S., Elaissi, A., & Zourgui, L. (2017). Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of Teucrium polium L. subsp. gabesianum (L.H.) from Tunisia. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 723–729. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0444-9>
- Benítez, R., Coronell, C., & Martin, J. (2018). Chemical characterization sacha inchi (*plukenetia volubilis*) seed: oleaginosa promising from the Colombian Amazon. *International Journal of Current Science Research and Review*, 01(01), 1–12.
- Bertranda, R. L. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*, 201(7), 1-18.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Bisignano, G., Tomaino, A., LoCascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974. <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- Bondi, M., Lauková, A., De Niederhausern, S., Messi, P., & Papadopoulou, C. (2017). Natural preservatives to improve food quality and safety. *Journal of Food Quality*, 2017, Article ID 1090932. <https://doi.org/10.1155/2017/1090932>
- Bonifaz, S. Me. (2016). *Prevalencia de Shigelosis en niños de 2 a 12 años en una población socioeconómica baja de Salcedo-Cotopaxi mediante el aislamiento microbiológico por el periodo enero-mayo del 2016*. [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador].
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9734>
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Frontiers in Microbiology*, 10, 829. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>
- Bouarab, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Boy, F. R., Casquete, R., Martínez, A., Córdoba, M. de G., Ruíz-Moyano, S., & Benito, M. J. (2021). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of phenolic compounds obtained from native plants by different extraction methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 1–12.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18052475>

- Briceño, J. I. (2017). *Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Citrus limetta sobre el crecimiento de Listeria monocytogenes*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9020>
- Calvo, J., & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 284–295.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Castaño, D. L., Valencia, M. del P., Murillo, E., Mendez, J. J., & Eras, J. (2012). Composición de ácidos grasos de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) y su relación con la bioactividad del vegetal. *Revista chilena de nutrición*, 39(1), 45-52.
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100005>
- Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., & Jimenez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17(2), 149–154.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200006&lng=en&tlang=es
- Cerqueira, K. (2018). *Desenvolvimento De Micropartículas Contendo Óleo De Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.) Através De Gelificação Iônica*. [Tesis de Maestria, Universidade Estadual de Campinas]. <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/332083>
- Chandrasekaran, U., & Liu, A. (2015). Stage-specific metabolism of triacylglycerols during seed germination of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Journal of the Science of Food*

- and Agriculture*, 95(8), 1764–1766. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6855>
- Chasquibol, N. A., del Aguila, C., Yácono, J. C., Guinda, Á., Moreda, W., Gómez, R. B., & Pérez, M. C. (2014). Characterization of glyceridic and unsaponifiable compounds of Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana* L.) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10162–10169. <https://doi.org/10.1021/jf5028697>
- Chen, G., & Tao, D. (2005). An experimental study of stability of oil-water emulsion. *Fuel Processing Technology*, 86(5), 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.03.010>
- Chirinos, R., Necochea, O., Pedreschi, R., & Campos, D. (2016). Original article Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell :an alternative source of phenolic compounds and antioxidants. *Food Science y Technology*, 51(4), 986–993.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.13049>
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Cedano, I., & Campos, D. (2015). Antioxidants from Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) control lipid oxidation in Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*L.) oil and raw ground pork meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2612–2619. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12511>
- Christie, W. W. (1998). Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids*, 33, 343–353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11745-998-0214-x>
- CODEX ALIMENTARIUS. (1981). Norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales (CODEX STAND 19).
- CODEX ALIMENTARIUS. (1981). *Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva* (CODEX STAN 33).
- CODEX ALIMENTARIUS. (1999). *Norma del Codex para aceites vegetales especificados*

(CODEX STAN 210).

Colquehuanca, E. Y. (2017). Efecto de diferentes niveles de dietas alimentarias en base a torta de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) en la alimentación de paco (*Piaractus brachypomus*) en la región Madre de Dios. *Revista de Investigaciones de La Escuela de Posgrado*, 6(3), 264–270. <http://dx.doi.org/10.26788/riepg.2017.49>

Colucci, G., Santamaria-Echart, A., Silva, S. C., Fernandes, I. P. M., Sipoli, C. C., & Barreiro, M. F. (2020). Development of water-in-oil emulsions as delivery vehicles and testing with a natural antimicrobial extract. *Molecules*, 25(9), 2105.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25092105>

Corzo, D. C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 43(3), 81–86.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300009&lng=es&tlang=es

Cruz, A., Rodríguez, N., & Rodríguez, C. E. (2010). Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 117–124.

<https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.738>

Cunha, F. de P., Vilela, M. L., Maximiano, T., Barbosa, T. M., Guimarães, D., & Toledo, R. C. (2017). *Shigella* sp: Um problema de saúde pública. *Higiene Alimentar*, 21(264/265), 52–57.

Cusimano, M. G., Di Stefano, V., La Giglia, M., Di Marco Lo presti, V., Schillaci, D., Pomilio, F., & Vitale, M. (2020). Control of growth and persistence of *Listeria monocytogenes* and β -lactam-resistant processing settings. *molecules*, 25(2), 383.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25020383>

Dave, N., & Joshi, T. (2018). Cloud point analysis: Influence of additives on polysorbate.

Journal of Dispersion Science and Technology, 39(4), 548–551.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/01932691.2017.1334563>

Dávila del Carpio, G., & Zanabria, D. (2013). Extracción de aceite de las semillas de *Plukenetia volubilis* l. “Sacha inchi” rico en ácidos linolénico, linoléico y oléico por fluidos

supercríticos (FSC). *Segundo Encuentro de Investigadores Ambientales*. h

<https://repositoriodigital.minam.gob.pe/handle/123456789/543>

De los Angeles, M. (2017). *Determinación del índice de saponificación en aceite de maíz usando una lipasa de procedencia nacional*. [Tesis de Pregrado, Universidad de los Andes].

https://www.researchgate.net/profile/Cristobal_Larez_Velasquez/publication/320622547_Determinacion_del_indice_de_saponificacion_en_aceite_de_maiz_usando_una_lipasa_de_procedencia_nacional/links/59f1cd97a6fdcc1dc7b92469/Determinacion-del-indice-de-saponificacion-en-aceite-de-maiz-usando-una-lipasa-de-procedencia-nacional.pdf

Dekker, J. P., & Frank, K. M. (2015). *Salmonella*, *shigella*, and *yersinia*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 225–246. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.002>

Delgado, J., Grande, C. D., Menjívar, J. C., & Sánchez, M. S. (2016). Relationship between refractive index and thymol concentration in essential oils of *lippia origanoides* kunth. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 32(2), 127–133.

<https://doi.org/10.4067/S0719-38902016000200006>

Do Prado, I. M., Giufrida, W. M., Alvarez, V. H., Cabral, V. F., Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. A., & Cardozo-Filho, L. (2011). Phase equilibrium measurements of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis*) and CO₂ at high pressures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(1), 1–10.

- Society*, 88(8), 1263-1269. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1786-z>
- Donat, V. (2017). *Aceites vegetales en cosmética* [Archivo pdf].
<http://www.industriacosmetica.net/descargar/articulos-descarga-directa/2mu2CkBZLF0LL2QTgvp4mzh2>
- Dorado, D., Hurtado, A.M., & Martínez, H. (2016). Extracción con CO₂ Supercrítico de aceite de semillas de guanábana (*Annona muricata*): Cinética, perfil de ácidos grasos y esteroles. *Informacion Tecnologica*, 27(5), 37–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>
- Dorado, D.J., Hurtado, A.M., & Martínez, H. (2017). Extracción supercrítica de aceite de papaya (*Carica papaya*): Composición y propiedades. *Revista Vitae*, 24(2), 35-45.
<https://revistas.udea.edu.co/index.php/vitae/article/view/330539>
- Durán, S., Torres, J., & Sanhueza, J. (2015). Aceites vegetales de uso frecuente en sudamérica: características y propiedades. *Nutrición Hospitalaria*, 32(1), 11–1911.
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.8874>
- Ecosistema Empresarial Agroindustrial Inclusivo en Red SumaSach'a. (2018). *Manual técnico: Producción Agrícola e Industrialización del Cultivo del Sacha Inchi, Mediante un Ecosistema Agroindustrial Inclusivo en Red*. <https://issuu.com/enuvo/docs/manual>
- Elgegren, M., Kim, S., Cordova, D., Silva, C., Noro, J., Cavaco-Paulo, A., & Nakamatsu, J. (2019). Ultrasound-assisted encapsulation of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo.) oil in alginate-chitosan nanoparticles. *Polymers*, 11(8), 1245.
<https://doi.org/10.3390/polym11081245>
- Elmogahzy, Y. E. (2020). Finished fibrous assemblies. In *Engineering Textiles* (pp. 275–298). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102488-1.00011-3>

- Eloff, J. N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 01-08. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>
- Fanali, C., Dugo, L., Cacciola, F., Beccaria, M., Grasso, S., Dachà, M., Dugo, P., & Mondello, L. (2011). Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13043–13049. <https://doi.org/10.1021/jf203184y>
- Fernandez, Y. (2014). *Obtención de queso fresco con mezcla de leche de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.) y leche fresca*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Martín]. <http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/521>
- Figueroa, P. M., Hurtado, A.M., & Ceballos, M.A. (2016). Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraido con CO₂ supercrítico. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 39–47. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>
- Fleming, H. P., Walter, W. M., & Etchells, J. L. (1973). Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives1. *Applied Microbiology*, 26(5), 777–782. <https://doi.org/10.1128/am.26.5.777-782.1973>
- Flores, G. A., Valencia del Toro, G., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Stability evaluation of β-Carotene nanoemulsions prepared by homogenization-emulsification process using stearic acid as oil phase. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 667–680. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1665-27382015000300010&lng=pt&nrm=iso&tlang=en
- Follegatti, L. A., Piantino, C. R., Grimaldi, R., & Cabral, F. A. (2009). Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal*

- of Supercritical Fluids*, 49(3), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.03.010>
- Folleatti, L., & Cabral, A. (2007). *Extração de óleo de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.) com dióxido de carbono supercrítico*. [Tesis de maestría, Universidad Estadual de Campinas].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). *Foodborne illnesses in Asia-Pacific ‘needlessly’ sicken 275 million annually and threaten trade*. FAO Regional Office for Asia and the Pacific. <https://www.fao.org/asiapacific/news/detail-events/en/c/1197008/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1987). Chapter 7 Seed storage. In *A guide to forest seed handling (FAO)*.
- Forero, Y., Galindo, M., & Ramírez, G. (2017). Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Revista Chilena de Nutricion*, 44(4), 325–332. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400325>
- Fu, Y., Sarkar, P., Bhunia, A. K., & Yao, Y. (2016). Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends in Food Science and Technology*, 57(1), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.013>
- Gallegos, J., Arrieta, G., Máttar, S., Poutou, R., Trespalacios, A., & Carrascal, A. (2007). Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 996–1012. <https://doi.org/10.21897/rmvz.420>
- Garcia, I. (2001). *Obtención de aceite de orujo mediante extracción con fluidos supercríticos*. Tesis de pregrado, Universidad Castilla La Mancha]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=71254>
- Garmus, T. T., de Oliveira Giani, N. A., Rammazzina Filho, W. A., Queiroga, C. L., & Cabral, F. A. (2019). Solubility of oleic acid, triacylglycerol and their mixtures in supercritical

- carbon dioxide and thermodynamic modeling of phase equilibrium. *Journal of Supercritical Fluids*, 143, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.018>
- Gonzalez, G., Belkhelfa, H., Haddioui-Hbabi, L., Bourdy, G., & Deharo, E. (2015). Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococcus aureus* to human skin explant and keratinocytes *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 171, 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.009>
- González, J. I., Medina-Vivanco, M. L., Garay-Montes, R., & Mendieta-Taboada, O. W. (2017). Desarrollo de películas comestibles a partir de proteínas extraídas de la torta de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Informacion Tecnologica*, 28(5), 115–130. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642017000500013>
- González, A., & Alós, J. I. (2015). Shigelosis, la importancia de la higiene en la prevención. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 33(3), 143–144. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.001>
- Green, K. J., Dods, K., & Hammer, K. A. (2020). Development and validation of a new microplate assay that utilises optical density to quantify the antibacterial activity of honeys including Jarrah, Marri and Manuka. *PLoS ONE*, 15(12), e0243246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243246>
- Guerrero, J. A. (2016). *Protocolo de vigilancia en salud pública. Enfermedades transmitidas por alimentos* [Archivo pdf]. http://www.hosusana.gov.co/sites/default/files/u1/capacitacion/PRO_Enfermedades_Trans._por_alimentos.pdf
- Guevara, J., Rojas, S., Carcelén, F., & Seminario, L. (2016). Enriquecimiento de la carne de cuy (*cavia porcellus*) con ácidos grasos omega-3 mediante dietas con aceite de pescado y

- semillas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 27(1), 45–50. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11450>
- Guo, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Chen, M., Zhang, D., Tian, C., Liu, M., & Jiang, G. (2020). The antibacterial activity and mechanism of action of luteolin against *Trueperella pyogenes*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1697–1711. <https://doi.org/10.2147/IDR.S253363>
- Gutiérrez, H., & De la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw - Hill.
- Gutiérrez, L. A., & Agudelo, D. A. (2009). Control del crecimiento *In Vitro* sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis. *Revista Lasallista de Investigación*, 6(1), 67–74.
- Gutiérrez, L. F., Rosada, L. M., & Jiménez, Á. (2011). Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y Aceites*, 62(1), 76–83. <https://doi.org/10.3989/gya044510>
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Henao, J. C., & Barreto, O. T. (2016). Recursos y nuevas opciones en la alimentación animal: torta de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 7(1), 83–92. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-es
- Hidalgo, L., Valdiviezo, C., & Bonilla, S. (2019). Caracterización del aceite de la semilla de Sacha Inchi (*plukenetia volubilis*) del cantón san vicente, manabí, ecuador, obtenida mediante procesos no térmicos de extrusión. *Revista de Ciencias de La Vida*, 30(2), 77–87. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.17163/lgr.n30.2019.07>
- Hincapié, L. (2016). *Modelamiento del proceso de extracción del aceite de Sacha Inchi*

- (*Plukenetia volubilis L.*) por solventes. [Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica de Pereira]. Repositorio Institucional-Universidad Tecnológica de Pereira
- Holmgren, J., & Lundgren, A. (2018). 18 – Diarrhea caused by bacteria. *Plotkin's Vaccines*, 252-260.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00018-3>
- Hurtado, Z. A. (2013). *Análisis composicional de la torta y aceite de semillas de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) cultivada en Colombia* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/21717>
- IFA. (2020a). *alpha Linolenic acid*. GESTIS Substance Database. [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/530450.xml?f=templates\\$fn=document-frameset.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/530450.xml?f=templates$fn=document-frameset.htm$3.0)
- IFA. (2020b). *Linolic acid*. GESTIS Substance Database. Institut For Occupational Safety And Health Of The German Social Accident Insurance. [http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/530450.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/530450.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2016). *Listeria monocytogenes* [Archivo pdf]. <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Listeria+monocytogenes+2017.pdf/208c08a>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2016). *Vigilancia Shigella spp. 2010-2015* [Archivo pdf]. https://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletin_Shigella_2010_2015.pdf
- Instituto Nacional de Salud de Colombia. (2021). *BES boletín epidemiológico semanal* [Archivo pdf]. https://www.ins.gov.co/busador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_4.pdf
- Jiménez, M. G. (2015). Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto. *Revista Varianza, 11*, 31–36.

- http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S9876-67892015000100007&lng=en&nrm=iso
- Jiménez, D., Medina, S. A., & Gracida, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y produccion de biotenoactivos. In *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 26 (1), 65–84.
- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992010000100006&lng=es&tlang=es
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). Listeria monocytogenes in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86, 181–213. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2018.02.006>
- Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015). El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Rev Chilena Infectol*, 32(6), 678–688.
- Joseph, E., & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 91–116). Elsevier.
- <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2>
- Jung, M. Y., Park, J. S., & Yoon, S. H. (2016). Quantitative determination of conjugated linoleic acids in hydrogenated vegetable oils using refractive index. *Food Science and Biotechnology*, 25(1), 121–124. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0018-6>
- Kodahl, N. (2020). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.)—from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges? *Planta*, 251(4), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03377-3>
- Kosegarten, C. E., & Jiménez, M. T. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 1–18.
- <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Kosegarten-Conde-et-al-2012.pdf>

- Kowalska, M., Krztoń-Maziopa, A., Babut, M., & Mitrosz, P. (2020). Rheological and physical analysis of oil-water emulsion based on enzymatic structured fat. *Rheologica Acta*, 59, 717–726. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00397-020-01232-6](https://doi.org/10.1007/s00397-020-01232-6)
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2016). One pot synthesis and characterization of gold nanocatalyst using Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) oil: Green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 55–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.023>
- Lakkhana, C., Atong, D., & Sricharoenchaikul, V. (2017). Fuel Gas Generation from Gasification of Sacha Inchi Shell using a Drop Tube Reactor. *Energy Procedia*, 138, 870–876. <https://doi.org/10.1016/J.EGYPRO.2017.10.109>
- Laskawy, G., Senser, F., & Grosch, W. (1983). Storage stability of roasted hazelnuts. *Chocolate, Confectionery and Bakery*, 8(3), 21–23.
- León, S. (2001). Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco*, 7(3), 0.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48770306>
- Li, B., Qiu, Y., Shi, H., & Yin, H. (2016). The importance of lag time extension in determining bacterial resistance to antibiotics. *Analyst*, 141, 3059–3067.
<https://doi.org/10.1039/c5an02649k>
- Li, P. H., & Chiang, B. H. (2012). Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(1), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.017>
- Lin, K.-Y. A., Chen, Y.-C., & Phattarapattamawong, S. (2016). Efficient Demulsification of Oil-in-Water Emulsions using a Zeolitic Imidazo- late Framework: Adsorptive Removal of Oil Droplets from Water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 478, 97–106.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.057>

Londoño, I. T., & Núñez, A. Ma. (2015). *Optimización para la validación de métodos cualitativos en la detección de Listeria monocytogenes en quesos frescos producidos en el departamento de Risaralda*. [Tesis de pregrado, Universidad Libre Seccional Pereira].

<https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/16146>

López de Ávila, L. M., Castaño, H. I., & Mejía, C. E. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos pátogenos transmitidos por alimentos. *Actualidades Biológicas*, 35(98), 77–83.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&typid=S0304-35842013000100007yng=enytlng=es

López, M. A., Valbuena, E., Quihui, L., Morales, G. G., Ruiz, S., Campos, J. C., Díaz, E., & Pablos, D. E. (2017). Efecto de microemulsiones de aceites esenciales sobre el eritrocito humano y bacterias patógenas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 38(1), 247–254.

<https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.19>

Macas, G. M. (2016). *Utilización de diferentes niveles de semilla de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*), en conejos neozelandeses en la etapa de gestación - lactancia*. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14th ed.). Pearson.

Maia, M. R. G., Marques, S., Cabrita, A. R. J., Wallace, R. J., Thompson, G., Fonseca, A. J. M., & Oliveira, H. M. (2016). Simple and versatile turbidimetric monitoring of bacterial growth in liquid cultures using a customized 3D printed culture tube holder and a miniaturized spectrophotometer: Application to facultative and strictly anaerobic bacteria. *Frontiers in*

- Microbiology*, 7, 1381. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01381>
- Malvern Panalytical. (2015). *Zeta potential - An introduction in 30 minutes*.
<https://www.malvernpanalytical.com/es/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction>
- Malvern Panalytical. (2021). *Potencial zeta*.
<https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/zeta-potential>
- Manikkuwadura, H. N. D. Z., Hasanga, R., Ruwani, P. H., & Weerasinghe, M. D. G. B. W. (2019). Determination of *in vitro* antimicrobial activity of five Sri Lankan medicinal plants against Selected Human pathogenic bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2019, 8. <https://doi.org/10.1155/2019/7431439>
- Mantilla, J., Pulido, M., & Jaime, J. (2010). Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(3), 168–177.
- Martínez, O. M. (2010). *Obtención de un preparado vacunal inmunogénico y protectogénico en modelos animales a partir de aislamientos autóctonos de Shigella sonnei* [Tesis de doctorado, Instituto de Ciencias Básicas y Pre-clínicas “Victoria de Girón”].
- Mattio, L. M., Dallavalle, S., Musso, L., Filardi, R., Franzetti, L., Pellegrino, L., D’Incecco, P., Mora, D., Pinto, A., & Arioli, S. (2019). Antimicrobial activity of resveratrol-derived monomers and dimers against foodborne pathogens. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55975-1>
- Maurer, N. E., Hatta, B., Pascual, G., & Rodriguez, L. E. (2012). Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry*, 134(2), 1173–1180.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.143>
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone, D., & Serio, A. (2015). *Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils*. *Food Control*, 50, 794–803. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029>
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques, third edition*. CRC Press.
- McClements, D. J., & Jafari, S. M. (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 251, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- Medina, E. (2008). *Antimicrobianos polifenólicos y oleosídicos en alimentos derivados de la aceituna* [Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla]. Depósito de Investigación Universidad de Sevilla.
- Messerli, M., Shejbal, J., Vitali, F., & Keme, T. (1983). The storage of hazelnuts at room temperature under nitrogen, pt. 2. *Review for Chocolate, Confectionery and Bakery*, 8(2), 15–20.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *2019-06-30 Cifras Sectoriales SACHA INCHI*. Sistema de Información de Gestión y Desempeño de Organizaciones de Cadenas. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2019-06-30 Cifras Sectoriales SACHA INCHI.pdf>
- Moet, K., Ye, N., & Win, Z. (2020). Diagnostic Characters of Powdered Seeds and Antibacterial Activities of Seed Extract of *Plukenetia volubilis* L. with Different Solvents. *3rd Myanmar-Korea Conference Research Journal*, 3(2), 486–492.

<https://www.dagonuniversity.edu.mm/category/research/3rd-myanmar-koera-conference-vol-3-no2-2020/page/2/>

Molano, A. B., Vega, N., & Lopez, J. (2016). *Producción y comercialización del aceite Sacha Inchi cultivado en Colombia con fines de exportación a Alemania*. [Tesis de pregrado,

Universidad Distrital Francisco José de Caldas].

Molina, S. N., Mercado, M., & Carrascal, A. K. (2009). Effect of cooking time and temperature on sausages artificially inoculated with *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 14(3), 198–205. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc14-2-3.edty>

Montgomery, D. C. (2003). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa-Wiley.

Montoya, A. (2019). *Formulación de emulsiones naturales de aceites y ceras en agua*. [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Cartagena].

<https://repositorio.upct.es/xmlui/handle/10317/7984?show=full>

Morales, A. F. (2015). *Efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo (thymus vulgaris) sobre la contaminación de Listeria monocytogenes en queso ricotta*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55569>

Moreira, J. B., Goularte, P. G., De Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2019). Preparation of beta-carotene nanoemulsion and evaluation of stability at a long storage period. *Food Science and Technology*, 39(3), 599–604. <https://doi.org/10.1590/fst.31317>

Morón de Salim, A. R., & Ramírez, L. G. (2013). Efecto bacteriostático y/o bactericida del xilitol sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 63(2), 173–179.

Muniz, M. P. (2013). *Estudo fitoquímico e da atividade biológica de Endopleura uchi Huber Cuatrecasas* [Tesis de maestría, Universidade Federal do Amazonas]. Biblioteca Digital-

- Universidade Federal do Amazonas
- Muñoz, A. M., Alvarado, C., Ramos, F., Castañeda, B., Barnett, E., Cárdenas, L., Yáñez, J., Cajaleón, D., & Encina, C. (2013). Estudio de polifenoles, taninos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante de la semilla de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Horizonte Médico*, 13(1), 11–18. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637128003>
- Nazir, N., Koul, S., Qurishi, M. A., Najar, M. H., & Zargar, M. I. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 2415–2420. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.03.025>
- Nikolovski, B. G., Ilić, J. D., & Sovilj, M. N. (2016). How to formulate a stable and monodisperse water-in-oil nanoemulsion containing pumpkin seed oil: The use of multiobjective optimization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 919–931. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160334s20140140>
- Norma Técnica Colombiana (1998). Grasas y Aceites Vegetales y Animales. Determinación del Índice de Yodo (NTC 283).
- Norma Técnica Colombiana. (1998). Grasas y Aceites Animales y Vegetales. Determinación del Índice de Saponificación (NTC 335).
- Norma Técnica Colombiana. (1999). *Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de acidez y de la acidez* (NTC 218).
- Norma Técnica Colombiana. (2002). Grasas y aceites animales y vegetales. Método de la determinación de la densidad (masa por volumen convencional) (NTC 336).
- Norma Técnica Colombiana. (2002). Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación del índice de refracción (NTC 289).

Norma Técnica Colombiana. (2011). *Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de peróxidos* (NTC 236).

Norma Técnica Peruana. (2014). SACHA INCHI. Aceite. Requisitos (NTP 151.400).

Norma, A., & Echeverri, I. (2016). Sacha Inchi (*plukenetia volubilis* linneo): ¿una experiencia ancestral desaprovechada? evidencias clínicas asociadas a su consumo. *Revista Chilena de Nutrición*, 43(2), 9–9. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000200009>

Ochoa, J. F., & Sánchez-Rodríguez, A. (2017). Caracterización molecular y criopreservación de hongos y bacterias asociados a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados por minería. *Bionatura*, 2(2), 288–295.

Oliveira, S. C., Vendramini, D. B., Betim, C. B., Maróstica, M. R., Borges, J. P., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*, 232, 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.002>

Organización Mundial de la salud (OMS). (2018). *Listeriosis*. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>

Organización Mundial de la salud (OMS). (2020). *Inocuidad de los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Querghemmi, I., Bettaieb Rebey, I., Rahali, F. Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Marzouk, B., & Saidani Tounsi, M. (2017). Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.04.001>

Pabon, L., Rodriguez, M., & Hernández, P. (2017). Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Blacpma*, 16(6), 529–

546.

- Pantoja, A. L. (2016). *Extracción de aceites con fluidos supercríticos a partir de semillas de frutas con potencialidad en la industria cosmética*. [Tesis de maestría, Universidad de Nariño]. http://bdigital.unal.edu.co/54767/1/Tesis-Ana_Lucia_Pantoja_Chamorro-2016.pdf
- Pantoja, A. L., Hurtado, A., & Martínez, H. A. (2017). Evaluación del Rendimiento, Composición y Actividad Antioxidante de Aceite de Semillas de Mora (*Rubus glaucus*) Extraído con CO₂ Supercrítico. *Informacion Tecnologica*, 28(1), 35–46.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100005>
- Pascual, G., & Mejía, M. (2000). Extracción y caracterización de aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Anales Científicos UNALM*, 42, 143–157.
- Paucar-Menacho, L. M., Salvador-Reyes, R., Guillén-Sánchez, J., Capa-Robles, J., & Moreno-Rojo, C. (2015). Comparative study of physical-chemical features of Sacha Inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.), olive oil (*Olea europaea*) and fish oil. *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 279–290. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.05>
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). An Overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, 10 (1), 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>
- Periódico La Campana. (2016). *Cultivos que prometen: Sacha Inchi y alpiste*.
<https://www.periodicolacampana.com/cultivos-que-prometen-sacha-inchi-y-alpiste/>
- PeruBioInnova. (23 de agosto de 2017). *Análisis de la cadena de valor del Sacha Inchi en San Martín al 2016*. https://issuu.com/educ007/docs/analisis_de_la_cadena_de_valor_del_
- Powell, S. L. (2018). *Enfermedades trasmittidas por alimentos. Guantánamo, 2002-2016*. Cuba Salud.

Poza, M., de la Fuente, P., Chamorro, P., & Moreno, M. (2004). Propiedades antioxidantes del hidroxitirosol procedente de la hoja de olico (*olea europaea L.*). *Revista de Fitoterapia*, 4(2), 139–147.

Presidencia de la República de Colombia. (8 de marzo de 2018). *Guaviare, primer departamento exitoso en sustitución: campesinos y gobierno cumplieron los acuerdos*.

<http://www.posconflicto.gov.co/sala-prensa/noticias/2018/Paginas/20180308-guaviare-primer-departamento-exitoso-en-sustitucion-campesinos-y-gobierno-cumplieron-los-acuerdos.aspx>

Puentes, J., & Hurrell, J. (2015). Plantas andinas y sus productos comercializados con fines medicinales y alimentarios en el área metropolitana Buenos Aires-La Plata, Argentina. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(3), 206–236.

Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2018). Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. In *Journal of Infection and Public Health*, 11(4), 451–454.

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.025>

Qian, W., Liu, M., Fu, Y., Zhang, J., Liu, W., Li, J., Li, X., Li, Y., & Wang, T. (2020). Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104056.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104056>

Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-silleras, B., & Redondo-Del-río, M. P. (2019). Food safety through natural antimicrobials. *Antibiotics*, 8(4), 208.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>

Ramírez, N., Baena, Y., & Osorio, C. (2019). Physicochemical characterization of O/W

- emulsions from goldenberry (*Physalis peruviana*) as an ingredient for food industry. *Informacion Tecnologica*, 30(3), 147–156. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000300147>
- Ramos, D. (2014). *Caracterización y trazabilidad del aceite de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis Linneo)*. [Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla]. Depósito de Investigación Universida de Sevilla
- Ramos, F., Ponce, Lady, Barnett, E., Celi, L., & Ramos, M. (2016). Perfil de ácidos grasos de aceite de Sacha Inchi (*plukenetia volubilis*) en comparación con otros combustibles. *Campus*, 21(21), 101–108. <https://doi.org/10.24265/campus.2016.v21n21.10>
- Rawdkuen, S., Murdayanti, D., Ketnawa, S., & Phongthai, S. (2016). Chemical properties and nutritional factors of pressed-cake from tea and Sacha Inchi seeds. *Food Bioscience*, 15, 64–71. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2016.05.004>
- Red de Seguridad Alimentaria del CONICET. (2017). *Evaluación de riesgos de *L. monocytogenes* en chacinados embutidos secos y salazones crudas* [Archivo pdf]. <https://rsa.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/2018/04/Informe-Final-2-ECR-Listeria-en-embutidos-y-salazones-RSA.pdf>
- Reina, E. (2018). *Análisis de Omega -3 y Omega -6 en amaranto (A. Quitensis), Sacha Inchi (Plukenetia volubilis l.) y Nuez Macadamia (Ternifolia Muell.), por cromatografía y su aplicación en una barra nutricional*. [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte].
- Roberts, B. N., Chakravarty, D., Gardner, J. C., Ricke, S. C., & Donaldson, J. R. (2020). Listeria monocytogenes response to anaerobic environments. *Pathogens*, 9(3), 1–9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030210>
- Rodriguez, A. C., Ströher, G. L., Freitas, A. R., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., & de Souza,

- N. E. (2011). The effect of genotype and roasting on the fatty acid composition of peanuts. *Food Research International*, 44(1), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.042>
- Rodríguez, G., Villanueva, E., Glorio, P., & Baquerizo, M. (2015). Estabilidad oxidativa y estimación de la vida útil del aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 155–163. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.02>
- Rodríguez, M. R. (2016). *Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación*. [Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=126543>
- Rodríguez, P., Rodríguez, J., Vázquez, D., & López, M. (2018). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7(6), 85. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
- Rojas, C. (2007). *Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá* [Tesis de pregrado, Pontificada Universidad Javeriana].
- Román, M. A., Rivera, C. M., Cardona, L. M., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., Passaro, C., & Quiceno, J. M. (2016). *Guía de extracción por fluidos supercríticos : fundamentos y aplicaciones*. Servicio Nacional de Aprendizaje-SENA [Archivo pdf].
<https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/4698>
- Saengsorn, K., & Jimtaisong, A. (2017). Determination of hydrophilic–lipophilic balance value and emulsion properties of Sacha Inchi oil. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1092–1096. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.011>
- Salager, J.L., Andérez, J. M., Briceño, M. I., Pérez de Sánchez, M., & Ramírez de Gouveia, M.

- (2002). Rendimiento de emulsionación en función de la formulación, de la composición y de la energía de agitación. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 25(3), 129–139.
- Salama, A., & Solano, P. P. (2001). Actividad antinociceptiva, antimicrobiana y antitumoral de Cucumis anguria. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 30(1), 81–86. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/1706>
- Saldivar, J. C., Davis, M. L., Johnson, M. G., & Ricke, S. C. (2018). Listeria monocytogenes Adaptation and Growth at Low Temperatures: Mechanisms and Implications for Foodborne Disease. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 227–248). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811835-1.00013-0>
- Salvia, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Physicochemical Characterization of Lemongrass Essential Oil-Alginate Nanoemulsions: Effect of Ultrasound Processing Parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2439–2446. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0881-y>
- Salvia, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Graü, M. A., McClements, D. J., & Martín-Belloso, O. (2017). Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 439–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025908>
- Sánchez, G. L. (2012). *Caracterización y cuantificación de los ácidos grasos omega 3 y omega 6 presentes en el aceite de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11657>
- Sánchez, M. (2010). *Evaluación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y actividad antimutagénica de los extractos de camu-camu (Myrciaria dubia) y yacón (Smallanthus*

- sonchifolius)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina].
- Sánchez, S. (2019). *Influencia de la temperatura y el tiempo de secado-tostado sobre la calidad fisicoquímica de las semillas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann].
- Sánchez, E., & Mesa, M. D. (2018). Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica En Medicina*, 12(2), 80–94.
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C., & Habibovic, P. (2018). *In vitro* antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2), 187–208.
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>
- Serio, A., Chaves-López, C., Martuscelli, M., Mazzarrino, G., Di Mattia, C., & Paparella, A. (2014). Application of Central Composite Design to evaluate the antilisterial activity of hydro-alcohol berry extract of *Myrtus communis* L. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.027>
- Serio, A., Chiarini, M., Tettamanti, E., & Paparella, A. (2010). Electronic paramagnetic Resonance investigation of the activity of *Origanum vulgare* L. essential oil on the *Listeria monocytogenes* membrane. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 149–157.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02877.x>
- Siddiqui, N., Ph, D., Rauf, A., Unani, M. D., Latif, A., Unani, M. D., Mahmood, Z., & Unani, M. D. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content , spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e- Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 4–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2016.11.006>

- Silva, K. F. C. e., da Silva Carvalho, A. G., Rabelo, R. S., & Hubinger, M. D. (2019). Sacha Inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. *Food and Bioproducts Processing*, 116, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.05.001>
- Silva, A. B., Zanini, S. F., Rosenthal, A., Rodrigo, D., Klein, G., & Martínez, A. (2015). Comparative study of the effects of citral on the growth and injury of Listeria innocua and Listeria monocytogenes cells. *PLoS ONE*, 10(2), e0114026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114026>
- Skozo, D., Šimat, V., Smole Možina, S., Katalinić, V., Boban, N., & Generalić Mekinić, I. (2019). Interactions of resveratrol with other phenolics and activity against food-borne pathogens. *Food Science and Nutrition*, 7(7), 2312–2318. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1073>
- Soares, A. C. F., Matos, P. M., Da Silva, K. F., Martins, C. H. G., Veneziani, R. C. S., Ambrósio, S. R., Dias, H. J., Dos Santos, R. A., & Heleno, V. C. G. (2019). Antimicrobial potential of natural and semi-synthetic ent-kaurane and ent-pimarane diterpenes against clinically isolated Gram-positive multidrug-resistant bacteria. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(2), 333–341. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180182>
- Sosa, W., & Hurtado, A. (2016). *Extracción, caracterización y microencapsulación de aceite de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis)*. [Tesis de pregrado, Universidad de Nariño].
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Subdirección de Salud Nutricional Alimentos y Bebidas. (2017). *ABECÉ de la inocuidad de alimentos* [Archivo pdf]. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/abc->

inocuidad.pdf

Superintendencia de Industria y Comercio. (2017). *Fitonutrientes derivados de la palma*

africana, sacha inchi y macadamia [archivo pdf].

<https://www.sic.gov.co/sites/default/files/files/Propiedad>

Industrial/Boletines_Tecnologicos/Boletin_fitonutrientes_21sep.pdf

Taylor, J. L. S., Rabe, T., Mcgaw, L. J., Jäger, A. K., & Van Staden, J. (2001). Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 23–37.

<https://doi.org/10.1023/A:1013310809275>

Teran, R. (2015). *Efecto de la hidrolisis de galotaninos de tara (caesalpinia spinosa) sobre la capacidad antioxidante in vitro y estabilidad del aceite de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurimac].

Toapanta, F. R., Bernal, P. J., Kotloff, K. L., Levine, M. M., & Sztein, M. B. (2018). T cell mediated immunity induced by the live-attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate CVD 1208S in humans. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 61.

<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1439-1>

Tobo, L. J. (2009). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de Pentacalia ledifolia y Pentacalia vaccinioides (Fam. Asteraceae) sobre cepas de Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens y Salmonella Typhimurium* [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana].

Tofío, A., Ortega, M., Herrera, B., Fagroso, P., & Pedraza, B. (2017). Conservación microbiológica de embutido carnico artesanal con aceites esenciales Eugenia caryophyllata y Thymus vulgaris. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 30–41. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\).591](https://doi.org/10.18684/bsaa(15).591)

Torres, D. F. (2016). *Fortalecimiento de dos asociaciones campesinas del municipio de Sabana de Torres mediante un modelo agroindustrial de generación de valor agregado por medio del cultivo de la Sacha Inchi*. [Tesis de pregrado, Universidad Santo Tomás].

<https://repository.usta.edu.co/handle/11634/1770>

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (9th ed.). Editorial Médica Panamericana.

https://books.google.com.co/books?id=Nxb3iTuwplCyprintsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_rycad=0#v=onepage&qyf=false

Trasande, L., Shaffer, R. M., Sathyarayana, S., & COUNCIL ON ENVIRONMENTAL HEALTH. (2018). Food additives and child health. *Pediatrics*, 142(2), e20181410.
<https://doi.org/10.1542/peds.2018-1410>

Triana, D.M., Torijano-Gutiérrez, S.A., & Giraldo-Estrada, C. (2017). Supercritical CO₂ extraction of oil and omega-3 concentrate from Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from Antioquia, Colombia. *Grasas y Aceites*, 68(1), 1–11. <https://doi.org/10.3989/gya.0786161>

Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 2019, 9. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>

Týskiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules*, 23(10), 2625.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102625>

Ulloa, M. (2016). *Enfermedades transmitidas por los alimentos en chile: agentes causantes y factores contribuyentes asociados a brotes ocurridos durante el año 2013*. [Tesis de

- pregrado, Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/138263>
- Valles, S., Medina, M., & Obregón, A. (2017). Obtención de una bebida nutritiva a partir de las semillas de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 83(3), 273–280.
- Vanegas, A.-M., & Gutiérrez, L.F. (2018). Physicochemical and sensory properties of yogurts containing Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.) seeds and β-glucans from Ganoderma lucidum. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1020–1033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13235>
- Vásquez, D. C., Jaramillo, J. D., Hincapié, G. A., & Vélez, L. M. (2017). Desarrollo de galletas empleando harina de Sacha Inchi (plukenetia volubilis l.) obtenida de la torta residual. *UGCiencia*, 23(0), 101–113. <https://doi.org/10.18634/UGCJ.23V.0I.781>
- Velasco, D. A. (2018). *Bioconservantes en productos cárnicos: Implicaciones frente a los principales referentes regulatorios en Listeria monocytogenes*. [Tesis de maestría, Universidad de la Sabana].
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Informacion Tecnologica*, 18(1), 53–66. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642007000100009>
- Vélez, N., Díaz, P. L., Rodríguez, C., Bautista, A., Montaño, L. A., & Realpe, M. E. (2015). Caracterización molecular de aislamientos de Shigella sonnei recuperados en el Programa de Vigilancia por el Laboratorio de la Enfermedad Diarreica Aguda en Colombia. *Biomédica*, 35(3), 395–406. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i3.2622>
- Vicente, J., de Carvalho, M. G., & Garcia, E. E. (2015). Fatty acids profile of Sacha Inchi oil and blends by ¹H NMR and GC-FID. *Food Chemistry*, 181, 215–221.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.092>

Villar, F., Millán, F., & Di Scipio, S. (2007). Uso de la metodología de superficie de respuesta en el estudio del protocolo de mezcla para obtención de emulsiones concentradas O/W.

Interciencia, 32(6), 404–409. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000600009

Wallace, N., Zani, A., Abrams, E., & Sun, Y. (2016). The impact of oxygen on bacterial enteric pathogens. *Advances in Applied Microbiology*, 95, 179–204.

<https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2016.04.002>

Walsh, D. J., Livinghouse, T., Goeres, D. M., Mettler, M., & Stewart, P. S. (2019).

Antimicrobial activity of naturally occurring phenols and derivatives against biofilm and planktonic bacteria. *Frontiers in Chemistry*, 7, 653.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00653>

Wang, B., Tian, H., & Xiang, D. (2020). Stabilizing the oil-in-water emulsions using the mixtures of *Dendrobium officinale* polysaccharides and gum Arabic or propylene glycol alginate. *Molecules*, 25(3), 759. <https://doi.org/10.3390/molecules25030759>

Wang, S., Zhu, F., & Kakuda, Y. (2018). Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. In *Food Chemistry*, 265, 316–328.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.055>

Weng, Z., Echevarría, Z., Maldonado, G., Álvarez, I., & Rodríguez, M. (2013). Recobrado de *Shigella* spp. Conservada por la técnica de secado en perlas de vidrio. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(1), 40–51.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000100005

Wilkinson, J. M. (2006). Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. En *Modern*

- Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs* (pp. 157-171). Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527609987.ch8>
- Xuan, T., Gangqiang, G., Minh, T., Quy, T., & Khanh, T. (2018). An overview of chemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of commercial vegetable edible oils marketed in Japan. *Foods*, 7(2), 21. <https://doi.org/10.3390/foods7020021>
- Yousefi, M., Khorshidian, N., & Hosseini, H. (2020). Potential application of essential oils for mitigation of Listeria monocytogenes in meat and poultry products. *Frontiers in Nutrition*, 7, 577287. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577287>
- Zamora, R., Hidalgo, F. J., & Alaiz, M. (1991). Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. I. Formación de los hidroperóxidos lipídicos. *Grasas y Aceites*, 42(2), 155–162. <https://doi.org/10.3989/gya.1991.v42.i2.1265>
- Zamuz, S., Munekata, P. E. S., Dzuvor, C. K. O., Zhang, W., Sant'Ana, A. S., & Lorenzo, J. M. (2021). The role of phenolic compounds against Listeria monocytogenes in food. A review. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.068>
- Zanabria, S. D. (2012). Extracción de aceite de las semillas de *Plukenetia volubilis* L. “Sacha Inchi” por fluidos supercríticos (FSC) y determinación de los ácidos grasos linolénico, linoleico y oleico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) [Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santa María].
- <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/3846>
- Zanqui, A. B., da Silva, C. M., de Morais, D. R., Santos, J. M., Ribeiro, S. A. O., Eberlin, M. N., Cardozo, L., Visentainer, J. V., Gomes, S. T. M., & Matsushita, M. (2016). Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil composition varies with changes in temperature and pressure in

- subcritical extraction with n-propane. *Industrial Crops and Products*, 87, 64–70.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.029>
- Zuloeta, G. (2014). *Compuestos fenólicos, tocoferoles, ácidos grasos, carotenoides, fitoesteroles y capacidad antioxidante de 16 cultivares de semillas de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.)*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Agraria].
- Zúñiga, I. R., & Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: Una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95–104.

Anexos

Anexo A. Formato control de extracción supercrítica

 Universidad de Nariño	SECCIÓN DE LABORATORIOS			Código: Página: 1 de 1 Versión: 1 Vigente a partir de: Julio de 2014	
	FORMATO DE CONTROL DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA				
RESPONSABLE:	Johanna Yama-Fernanda Abahonza		Firma:		
MUESTRA:	Semilla de Sacha Inchi		Fecha:	12 de marzo de 2019	
TEMPERATURA (°C)					
T° Operación:	64	T° Intercambiador:	69	T° Chaqueta Extractor:	64
T° Interna:	66	T° Separador:	63		
PRESIÓN (bar)					
P, Bomba:	375	P, Válvula:	380	P, Manómetro Extractor:	390
P, Manómetro Separador:			9		
FLUJO (g CO₂ /min)					
Flujo de Operación:			30		
TIEMPO					
Hora Inicio Presurización:		9:49 a. m.	Hora Inicio Rinse:	10:05 a. m.	
Hora Inicio Extracción:		10:05 a. m.	Hora Final Extracción:	12:35 p. m.	
T, Purga:	5	T, de Rinse:	16	T, de Extracción:	150
MUESTRA (g)					
Cantidad de Muestra Molida:	200				
Peso Inicial (Vial):	85,2865	Peso Final:	153,1097		
Cantidad de Aceite:	67,8232	Rendimiento:	33,9116		
CILINDRO CO₂					
No, Cilindro:	6	No, Extracción:	24		
Observaciones:					
Elaborado por:	Revisado por:		Aprobado por:		
Ana Lucia Pantoja Chamorro	Andrés Mauricio Hurtado B		Andrés Mauricio Hurtado B		
Investigadora	Coordinador Proyecto		Coordinador Proyecto		

 Universidad de Nariño	SECCIÓN DE LABORATORIOS				Código: Página: 1 de 1 Versión: 1
	FORMATO DE CONTROL DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA				
					Vigente a partir de: Julio de 2014
RESPONSABLE:	Johanna Yama-Fernanda Abahonza			Firma:	
MUESTRA:	Semilla de Sacha Inchi			Fecha: 13 de marzo de 2019	
TEMPERATURA (°C)					
T° Operación:	64	T° Intercambiador:	66	T° Chaqueta Extractor:	64
T° Interna:	65	T° Separador:	63		
PRESIÓN (bar)					
P, Bomba:	375	P, Válvula:	380	P, Manómetro Extractor:	400
P, Manómetro Separador:			9		
FLUJO (g CO₂ /min)					
Flujo de Operación:		30			
TIEMPO					
Hora Inicio Presurización:		1:30 p, m,	Hora Inicio Rinse:	1:48 p, m,	
Hora Inicio Extracción:		1:48 p, m,	Hora Final Extracción:	4:18 p, m,	
T, Purga:	5	T, de Rinse:	18	T, de Extracción:	150
MUESTRA (g)					
Cantidad de Muestra Molida:	200				
Peso Inicial (Vial):	85,3377		Peso Final:	151,0756	
Cantidad de Aceite:	65,7379		Rendimiento:	32,8690	
CILINDRO CO₂					
No, Cilindro:	6	No, Extracción:	25		
Observaciones:					
Elaborado por:	Revisado por:			Aprobado por:	
Ana Lucia Pantoja Chamorro	Andrés Mauricio Hurtado B			Andrés Mauricio Hurtado B	
Investigadora	Coordinador Proyecto			Coordinador Proyecto	

