

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

**Evaluación del contenido de tocoferoles y tocotrienoles en  
aceite de nuez de selecciones clonales de *Gevuina avellana* Mol.**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Agronomía

**ROXANA PATRICIA NÚÑEZ PIZARRO**

VALDIVIA, CHILE 2007

## **PROFESOR PATROCINANTE**

Fernando Medel Salamanca

Ing. Agr.; Dr. Ing. Agr.

---

## **PROFESORES INFORMANTES**

Hernán Palma Fleming.

Lic. Cs. Menc. Química, M Sc.

---

Ricardo Fuentes Pérez

Ing. Agr. ; M. Sc.

---

**INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL**

## *Agradecimientos*

Quisiera agradecer a todos los que de una u otra forma participaron para que pudiera lograr esta meta tan anhelada...

A mi profesor patrocinante Sr. Fernando Medel Salamanca por su tiempo, su preocupación y constante apoyo para lograr el desarrollo de este trabajo y que este llegara a buen término.

A los profesores Sr. Hernán Palma y Sr. Ricardo Fuentes, por su colaboración y orientación para el desarrollo de este trabajo. Así también a Lea, Pato y Sr. Ramón Mancilla, por su trabajo, tiempo y apoyo en todo a lo referente al trabajo en laboratorio, también a Lucia, Patricia y Sra. Nimia.

A mi gran amiga “Chipie”, por su incondicionalidad, por su apoyo constante y por estar siempre ahí en las buenas y en las malas... A mis “amiguis” Marce e Ingrid, por su amistad, con las que compartí alegrías y dificultades...

No puedo dejar de mencionar a todos los que pude conocer, compartir y relacionarme todos estos años de estudios a la Feña, Mariana, Diana, Anessi, Claudia A., Andrea S., Dany, Javier, Hector, Eduardo, Willy, Jano, Sra. Lily, Sra. Tere, Sra Silvia, Lety, Lea, Pato... y a la distancia los de siempre Andre, Caro, Ricardo y Felipe...

Y por sobre todo a mis padres Ana y Mario, por su amor, por sus sacrificios, comprensión y apoyo incondicional... a mis hermanos Lucia, María Paz y Sergio por su apoyo y comprensión... y a mi “monito” Fran, por su compañía...

A Dios, por darme la oportunidad de conocerlos y disfrutar junto a cada uno y una de ustedes...

**INDICE DE MATERIAS**

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	<i>Gevuina avellana</i> Mol. (avellano chileno).	3
2.2	Característica del fruto.	4
2.3	Utilización de fruto.	4
2.3.1	Consumo humano.	5
2.3.2	Alimentación animal.	5
2.4	Composición química y nutricional del fruto.	5
2.5	Contenido de ácidos grasos en el aceite de Gevuin.	7
2.6	Vitaminas.	9
2.6.1	Vitaminas hidrosolubles.	9
2.6.2	Vitaminas liposolubles.	10
2.6.3	Vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles).	10
2.6.3.1	Propiedades de la Vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles).	13
2.6.4	Contenido vitamínico en distintos frutales nuez.	14
3	MATERIAL Y METODO	17
3.1	Ubicación y época del estudio.	17
3.2	Material vegetal.	17
3.3	Procesamiento inicial de las nueces.	18
3.3.1	Extracción de lípidos.	19
3.4	Determinación tocoferoles y tocotrienoles.	19
3.4.1	Determinación de tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.	19
3.4.1.1	Equipos e instrumentos.	20

3.4.1.2	Reactivos.	20
3.4.1.3	Materiales.	21
3.4.1.4	Preparación de tocoferoles - TMS y tocotrienoles - TMS.	21
3.4.1.5	Condiciones de trabajo de cromatógrafo de gas más espectrómetro de masa (GC/MS).	23
3.4.2	Determinación de tocoferoles y tocotrienoles por HPLC.	24
3.4.2.1	Equipos e instrumentos.	24
3.4.2.2	Reactivos.	24
3.4.2.3	Materiales.	25
3.4.2.4	Preparación de la muestra.	25
3.5	Observaciones y determinaciones.	25
3.5.1	Contenido de tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.	25
3.5.2	Contenido de tocoferoles y tocotrienoles por HPLC.	27
3.6	Diseño experimental y análisis estadístico	28
4	<b>PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	29
4.1	Antecedentes de la evaluación realizada por GC/MS.	29
4.2	Contenido Tocolos totales, determinado por GC/MS.	30
4.2.1	Tocoferoles totales, determinados por GC/MS.	32
4.2.1.1	$\alpha$ – <i>tocoferol</i> .	33
4.2.1.2	$\gamma$ – <i>tocoferol</i> .	34
4.2.1.3	$\delta$ – <i>tocoferol</i> .	35
4.2.2	Tocotrienoles totales, determinados por GC/MS.	36
4.2.2.1	$\alpha$ – <i>tocotrienol</i> .	38
4.2.2.2	$\beta$ – <i>tocotrienol</i> .	39
4.2.2.3	$\gamma$ – <i>tocotrienol</i> .	40
4.2.2.4	$\delta$ - <i>tocotrienol</i> .	41
4.3	Contenido Tocolos totales, determinados por HPLC.	42
4.3.1	$\alpha$ – <i>tocotrienol</i> .	44

4.4	Síntesis e importancia de tocoles en aceite de Gevuin y de otras especies.	47
5	CONCLUSIONES	51
6	RESUMEN	53
7	BIBLIOGRAFÍA	57
	ANEXOS	66

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química del fruto de avellano.	6
2	Ácidos grasos contenidos en el aceite de <i>Gevuina avellana</i> Mol.	8
3	Contenido vitamínico de algunos frutales de nuez.	14
4	Contenido de tocoferoles y tocotrienoles presente en aceite de Gevuin y de cuatro frutales de nuez (mg/kg).	15
5	Tiempo de retención e Iones referenciales para identificación tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.	26
6	Rangos de las curvas de calibración (ppm), Ecuación de la curva y $R^2$ , para cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.	27
7	Contenido tocoles totales, determinado por GC/MS (mg/kg).	31
8	Contenido total de tocoferoles, determinado por GC/MS (mg/kg).	32
9	Contenido de tocoferoles por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	33
10	Variación de $\alpha$ - <i>tocopherol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	34
11	Variación de $\gamma$ - <i>tocopherol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	35
12	Variación de $\delta$ - <i>tocopherol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	36
13	Contenido total de tocotrienoles, determinado por GC/MS (mg/kg).	37
14	Contenido de tocotrienoles por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	38
15	Variación de $\alpha$ - <i>tocotrienol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	39
16	Variación de $\beta$ - <i>tocotrienol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	40
17	Variación de $\gamma$ - <i>tocotrienol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	41

18	Variación de $\delta$ - <i>tocotrienol</i> en siete clones de Gevuin (mg/kg).	42
19	Variación de $\alpha$ - <i>tocotrienol</i> en seis clones de Gevuin (ug/g).	44

**INDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Estructura química de Tocoferoles y Tocotrienoles.	11
2	Variación en el contenido de $\alpha$ – tocotrienol (a T3) en cuatro clones de Gevuin, determinado por HPLC y GC/MS.	45
3	Composición de tocoferoles (TF) y tocotrienoles (T3) en aceite de Gevuin.	47

**INDICE DE ANEXOS**

Anexos		Página
1	Derivatización.	67
2	Silanización material de vidrio.	71
3	Selectividad del método analítico.	72
4	Linealidad método analítico (Curva de Calibración).	79
5	Precisión del sistema.	83
6	Cromatogramas de tocoles presentes aceites de Gevuin de siete clones determinados por GC/MS.	86
7	Cromatogramas de tocoles presentes aceites de Gevuin de seis clones determinados por HPLC.	90
8	Análisis de varianza del contenido de Tocoles totales en el aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	93
9	Análisis de varianza del contenido de Tocoferoles totales en aceite de Gevuin, por clon determinado por GC/MS (mg/kg).	93
10	Análisis de varianza del contenido de $\alpha$ - tocoferol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	93
11	Análisis de varianza del contenido de $\gamma$ - tocoferol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	94
12	Análisis de varianza del contenido de $\delta$ - tocoferol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	94
13	Análisis de varianza del contenido de Tocotrienoles totales en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	94
14	Análisis de varianza del contenido de $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	95
15	Análisis de varianza del contenido de $\beta$ - tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	95

16	Análisis de varianza del contenido de $\gamma$ - tocotrienol en aceite Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	95
17	Análisis de varianza del contenido de $\delta$ - tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).	96
18	Análisis de varianza del contenido de $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por HPLC (ug/g).	96
19	Análisis de varianza del contenido de $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin de cuatro clones, determinado por GC/MS (mg/kg).	96
20	Análisis de varianza del contenido de $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin de cuatro clones, determinado por HPLC (ug/g).	97

## 1. INTRODUCCION

Basándose en la posibilidad de contar con un frutal de nuez con altos índices de productividad y calidad de nueces, Gevuin (*Gevuina avellana* Mol.) especie nativa de nuestro país, ha sido estudiada durante los últimos 20 años a través de un programa de “Mejoramiento Genético y Productivo en *Gevuina avellana* Mol.” en la Universidad Austral de Chile, en función de las condiciones particulares de clima y suelo en un vasto territorio del sur de Chile, con la finalidad de poder posicionar a esta especie tanto a nivel nacional como internacional.

Una de las líneas principales de investigación del programa mencionado, es el mejoramiento genético en función de su composición química, para objetivos nutricionales y fitoterapéuticos. Se ha estudiado la composición química y mineralógica de las nueces, así como también el contenido de aceite y la composición de ácidos grasos constituyentes de la fracción lipídica de la nuez de clones seleccionados (MEDEL y MEDEL, 2000, MEDEL, *et al* 2003 y MEDEL y CARRILLO 2005).

La evaluación de componentes vitamínicos tales como tocoferoles y tocotrienoles (componentes de la vitamina E), permitirá completar los estudios realizados de la línea de investigación antes señalada para la selección clonal, considerando además la importancia que esta adquiriendo esta vitamina en particular, por su reconocida propiedad antioxidante, la cuál tendría un efecto benéfico en la prevención de enfermedades como el cáncer, arteriosclerosis, Alzheimer, Parkinson y desordenes en procesos de envejecimiento, producidos generalmente por el estrés oxidativo del organismo.

Recientemente se ha demostrado que esta propiedad se debe no sólo a una fracción de la vitamina,  $\alpha$ -tocoferol, sino que al conjunto de todas las fracciones que la

componen y en situaciones particulares, las otras fracciones como tocotrienoles tendrían mayor efecto que la antes mencionadas.

Se ha señalado que el aceite de Gevuin presenta ambas fracciones de la vitamina E, destacando el contenido de  $\alpha$ -tocotrienol, lo cual lo convierte en un caso particular entre los frutales de nuez, no siendo frecuente encontrar un alto contenido de esta fracción en ellos.

Con estos antecedentes, la hipótesis que se planteó para este estudio fue que existen diferencias entre los clones estudiados en cuanto al contenido de tocoferoles y tocotrienoles (componentes de la vitamina E), presentes en el aceite de avellana chilena de selecciones clonales.

Por lo tanto el objetivo general fue determinar y evaluar el contenido de tocoferoles y tocotrienoles en el aceite de avellana de los clones seleccionados, a efectos de contribuir al proceso de selección de material genético.

Los objetivos específicos dados para este estudio, por lo tanto fueron los siguientes:

- Caracterizar las distintas fracciones de la vitamina E que forman parte del aceite de nuez de avellana chilena.
- Determinar el contenido de las fracciones  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocoferoles y -tocotrienoles presente en este aceite.
- Evaluar las diferencias de contenidos de tocoferoles y tocotrienoles entre las distintas selecciones clonales.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 *Gevuina avellana* Mol. (Gevuin, avellano chileno).

Gevuin, pertenece a la familia Proteáceas, las cuales son plantas leñosas propias de los países tropicales y subtropicales del Hemisferio Austral. Tienen representantes en África del Sur, América del Sur y Australia. (RODRÍGUEZ *et al*, 1983 y MEDEL y MEDEL, 2000)

Una de las características más importante de esta familia, es la presencia de las raíces proteiformes, que son unos conglomerados de raicillas, con abundantes pelos radicales dispuestos en torno a un eje (GRINBERGS *et al*. 1986).

Su nombre científico esta compuesto por Gevuina, que es una palabra proveniente del mapuche Gevuin que significa “hermosa flor” y avellana es el nombre vulgar dado por colonizadores españoles por la similitud del fruto al de avellano europeo (*Corylus avellana*) (NUESTRA TIERRA, 1990 y HOFFMANN, 1991).

Algunos nombres comunes por los cuales puede ser conocida, son “Gevuin”, “Gevuina”, “Neufén” o “Ñefu” (MUÑOZ, 1956), además de “Chilean Hazelnut”, “Chile hazel” y “Chile nut” (MEDEL y MEDEL, 2000).

Es una especie endémica y género monotípico de los bosques subantárticos de Chile, el árbol puede llegar hasta 20 m de alto con 60 cm. de diámetro (DONOSO, s.f., MUÑOZ, 1956, HOFFMANN, 1991, RODRIGUEZ *et al.*, 1995 y MEDEL *et al* 2003)

Su distribución geográfica, está restringida entre los paralelos 35° y 44° latitud sur de Chile desde el río Tenoy Mataquito hasta las islas de las Guaitecas, abarcando un amplio territorio (DONOSO, 1978 y MEDEL y MEDEL, 2000).

## 2.2 Características del fruto.

El fruto corresponde a una nuez drupácea leñosa indehisciente de forma redondeada con el ápice algo protuberante con un diámetro promedio de 1,8 cm. y un peso promedio de 2 g por fruto. Su color cambia según el grado de madurez que represente, variando de verde a negro, pasando por los tonos rojo, marrón y violeta (MUÑOZ, 1956; NAVAS, 1976; MUÑOZ, 1980, HOFFMANN, 1982 y RODRIGUEZ *et al*, 1983).

Éste, esta conformado por el pericarpio, cutícula y los cotiledones, KARMELIC (1982) señala que la nuez de Gevuin esta compuesta en 34,7% por los cotiledones y un 65, 3% por cutícula y pericarpio, lo que difiere con (LOPEZ, 1988) el cual indica que existe una proporción aproximada de 72% entre la cáscara y la cutícula y el 28% restante corresponde a los cotiledones. Al respecto MEDEL (2001), indico una proporción de pericarpio 62% y de cotiledones de 38%.

Su semilla es redonda, ligeramente arrugada, que se separa en dos cotiledones los cuales son comestibles, de color blanquecino y se presentan cubiertos por una cutícula de color violáceo oscuro. Su diámetro fluctúa en un rango de 1,0 – 1,4 cm. (MUÑOZ, 1980, RODRIGUEZ *et al.*, 1983. HOFFMANN, 1991).

La nuez presenta una cáscara o pericarpio leñoso que mide alrededor de 3 mm. de ancho y es relativamente flexible y taninoso. (MUÑOZ, 1980; RODRIGUEZ *et al.*, 1983 y MEDEL, 2001).

## 2.3 Utilización del fruto

Éste y en especial la semilla presenta gran potencialidad, pero su utilización tradicionalmente se ha enfocado al tostado de esta para el consumo directo o bien para uso en confitería, pastelería o salada para coctelería (KARMELIC, 1982 y MEDEL, 1987).

**2.3.1 Consumo humano.** Algunos de los productos elaborados a partir de avellanas se pueden encontrar desde sucedáneo de café utilizado como bebida hasta harina de avellana entera o desgrasada que puede ser empleada en confitería, pastelería, alimentos infantiles o alimentación animal (KARMELIC, 1982 y MEDEL y MEDEL 2000).

Otro posible uso para el fruto de Gevuin es “mantequilla”, elaborada con un sencillo procedimiento, siendo su composición comparable a la mantequilla de maní y del todo aceptable para el consumo humano (CIREDE, 1972).

En la actualidad la investigación está abocada a describir nuevas aptitudes existentes en Gevuin, enfocados principalmente en potencial uso agroindustrial lo constituya la obtención de aceite de avellanas para consumo, uso cosmetológico o farmacéutico (BERTOLI *et al* 1998 y MEDEL Y MEDEL, 2000).

**2.3.2 Alimentación animal.** El alto contenido proteico y energético, con un 12,5% y 47% respectivamente, convierten al fruto en una atractiva fuente de alimento animal (MENDEZ; 1981 y VOULLIEME, 1982).

KARMELIC (1982), concuerda con los autores anteriores sugiriendo que la nuez debe ser pelada y sin tostar para constituir una buena alternativa en la alimentación animal. También sugiere que de la extracción de aceite, se obtiene como subproducto harina desgrasada de avellana. La cual contiene un 23,6% de proteína bruta, 17.2% de fibra cruda y 52.9% de hidratos de carbono (Extracto No Nitrogenado, E.N.N.), lo que lo hace factible de utilizar.

## **2.4 Composición química y nutricional del fruto.**

La parte comestible del fruto, está conformado básicamente por dos cotiledones y se caracteriza por presentar un sabor muy apreciado, poseen un gran valor alimenticio y

calórico, destacando entre otras características su contenido de proteínas (KARMELIC, 1982 y MEDEL y MEDEL, 2000).

El Cuadro 1 presenta la composición química y nutricional evaluada en la selección clonal perteneciente al programa de mejoramiento informado por MEDEL (2005), estos valores concuerdan con lo presentado por KARMELIC (1982), el que destaca el contenido de proteínas (12,1 - 12,4 %), lípidos (47,7 – 49,3%), fibras (3,6 – 4,9%) y carbohidratos (20,0 a 20,5%). Esto permite afirmar que dispone de un buen recurso nutricional (CACERES *et al.*, 1982).

**CUADRO 1 Composición química del fruto de avellano (por 100g).**

Composición		Rango Clonal
Agua	(g)	1.9 – 2.3
Proteína	(g)	10.90 – 14.40
Lípidos	(g)	45.2 – 55.2
Carbohidratos	(g)	19.60 – 25.70
Fibra Cruda	(g)	2.80 – 6.19
Cenizas	(g)	2.80 – 4.12
Calorías	(cal)	535 - 680
<u>Minerales</u>		
Potasio	(mg)	391 – 528
Calcio	(mg)	196 – 222
Fósforo	(mg)	71 – 114
Magnesio	(mg)	65 – 93
Manganeso	(mg)	2.08 – 5.42
Fierro	(mg)	1.61 – 6.20
Zinc	(mg)	1.31 – 2.00
Cobre	(mg)	0.28 – 0.47

FUENTE: Adaptado de MEDEL, (2005)

Gevuin, presenta un mayor contenido en parámetros tan importante como proteína, fibra, potasio y calcio en comparación con macadamia, sin embargo, esta última, posee un mayor contenido de lípidos y fósforo, a su vez el avellano europeo posee mayor contenido de lípidos y valores semejante en el contenido de proteínas y calcio que Gevuin según lo señalado por VALDIVIA (2003).

Cabe mencionar que según lo señalado por MARTINEZ, (2001) y VILLARROEL *et al.* (1987), en el contenido de aminoácidos en la harina desgrasada de Gevuin se encontraron altos contenidos de ácido glutámico, aspártico y arginina, siendo el aminoácido limitante la lisina.

Finalmente, MEDEL (2005) señala que los clones de Gevuin presentan una alta variabilidad y claras diferencias entre los ellos, excepto en el calcio como se puede apreciar en el Cuadro 1. Entre los valores proximales más importantes, está el contenido total de aceite (45,2 hasta 55,2%), energía (535 a 680 cal) y proteína cruda (10,9 a 14,4%).

## **2.5 Contenido de ácidos grasos en el aceite de Gevuin.**

La composición de ácidos grasos en el aceite de Gevuin se presenta en el Cuadro 2, una característica destacable es que posee un menor contenido de ácidos grasos saturados que los aceites comestibles comerciales, destacando alto contenido de monoinsaturados sobre el 80%, destacándose el oleico y palmitoleico, sumado el contenido de ácidos grasos esenciales como lo son linoleico y linolénico, lo que le atribuye propiedades de interés para la industria de aceites comestibles (BERTOLI *et al* 1998, MEDEL y MEDEL, 2000 y MEDEL y CARRILLO 2005).

El contenido de ácido palmitoleico (sobre el 21%) en el aceite de Gevuin, ha tomando importancia en la industria cosmetológica, ya que esta característica permitiría su utilización en filtros solares por su propiedad de absorber las radiaciones bajas del espectro UV, eliminando las que producen eritemas en la piel permitiendo el paso de aquellas que producen un bronceado sin daño para la misma (MEDEL *et al* 2003).

**CUADRO 2. Ácidos grasos contenidos en el aceite de *Gevuina avellana* Mol.**

Ácido Graso	Proporción (%)		
	( 1 )	( 2 )	( 3 )
C <sub>10:0</sub> Cáprico	-	-	0.01 – 0.09
C <sub>12:0</sub> Láurico	-	-	0.03 – 0.09
C <sub>14:0</sub> Mirístico	-	0.06 – 0.40	0.05 – 0.07
C <sub>16:0</sub> Palmítico	1.9	2.01 – 2.39	1.89 – 2.18
C <sub>18:0</sub> Esteárico	0.5	0.51 – 0.82	0.42 – 0.56
C <sub>20:0</sub> Eicosanoico	1.4	1.53 – 1.94	1.30 – 1.58
C <sub>21:0</sub> Heneicosanoico	-	-	0.02 – 0.08
C <sub>22:0</sub> Docosanoico	2.2	1.49 – 2.93	2.20 – 3.38
C <sub>23:0</sub> Tricosanoico	-	-	0.01 – 0.04
C <sub>24:0</sub> Tetracosanoico	0.5	0.38 – 0.47	0.47 – 0.53
<b>Total saturados</b>	<b>6.5</b>	<b>5.98 – 8.95</b>	<b>6.40 – 8.60</b>
C <sub>14:1</sub> Miristoleico	-	0.02	0.04 – 0.06
C <sub>16:1</sub> Palmitoleico	22.7	21.73 – 23.72 (C <sub>16:1</sub> Δ 11)	21.37 – 22.97
C <sub>17:1</sub> Heptadecenoico	-	-	0.03 – 0.06 (C <sub>17:1</sub> Δ 10)
C <sub>18:1</sub> Oleico	39.4 (C <sub>18:1</sub> Δ 9) 6.2 (C <sub>18:1</sub> Δ 12)	40.38 – 43.68 (C <sub>18:1</sub> Δ 9)	40.00 – 42.64
C <sub>20:1</sub> Licosaenoico	3.1 (C <sub>20:1</sub> Δ 11) 6.6 (C <sub>20:1</sub> Δ 15)	7.99 – 8.98 -	9.69 – 10.09 -
C <sub>22:1</sub> Docosaenico	7.9 (C <sub>22:1</sub> Δ 17) 1.6 (C <sub>22:1</sub> Δ 19)	7.44 – 8.99 1.33 – 1.74 (C <sub>22:1</sub> Δ 13)	9.29 – 10.73 -
C <sub>24:1</sub> Nervonico	-	-	0.01 – 0.03
<b>Total Monoinsaturado</b>	<b>87.5</b>	<b>78.89 – 87.13</b>	<b>80.43 – 86.58</b>
C <sub>18:2 (n-6)</sub> Linoleico	5.6	7.07 – 8.63	8.28 – 9.57
C <sub>18:3 (n-3)</sub> Linolénico	0.1	1.29 – 1.42	0.11 – 0.15
C <sub>20:2</sub> Eicosadienoico	-	-	0.02 – 0.06
<b>Total poliinsaturados</b>	<b>5.7</b>	<b>8.36 – 10.05</b>	<b>8.41 – 9.78</b>

FUENTE: 1. BERTOLI *et al*, (1998)

2. Adaptado de CARRILLO (2004) y MEDEL y CARRILLO (2005).

3. Adaptado de JIL (2006).

Los clones de Gevui, presentan diferencias significativas con respecto al contenido del ácido palmitoleico (C<sub>16:1</sub>) como lo señala MEDEL y CARRILLO (2005) y JIL (2006), siendo el rango de variación de 21,73 a 23,72 %, destacando una mayor

proporción del isomero cis  $\Delta^{11}$ , seguido por cis  $\Delta^9$  y en menor proporción un isomero no identificado. Esto último tiene importancia, ya que se relaciona la posición del doble enlace en el isomero, con las propiedades químicas y físicas que se les atribuyen (Niemayer, 1965 y Weber *et al* 1997 citados por MEDEL y CARRILLO, 2005)

## 2.6 Vitaminas.

Las vitaminas son cuantitativamente los componentes minoritarios de los alimentos, muchas de estas influyen en la naturaleza química de los alimentos al comportarse como agentes reductores, secuestradores de radicales, reactantes en las reacciones de pardeamiento y como precursor de sabor y aroma (FENNEMA, 2000).

Son consideradas sustancias orgánicas que deben obtenerse en pequeñas cantidades a partir del ambiente, porque los seres humanos no pueden sintetizarlas de novo o su velocidad de síntesis es inadecuada para la conservación de la salud. Es por esto que desde el punto de vista nutritivo, son considerados micro nutrientes esenciales (FENNEMA, 2000 y MARCUS y COULSTON, 2001).

Las vitaminas difieren mucho en cuanto a estructura y función, se clasifican en dos grandes grupos, vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles, en las cuales se diferencian según el tipo de solubilidad (MARCUS y COULSTON, 2001 y BLANCO 2001)

**2.6.1 Vitaminas hidrosolubles.** Aquellas que solo se almacenan en el cuerpo en una cantidad limitada y se requiere consumo frecuente para conservar la saturación de tejidos. Constituyen este grupo el complejo B y la vitamina C. (MARCUS y COULSTON, 2001 y BLANCO, 2001).

Las fuentes naturales que aportan este tipo de vitaminas pueden ser de origen animal (hígado, carnes, pescado, lácteos y huevos) y vegetal (levaduras, cereales,

legumbres, verduras verdes, frutos cítricos y frutos secos). La vitamina B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> se pueden obtener de frutos secos y la vitamina C, sólo se indica como fuente natural de origen vegetal, como los frutos cítricos y verduras verdes (LICATA, 2006).

**2.6.2 Vitaminas liposolubles.** Pueden almacenarse en cantidades muy abundantes y esta propiedad les confiere un potencial de toxicidad si se consumen en exceso. Están asociadas a los lípidos de los alimentos naturales e incluyen a las vitaminas A, D, K y E (MARCUS y COULSTON, 2001 y BLANCO, 2001).

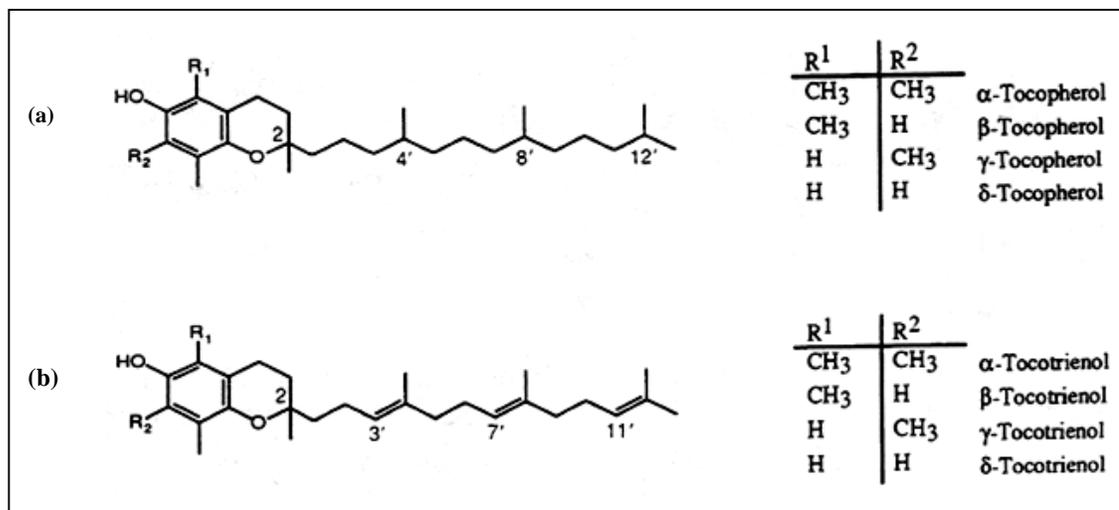
Estas vitaminas se encuentran en diversas fuentes naturales: de origen animal, como hígado, lácteos y huevos. De origen vegetal en frutas, verduras, legumbres, frutos secos y aceites vegetales (BALL, 1988 y LICATA, 2006).

En la actualidad se está incentivando su consumo de vitaminas hidrosolubles (vitamina C) y liposolubles (vitamina A y E), ya que se les atribuyen propiedades antioxidantes, éstas se obtienen principalmente de fuentes de origen vegetal, (OLIVERAS, 2005), entre ellas la vitamina E ha sido reconocida como una de las más importantes. Las fuentes vegetales más relevantes que aportan vitamina E, son aceites vegetales, germen de trigo y las nueces en general. (Quiles *et al*, 1999 citado por OLIVERAS, 2005).

**2.6.3 Vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles).** Esta vitamina está conformada por ocho compuestos (tocolos), derivados de una estructura básica llamada tocol. Su estructura consta de dos partes primarias, un anillo complejo cromanó, con un hidroxilo (6- hidroxicromanó) y un larga cadena lateral de 16 carbonos constituidas por la unión de tres unidades de isopreno saturado (Figura 1) (PITA, 1997 y BRAMLEY *et al* 2000).

Estos ocho tocolos se dividen en dos grupos fundamentales, cuatro tocoferoles ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -) y cuatro tocotrienoles ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -) los que se diferencian en la saturación de la cadena lateral, los primeros tienen una cadena saturada y los segundos

una insaturada con tres dobles enlaces (PITA, 1997; BRAMLEY *et al* 2000 y BLANCO, 2001), como se muestra en la Figura 1.



**FIGURA. 1** Estructura química de Tocoferoles (a) y Tocotrienoles (b)

FUENTE: CYBERLIPID CENTER (2004)

Los tocoferoles y tocotrienoles en su forma pura han sido descritos como sustancias viscosas de color amarillo pálido, que se descomponen fácilmente en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino y ciertas trazas de minerales como fierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Insolubles en agua, medianamente solubles en solventes orgánicos y en aceites vegetales, se pueden aislar de la fracción insaponificable de estos últimos (BALL, 1988, BRAMLEY *et al* 2000 y BLANCO, 2001).

El rol principal de la vitamina E es la inhibición de los procesos de oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos. En las plantas son biosintetizados en los cloroplastos, por lo que cumpliría una función clave en la protección del complejo fotosintético y la protección de las semillas durante el almacenaje, la germinación, y el temprano desarrollo (SCHNEIDER, 2005).

Al igual que los otros antioxidantes lipídicos, actúa como captador de radicales libres, de manera que rompe la reacción en cadena, generalmente al transferir su

hidrógeno fenólico al radical libre, previniendo la peroxidación de los lípidos insaturados de las membranas celulares y sub - celulares (BALL, 1988, PITA 1997 y SCHNEIDER, 2005).

Se ha señalado que cada uno de los tocoles que conforman esta vitamina poseen diferente actividad antioxidante, la cual decrece en el orden  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ , al igual que su potencial biológico. Considerando generalmente a  $\alpha$  - tocoferol la forma más importante por ejercer una mayor actividad biológica (BALL, 1988, YOSHIDA *et al* 2003 y AKAIKE *et al* 2004).

Las diferencias que existirían entre los tocoles en cuando a su potencial como vitamina E, ha llevado que su presencia en los alimentos sea expresada como “Equivalentes de alfa-tocoferol” (ATE) puesto que éste se ha descrito con la mayor actividad, para ello el resto de los tocoles se deben transformar a Equivalentes de alfa-tocoferol, usando factores de conversión derivados de diferentes métodos ensayados (SCHAKEL *et al*, 1997)

La fórmula más utilizada para hacer esta conversión es la señalada por McLaughlin y Weihrauch (1979) citado por SCHAKEL *et al*, (1997), que indica lo siguiente:

$$\begin{aligned} \text{ATE} = & (\text{mg } \alpha \text{ - tocoferol} * 1.0) + (\text{mg } \beta \text{ - tocoferol} * 0.4) + \\ & (\text{mg } \gamma \text{ - tocoferol} * 0.1) + (\text{mg } \delta \text{ - tocoferol} * 0.01) + \\ & (\text{mg } \alpha \text{ - tocotrienol} * 0.3) + (\text{mg } \beta \text{ - tocotrienol} * 0.05) + \\ & (\text{mg } \gamma \text{ - tocotrienol} * 0.01). \end{aligned}$$

La conversión de Equivalentes de alfa-tocoferol a Unidades Internacionales (IU) de vitamina E, se realiza por un factor de conversión 1.49 IU de vitamina E equivalen a 1.0 mg. de Equivalentes de alfa-tocoferol, según “American Pharmaceutical Association” (1975) citado por SCHAKEL *et al*, (1997).

Los tocoferoles generalmente están presentes en las nueces y aceites vegetales comunes (de germen de trigo y girasol), en cambio los tocotrienoles se encuentran en mayor concentración, en cereales de granos (avena, cebada y centeno) y ciertos aceites vegetales (aceite de palma y aceite de salvado de arroz) (Gombs, 1996 citado por THERIAULT *et al*, 1999 y SCHWENKE, 2002).

2.6.3.1. Propiedades de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles). Se ha considerado como un antioxidante natural que reacciona con los radicales libres solubles en lípidos de la membrana celular. Estos radicales libres son formados primeramente por el organismo humano durante el metabolismo natural, y también por la exposición a factores medioambientales, tales como, el cigarrillo, el smog y contaminantes (HIGDON, 2003).

La alteración en el estado de equilibrio del sistema pro-oxidante y el antioxidante en las células, es lo que se conoce como estrés oxidativo. Un aumento en la concentración de los radicales libres, pueden dañar de forma reversible o irreversible la mayoría de los constituyentes de la células incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos, lo que puede alterar la actividad celular a nivel de membrana, metabolismo o de expresión génica (Droge, 2002 citado por OLIVERAS, 2005).

Puntualmente se ha indicado que los tocoferoles protegen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación, estas son las encargadas de transportar las grasas por el torrente sanguíneo desde el hígado hacia los tejidos, la oxidación de LDL puede implicar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (HIGDON, 2003, PITA, 1997, MARCUS y COULSTON, 2001).

Además en estudios realizados con algunos modelos de animales la vitamina E inhibe la formación de nitrosaminas carcinógenas y modifica la aparición de neoplasias y la conducta de las mismas. Todavía no son claros los efectos de la ingestión de

vitamina E sobre cánceres en seres humanos, pero dietas con mayor contenido de antioxidantes como A, C y E se han relacionado con menor incidencia de estas enfermedades malignas (MARCUS y COULSTON, 2001).

Una de las primeras propiedades descritas para la vitamina E, es que sería esencial para la reproducción normal de mamíferos, con esa base se ha usado en clínicas para tratar aborto recurrente e infertilidad en ambos sexos, siendo también utilizadas en toxemia del embarazo, trastornos de la menstruación, y síntomas de menopausia (MARCUS y COULSTON, 2001)

**2.6.4 Contenido vitamínico en distintos frutales nuez y en Gevuin.** En las nueces el contenido vitamínico es variable dependiendo de la especie que se trate, como se puede apreciar en el Cuadro 3 presentando diferentes concentraciones de Tiamina, Riboflavina, Niacina y vitamina A, siendo poco frecuente el contenido de vitamina C (SAVAGE, 2000). Uno de los aspectos importantes del contenido vitamínico de las nueces lo constituye el nivel de vitamina E (MEDEL *et al*, 2003).

**CUADRO 3. Contenido vitamínico de algunos frutales de nuez.**

Vitamina	Almendra <sup>1</sup> -2	Avellano europeo <sup>1-2</sup>	Nueces de Nogal <sup>1-2</sup>	Macadamia 1-2	Gevuin <sup>3</sup>
Tiamina (B <sub>1</sub> )	0.24 *	0.46 *	0.67 *	0.34 *	
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	0.92 *	0.46 *	0.67 *	0.34 *	
Niacina (B <sub>3</sub> )	3.50 *	0.90 *	1.40 *	1.30 *	
Ac. Pantoténico (B <sub>5</sub> )	0.35 *	0.92 *	0.57 *	0.60 *	
Piridoxina (B <sub>6</sub> )	0.13 *	0.56 *	0.57 *	0.36 *	
Vitamina C	0	6.30 *	1.30 *	0.70 *	
Vitamina A	10 **	40 **	41 **	-	2.20-3.20*
Vitamina E	26.18 ***	15.19 ***	2.92 ***	0.57 ***	13.0-15.0*

FUENTE: Adaptado de <sup>1</sup>SAVAGE (2000), <sup>2</sup>USDA (2002) y <sup>3</sup>MEDEL (2005)

\* mg. /100g; \*\* (IU) Unidades Internacionales; \*\*\*mg. Alfa Tocoferol Equivalente (ATE) /100g

La composición vitamina E, específicamente el nivel de tocoferoles y tocotrienoles, difiere entre las distintas nueces, destacando la fracción de tocoferoles, particularmente de  $\alpha$  – tocoferol y  $\gamma$  - tocoferol en la mayoría de ellos (SAVAGE y RUSSELL, 2003 y MAGUIRE *et al*, 2004). Gevuin, presenta la particularidad de poseer un mayor contenido de tocotrienoles (BERTOLI *et al*, 1998), especialmente  $\alpha$  – tocotrienol (130 mg/kg), lo que la diferencia de la mayoría de los frutales de nuez, como se muestra en el Cuadro 4.

**CUADRO 4 Contenido de tocoferoles y tocotrienoles presente en aceite de Gevuin y de cuatro frutales de nuez (mg/kg).**

	Almendras 2 y3	Avellanas europeas <sup>2 y3</sup>	Nueces de nogal <sup>2 y3</sup>	Macadamia 1 y2	Gevuin <sup>1</sup>
<b>Tocoferol</b>					
$\alpha$	151.8	339.9	23.3	0.9	0.4
$\beta$	3.1	11.2	4.6		**
$\gamma$	60.3	45.0	290.7		0.6
$\delta$		2.7	41.6	4.3	**
<b>Tocotrienol</b>					
$\alpha$				27.8	130
$\beta$					1.3
$\gamma$					0.9
$\delta$					0.1

FUENTE: <sup>1</sup>BERTOLI *et al*, (1998), <sup>2</sup>SAVAGE, (2000) y <sup>3</sup>SAVAGE y RUSSELL (2003)

\*\* Bajo limite de detección.

Se ha indicado que alto contenido de tocoferoles en especies como avellano europeo y nueces de nogal contribuyen a la estabilidad de la nueces (fruto), a su vez en Macadamia esta estabilidad estaría dada por la presencia de  $\alpha$  – tocotrienol (DUTTA *et al*, 2000).

El aceite de Gevuin presenta buena estabilidad oxidativa, esta podría estar originada por el bajo contenido de ácidos grasos poliinsaturados y la presencia

importante de tocotrienoles en el aceite (BERTOLI *et al*, 1998), al igual en Macadamia, presenta una mejor estabilidad oxidativa aceite de cultivares que poseen un mayor nivel de tocoferoles y tocotrienoles según lo señalado por (DUTTA *et al*, 2000).

La particularidad que presenta el aceite de Gevuin, un alto nivel de la fracción de tocotrienoles con respecto a los tocoferoles no se encuentra comúnmente en aceites vegetales, dando un sello particular al aceite (Madhavi *et al*, 1996 citado por BERTOLI *et al*, 1998).

### 3. MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Ubicación y época del estudio.

Las nueces de los clones de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.) seleccionados para este estudio, se cosecharon en los primeros 15 días de marzo del año 2006 en el arboretum frutal de la estación experimental Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile ubicada entre los paralelos 39° 45'30'' latitud sur y los meridianos 73° 13'50'' y 73° 14'55'', a una altura de 12 m.s.n.m.

La extracción y un primer análisis de los aceites para este estudio se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Austral de Chile, en la ciudad de Valdivia en los meses de mayo a julio del 2006.

Un segundo análisis de los aceites se realizó en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica de la Universidad de Chile, en la ciudad de Santiago, en el mes Septiembre del 2006.

#### 3.2 Material vegetal.

El primer análisis se realizó con nueces de Gevuin de siete clones de la serie VAX, estos fueron el 01, 22, 23, 33, 34, 42, y 70, pertenecientes al programa de mejoramiento genético y productivo de esta especie nativa.

El segundo análisis se realizó sólo con seis clones de la serie VAX 01, 22, 33 y 34, 53 y 64, pertenecientes al programa mencionado. Todos los clones de esta serie destacan por sus altos índices de productivos bajo condiciones de secano, estrés hídrico estival y baja fertilidad de suelo (MEDEL y MEDEL, 2000).

El clima del lugar donde crecieron estas plantas es templado-húmedo con influencia marítima presentando isotermas anuales de 11° y 12°C. Las precipitaciones alcanzan como promedio 2.200 a 2.700 mm de agua caída en un periodo de 184 días. El suelo es trumao perteneciente a la serie Valdivia la cual se caracteriza por los altos niveles de materia orgánica y pH subácidos (NISSEN, 1974; MEDEL, 1987 y MEDEL, 1988).

Su crecimiento fue de forma natural sin aplicación de pesticidas, fertilizantes y ni riego. No fueron sometidas a ningún tipo de manejo a excepción de una siega del pasto en el momento previo de la cosecha, la cual se realizó en forma manual desde el suelo. La edad de las plantas seleccionadas era 19 años (2006) al momento de la cosecha de los frutos.

### **3.3 Procesamiento inicial de las nueces.**

Las nueces fueron cosechadas en los primeros 15 días de marzo del año 2006, que se mantuvieron en cámara a 4°C, en la experimental Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile. Luego se tomaron muestras al azar de cada clon y fueron mantenidas en bolsas de papel a temperatura 4°C, hasta el momento del procesamiento.

Se seleccionaron aproximadamente 100 frutos por cada clon, a los cuales se les eliminó el pericarpio, para obtener los cotiledones. Luego a estos últimos fueron picados, con una procesadora de alimento (Moulinex) para obtener partículas de 3 mm aproximadamente, con el objetivo de obtener un deshidratado homogéneo de las muestras con una humedad constante lo que facilita la extracción de lípidos.

Antes de ser sometidas a deshidratado se les determinó contenido de materia seca (%), de acuerdo método termogravimétrico, según NCh 484 Of. 88 (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION, INN, 1988) para granos o semillas oleaginosas.

Se sometieron proceso de deshidratado en horno de aire forzado por 24 horas a 60° C. Luego de este tratamiento se les determinó nuevamente materia seca (%), según norma antes mencionada, para corroborar si presentaba humedad homogénea.

3.3.1 Extracción de Lípidos. Este procedimiento se realizó por el método SOXHLET, de acuerdo a la NCh 485 Of. 88 (INN, 1999) para granos o semillas oleaginosas.

Se pesaron 5 g de muestra picada, las que se empaquetaron en papel filtro. Se utilizó como solvente 65 mL de éter de petróleo. La muestra se introdujo en un extractor Soxhlet, y se mantuvo la extracción a reflujo durante 6 horas.

Posteriormente se realizó la destilación del éter de petróleo, con equipo de destilación simple con manta calefactora a 40°C. Luego se les eliminó los residuos del solvente, llevando a estufa por 15 minutos a 60°C.

Una vez que se eliminó los restos de solvente, el aceite se almacenó en frascos ámbar de 5 mL en refrigeración a 4°C.

### **3.4 Determinación tocoferoles y tocotrienoles.**

Las determinaciones se realizaron en dos momentos y por dos sistemas analíticos diferentes, la primera se realizó con un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masa (GC/MS) y la segunda en un equipo HPLC.

**3.4.1 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.** La determinación se realizó, una vez extraídos y derivatizados<sup>1</sup> los tocoferoles y tocotrienoles de las muestras de aceites siguiendo la metodología de utilizada por SLOVER *et al* (1983), adaptada a las condiciones del laboratorio.

En cuanto a la validación del método sólo se pudo determinar selectividad, linealidad y precisión del método analítico para las condiciones existentes en laboratorio (ANEXO 1, 2 y 3), ya que el equipo GC/MS sufrió desperfectos y no se pudo concluir de forma óptima esta etapa.

Los equipos e instrumentos, reactivos y materiales utilizados fueron los siguientes:

#### 3.4.1.1 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de gas marca Varian, modelo CP-3800, con columna capilar CP SIL 5 CB Low Beed / MS, acoplado a un espectrómetro de masa marca Varian, modelo SATURN 2200 MS/MS.
- Balanza analítica de precisión 0,0001 g.
- Centrifuga, rango entre 1800 - 4200 r.p.m.
- Agitador de tubos (Vortex), rango de 50 – 60 CY.
- Freezer.
- Refrigerador.
- Baño termostático, con temperatura de trabajo hasta 100°C.

#### 3.4.1.2 Reactivos

- Estándar de Referencia: Tocoferol Kit ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Marca Merck).
- Estándar de Referencia : Tocotrienol Kit ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ),(Marca Merck)
- Estándar Interno: 5,7- dimetiltocol (Marca Matreya).
- Butilhidroxianisol (BHA)
- Pirogalol al 3% en etanol absoluto.
- Hidróxido de Potasio (KOH), acuoso saturado.
- Ciclohexano
- Piridina.

---

<sup>1</sup> Derivatización, ver ANEXO 1

- BSTFA + TMCS (99:1)
- Heptano
- Acetona
- Hexano
- Tolueno
- Agua Destilada sin gas.

#### 3.4.1.3 Materiales

- Tubos de centrifuga de 10mL.
- Tubo con tapa rosca de 10mL.
- Frascos herméticos 2mL.
- Frascos ámbar de 5mL.
- Pipetas plásticas de 3mL.
- Pipetas aforadas de 2, 3 y 5mL.
- Micropipetas: capacidad 100 - 1000, 10 - 100 y 2 - 20 uL.
- Puntas plásticas para micropipetas.
- Jeringa de 10 uL, marca Hamilton.
- Parafilm de 4 in x 125 ft
- Gas Nitrógeno estándar.

3.4.1.4 Preparación de tocoferol -TMS y tocotrienol -TMS. Los estándares de referencia como las muestras de aceite recibieron el mismo tratamiento, se les agregó el estándar interno, se les realizó la saponificación, la extracción de la fracción insaponificable y la derivatización, según lo descrito en SLOVER *et al* (1983) y adaptado a las condiciones del Laboratorio de Fitoquímica.

Se pesaron 50 mg de aceite los cuales fueron colocados en tubos de centrifuga. A estos se agregó 25 uL del estándar interno 5,7-dimetiltocol, en una concentración de 4 µg/mL más 3,2 uL de BHA a una concentración de 2000 µg/mL.

El solvente fue removido con flujo de nitrógeno, proceso que se realizó en presencia de calor en un baño termostático a 45-50 °C. Una vez que fue removido todo el solvente, los tubos se retiraron del calor y se les agregó 2 mL de Pirogalol al 3% en etanol absoluto y sin interrumpir el flujo de nitrógeno, se agregó 125 µL de KOH acuoso saturado. Luego los tubos se sellaron rápidamente, de este punto en adelante los tubos siempre fueron protegidos de la luz directa.

Luego las muestras se mezclaron vigorosamente en un Vortex por 5 segundos y se calentaron por 8 min. en un baño termostático a 80°C, los tubos fueron agitados en tres tiempos, después de 1, 2 y 4 min. de calentamiento. Después de exactamente los 8 min., los tubos fueron retirados del calor y enfriados con agua por 15 segundos.

A los tubos se les agregó 5 mL de ciclohexano y 3 mL de agua destilada sin gas, los tubos fueron tapados y agitados vigorosamente, luego se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min.

La capa superior de ciclohexano fue transferida a segundo tubo, con tapa rosca silanizado<sup>2</sup> de 10 mL. La fase acuosa inferior fue reextractada con 5 mL de ciclohexano. Los dos extractos de ciclohexano fueron mezclados en el tubo silanizado.

Después se concentró a 1 mL aproximadamente, con flujo de Nitrógeno, la mezcla concentrada fue transferida a frascos herméticos silanizados de 2 mL en donde el resto de ciclohexano fue removido llevando a sequedad.

Se agregaron 12.5 µL de piridina y 12.5 µL de BSTFA + TMCS, se taparon y se mezclaron completamente.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por un mínimo de 15 min. Luego fueron almacenadas a 4 °C., para ser inyectadas al día siguiente.

---

<sup>2</sup> Silanización, ver ANEXO 2

3.4.1.5 Condiciones de trabajo de cromatógrafo de gas más espectrómetro de masa (GC/MS). Se inyectó 1,0  $\mu\text{L}$  en forma manual del extracto derivatizado, siendo las condiciones del equipo las que se detallan a continuación.

Se utilizó una columna capilar CP-SIL 5 CB Low Bleed/MS (30 m de largo y 25 mm. de diámetro interno), gas de arrastre Helio (flujo del gas: 0.8mL/min.), Temperatura de inyector: 240°C

Las temperaturas del horno de la columna utilizadas fueron las siguientes: al inicio 230°C, se mantuvo por 5 min., luego se aumento a 240°C con tasa de incremento de 2°C/min., nuevamente se aumento a 244°C con tasa de incremento de 0.5°C y finalmente se aumentó a 246°C con una tasa de incremento 1°C/min.

El detector del equipo es el espectrómetro de masa con trampa de iones, Saturn 2200 GC/MS/MS, marca VARIAN. El encendido del filamento fue a los 8 min., el rango de almacenamiento de masa fue de 70 a 510 (m/z), el modo de ionización es EI Auto (Impacto Electrónico Automático) con preparación del ion SIS (Almacenamiento Selectivo Iones).

La preparación de ion, SIS (Almacenamiento selectivo de iones), permite guardar los iones que se necesitan para el análisis en la trampa, lo que por ende, aumenta la sensibilidad del equipo. Los rango iones utilizados en este estudio, se determinaron con la ayuda de la librería NIST/02 Mass Spectral Library, Varian, para los tocoferoles y para tocotrienoles iones referenciales de MIRMIRA y EDWARD, (1972) y confirmados con los estándares de referencia. Los rangos de iones utilizados fueron en el siguiente orden: 73 (m/z), de 208 a 210(m/z), de 219 a 251(m/z), de 468 a 490(m/z) y de 501 a 505(m/z).

Las temperaturas del detector son las siguientes: línea de transferencia a 300 °C, manifold a 80 °C y la trampa a 200 °C respectivamente.

**3.4.2 Determinación de tocoferoles y tocotrienoles por HPLC.** La segunda determinación se realizó según la metodología de AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS), Ce 8-89 (1993). Los equipos e instrumentos, reactivos y materiales utilizados son los siguientes:

#### 3.4.2.1 Equipos e instrumentos

- Sistema HPLC: Bomba Merck Hitachi E-6200, Detector de fluorescencia Merck Hitachi F-1050 con longitud de onda de excitación a 290 nm y longitud de onda de emisión de 330nm. Integrador Merck Hitachi D-2500. Columna Merck Superspher Si 60 de 250mm\*4 $\mu$ m; Flujo 1.0 ml/min.
- Balanza analítica de precisión 0,0001 g.
- Freezer

#### 3.4.2.2 Reactivos

- Estándar de Referencia: Tocoferol Kit ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), (Marca Merck).
- Estándar de Referencia : Tocotrienol Kit ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ),(Marca Merck)
- Hexano grado HPLC
- Isopropanol grado HPLC
- Fase Móvil Hexano: Isopropanol (99.5:0.5)

#### 3.4.2.3 Materiales

- Matraz esmerilado de 10 mL.
- Frascos ámbar de de 10 mL.
- Pipetas Pasteur
- Jeringa de 100 uL, marca Hamilton.

3.4.2.4 Preparación de la muestra. Los estándares de referencia de los tocoferoles y tocotrienoles se preparan en una concentración conocida, utilizando como solvente hexano.

Se pesaron 100mg de aceite en un matraz esmerilado de 10mL, luego se aforo con hexano, usado como solvente, hasta los 10mL. Esta preparación se traspasó a frascos ámbar de 10 mL, para se conservadas en Frezzer hasta el momento de inyección.

Se inyectan 60  $\mu$ L, en condiciones del equipo descritas anteriormente.

### **3.5 Observaciones y determinaciones.**

La presencia de tocoferoles y tocotrienoles en el aceite de los clones de Gevuin seleccionados se evaluó por dos equipos distintos, por lo que el contenido de cada tocol se obtuvo como se indica a continuación según ensayo al cual corresponda.

**3.5.1 Contenido de tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.** Para la identificación y cuantificación de los  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocoferoles (TMS) y  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocotrienoles (TMS) en las muestras de aceite utilizó el software del equipo MS Workstation (VARIAN) versión 6.5 (SP1).

La identificación de cada uno de los tocoles se utilizó como referencia el tiempo de retención y la relación en la abundancia de los iones de los espectros, estas características son específicas para cada uno de ellos, estos datos se presentan en Cuadro 5 y ANEXO 3, los iones que se presentan en el cuadro se tomaron de los espectros generados por los estándares adquiridos para el estudio y fueron confirmados con la librería NITS 02 (Mass Spectral Library) para los tocoferoles y con el estudio de MIRMIRA y EDWARD(1972), para los tocotrienoles.

**CUADRO 5 Tiempo de retención e Iones referenciales para identificación tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS**

<b>Analito</b>	<b>Tiempo de Retención (min.)</b>	<b>Iones Referenciales (m/z)</b>
α- tocoferol TMS	14.1	503.2 ; 504.0 ; 237.7 ; 236.8
β- tocoferol TMS	10.8	489.3 ; 490.1 ; 222.7 ; 223.7
γ- tocoferol TMS	10.9	489.3 ; 490.1 ; 223.7 ; 222.7
δ- tocoferol TMS	9.2	475.1 ; 475.9 ; 208.6 ; 209.5
α- tocotrienol TMS	17.3	497.2 ; 498.0 ; 237.8 ; 237.0
β- tocotrienol TMS	13.1	483.1 ; 484.0 ; 223.5 ; 222.6
γ- tocotrienol TMS	13.4	483.0 ; 223.5 ; 484.0 ; 222.5
δ- tocotrienol TMS	11.1	468.9 ; 469.8 ; 249.5 ; 209.5
5,7- dimetiltocol (*EI)	12.6	489.3 ; 490.1 ; 223.7 ; 491.0

\* EI, estándar interno

La cuantificación se realizó a partir de las curvas de calibración para cada analito utilizando para ello los estándares de referencia y en caso un estándar interno, 5,7-dimetiltocol, las que permiten relacionar una determinada concentración de cada tocol (x) con la relación área (kcount) bajo la curva (área de tocol / área del 5,7-dimetiltocol) (y) ANEXO 4.

La referencia para los rangos de concentración de las curvas de calibración de cada analito se tomó del estudio realizado por BERTOLI, *et al* (1998). Los datos de rango de la curva, la ecuación de estas y sus  $R^2$ , se presentan en Cuadro 6.

**CUADRO 6 Rangos de las curvas de calibración (ppm), Ecuación de la curva y R<sup>2</sup>, para cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles por GC/MS.**

<b>Analito</b>	<b>Rango Curva Calibración (ug/ml)</b>	<b>Ecuación de curva</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
α- tocoferol TMS	0.15 – 2.4	y = 1.5416x + 0.0768	0.998098
β- tocoferol TMS	0.15 – 2.4	y = 1.0180x – 0.0157	0.995545
γ- tocoferol TMS	0.15 – 2.4	y = 1.1176x – 0.0066	0.997873
δ- tocoferol TMS	0.15 – 2.4	y = 1.6416x + 0.1223	0.996291
α- tocotrienol TMS	50 – 250	y = 0.2966x – 1.4700	0.983396
β- tocotrienol TMS	0.15 – 2.4	y = 0.3879x + 0.0459	0.982800
γ- tocotrienol TMS	0.15 – 2.4	y = 0.1776x + 0.0287	0.980656
δ- tocotrienol TMS	0.15 – 2.4	y = 0.5225x + 0.0287	0.976015
5,7- dimetiltocol (*EI)	4	---	---

\* EI, estándar interno

Las concentraciones de cada analito se expresaran en mg/kg (ppm). El valor entregado por el equipo se relaciona con el peso del aceite utilizado de cada muestra.

**3.5.2 Contenido de tocoferoles y tocotrienoles por HPLC.** Para cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles por medio de este método se utilizó la siguiente formula:

$$C_{\text{tocol}} = \frac{c \times a \times V}{A \times m}$$

Donde:  $c$  = concentración del estándar del tocol (μg/ml)

$a$  = área del tocol en la muestra (mv\*s)

$V$  = volumen de aforo (ml)

$A$  = área del tocol estándar (mv\*s)

$m$  = peso de la muestra (g)

Las concentraciones de cada analito se expresaran en ug/g (ppm).

### **3.6 Diseño experimental y análisis estadístico.**

El diseño experimental utilizado fue de tipo jerárquico, completamente al azar, con 6 y 7 tratamientos (clones según ensayo) y tres repeticiones por clon. Se constató la distribución normal a través del test estadístico de normalidad de Kolmogorov - Smirnov con un nivel de significancia de 5%.

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas de los datos originados, se realizó los test estadístico de Cochran's (desviación estándar), con un nivel de significancia de 5%.

Posteriormente los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y a una comparación de medias a través del test Tukey DHS ( $p \leq 0,05$ ) (LITTLE, 1976). Las pruebas estadísticas se realizaron con programa computacional Statgraphics 5.1.

#### 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se presenta y se discuten a continuación los resultados de los análisis realizados a el aceite cotiledonar de las nueces de un total nueve clones de Gevuin para determinar el contenido de tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E).

Con la información obtenida en los dos ensayos realizados en este estudio, se analizan las diferencias entre clones y se comparan estos valores con los obtenidos en trabajos previos y de otras especies frutales de nuez.

**4.1 Antecedentes de la evaluación realizada por GC/MS.** La evaluación realizada por este sistema analítico, permitió caracterizar el aceite de los clones de Gevuin, detectando tocoferoles y tocotrienoles en cada clon evaluado en este ensayo como se puede apreciar en los cromatogramas en el ANEXO 6.

Como se indicó, esta evaluación se interrumpió por los desperfectos que presentó equipo GC/MS, los cuales que afectaban el funcionamiento óptimo de éste.

Además, en el caso puntual de  $\alpha$ - y  $\gamma$  – tocotrienol, las concentraciones de éstos fueron superiores a la concentración del punto más alto de las curvas de calibración realizadas para este estudio, en los siete clones evaluados. En estos casos, se indica como pasos a seguir, que los valores fuera de la curva no sean considerados, debiendo modificar las curvas a las concentraciones necesarias o bien diluir las muestras y analizar nuevamente.

Al no poder realizar las opciones indicadas por defectos en el equipo, considerando además que los siete clones presentaron las mismas características mencionadas y que las siete muestras recibieron idénticas condiciones al ser preparadas

e inyectadas en el equipo, se tomaron todos los datos entregados por el equipo a través de las únicas curvas existentes, para realizar la evaluación del contenido y determinar las posibles diferencias existentes entre los clones.

Con estos antecedentes, se decidió realizar una segunda determinación de tocoferoles y tocotrienoles sólo en seis clones de Gevuin perteneciente al programa, por medio del sistema analítico HPLC, que en ese momento fue el único disponible, los resultados obtenidos en ambas determinaciones se presentan a continuación.

#### **4.2 Contenido Tocolos totales, determinado por GC/MS.**

La información existente de determinaciones de tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) en Gevuin es muy escasa. Además se debe señalar que es impreciso el origen de las nueces utilizadas en esos estudios y los procedimientos utilizados en la determinación analítica de laboratorio.

El contenido total de tocoles presente en cada muestra de aceite, esta conformado por siete de los ocho tocoles constituyente de la vitamina E detectados en este estudio, resultado similar a lo obtenido por BERTOLI *et al* (1998), quien señala que Gevuin presenta los ocho vitameros en distintas proporciones.

En el Cuadro 7 se presenta el contenido total de tocoles de cada uno de siete clones de Gevuin, además se indica las diferencias estadísticas entre los clones por la variación que presento el contenido total de tocoles.

**CUADRO 7 Contenido tocoles totales determinado por GC/MS (mg/kg).**

Clon	Total tocoles
01	537,31 a
42	514,46 a
33	467,24 b
70	397,94 c
34	382,18 c
23	372,38 c
22	319,13 d
Media	427,23

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

El contenido total de tocoles varió entre 319,44 mg/kg (clon 22) hasta 537,31 mg/kg (clon 01) presentando diferencias significativas entre los clones evaluados. El contenido promedio de tocoles es de 426,61 mg/kg, el cual contrasta con el trabajo realizado por BERTOLI, *et al* (1998), donde valor total de tocoles sólo alcanzó a 133,3 mg/kg y con lo obtenido por ROMERO *et al* (2004), que presentó un total de tocoles de 156,0 mg/kg.

Ambos autores señalan valores muy cercanos y a su vez menores al obtenido en este estudio, es necesario mencionar que ambos trabajos no indican claramente el origen de la nuez, en relación a tipo de suelo y clima de donde provienen, edad de planta, el tipo y tamaño de muestra y los procedimientos analíticos en cada caso.

La variación clonal en el contenido total de tocoles en Gevuin (319,44 a 537,31 mg/kg) es similar a las diferencias en el contenido total encontradas en evaluaciones de distintos cultivares de especies como avellanas europeas y nueces de nogal, en donde los contenidos totales de tocoles varían en un rango de 314 a 613 mg/kg y de 429 a 505 mg/kg respectivamente (CREWS *et al*, 2005a y CREWS *et al*, 2005b).

**4.2.1 Tocoferoles totales determinados por GC/MS.** El contenido total de tocoferoles presentó diferencias significativas entre los clones, las cuales se presentan en el Cuadro 8, encontrándose este contenido en un rango de 0,82 mg/kg (clon 34) a 2,29 mg/kg (clon 42).

**CUADRO 8 Contenido total de tocoferoles determinado por GC/MS (mg/kg).**

Clon	Total Tocoferoles
42	2.29 a
22	1.67 b
01	1.46 c
70	1.31 c d
33	1.22 d
23	1.16 d
34	0.82 e
Media	1.42

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

El contenido promedio de los siete clones evaluados es de 1,42 mg/kg, contenido que se asemeja a lo obtenido por BERTOLI *et al*, (1998) que alcanzó 1,1 mg/kg.

Como se puede apreciar Gevuin posee un bajo contenido de tocoferoles lo que la diferencia de otros frutales de nuez, como las avellanas europeas y las nueces de nogal, en el primero se puede encontrar contenidos promedios de 186,01 a 206,01 mg/kg, según año de evaluación, como lo indica AMARAL *et al* (2006) en su estudio realizado en Portugal y en el segundo los contenidos promedios pueden variar de 260 a 632 mg/kg, según lo señalado por CREWS *et al* (2005 b).

Gevuin tiene similitud con Macadamias, frutal de nuez que también pertenece a la familia de las Proteáceas, la cual presenta bajos contenidos de tocoferoles, menores a

5,9 ug/g según lo señalado por DUTTA *et al* (2000), pero estos son superiores a lo registrado por Gevuin en este estudio.

El contenido total de tocoferoles para cada clon en este estudio, esta dado por la presencia de  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocoferol como se indica en el Cuadro 9, estos contenidos no superaron 1,02 mg/kg, aun así para cada uno de ellos se presentaron diferencias significativas entre los clones.

**CUADRO 9 Contenido de tocoferoles por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Clon	$\alpha$ - <i>tocoferol</i> *	$\beta$ - <i>tocoferol</i>	$\gamma$ - <i>tocoferol</i> *	$\delta$ - <i>tocoferol</i> *
01	0.66	nd	0.61	0.19
22	0.79	nd	0.79	0.09
23	0.64	nd	0.41	0.11
33	0.57	nd	0.58	0.07
34	0.44	nd	0.35	0.03
42	1.00	nd	1.02	0.27
70	0.73	nd	0.50	0.08

nd = no detectado.

\* = existen diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ )

En este estudio, el compuesto  $\beta$  – tocoferol, no fue detectado en ninguna de las muestras de aceite de los siete clones estudiados, según lo señalado por BERTOLI *et al* (1998) la presencia de éste en el aceite de Gevuin se encontraría en cantidades menores a 0,05 mg/kg, siendo un tocol de muy baja presencia en este aceite.

4.2.1.1  $\alpha$  - *tocoferol*. En el Cuadro 10 se observa la presencia de variaciones entre los clones en el contenido de este tocol, cuyo rango esta entre 0,44 mg/kg (clon 34) a 1,0 mg/kg (clon 42).

**CUADRO 10** Variación de  $\alpha$  – *tocoferol* en siete clones de Gevuin (mg/kg).

Clon	$\alpha$ - <i>tocoferol</i>
42	1.00 a
22	0.79 b
70	0.73 c
01	0.66 d
23	0.64 d
33	0.57 e
34	0.44 f
Media	0.69

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

El valor medio de  $\alpha$  – *tocoferol* en este estudio es de 0,69 mg/kg, valor similar a lo presentado por BERTOLI *et al* (1998), el cual encontró un contenido de 0,4 mg/kg. Gevuin, tiene comportamiento similar a Macadamia, la cual presenta contenidos en un rango de 0,8 a 1,1 ug/g, según lo señalado por DUTTA *et al* (2000).

Al contrario de Gevuin, uno de los frutales de nuez que destaca por presentar un alto contenido de  $\alpha$  – *tocoferol* es el avellano europeo, registrando contenidos de 105,9 a 226,8 mg/kg. Se ha indicado también que este contenido es variable dependiendo del cultivar, año de producción y localidad donde se encuentren las plantas PARCERISA, *et al* (1998), AÇKURT, *et al* (1999), ÖZDEMİR *et al* (2001) y AMARAL *et al* (2006).

4.2.1.2  $\gamma$  – *tocoferol*. El Cuadro 11 se observa que el contenido de este tocol presentó variación clonal, fluctuando el contenido entre 0,35 mg/kg (clon 34) a 1,02 mg/kg (clon 42). El valor promedio de los siete clones es de 0,61 mg/kg, contenido similar al informado por BERTOLI, *et al* (1998), el cual señala un valor de 0,6 mg/kg e inferior a lo observado por ROMERO *et al* (2004) el cual fue de 4,0 mg/kg.

**CUADRO 11 Variación de  $\gamma$  – tocoferol en siete clones de Gevuin (mg/kg).**

Clon	$\gamma$ – tocoferol
42	1.02 a
22	0.79 b
01	0.61 c
33	0.58 c d
70	0.50 d
23	0.41 e
34	0.35 e
Media	0.61

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

Gevuin, a diferencia de especies comerciales de nueces, presenta un bajo contenido de  $\gamma$  – tocoferol, ya que el contenido de éste en almendras es de 12,5 ug/g, en avellanas europeas de 61,2 ug/g y en nueces de nogal 300,5 ug/g, siendo este último el que presenta el mayor contenido de esta fracción (MAGUIRE *et al*, 2004), con variaciones en el contenido que van de 247 a 525 mg/kg, según lo indicado por CREWS *et al* (2005 b).

4.2.1.3  $\delta$  – tocoferol. En el Cuadro 12 se presenta el contenido y la variación entre los clones de  $\delta$  – tocoferol, los que fluctuaron de 0,03 mg/kg (clon 34) a 0,27 mg/kg (clon 42).

**CUADRO 12 Variación de  $\delta$  – tocoferol en siete clones de Gevuin (mg/kg).**

Clon	$\delta$ – tocoferol
42	0.27 a
01	0.19 a b
23	0.11 b c
22	0.09 b c
70	0.08 b c
33	0.07 b c
34	0.03 c
Media	0.12

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

El contenido promedio es de 0,12 mg/kg, el cual es superior al determinado por BERTOLI *et al* (1998), el cual informó que el contenido de esta fracción fue menor a 0,05 mg/kg.

En especies como Macadamia,  $\delta$  – tocoferol presenta contenidos en un rango de 3,5 a 4,8 ug/g (DUTTA *et al*, 2000), avellanas europeas de 1,0 a 3,0 mg/kg, pistachos de 0,5 a 2,3 mg/kg, destacando la concentración en nueces de nogal, de 23 a 54 mg/kg (KONRSTEINER *et al*, 2006) todos superiores a lo encontrado en Gevuin.

**4.2.2 Tocotrienoles totales, determinados por GC/MS.** El contenido total de tocotrienoles presentó diferencias significativas entre los clones como se puede observar en el Cuadro 13, encontrándose este contenido en un rango de 317,77 mg/kg (clon 22) a 535,85 mg/kg (clon 01).

**CUADRO 13 Contenido total de tocotrienoles, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Clon	Total Tocotrienoles
01	535.85 a
42	512.17 a
33	466.02 b
70	396.63 c
34	381.36 c
23	371.22 c
22	317.76 d
Media	425.86

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

El valor promedio de los siete clones es de 425,86 mg/kg, el cual es superior a lo obtenido por BERTOLI *et al* (1998), el cual alcanzó un contenido de 132,3 mg/kg.

Gevuin presenta un mayor contenido de tocotrienoles que tocoferoles, lo que concuerda con lo informado por BERTOLI *et al* (1998). Esta característica la diferencia otros frutales de nuez, ya que en ellos destaca frecuentemente la fracción de tocoferoles, es así, como en avellano europeo el contenido de fracción de tocotrienoles sólo alcanza a 56 mg/kg como lo indica CREWS *et al*, (2005 a) y en nueces de nogal no se ha detectado ninguno de los cuatro componentes de esta fracción según lo señalado por CREWS *et al*, (2005 b).

El contenido total de tocotrienoles para cada clon en este estudio, está dado por la presencia de los cuatro tocoles que conforman esta fracción de la vitamina E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocotrienol) como se indica en el Cuadro 14.

**CUADRO 14 Contenido de tocotrienoles por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

<b>Clon</b>	<i><math>\alpha</math>-tocotrienol</i> *	<i><math>\beta</math>-tocotrienol</i> *	<i><math>\gamma</math>-tocotrienol</i> *	<i><math>\delta</math>-tocotrienol</i> *
01	524.24	1.35	10.04	0.22
22	307.85	0.65	9.20	0.06
23	361.57	0.94	8.62	0.09
33	456.33	1.07	8.40	0.22
34	373.59	0.92	6.82	0.03
42	497.28	1.55	13.17	0.17
70	385.45	1.11	10.01	0.06

\* = existen diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ )

Es  $\alpha$  - tocotrienol, el tocol que presenta un mayor contenido dentro de esta fracción de la vitamina E, en cada clon evaluado en este estudio. Además para cada uno de estos cuatro componentes los clones presentaron diferencias significativas, como se indica (\*), las cuales son discutidas individualmente a continuación.

4.2.2.1  *$\alpha$  - tocotrienol*. El Cuadro 15 se observa la presencia de diferencias entre los clones estudiados. El contenido varió entre 307,24 mg/kg (clon 22) hasta 524,24 mg/kg (clon 01).

Para  $\alpha$  - tocotrienol el contenido medio de los siete clones es de 415,18 mg/kg, superior a lo informado por BERTOLI *et al* (1998) y ROMERO *et al* (2004), los cuales presentan contenidos de 130 mg/kg y 152 mg/kg para este vitamero.

**CUADRO 15 Variación de  $\alpha$  - tocotrienol en siete clones de Gevuin (mg/kg).**

Clon	$\alpha$ - tocotrienol
01	524.24 a
42	497.28 a
33	456.33 b
70	385.45 c
34	373.59 c
23	361.57 c
22	307.85 d
Media	415.18

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

Gevuin presenta un alto contenido de  $\alpha$  - tocotrienol, lo que la diferencia de la mayoría de las nueces comerciales, Macadamia presenta este mismo comportamiento, en la cual se ha observado valores de 12,5 a 48,4 ug/g, dependiendo del cultivar (DUTTA, *et al* 2000), pero estos son menores a los registrados por Gevuin en este estudio.

Por el contrario, el avellano europeo destaca la fracción de los tocoferoles de la vitamina E, así lo demuestra un estudio realizado por AMARAL *et al* (2006), sólo en algunas de las variedades comerciales estudiadas presentan bajos contenidos de  $\alpha$  - tocotrienol (1,0 a 2,5 mg/kg.) y en la mayoría de ellas no se ha detectado este vitamero.

4.2.2.2  $\beta$  - tocotrienol. En el Cuadro 16 se presentan las variaciones entre los clones estudiados las que fluctuaron en un rango de 0,66 mg/kg (clon 22) a 1,55 mg/kg (clon 42).

**CUADRO 16 Variación de  $\beta$  - tocotrienol en siete clones de Gevuin (mg/kg).**

Clon	$\beta$ - tocotrienol
42	1.55 a
01	1.35 b
70	1.11 c
33	1.07 c
23	0.94 d
34	0.92 d
22	0.65 e
Media	1.08

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

El valor promedio, para  $\beta$  - tocotrienol en este estudio es de 1,09 mg/kg, siendo este valor muy semejante al nivel informado por BERTOLI, *et al* (1998) de 1,3 mg/kg.

La presencia de este vitámero en frutales de nuez es baja, es así como en nueces de nogal no ha sido detectado y en avellanas europeas los contenidos fluctuarían de 0,1 a 3,8 mg/kg (CREWS *et al*, 2005 b y AMARAL *et al*, 2006).

4.2.2.3  $\gamma$  - tocotrienol. Las diferencias clonales se pueden apreciar en el Cuadro17, presentando una variación de 6,82 mg/kg (clon 34) a 13,17 mg/kg (clon 42).

El contenido promedio de los siete clones es de 9,47 mg/kg, contenido superior a lo informado por BERTOLI *et al* (1998) el cual obtuvo 0,9 mg/kg en aceite de Gevuin analizado.

**CUADRO 17 Variación de  $\gamma$  - tocotrienol en siete clones de Gevuin (mg/kg).**

Clon	$\gamma$ - tocotrienol
42	13.17 a
01	10.04 b
70	10.01 b
22	9.20 b c
23	8.62 c
33	8.40 c
34	6.82 d
Media	9.47

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

En avellano europeo, la presencia de  $\gamma$  - tocotrienol es baja y sólo ha sido detectado en algunos cultivares de España, el contenido varía de no ser detectado a 34 mg/kg (CREWS *et al*, 2005 a). En Gevuin sería el segundo tocol de importancia como lo refleja este estudio.

El aceite Palma tiene la particularidad de presentar un elevado contenido de tocotrienoles,  $\gamma$  – tocotrienol es el de mayor presencia, alcanzando un contenido de 352,3 mg/kg (AL-SAQER *et al* 2004).

4.2.2.4  $\delta$  - tocotrienol. El Cuadro 18 presenta la diferencias clonales para este tocol, el contenido varió de 0,03 mg/kg (clon 34) a 0,22 mg/kg (clon 33). Con un valor promedio es de 0,12 mg/kg, muy semejante a lo observado por BERTOLI *et al* (1998), de 0,1 mg/kg.

**CUADRO 18 Variación de  $\delta$  - tocotrienol en siete clones de Gevuin (mg/kg).**

Clon	$\delta$ - tocotrienol
33	0.22 a
01	0.22 a
42	0.17 a b
23	0.09 b c
70	0.06 b c
22	0.06 b c
34	0.03 c
Media	0.12

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

$\delta$  - tocotrienol, al igual que  $\delta$ - tocoferol, se encuentra en cantidades trazas en la mayoría de los frutales de nuez estudiados, en avellanas europeas y nueces de nogal es reportado como no detectado (CREWS *et al*, 2005 a, CREWS *et al*, 2005 b y AMARAL *et al*, 2006).

#### 4.3 Contenido Tocolos totales, determinados por HPLC.

En la segunda determinación de vitamina E, sólo se evaluaron seis clones de interés, pertenecientes al programa de mejoramiento.

En esta evaluación sólo se logró detectar  $\alpha$  – tocotrienol, en cada uno de los seis clones evaluados, es este tocol el de mayor presencia en aceite de Gevuin, como ha sido indicado por BERTOLI *et al* (1998), ROMERO *et al* (2004) y los clones VAX evaluados en el ensayo por GC/MS, presentado anteriormente.

Las condiciones de almacenaje de los frutos y de extracción de aceite, fueron idénticas para ambas evaluaciones, según lo señalado por Von Coors *et al* (1988) citado

por CREWS *et al*, (2005 a), los tocoferoles tienen buena estabilidad en aceites almacenados a 4°C, temperatura en que se mantuvo los frutos y aceites antes de ser evaluados en este estudio, por lo que las diferencias observadas en cuanto a detección y contenido de tocoles entre ambas evaluaciones de este estudio, se debieron probablemente a las distintas metodologías analíticas utilizadas, por lo que es importante mencionar:

- Para HPLC, se realiza una dilución de la muestra de aceite en hexano, basado en que la vitamina E es medianamente soluble en solventes orgánicos y en aceites vegetales, según lo indico ORTIS, (2006)<sup>3</sup>.
- Para GC/MS, se realizó una saponificación de la muestra de aceite, lo que permite separar la vitamina E de los lípidos, aislando la vitamina en la fracción insaponificable de los aceites vegetales (BLANCO, 2001 y FENNEMA, 2000), obteniendo una muestra más pura, requisito importante en un equipo GC/MS.
- El volumen final en que queda la muestra, en HPLC es de 10 mL y por el contrario en GC/MS es de 0.025 mL.

AMARAL *et al* (2006), en su estudio en avellanas europeas determinando contenidos de tocoferoles y tocotrienoles en distintos cultivares, indican que las diferencias entre los valores entregados en su estudio con otras publicaciones, probablemente se deben al método de detección utilizado en cada investigación, variando la selectividad y sensibilidad de los equipos, indicando además que existen diferencias entre las metodologías para la identificación y separación de los vitameros.

---

<sup>3</sup> ORTIS, J. 2006. Ing. Ej. Alim. M. Cs. Alim. Profesor Asistente, Departamento de los Alimentos y Tec. Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica. Universidad de Chile. Comunicación personal.

**4.3.1  $\alpha$  – tocotrienol.** Los clones presentaron diferencias significativas en contenido de  $\alpha$  – tocotrienol como se presenta en el Cuadro 19, fluctuando los valores entre 63,41 ug/g (clon 34) a 163,74 ug/g (clon 53).

**CUADRO 19 Variación de  $\alpha$  – tocotrienol en seis clones de Gevuin (ug/g).**

Clon	$\alpha$ - tocotrienol
53	163.74 a
64	157.53 a
01	152.20 a
33	147.05 a b
22	97.45 b c
34	63.41 c
Media	105.72

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey.

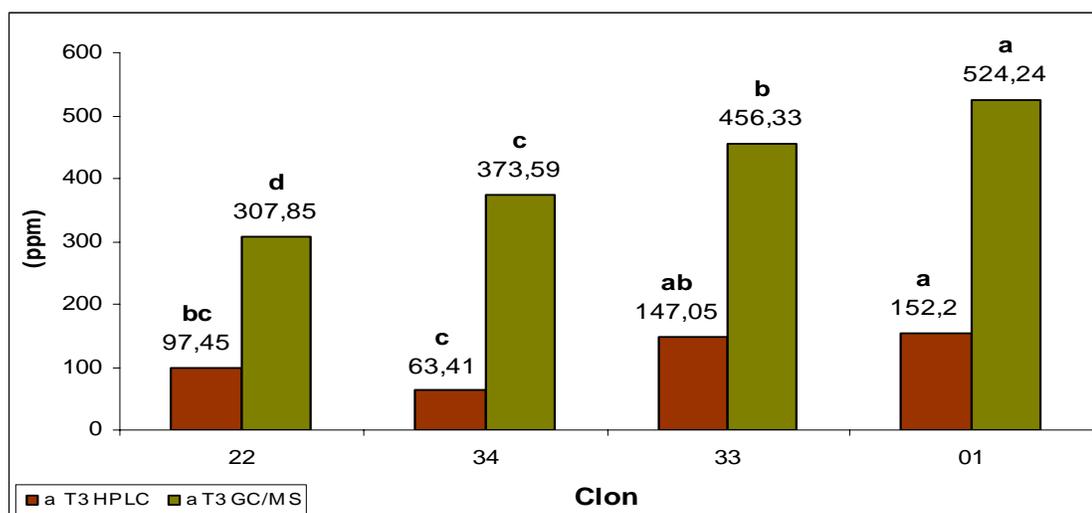
El valor medio entregado por estos seis clones es de 105,71 ug/g, inferior a la media obtenido por los clones VAX en ensayo anterior (415,18 mg/kg), si bien es un valor más próximo a lo observado por BERTOLI *et al* (1998) de 130 mg/kg y ROMERO *et al* (2004) de 152 mg/kg, es inferior a lo indicado por estos autores.

Al comparar la media con otro frutal nuez como Macadamia, Gevuin presenta un mayor contenido, ya que en la primera el contenido varía de 12,5 a 48,4 ug/g según cultivar como lo señala DUTTA *et al* (2000).

Se ha indicado que la buena estabilidad oxidativa del aceite de Gevuin podría estar originada por el bajo contenido de ácidos grasos poliinsaturados y la presencia importante de tocotrienoles, particularmente  $\alpha$  - tocotrienol (BERTOLI *et al*, 1998)

El aceite de Gevuin posee un alto contenido de ácido palmitoleico ( $C_{16:1} \Delta^{11}$  cis), el cual da la propiedad de poder absorber las radiaciones bajas del espectro U.V., lo que le permite actuar como filtro solar (MEDEL y MEDEL, 2000), esta característica se ha relacionado con el alto nivel  $\alpha$ -tocotrienol, destacando la importancia de utilizar el aceite, como un producto de índole cosmético y/o farmacéutico (MEDEL y CARRILLO, 2005)

Con los datos obtenidos del contenido  $\alpha$  – tocotrienol en ambas evaluaciones realizadas para este estudio y sólo con los cuatro clones analizados en ambos sistemas (clones VAX 01, 22, 33 y 34), se puede señalar que éstos presentaron diferencias significativas en el contenido de  $\alpha$  – tocotrienol en cada evaluación realizada, analizando por separado cada sistema, como se puede observar en la Figura 3.



\* Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Tukey, entre clones para un mismo método analítico.

**FIGURA 2. Variación en el contenido de  $\alpha$  – tocotrienol (a T3) en cuatro clones de Gevuin, determinado por HPLC y GC/MS.**

El clon 01, es el que presenta el mayor contenido de  $\alpha$  – tocotrienol en ambos sistemas de analíticos, se diferencia claramente de otros clones en GC/MS, en la determinación por HPLC sólo es semejante con clon 33. A su vez, los clones 22 y 34 son estadísticamente diferentes en la evaluación por GC/MS, presentan los menores contenidos, lo que se replica en la evaluación por HPLC, aunque en esta última comparten la ubicación por la similitud en el contenido de este tocol, dejando de manifiesto una clara diferenciación clonal en el contenido de  $\alpha$  – tocotrienol.

Según lo señalado por SAVAGE (2000), es posible que algunas plantas de nuez tengan mayores efectos benéficos que otras plantas según el perfil lipídico que posean, si a este antecedente se le suma la evidencia que indica que tanto tocoferoles y tocotrienoles pueden jugar un rol importante en la salud humana, el conocer la variación en el contenido de todos los tocoferoles y tocotrienoles en los alimentos esta adquiriendo una mayor importancia (AMARAL *et al*, 2006).

Se ha indicado que en nueces de nogal se encontraron diferencias en el contenido de tocoferoles entre las variedades y la localidad de procedencia de las nueces, con una marcada influencia de la localidad de procedencia de estas (CREWS *et al* 2005 b).

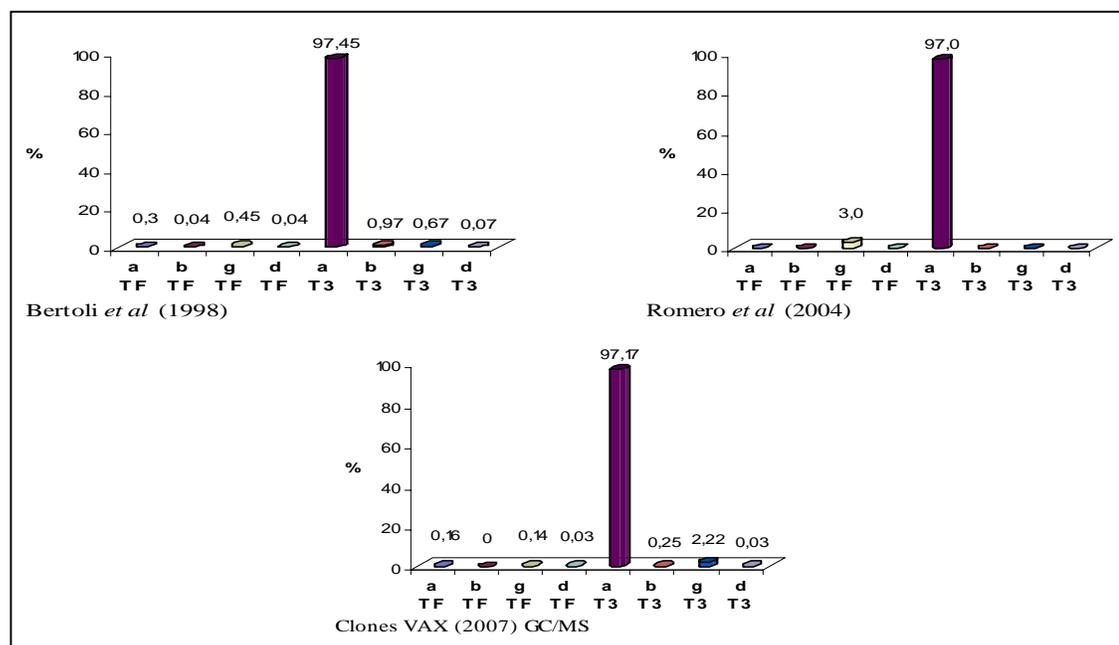
En avellano europeo se ha señalado que la composición general del aceite es afectado por la variedad, localización geográfica, efectos climáticos y la diversidad de tratamientos recibidos por las plantas (CREWS *et al* 2005 a), encontrando diferencias significativas de tocoferoles y esteroides en la composición de aceites en variedades españolas de avellano europeo cultivadas en Estados Unidos (PARCERISA *et al* 1998). Además se ha informado de diferencias en el contenido de  $\alpha$  – tocoferol, entre variedades neocelandesas, estadounidenses y europeas cultivadas en Nueva Zelanda, pero estas no presentaron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos y esteroides (Savage *et al* 1997 citado por CREWS *et al* 2005 a), estos últimos autores explican que es importante contar con información del efecto varietal en la composición

de aceite de avellanas europeas, ya que permitiría proveer al mercado, nueces y aceites ricos en antioxidantes que dan estabilidad y beneficios para la salud.

Este punto señala la importancia de realizar en caso particular de Gevuin, una selección clonal, identificando los fenotipos que presentan mayores contenidos de  $\alpha$  – tocotrienol, lo que permitiría enfocar la utilización del aceite o frutos de esos clones en nutrición, cosmetología o farmacología.

#### 4.4 Síntesis e importancia de tocoles en aceite de Gevuin y de otras especies.

El aceite de Gevuin, como se ha podido corroborar se caracteriza por poseer una mayor proporción de tocotrienoles, específicamente  $\alpha$  – tocotrienol, el cual representa el 97% del total de la vitamina E (Figura 3) y el 3% restante esta conformado por el resto de tocotrienoles y los tocoferoles.



**FIGURA 3. Composición de tocoferoles (TF) y tocotrienoles (T3) en aceite de Gevuin.**

A su vez Macadamia sólo presenta  $\alpha$  – tocotrienol, el cual alcanza un 90% de la vitamina, el otro 10% esta conformado únicamente por  $\alpha$  – y  $\delta$  – tocoferol (DUTTA *et al*, 2000). Una alta proporción de tocotrienoles se puede encontrar en el aceite de Palma, la cual alcanza alrededor del 70%, del cual el 45% es  $\gamma$ -tocotrienol, seguido por  $\alpha$  – y  $\delta$  – tocotrienol (AL - SAQER *et al*, 2004).

Por el contrario a Gevuin, en especies comerciales como el avellano europeo y de nueces de nogal se destaca mayoritariamente la fracción de tocoferoles, en el primero  $\alpha$  – tocoferol representa 92% de la vitamina, el 8% restante esta conformado por  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - tocoferol, los tocotrienoles tienen baja presencia y están presentes sólo en algunas variedades (CREWS *et al*, 2005 a y AMARAL *et al*, 2006). En el segundo es  $\gamma$ - tocoferol que tiene mayor presencia alrededor del 90%, el 10% restante esta conformado por  $\alpha$  - y  $\delta$  – tocoferol, los tocotrienoles no han se detectado según lo informado por CREWS *et al* (2005 b).

En la actualidad, esta adquiriendo mayor importancia conocer la composición de tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) en los alimentos, ya que en el pasado se había considerado a  $\alpha$  – tocoferol como el tocol más importante por poseer una mayor biopotencia, sin embargo, la evidencias recientes muestran que los demás tocoles también pueden contribuir al total de bioactividad de esta vitamina, además podrían cumplir diferentes roles en el cuerpo humano, por lo que los diferentes beneficios que presenta esta vitamina contra distintas enfermedades pueden provenir de estos tocoles (THERIAULT *et al* 1999).

En la mayoría de las fuentes que aportan vitamina E, los tocoferoles son más abundantes que tocotrienoles, existiendo variación en la composición de éstos según la especie (SCHWENKE, 2002).

En general, se ha sugerido que los antioxidantes reducen enfermedades cardiovasculares y el cáncer por detener el daño que ocasionan los radicales libres, por

lo tanto, el consumo de ciertos productos de alimenticios ricos en vitamina E, reducirían la incidencia de estas patologías (THERIAULT *et al*, 1999).

En el estudio realizado por YOSHIDA *et al* (2003), pudieron concluir que los tocoferoles y tocotrienoles tiene la misma reactividad hacia radicales libres y ejercerían la misma actividad antioxidante contra peroxidación de los lípidos en la solución, además ambos tienen movilidad similar dentro de las membranas celulares, pero los tocotrienoles son transferidos más fácilmente entre las membranas e incorporados en ellas que los tocoferoles.

Además de sus funciones como antioxidantes, los tocoles, en particular los tocotrienoles han mostrado tener propiedades funcionales (no antioxidantes) en contraste con  $\alpha$ -tocoferol, compuesto que por lo general se encuentra en suplementos de vitamina E (como alfa tocoferil acetato “DL” (sintético) y “D” (natural)) (THERIAULT *et al*, 1999). Recientes investigaciones han obtenido resultados indican que las funciones biológicas de tocoferoles y tocotrienoles no parecen estar relacionadas entre si (Hayes, et al, 1993 citado por VASCONCELLOS, s/f).

Existe evidencia que demuestra que  $\alpha$ -tocoferol tiene funciones en la expresión génica, como es evidenciado por estudios realizados con genes individuales y análisis de microseries (Azzi *et al.*, 2004 y Barella *et al.*, 2004 citado por BRIGELIUS, 2005);  $\gamma$ -tocoferol presenta funciones anti-inflamatorias por la inhibición de actividad ciclooxigenasa y por ende la formación de prostaglandina E2 (Jiang *et al.*, 2000 y Jiang y Ames, 2003 citado por BRIGELIUS, 2005).

Se ha demostrado que los tocotrienoles pueden reducir niveles de colesterol en el plasma, así como también de otros factores de riesgo, lipídico y no lipídico relacionados con enfermedades cardiovasculares (THERIAULT *et al*, 1999).

En el cáncer, los tocotrienoles presentan mejor actividad anti-tumor que  $\alpha$  – tocoferol, particularmente contra el cáncer de mama induciendo a apoptosis a las células cancerígenas (THERIAULT *et al*, 1999, SCHWENKE, 2002 y Takahashi y el Water, 2004 citado por BRIGELIUS, 2005).

Además se ha reportado que  $\alpha$  – tocotrienol presenta una potente acción neuroprotectora, en neuronas del sistema nervioso central. Estudios epidemiológicos y clínicos sugieren que la vitamina E, en particular  $\alpha$ -tocoferol, presenta beneficios en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad Alzheimer, por lo que  $\alpha$ -tocotrienol puede ser un instrumento potencial en las terapias para estas enfermedades (AKAIKE *et al* 2004).

La información de las particularidades que presentan los tocoferoles y tocotrienoles, esta llevando a buscar una formulación más eficiente y beneficiosa de suplementos de vitamina E. En la actualidad los suplementos de tocotrienoles disponibles comercialmente, son hechos en base de aceite de salvado de arroz o de aceite de palma (THERIAULT *et al*, 1999).

Estos antecedentes realzan la posibilidad de utilización del aceite de Gevuin como un producto fitoterapéutico, por ser una fuente que aporta un interesante contenido de  $\alpha$ -tocotrienol.

## 5. CONCLUSIONES

Al caracterizar y determinar contenido de las distintas fracciones de tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) en el aceite de los clones de Gevuin evaluados, se pudo demostrar que existen variaciones significativas entre los clones en el contenido de cada fracción, por lo que se acepta la hipótesis general planteada para este estudio.

La fracción de la vitamina E más importante en este aceite es la de tocotrienoles, la cual alcanzó, en el primer ensayo realizado, una media 425,86 mg/kg, dado por la presencia mayoritaria de  $\alpha$  – tocotrienol (97% de la vitamina E) en todos lo clones evaluados.

La variación entre clones en el contenido de  $\alpha$  – tocotrienol fluctuó en un rango de 307,85 mg/kg (clon 22) a 524,24 mg/kg (clon 01). Otro tocol de esta fracción que destacó, pero en una menor proporción (2,2%), fue  $\gamma$  – tocotrienol presentando una variación clonal entre 13,17 mg/kg (clon 42) a 6,82 mg/kg (clon 34).

En el segundo ensayo realizado arrojo sólo la presencia de  $\alpha$  – tocotrienol, presentando una media de 105,72 ug/g. El contenido de este vitamero, presentó una variación significativa entre los clones, la que fluctuó en un rango entre los 63,41 ug/g (clon 34) a 163,74 ug/g (clon 53), para este análisis.

Lo relevante de este estudio es que permite tener las primeras nociones de la variabilidad en el contenido de las fracciones de la vitamina E que presentan los clones seleccionados del programa de mejoramiento genético de esta especie, en especial la variación en el contenido de  $\alpha$  – tocotrienol, lo que permite contar con una herramienta más para la selección de aquellos clones con mejores características fitoquímicas, para

obtener un producto, ya sea para fines nutricionales, farmacológicos, cosmetológicos o fitoterapéuticos.

## 6. RESUMEN

Gevuin (*Gevuina avellana* Mol.), especie endémica de Chile perteneciente a la familia de las Proteaceas, ha sido estudiada durante los últimos 20 años a través de un programa de “Mejoramiento Genético y Productivo en *Gevuina avellana* Mol.” en la Universidad Austral de Chile, seleccionando clones en función de sus características productivas, estructurales y de calidad de fruto.

El objetivo de este estudio, fue determinar y evaluar el contenido de tocoferoles y tocotrienoles, constituyentes de la vitamina E, presentes en el aceite de avellana de los clones seleccionados, a efectos de contribuir al proceso de selección de material genético.

En el mes de Marzo del año 2006 se seleccionaron nueces por cada clon estudiado, las cuales fueron picadas y sometidas a la extracción de lípidos por el método de Soxhlet. Se realizó una primera determinación de tocoferoles y tocotrienoles a siete clones de Gevuin mediante la utilización de un equipo cromatógrafo de gas acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS). La segunda determinación se realizó a seis clones de Gevuin, mediante un equipo HPLC.

Los resultados obtenidos en la primera determinación por GC/MS, entregaron la conformación de las fracciones de tocoferoles y tocotrienoles presentes en el aceite de los clones evaluados, destacando en todos ellos la fracción de los tocotrienoles específicamente la fracción  $\alpha$ - (alfa), la cual representa sobre el 97% del total de los constituyentes de la vitamina E en este aceite, la cual, al igual que las otras fracciones de esta vitamina, presentaron una variación significativa entre los clones. El contenido de  $\alpha$ - tocotrienol presentó una variación que fluctuó entre 307,85 mg/kg (clon 22) a 524,24 mg/kg (clon 01).

Los resultados obtenidos en el análisis realizado por HPLC se detectó sólo la presencia de  $\alpha$  – tocotrienol, tocol de mayor presencia en este aceite, al igual que en la evaluación anterior presentó una variación significativa entre los clones, la cual fluctuó entre los 63,41 ug/g (clon 34) a 163,74 ug/g (clon 53).

Estos resultados demostraron la presencia de variaciones entre los clones en el contenido de la vitamina E, específicamente  $\alpha$  – tocotrienol, lo que contribuye como una herramienta más en el proceso de selección clonal, lo que permite ir identificando aquellos con mejores características fitoquímicas, para la obtención de productos con objetivos nutricionales, farmacológicos, cosmetológicos o fitoterapéuticos.

## SUMMARY

Gevuin (*Gevuina avellana* Mol.) endemic species of Chile pertaining to the family of the Proteaceas, has been studied during last the 20 years through a program of “Genetic Improvement and Productive in *Gevuina avellana* Mol.” in the Universidad Austral de Chile, selecting clones based on productive, structural characteristics and of quality of fruit.

The objective of this study, was to determine and to evaluate the content of tocopherols and tocotrienols, components of the vitamin E, presents in the oil of the selected clones, with the object of contributing to the process of selection of genetic material.

In the month of March of year 2006 nuts by were selected each studied clone, which were pricked and put under the lipid extraction by the method of Soxhlet. The first determination of tocopherols and tocotrienols was made to seven clones of Gevuin by means of the use of an equipment was made Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC/MS). The second determination was made to six clones of Gevuin, by means of an equipment HPLC.

The results obtained in the first determination by GC/MS, gave to the conformation of the fractions of tocopherols and tocotrienols in the oil of the evaluated clones, emphasizing in the all of them fraction of tocotrienols specifically the fraction  $\alpha$ - (alpha), which represents on 97% of the total of the components of the vitamin E in this oil, which, like the other fractions of this vitamin presented a significant variation between the clones. The content of  $\alpha$  - tocotrienol presented a variation that fluctuated between 307.85 mg/kg (clone 22) to 524.24 mg/kg (clone 01).

In the results obtained in the analysis made by HPLC detect only the presence of  $\alpha$  - tocotrienol, tocol was detected of greater presence in this oil, like in the previous evaluation it presented a significant variation between the clones, which fluctuated between the 63.41 ug/g (clone 34) to 163.74 ug/g (clone 53).

These results demonstrated the presence of variations between the clones in the content of the vitamin E, specifically  $\alpha$  - tocotrienol, which contributes like one more instrument in the process of clonal selection, which allows to be identifying those with better phytochemical characteristics, for the product obtaining with objectives nutritional, pharmacological, cosmetological or phytotherapeutical.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AÇKURT, F., ÖZDEMİR, M., BIRINGEN, G. y LÖKER, M. 1999. Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*. 65: 309-313.
- AL-SAQER, J., SIDHU, J., AL-HOOTI, S., AL-AMIRI, H., AL-OTHMAN, A., AL-HAJI, L., AHMED, N., MANSOUR, I. y MINAL, J. 2004. Developing functional foods using red palm olein. IV. Tocopherols and Tocotrienols. *Food Chemistry*. 85:579-583.
- AKAIKE, A., OSAKADA, F., HASHINO, A., KUME, T., KATSUKI, H y KANEKO, S. 2004.  $\alpha$  – Tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. *Neuropharmacology* 47: 904 – 915.
- AMARAL, J., CASAL, S., ALVES, M., SEABRA, R. y OLIVEIRA B. 2006. Tocopherol and tocotrienol content of hazelnut cultivars grown in Portugal. *Journal Agricultural Food Chemistry (USA)* 54: 1329-1336.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). 1993. Official Method Ce 8–89. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC.
- BALL, G. 1988. Fat-soluble Vitamin assays in food analysis, An comprehensive review. Elsevier Science Publishers. New York. USA. 326p

- BERTOLI, C.; FAY, L.; STANCANELLI, M; GUMY, D. y LAMBELET, P. 1998. Characterization of chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol) seed oil. (Switzerland). JACOS 75 (8):1037 – 1040.
- BLANCO, A. 2001. Vitaminas. In: Química biológica. El Ateneo. Argentina. 605p
- BRAMLEY, P., ELMADFA, I., KAFATOS, A., KELLY, F., MANIOS, Y., ROXBOROUGH, H., SCHUCH, W., SHEEHY, P., y WAGNER, K. 2000. Review vitamin E. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 913-938.
- BRIGELIUS, R. 2005. Induction of drug metabolizing enzymes by vitamin E. Journal of Plant Physiology 162 : 797 - 802
- CACERES, O.; ANRIQUE, R.; VOULLIEME, S. y MENDEZ, C. 1982. Utilización del fruto de avellano (*Gevuina avellana* Mol.) en alimentación de pollas cornish de 0 a 30 días de edad. Simiente (Chile) 52 (3-4):161
- CARRILLO, T. 2004. Caracterización y evaluación del contenido de lípidos y ácidos grasos en nueve clones de *Gevuina avellana* Mol. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 87p.
- CIREDE. 1972. “Mantequilla” de avellanas chilenas. Corporación Industrial para el Desarrollo Regional del Bio Bio. Chile. 3p.
- CREWS, C., HOUGH, P., GODWARD, J., BRERETON, P., LEES, M., GUIET, S. y WINKELMANN, W. 2005 a. Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (USA) 53:4853-4860

- CREWS, C., HOUGH, P., GODWARD, J., BRERETON, P., LEES, M., GUIET, S. y WINKELMANN, W. 2005 b. Study of the main constituents of some authentic walnut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (USA) 53:4853-4860.
- CYBERLIPID CENTER. 2004. Vitamin E. on line <http://www.cyberlipid.org/vite/vite0001.htm> (05 sep 2004)
- DONOSO, C. 1978. Antecedentes sobre la producción de avellanas. *Bosque (Chile)* 2 (1): 69 – 70.
- DONOSO, C. s.f. Guía para la identificación de árboles de Chile. Santiago, Chile. Gabriela Mistral. 72p.
- DUTTA, P., SAVAGE, G. y KAIJSER, A. 2000. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. *Food Chemistry*. 71:67-70.
- FENNEMA, O. 2000. Vitaminas In: *Química de los alimentos*. Zaragoza, España. Acribia. 633-734p.
- GRINBERGS, J.: VALENZUELA, E. y CONTRARAS, D. 1986. Raíces proteiformes en flora chilena. *Archivos de Biología y Medicina Experimental (Chile)* 19 (2): 210 – 219.
- HIGDON, J. 2003. Vitamin E. Linus Pauling Institute Oregon State University 11p.
- HOFFMANN, A. 1982. Flora silvestre de Chile. Árboles, arbustos y enredaderas leñosas. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 258p.

- HOFFMANN, A. 1991. Flora silvestre de Chile, zona araucana. 2ª ed. Santiago, Chile. Claudio Gay. 257p.
- INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN). 1988. Norma chilena oficial. Granos o semillas oleaginosas. Determinación de la humedad y materias volátiles. Santiago, Chile. 3p
- INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN). 1999. Norma chilena oficial. Granos o semillas oleaginosas. Determinación del extracto al éter de petróleo denominado contenido graso. Santiago, Chile. 11p
- JIL, P. 2006. Variación del contenido de los ácidos grasos en el aceite extruído en frío de nueve clones de *Gevuina avellana* Mol. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 72p
- KARMELIC, J. 1982. Recolección e industrialización de avellana chilena. Instituto de Investigaciones Tecnológicas. Santiago, Chile. 163p.
- KORNSTEINER, M., WAGNER, K. y ELMADFA, I. 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. Food Chemistry 98: 381-387.
- LICATA, M. 2006. Vitaminas. Nutricion Zonadiet. Online: < <http://www.zonadiet.com/nutricion/vitaminas.htm> > (22 dic 2006).
- LITTLE, T. 1976. Métodos estadísticos para la investigación e la agricultura. México. Trillas. 270 p.
- LOPEZ, C. 1988. El avellano, su cultivo y perspectivas comerciales. El Campesino (Chile) 119 (12):12 – 19.

- MAGUIRE, L., O'SULLIVAN, S., GALVIN, K., O'CONNOR, T. y O'BRIEN. 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnut, almonds, peanuts, hazelnuts and macadamia nut. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 55(3): 171-178.
- MARCUS, R. y COULSTON, A. 2001. Vitaminas. In: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Goodman. México. 1765 – 1811p
- MARTINEZ, C. 2001. Evaluación de la producción de nueces de once clones de *Gevuina avellana* Mol. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 87p.
- MEDEL, F. 1987. Árboles frutales. Situación y su potencial en el sur de Chile. Corporación de Fomento de la Producción. Chile. 59p.
- MEDEL, F. 1988. Fertilización y nutrición mineral de huertos frutales en el sur de Chile. Corporación de Fomento – Universidad Austral de Chile. Chile. 64p.
- MEDEL, F. y MEDEL, R. 2000. *Gevuina avellana* Mol: características y mejoramiento genético de un frutal de un frutal de nuez nativo para el mercado internacional. *Revista Frutícola (Chile)* 21 (2): 37 – 47.
- MEDEL, F. 2001. *Gevuina avellana*: Potencial for comercial nut clonal. *Acta Horticulturae*: 521 – 528 p.
- MEDEL, F. DONOSO, C y HALLOY, S. 2003. Variación en *Gevuina avellana* Mol (Gevuin, avellano chileno, Chile nut) In: *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Universitaria. 321 – 344 pp

- MEDEL, F. 2005. Clonal selection in *Gevuina avellana* For Nutritional and Phytotherapy purposes. *Acta Horticulturae*: 625 – 630 p.
- MEDEL, F. y CARRILLO, T. 2005. Variability of total fat and fatty acids in nut oil from *Gevuina avellana* clones. *Acta Horticulturae*. 631 – 637 p.
- MENDEZ, C. 1981. Utilización de fruto de avellano (*Gevuina avellana* Mol) en la alimentación de pollos Broilers. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias 81p.
- MIRMIRA, K y EDWARD, P. 1972. Identification and estimation of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils using gas chromatography – Mass Spetrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (USA)* 20 (2): 240 - 245
- MUÑOZ, C. 1956. Botánica Agrícola. Santiago, Chile. Universitaria 1237p.
- MUÑOZ, M. 1980. Flora del Parque Nacional Puyehue. Universitaria. Santiago, Chile 557p.
- NAVAS, L. 1976. Flora de la Cuenca de Santiago de Chile. Santiago, Chile. Universitaria 559p.
- NISSEN, J. 1974. Estudio agroecológico del predio Experimental Santa Rosa. Valdivia. Universidad Austral de Chile. 46 p.
- NUESTRA TIERRA. 1990. Avellanas: Alternativas de industrialización. *Nuestra Tierra (Chile)* 127:11- 14.

- OLIVERAS, M. 2005. Calidad del aceite de oliva virgen extra. Antioxidante y función Biológica. Memoria Doc. Farm. Granada. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. 291p
- ÖZDEMİR, M. y AÇKURT, F., KAPLAN, M., YILDIZ, M. y LÖKER, M. 2001. Evaluations of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L) varieties: fatty acid composition,  $\alpha$ -tocopherol content, mineral composition and stability. Food Chemistry. 73: 411-415.
- PARCERISA, J., RICHARDSON, D., RAFECAS, M., CODONY, R y BOATELLA, J. 1998. Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). Journal of Chromatography. 805: 259-268.
- PITA, G. 1997. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición (Cuba) 11 (1):46 – 57
- QUATTROCCHI, O., ANDRIZZI, S., y LABA R. 1992. Introducción al HPLC, Aplicación y Práctica. Artes gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina. 407p
- REGIS TECHNOLOGIES, 2000. GC Derivatization. Derivatization procedures. On line: <<http://www.registech.com/gc/gcderrev.pdf>> (10 mar 2006)
- RODRIGUEZ, D.; SOURRONILE, A.; GALLOPIN, G. y MANTACA, C. 1983. Estudio ecológico integrado de la cuenca del río Manso superior (Río Negro, Argentina) II. Tipos de vegetación XIV: 231 – 248.
- RODRIGUEZ, G.; RODRIGUEZ, R. y BARRALES, H. 1995. Plantas ornamentales chilenas. Lamas y Cía Ltda., Concepción (Chile) 130p.

- ROMERO, N.; ROBERT, P.; MASSON, L.; ORTIZ, J.; PAVEZ, J.; GARRIDO, C.; FOSTER, M. y DOBARGANES, C. 2004. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol on the performance of chilean hazelnut oil (*Gevuina avellana* Mol) at high temperature. Journal of the Science of Food and Agriculture. 84: 943 – 948.
- SAVAGE, G. 2000. The nutritive value and composition of nuts commonly eaten by humans. Lincoln University (New Zealand). 43 p.
- SAVAGE, G. y RUSSELL, K. 2003 Nuts and Health. Food Science. On line.[http://www.nutritionociety.ac.nz/food\\_group/research\\_topics/nuts/nuts.htm](http://www.nutritionociety.ac.nz/food_group/research_topics/nuts/nuts.htm) (12 sep 2004).
- SCHAKEL, S., BUZZADR, M y GEBEHARDT. 1997. Procedures estimating nutrient values for food composition databases. Journal of Food Composition and Analysis. 10: 102 – 114.
- SCHNEIDER, C. 2005. Review chemistry and biology of vitamin E. Mol. Nutr. Food Res. 49: 7 – 30.
- SCHWENKE, W. 2002. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer?. Journal of Nutritional Biochemistry 13: 2 - 20
- SIGMA-ALDRICH, 1997. Guide to derivatization reagents for GC. Bulletin 909A. On line: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4537.pdf> (10 mar 2006)
- SLOVER, H., THOMPSON, J. y MEROLA, G. 1983. Determination of tocopherol and sterols by capillary gas chromatography. JACOS 60 (8):1524-1528.

- THERIAULT, A., CHAO, J., WANG, Q., GAPOR, A y ADELI, K. 1999. Tocotrienol: A review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry* 32 (5): 309 – 319.
- USDA. 2002. Nutrients in 100 grams of tree nuts. Fundación Nucis Salud y Frutos Secos. (On line). <<http://www.nucis.org/pdf/usda02.pdf>> (05 mar. 2007).
- VALDIVIA, V. 2003. Composición química cotiledonar en nueces de nueve clones de gevuin (*Gevuina avellana* Mol.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 79p.
- VASCONCELLOS, A. s/f. Alimentos funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. *The World of Food Science*. (On line) [http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos\\_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm](http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm) (05mar 2007)
- VILLARROEL, M.; BIOLLEY, E.; SCHNEEBERGER, R.; BALLESTER, D. y RAMIREZ, S. 1987. Aminoacid composition of chilean hazelnut. *Food Chemistry* 25: 155 – 158.
- VOULLIEME, A. 1982. Posibilidades industriales del fruto de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol). *Simiente (Chile)* 52 (3-4):161.
- YOSHIDA, Y., NIKI, E. y NOGUCHI, N. 2003. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physical of Lipids*. 123: 63 – 75.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. Derivatización.

La derivatización es un proceso de modificación química de un compuesto, esto genera nuevos compuestos con propiedades compatibles para ser analizados por cromatógrafos de gas (GC). También reduce la adsorción del analito o compuesto en el sistema GC y mejora la respuesta de detector, separación y la simetría de los peak (SIGMA-ALDRICH, 1997 y REGIS TECHNOLOGIES, 2000). Este procedimiento se utiliza por las siguientes razones:

- mejora volatilidad, eliminando la presencia de grupos polares (como OH, NH y SH).
- Mejora la eficiencia analítica e incrementa detectabilidad.
- Mejora estabilidad de los compuestos.
- Permite análisis relativos de compuestos no volátiles (SIGMA-ALDRICH, 1997).

Uno de los tipos de derivatización, es la Sililación, el cual es el método más frecuente de derivatización, consiste en la introducción de un grupo silil a la molécula, por lo general en la sustitución un hidrógeno activo. El reemplazo de hidrógeno activo por un grupo silil reduce la polaridad del compuesto y a su vez el derivado sililado es más volátil y estable, lo que aumenta su detección (SIGMA-ALDRICH, 1997 y REGIS TECHNOLOGIES, 2000).

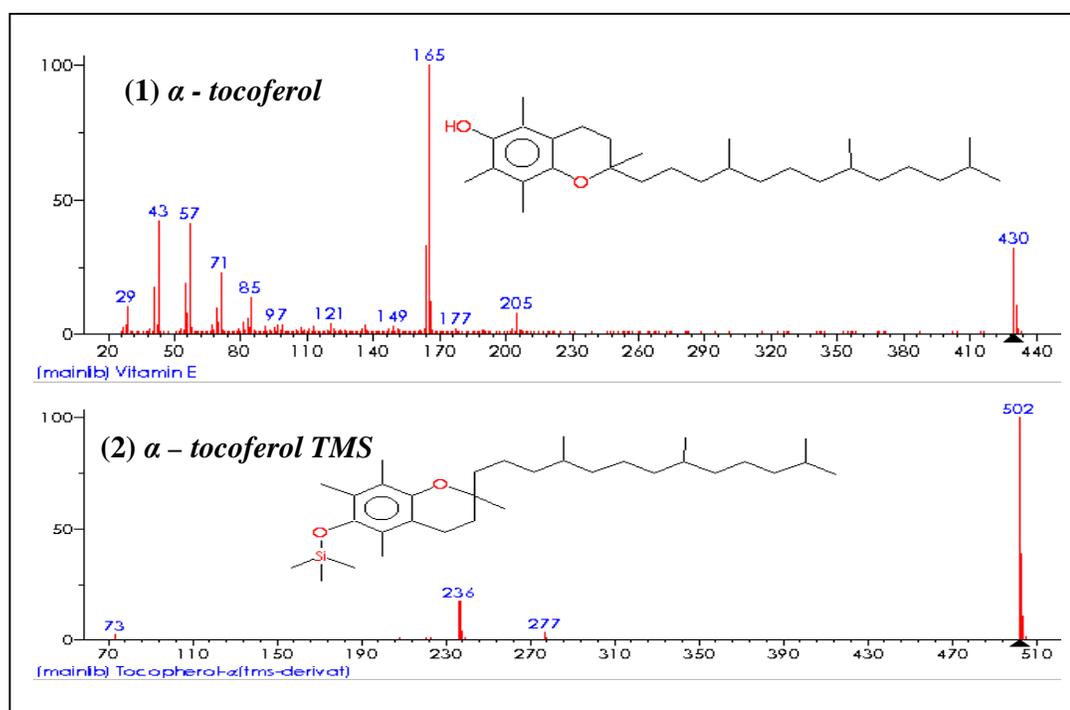
El grupo trimetilsilil (TMS),  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ , es el más común y versátil para los análisis por GC. La derivatización con TMS permiten mejores separaciones en GC y es compatibles con la mayor parte de sistemas de detección utilizados (SIGMA-ALDRICH, 1997 y REGIS TECHNOLOGIES, 2000).

El TMS es influenciado por el solvente del sistema como por la adición de un catalizador. Un catalizador, como trimetilclorosilano o piridina, aumentan la reactividad

del agente derivatizante, además se debe considerar que son generalmente muy sensibles a la humedad, por lo que se debe mantener bien sellado (SIGMA-ALDRICH, 1997 y REGIS TECHNOLOGIES, 2000).

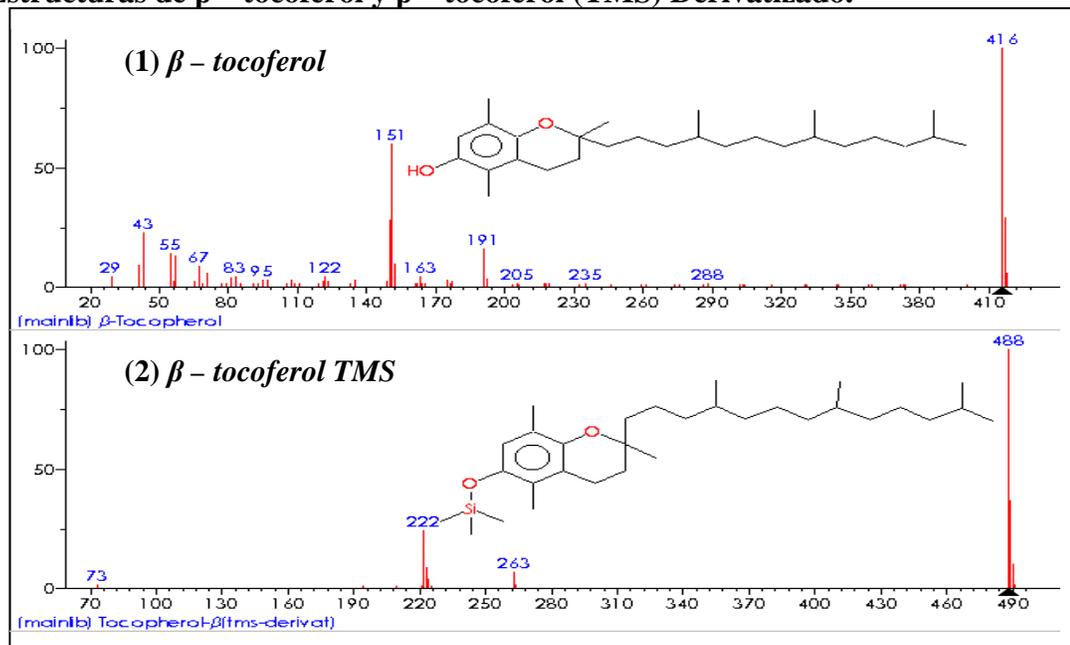
Los reactivos derivatizantes utilizados para los tocoferoles y tocotrienoles en este estudio fueron BSTFA + TMCS (99:1) y Piridina, según procedimiento descrito en la sección 2 Materiales y Método.

### Estructuras de $\alpha$ – tocoferol y $\alpha$ – tocoferol (TMS) Derivatizado.



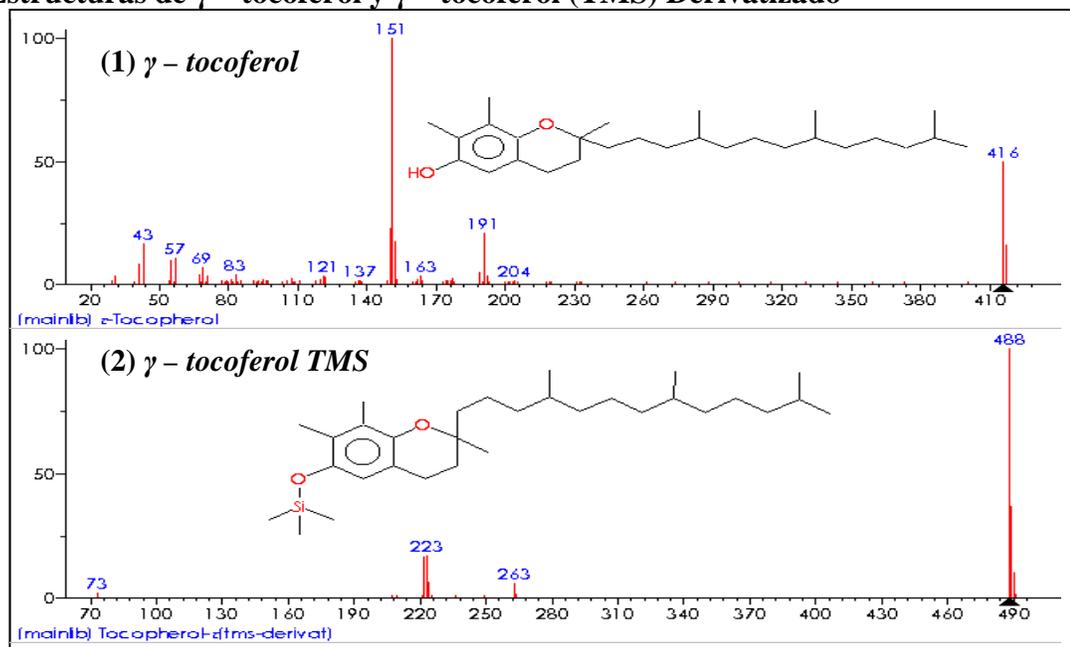
Fuente: Librería NIST/02 Mass Spectral Library, Varian.

**ANEXO 1. Continuación**  
**Estructuras de  $\beta$  – tocoferol y  $\beta$  – tocoferol (TMS) Derivatizado.**



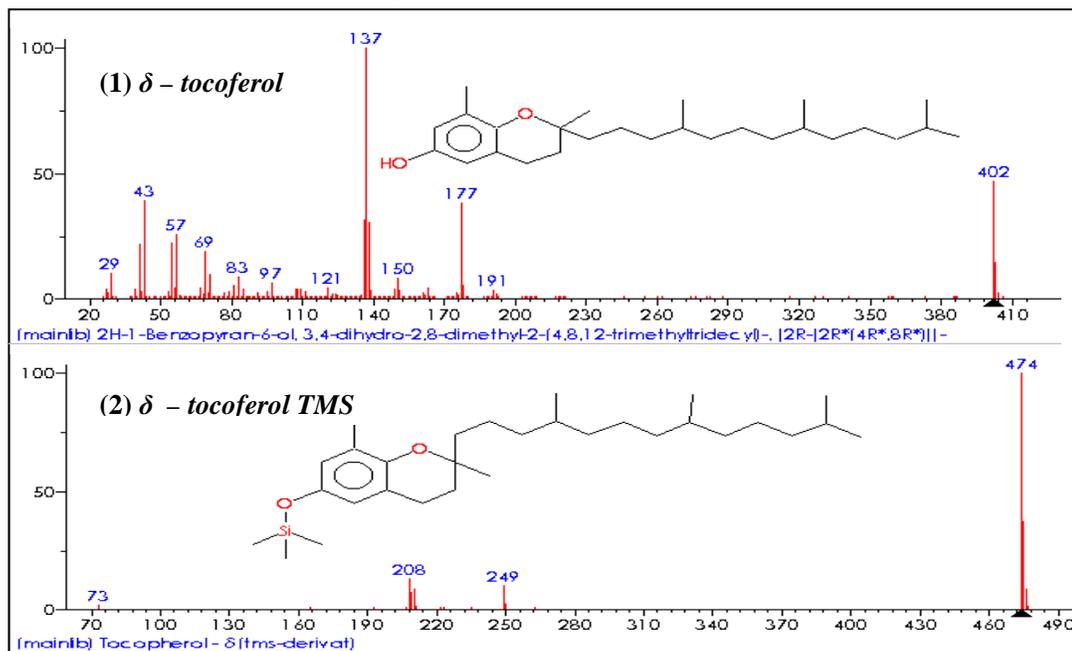
Fuente: Librería NIST/02 Mass Spectral Library, Varian.

**Estructuras de  $\gamma$  – tocoferol y  $\gamma$  – tocoferol (TMS) Derivatizado**



Fuente: Librería NIST/02 Mass Spectral Library, Varian.

**ANEXO 1. Continuación**  
**Estructuras de  $\delta$  - tocoferol y  $\delta$  - tocoferol (TMS) Derivatizado**



## **ANEXO 2 Silanización material de vidrio.**

La superficie del material de vidrio utilizado en laboratorios suele ser ligeramente ácido, esto puede adsorber algunos analitos en particular aminoras. En análisis de compuestos trazas o de niveles bajos, tales pérdidas pueden ser significativas. Para prevenir la pérdida de la muestra por adsorción, el material de vidrio usado para los análisis por lo general es silanizado (SIGMA-ALDRICH, 1997).

Silanización cubre la superficie del material de vidrio de grupos polares Si-OH, unidos químicamente formando una capa que no adsorbe analitos, dando el efecto "derivatizado" del material de vidrio (SIGMA-ALDRICH, 1997).

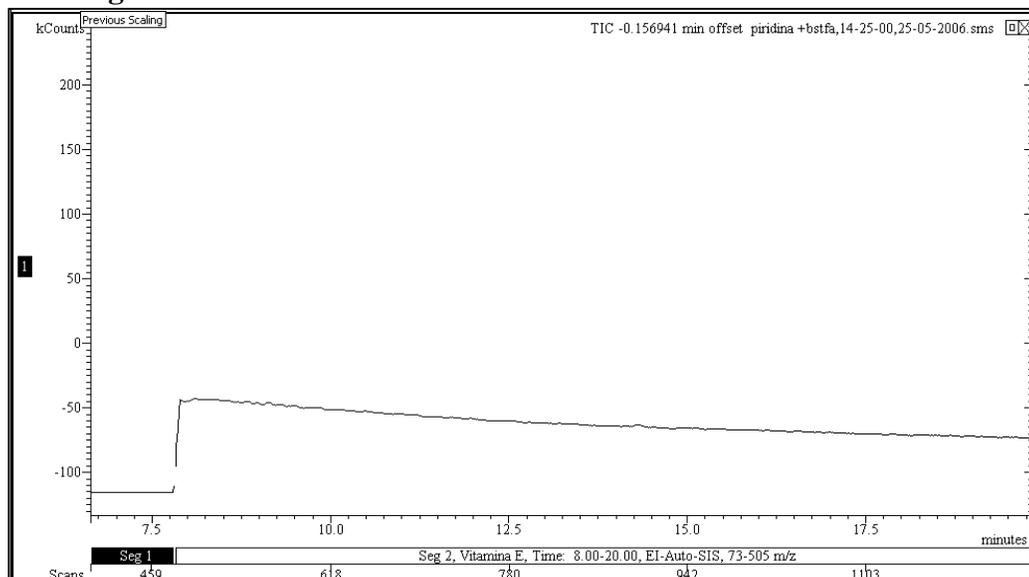
El procedimiento más común silanización de material de vidrio es tratarlo con una solución de dimetildiclorosilano (DMDCS) en tolueno al 5 -10 % durante 30 minutos. Para desactivar el material de vidrio, primero se debe dar enjuagues de tolueno e inmediatamente después con metanol (SIGMA-ALDRICH, 1997).

El procedimiento realizado en este estudio se realizó con una solución de BSTFA + TMCS (99:1) en tolueno al 5 %, por un tiempo de 30 min. Para desactivar este material se realizaron enjuagues con tolueno y después con metanol.

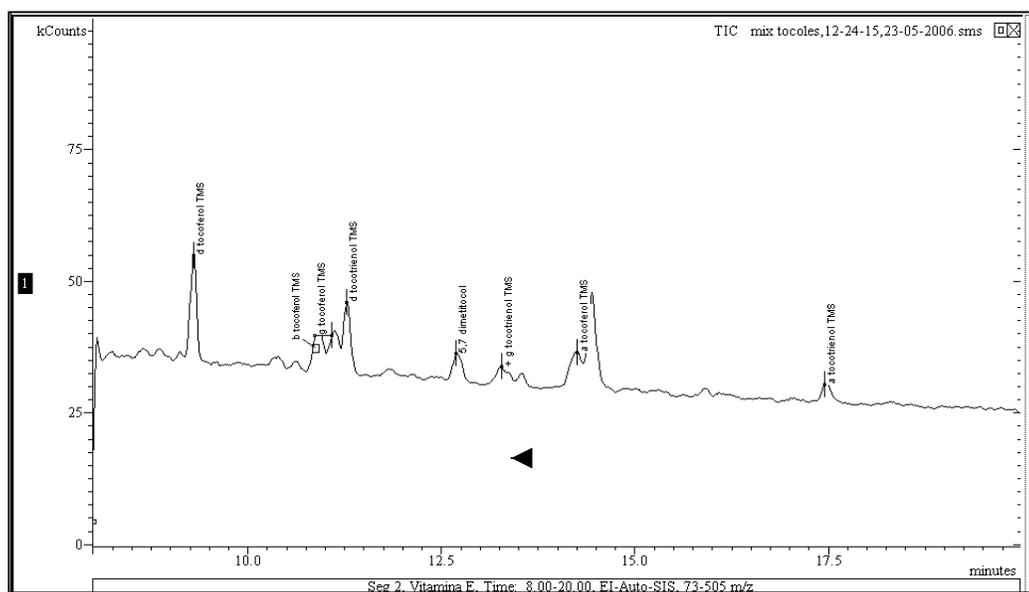
### ANEXO 3 Selectividad del método analítico.

Selectividad o especificidad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

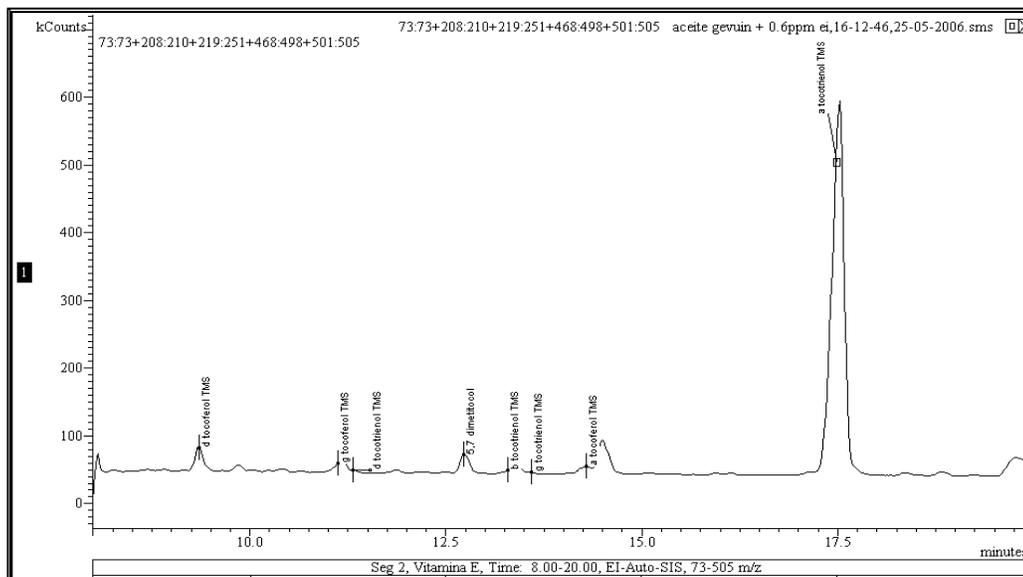
#### Cromatograma Blanco reactivo.



#### Cromatograma mezcla de tocoles a partir de inyección mezcla de estándares.

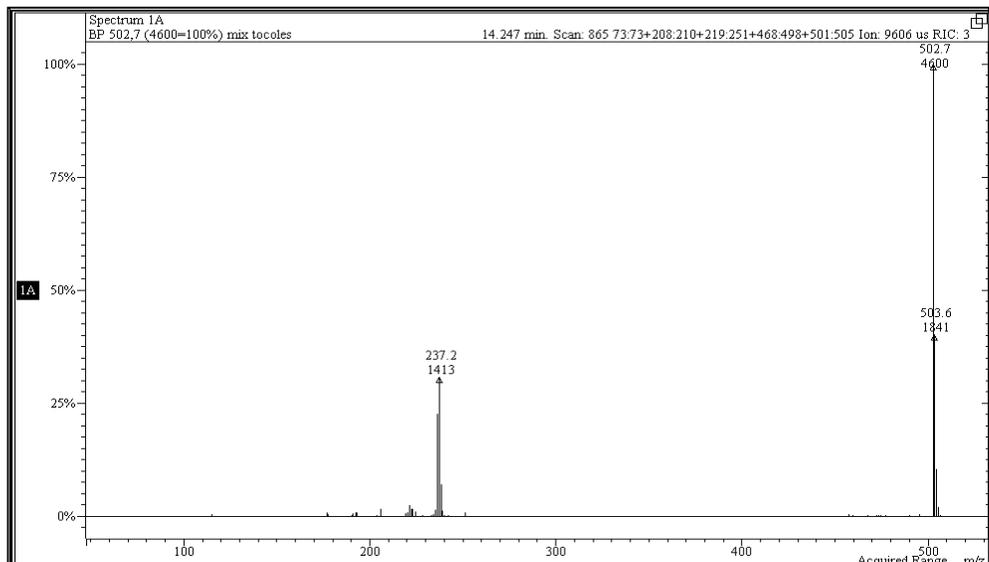
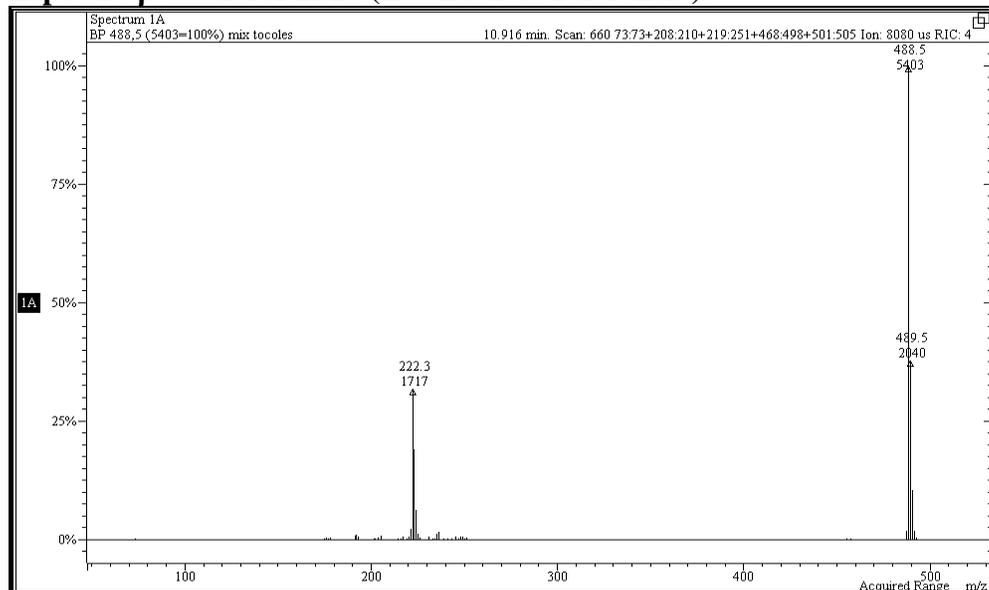


## ANEXO 3. Continuación

Cromatograma aceite avellanas (*Gevuin avellana* Mol.).

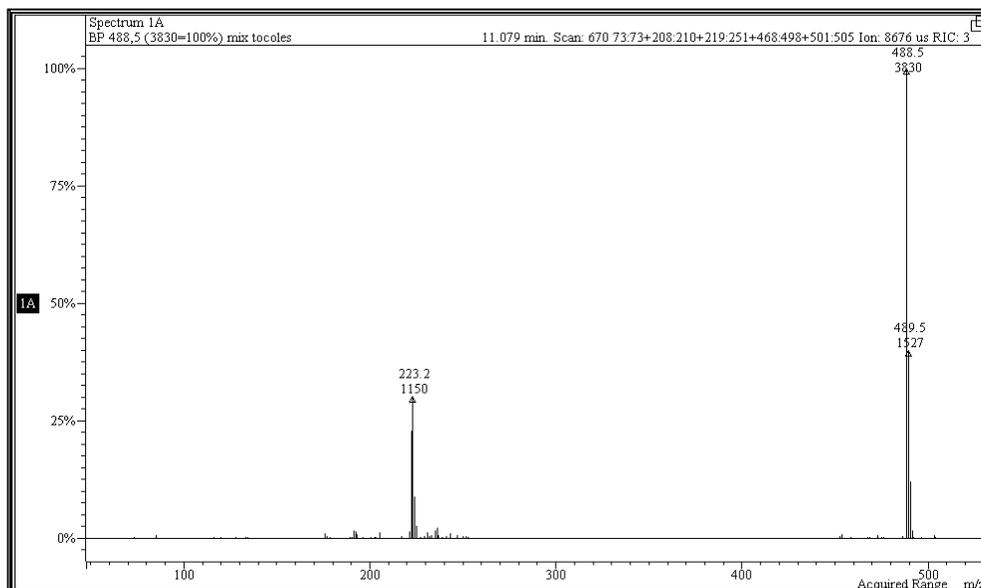
Tiempos de retención  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocoferoles y  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tocotrienoles y el estándar interno 5,7 – dimetiltocol

Analito	Tiempo de Retención (min)
$\alpha$ - tocoferol TMS	14.1
$\beta$ - tocoferol TMS	10.8
$\gamma$ - tocoferol TMS	10.9
$\delta$ - tocoferol TMS	9.2
$\alpha$ - tocotrienol TMS	17.3
$\beta$ - tocotrienol TMS	13.1
$\gamma$ - tocotrienol TMS	13.4
$\delta$ - tocotrienol TMS	11.1
5,7- dimetiltocol	12.6

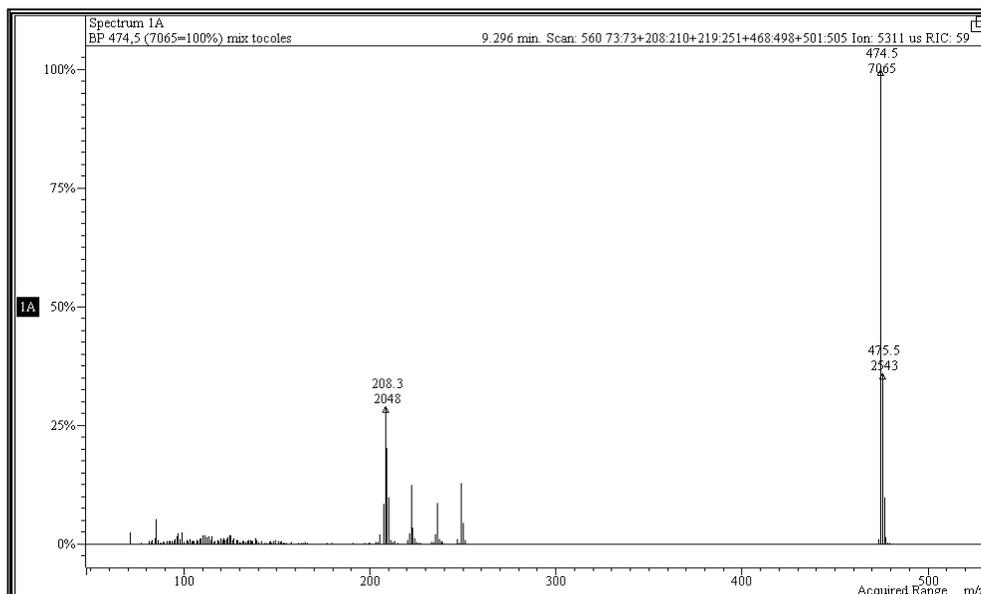
**ANEXO 3. Continuación****Espectro  $\alpha$ -tocoferol TMS (Estándar de referencia).****Espectro  $\beta$ -tocoferol TMS (Estándar de referencia).**

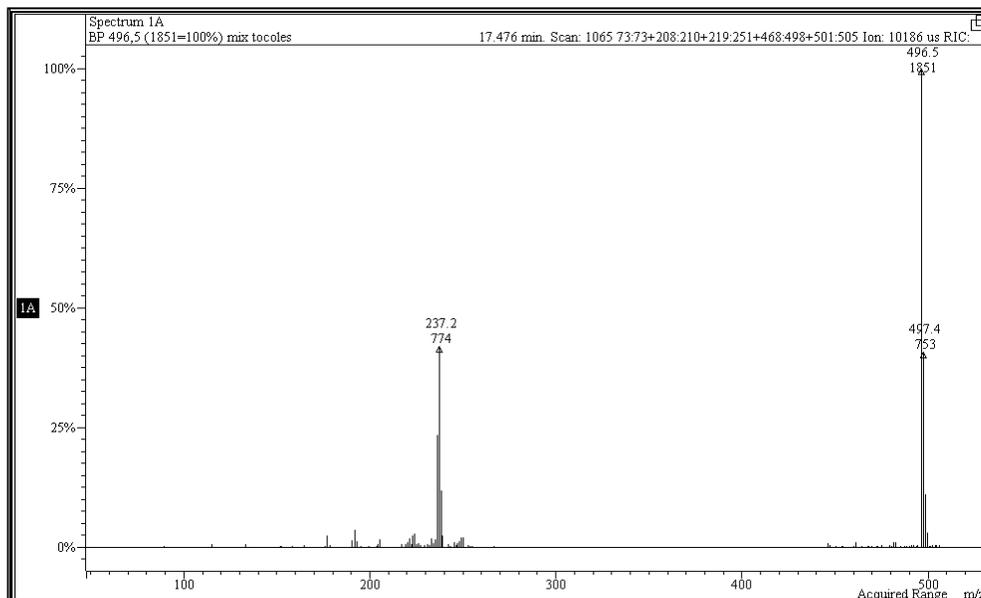
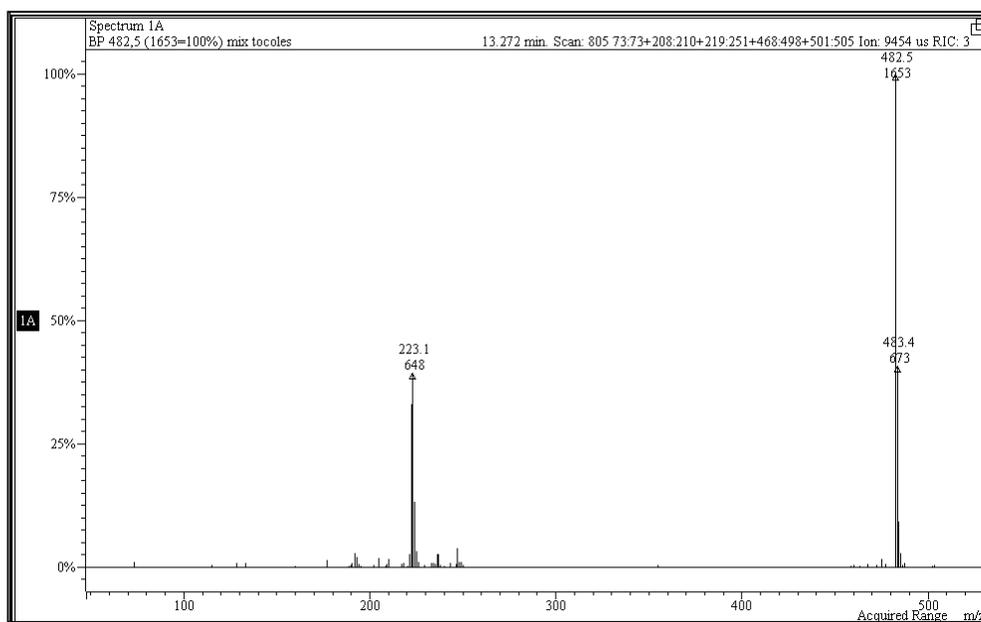
### ANEXO 3. Continuación

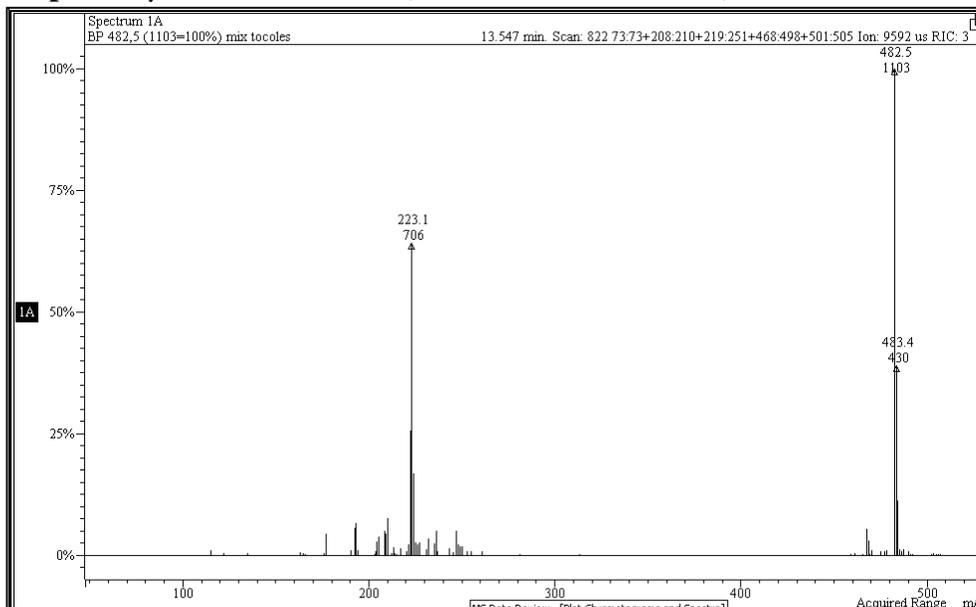
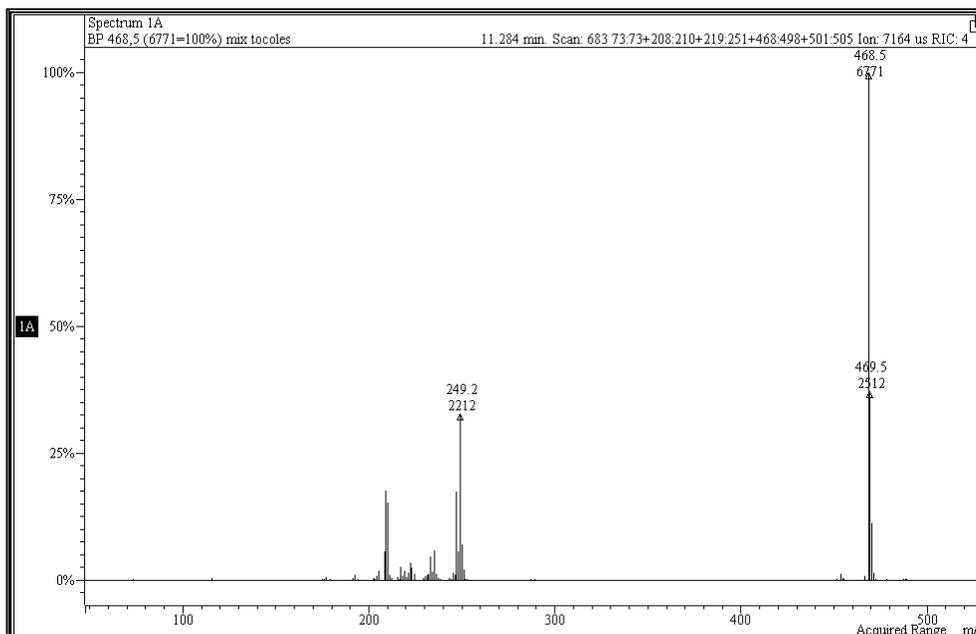
#### Espectro $\gamma$ -tocoferol TMS (Estándar de referencia).

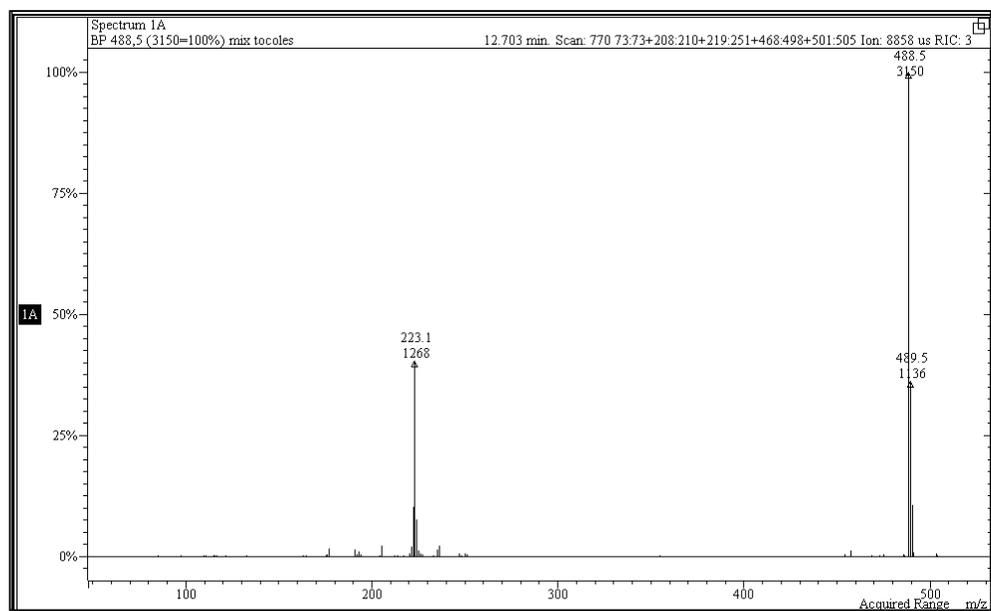


#### Espectro $\delta$ -tocoferol TMS (Estándar de referencia).



**ANEXO 3. Continuación****Espectro  $\alpha$ -tocotrienol TMS (Estándar de referencia).****Espectro  $\beta$ -tocotrienol TMS (Estándar de referencia)**

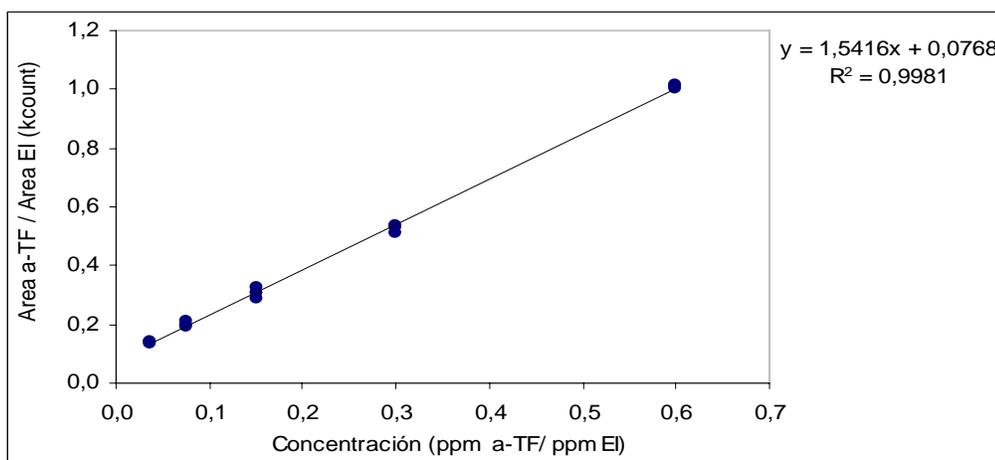
**ANEXO 3. Continuación****Espectro  $\gamma$ -tocotrienol TMS (Estándar de referencia)****Espectro  $\delta$ -tocotrienol TMS (Estándar de referencia)**

**ANEXO 3. Continuación****Espectro 5,7 - dimetiltocol (Estándar Interno)**

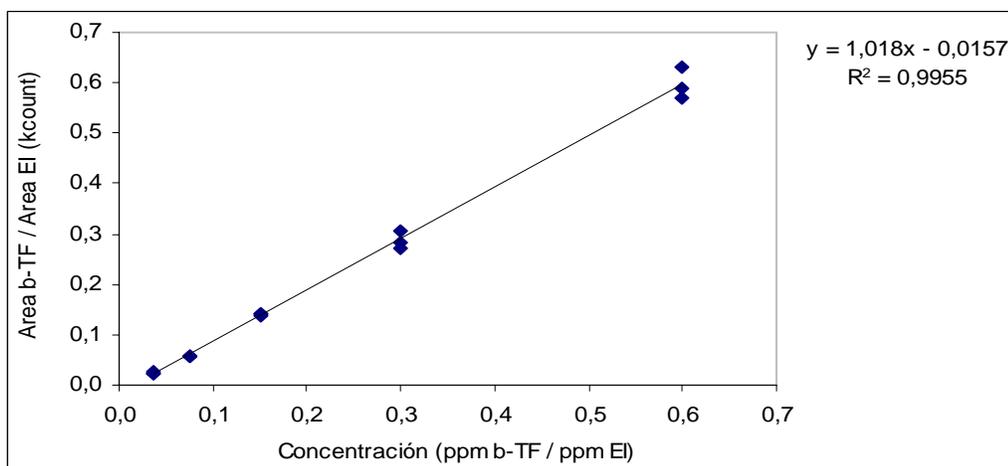
#### ANEXO 4. Linealidad método analítico (Curva de Calibración).

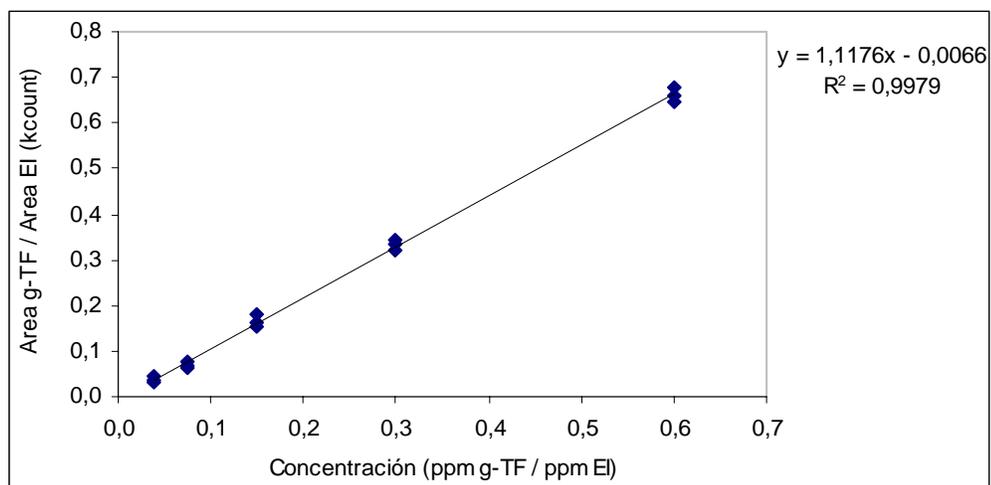
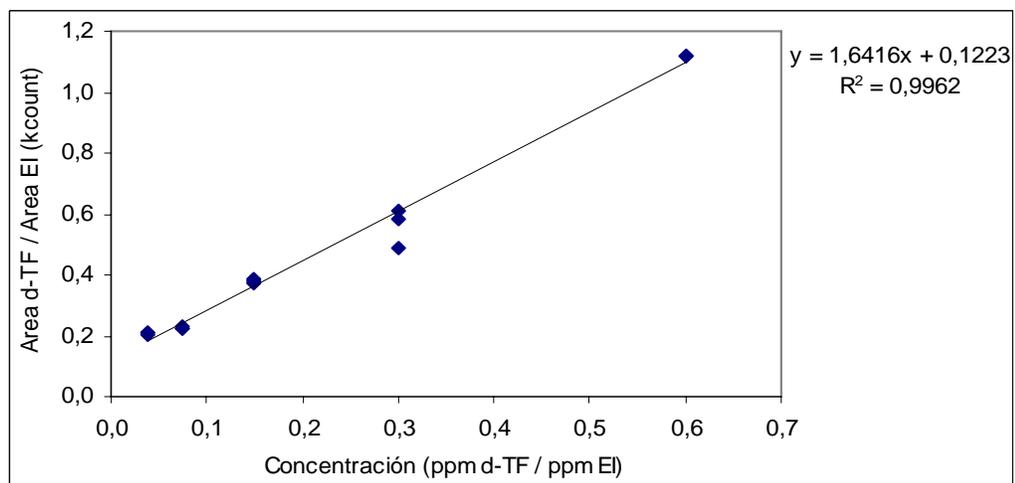
En este estudio se utilizó estándar interno (5,7-dimetiltocol), es por esto que la linealidad se refiere a la proporcionalidad entre la relación de la concentración del analito / concentración estándar interno y su respuesta que esta dado también en la relación de área del analito / área del estándar interno.

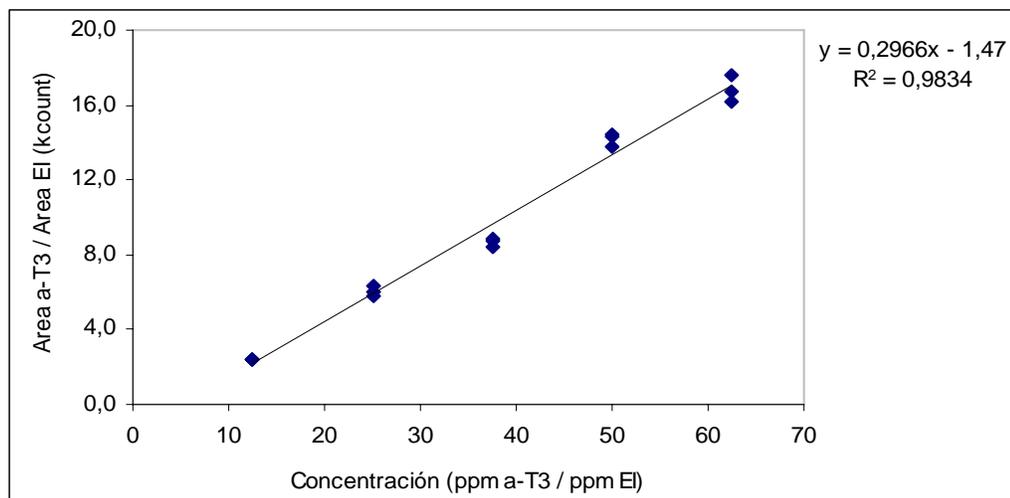
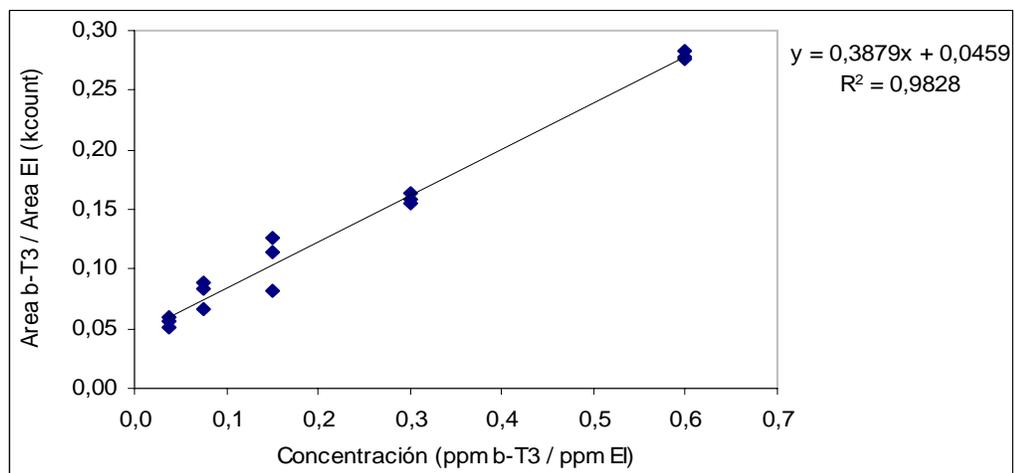
##### Curva de calibración de $\alpha$ - tocoferol TMS entre 0,15 y 2,4 ug/ml (5,7–dimetiltocol 4 ug/ml).

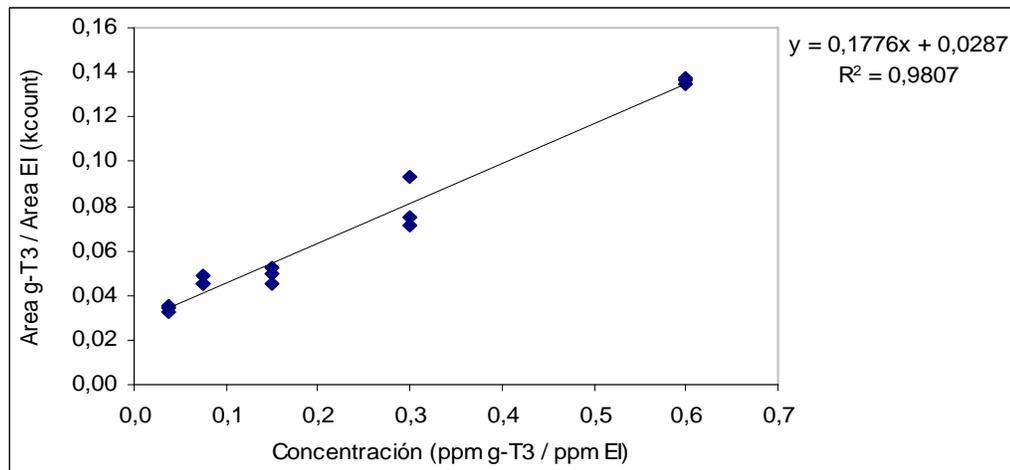
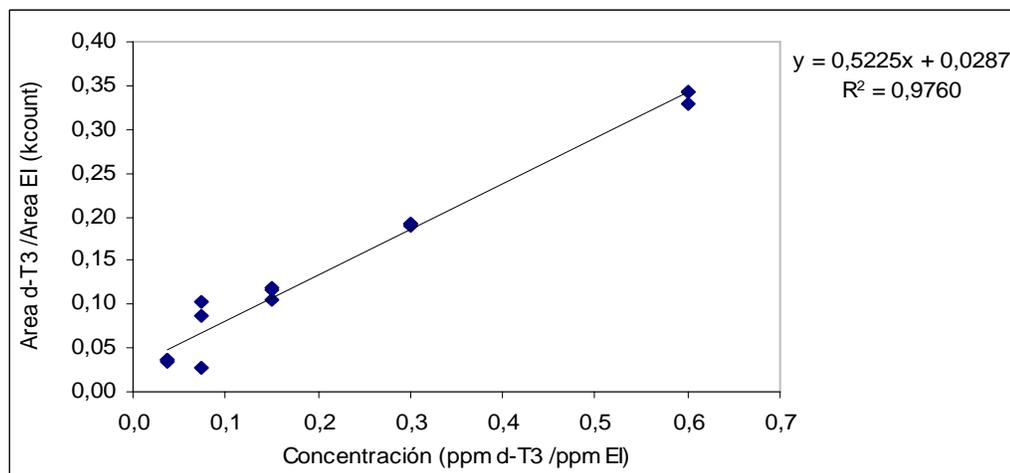


##### Curva de calibración $\beta$ - tocoferol TMS entre 0,15 y 2,4 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml).



**ANEXO 4 Continuación****Curva de calibración  $\gamma$  - tocoferol TMS entre 0,5 y 2,4 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml)****Curva de calibración  $\delta$  - tocoferol TMS entre 0,15 y 2,4 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml)**

**ANEXO 4 Continuación****Curva de calibración  $\alpha$ -tocotrienol TMS entre 50 y 250 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml)****Curva de calibración  $\beta$ -tocotrienol TMS entre 0,15 y 2,4 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml)**

**ANEXO 4 Continuación****Curva de calibración  $\gamma$ -tocotrienol TMS entre 0,15 y 2,4 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml).****Curva de calibración  $\delta$ -tocotrienol TMS entre 0.15 y 2.4 ug/ml (5,7 – dimetiltocol 4 ug/ml)**

## ANEXO 5. Precisión del sistema.

La precisión está relacionada con la dispersión de las medias alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV) (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

Se evaluó por triplicado cinco concentraciones de solución patrón dentro rango de la curva de calibración.

- **$\alpha$ - tocoferol TMS.**

Relación área de  $\alpha$ - tocoferol TMS / 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 - dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,138	0,005	3,71
0,3	0,200	0,011	5,65
0,6	0,306	0,022	7,20
1,2	0,525	0,014	2,70
2,4	1,008	0,006	0,60
<b>Promedio</b>	<b>0,44</b>	<b>0,01</b>	<b>3,97</b>
<b>DS</b>	<b>0,35</b>	<b>0,01</b>	<b>2,57</b>

- **$\beta$ - tocoferol TMS**

Relación área de  $\beta$  - tocoferol TMS / 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 - dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,024	0,002	10,24
0,3	0,058	0,001	1,52
0,6	0,140	0,002	1,45
1,2	0,286	0,018	6,17
2,4	0,596	0,033	5,52
<b>Promedio</b>	<b>0,22</b>	<b>0,01</b>	<b>4,98</b>
<b>DS</b>	<b>0,23</b>	<b>0,01</b>	<b>3,67</b>

## ANEXO 5. Continuación

- $\gamma$ - tocoferol TMS.

Relación área de  $\gamma$  - tocoferol TMS / 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 – dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,038	0,006	14,97
0,3	0,069	0,007	10,04
0,6	0,165	0,014	8,56
1,2	0,334	0,011	3,33
2,4	0,661	0,016	2,36
<b>Promedio</b>	<b>0,25</b>	<b>0,01</b>	<b>7,85</b>
<b>DS</b>	<b>0,26</b>	<b>0,004</b>	<b>5,16</b>

- $\delta$ - tocoferol TMS

Relación área de  $\delta$  - tocoferol TMS / 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 – dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,206	0,004	1,97
0,3	0,227	0,003	1,53
0,6	0,380	0,009	2,27
1,2	0,587	0,020	3,33
2,4	1,119	0,002	0,21
<b>Promedio</b>	<b>0,50</b>	<b>0,01</b>	<b>1,86</b>
<b>DS</b>	<b>0,38</b>	<b>0,01</b>	<b>1,14</b>

- $\alpha$ - tocotrienol TMS.

Relación área de  $\alpha$ - tocotrienol TMS./ 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 – dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	2,422	0,047	1,93
0,3	6,032	0,299	4,95
0,6	8,694	0,205	2,35
1,2	14,282	0,112	0,79
2,4	16,835	0,736	4,37
<b>Promedio</b>	<b>9,65</b>	<b>0,28</b>	<b>2,88</b>
<b>DS</b>	<b>5,90</b>	<b>0,27</b>	<b>1,74</b>

## ANEXO 5. Continuación

- **$\beta$ - tocotrienol TMS.**

Relación área de  $\beta$  - tocotrienol TMS / 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 - dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,056	0,004	7,69
0,3	0,079	0,012	14,81
0,6	0,107	0,023	21,69
1,2	0,159	0,005	2,89
2,4	0,279	0,003	1,12
<b>Promedio</b>	<b>0,14</b>	<b>0,01</b>	<b>9,64</b>
<b>DS</b>	<b>0,09</b>	<b>0,01</b>	<b>8,57</b>

- **$\gamma$ - tocotrienol TMS.**

Relación área de  $\gamma$  - tocotrienol TMS / 5,7-dimetiltocol.

Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 - dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,034	0,001	3,93
0,3	0,046	0,002	4,21
0,6	0,049	0,004	8,07
1,2	0,080	0,012	14,86
2,4	0,136	0,001	1,04
<b>Promedio</b>	<b>0,07</b>	<b>0,00</b>	<b>6,42</b>
<b>DS</b>	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>	<b>5,34</b>

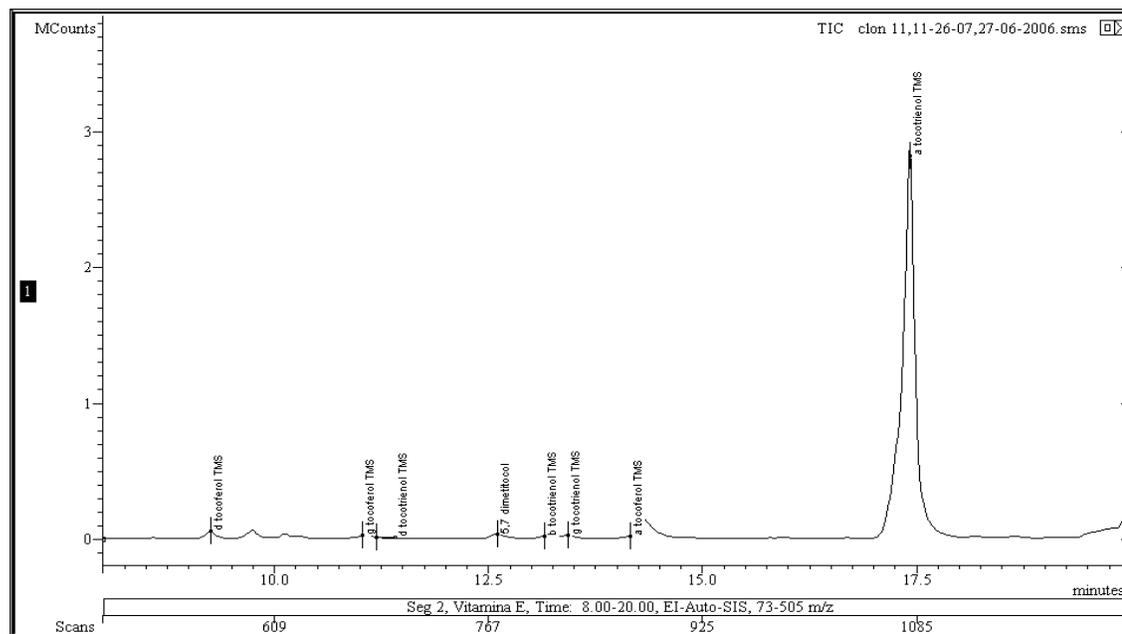
- **$\delta$ - tocotrienol TMS**

Relación área de  $\delta$  - tocotrienol TMS / 5,7-dimetiltocol

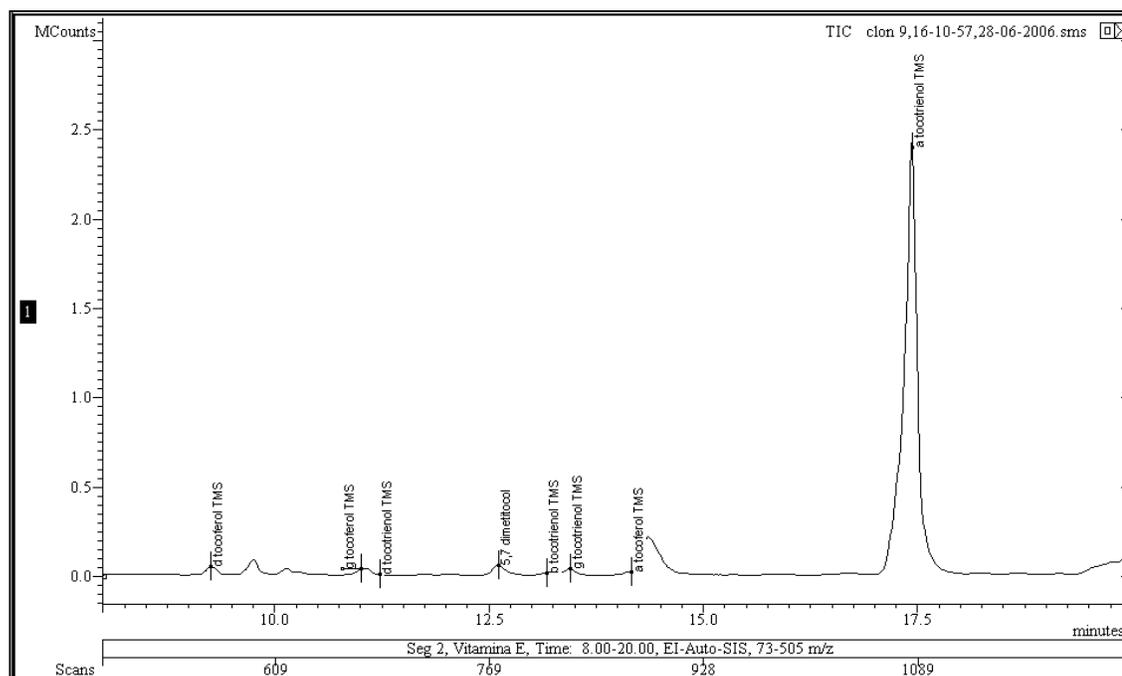
Concentración (ppm)	Área a - TF / 5,7 - dt (counts)	DS	CV (%)
0,15	0,0359	0,0019	5,19
0,3	0,0724	0,0400	55,23
0,6	0,1133	0,0078	6,85
1,2	0,1911	0,0005	0,26
2,4	0,3379	0,0069	2,06
<b>Promedio</b>	<b>0,15</b>	<b>0,01</b>	<b>13,92</b>
<b>DS</b>	<b>0,12</b>	<b>0,02</b>	<b>23,24</b>

## ANEXO 6 Cromatogramas de tocoles presentes aceites de Gevuin de siete clones determinados por GC/MS.

### 1. Clon 01

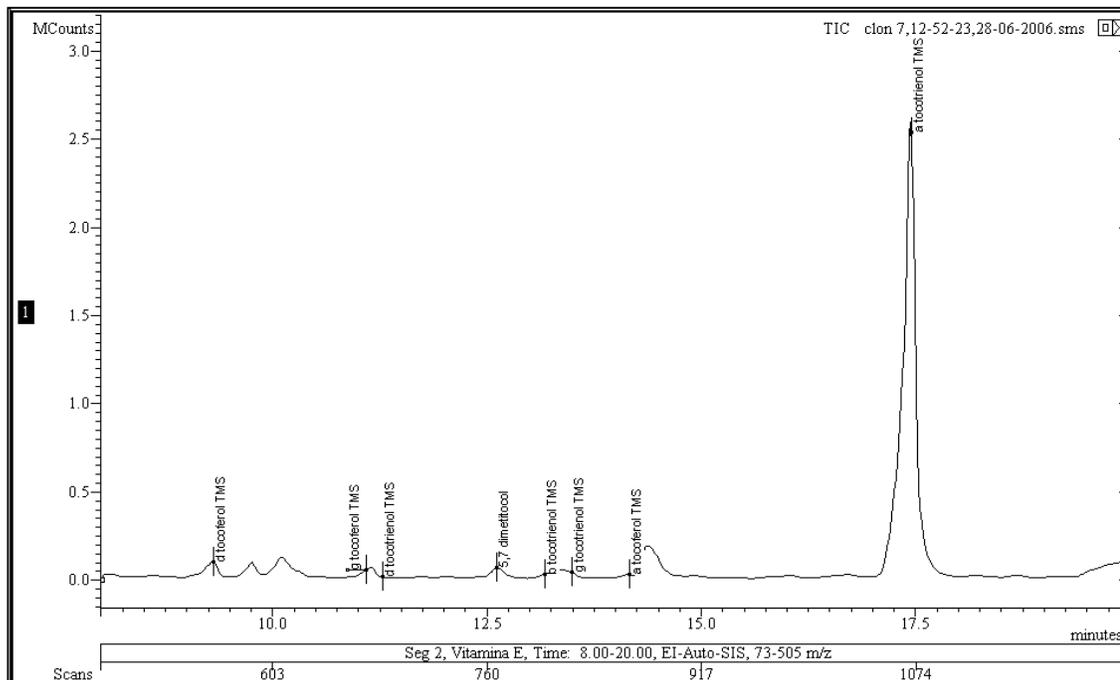


### 2. Clon 22

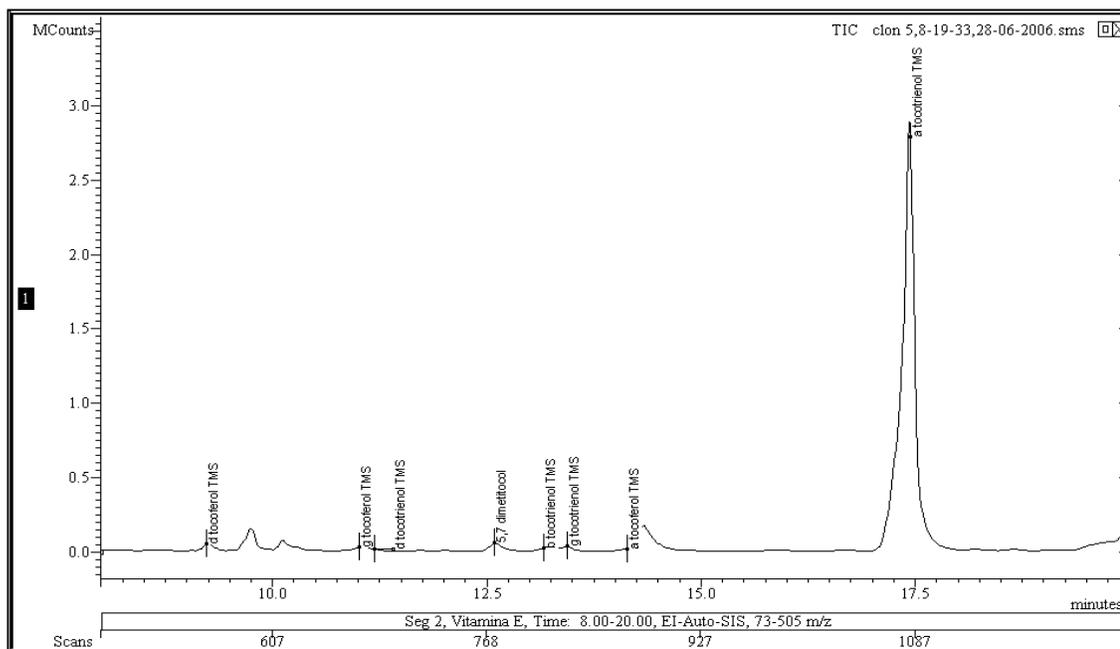


## ANEXO 6. Continuación

## 3. Clon 23

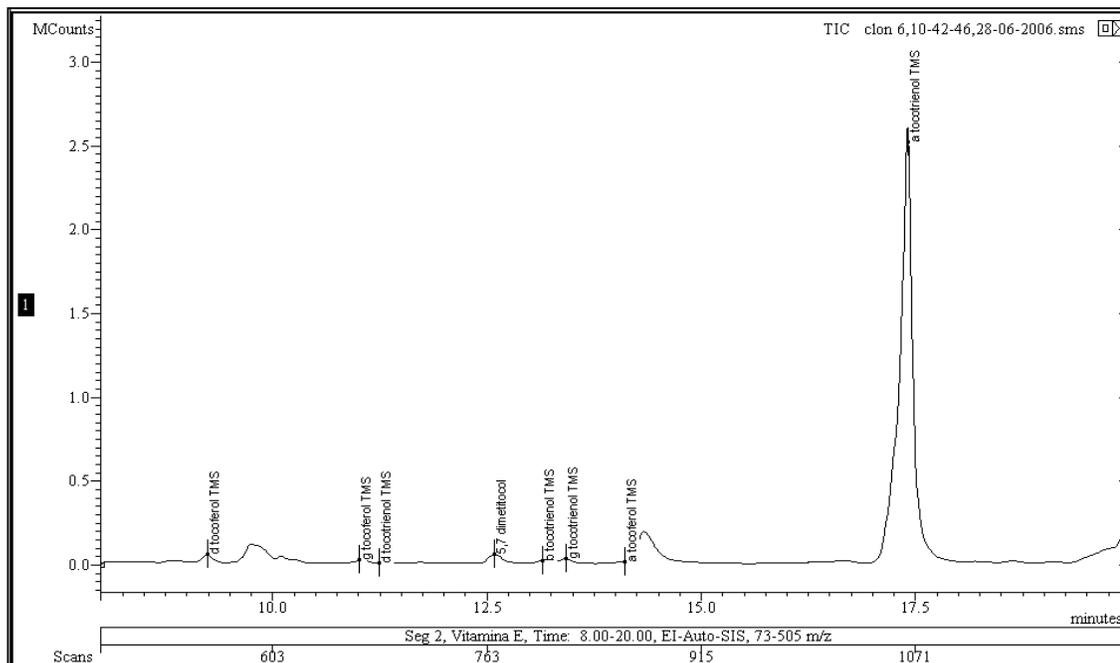


## 4. Clon 33

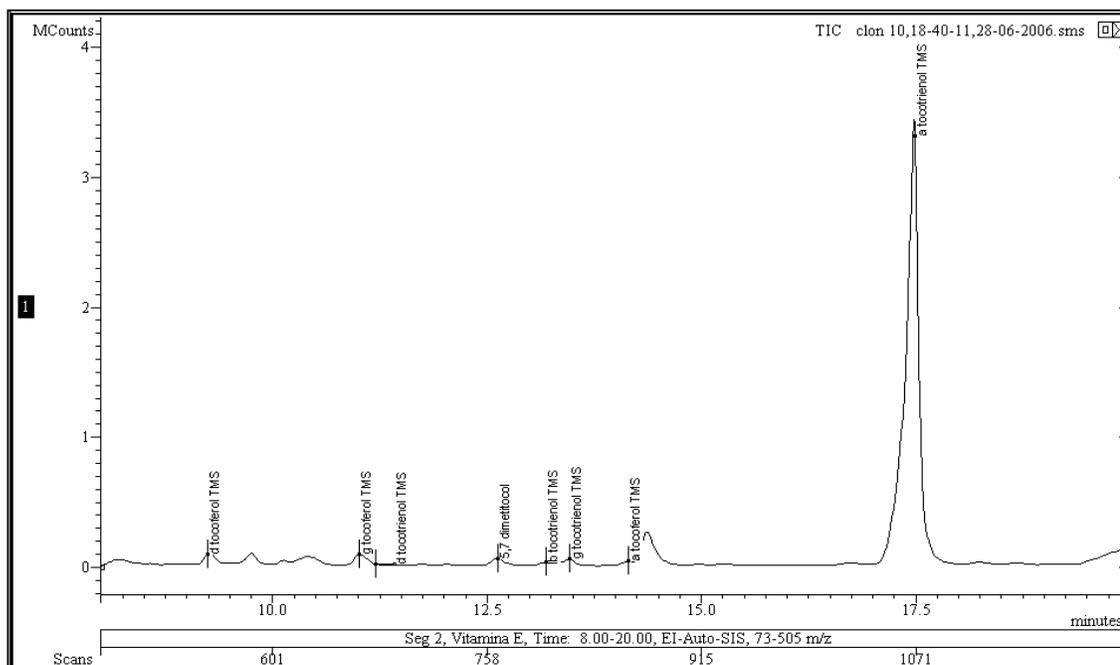


## ANEXO 6. Continuación

## 5. Clon 34

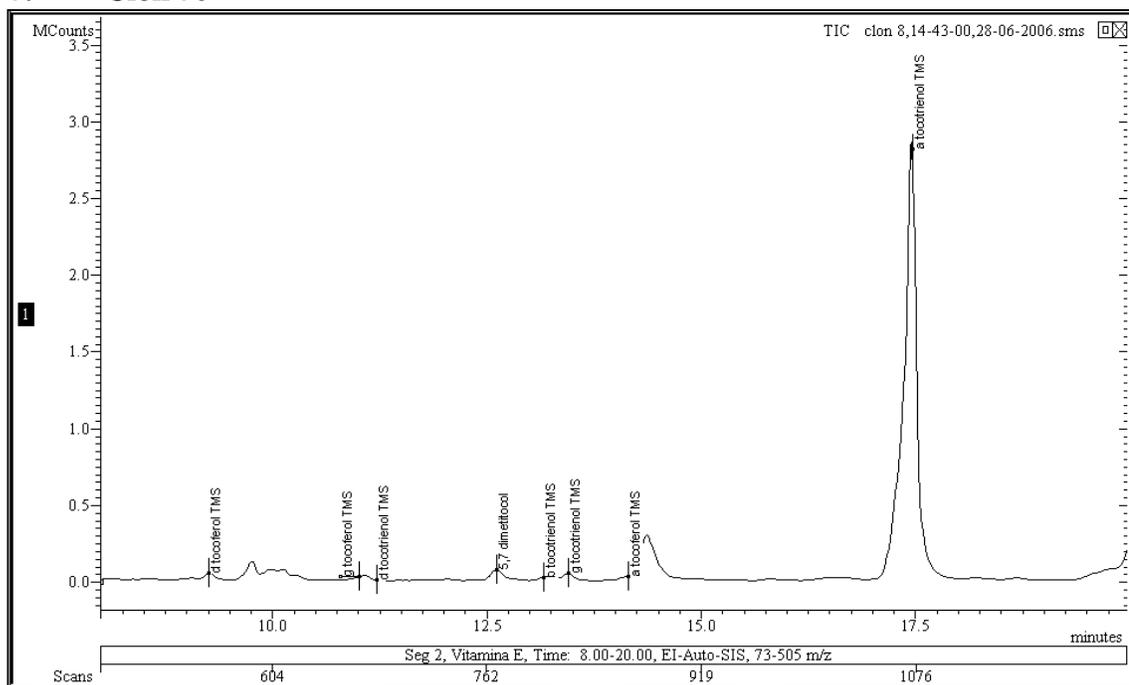


## 6. Clon 42



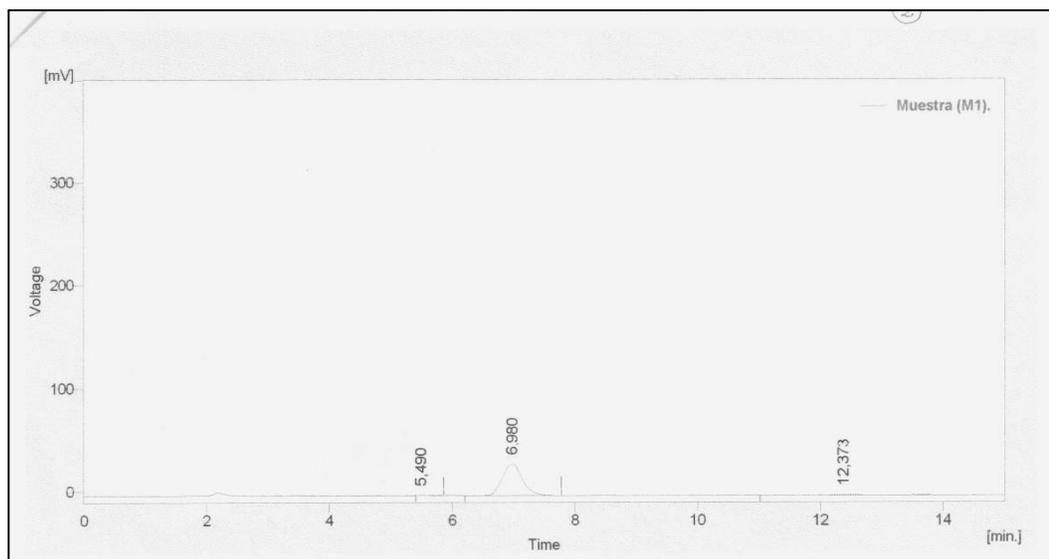
## ANEXO 6. Continuación

## 7. Clon 70

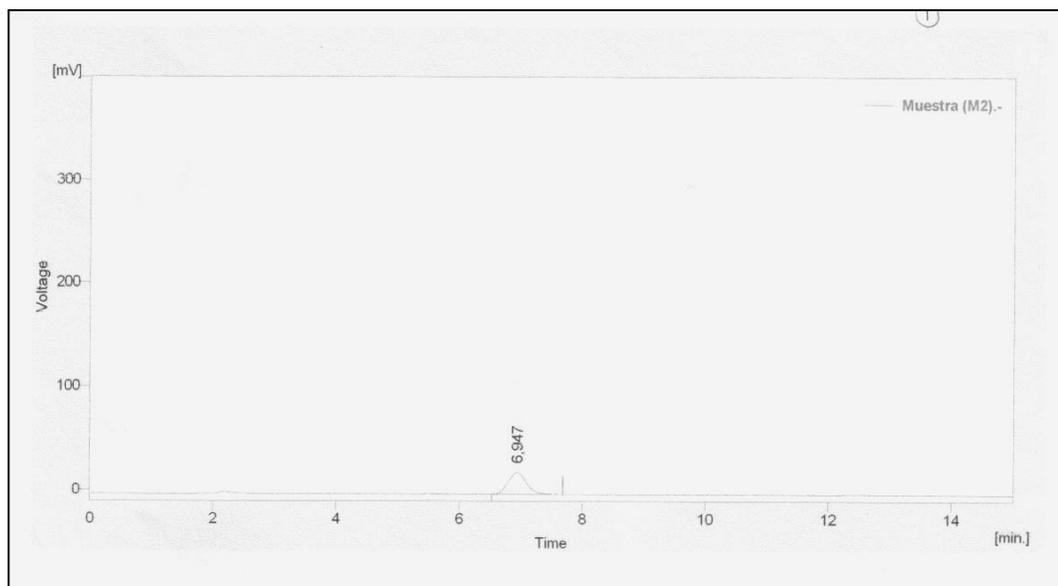


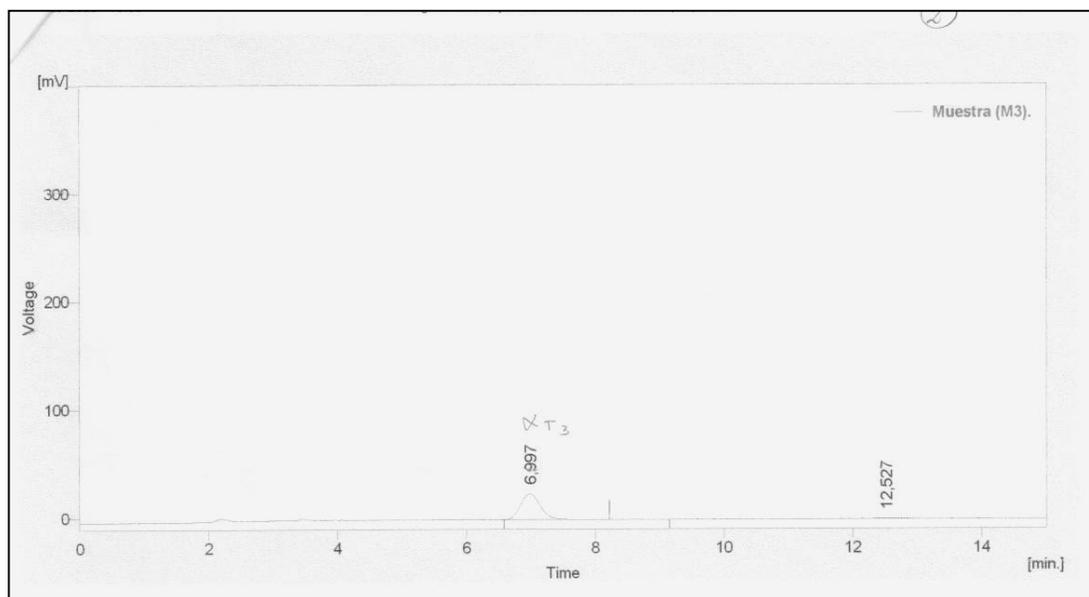
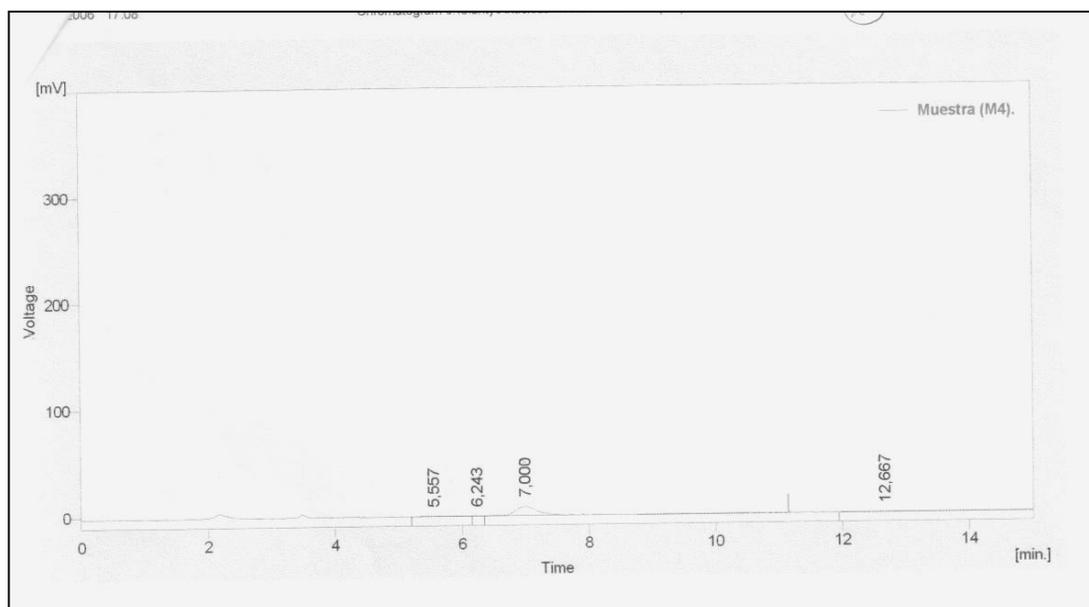
**ANEXO 7 Cromatogramas de tocoles presentes aceites de Gevuin, de seis clones determinados por HPLC.**

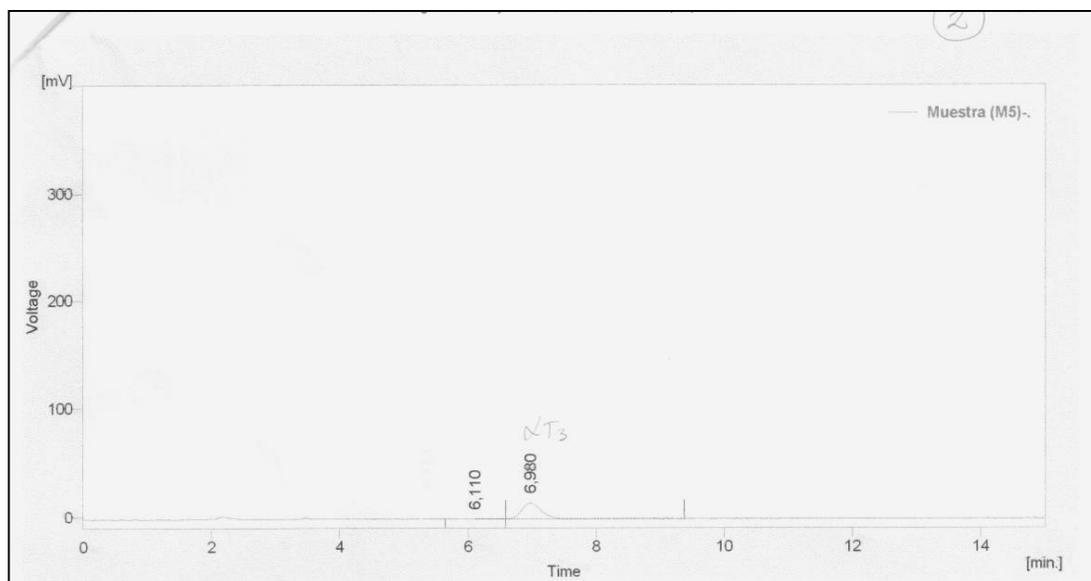
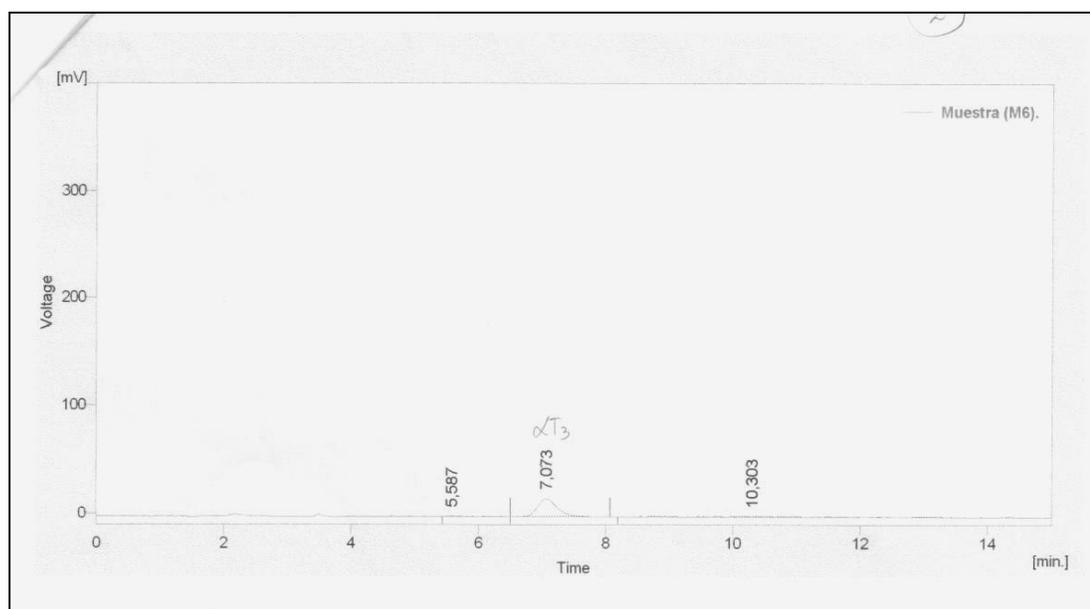
**1. Clon 53.**



**2. Clon 64**



**ANEXO 7. Continuación****3. Clon 33****4. Clon 34**

**ANEXO 7. Continuación****5. Clon 22****6. Clon 01.**

**ANEXO 8 Análisis de varianza del contenido de Tocolos totales en el aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	116305,0	6	19384,1	91,83	0,0000 *
Intra grupos	2955,19	14	211,085		
Total (Corregido)	119260,0	20			

\*P ≤ 0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 9 Análisis de varianza del contenido de Tocoferoles totales en aceite de Gevuin, por clon determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	3,89083	6	0,648471	215,13	0,0000 *
Intra grupos	0,0422	14	0,00301429		
Total (Corregido)	3,93303	20			

\*P ≤ 0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 10 Análisis de varianza del contenido de  $\alpha$ - tocoferol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	0,560762	6	0,0934603	377,44	0,0000*
Intra grupos	0,00346667	14			
Total (Corregido)	0,564229	20			

\*P ≤ 0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 11 Análisis de varianza del contenido de  $\gamma$ - tocoferol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	0,944533	6	0,157422	206,62	0,0000*
Intra grupos	0,0106667	14	0,000761905		
Total (Corregido)	0,9552	20			

\* $P \leq 0,05$  indica diferencias significativas

**ANEXO 12 Análisis de varianza del contenido de  $\delta$ - tocoferol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	0,120857	6	0,0201429	8,01	0,0007*
Intra grupos	0,0352	14	0,00251429		
Total (Corregido)	0,156057	20			

\* $P \leq 0,05$  indica diferencias significativas

**ANEXO 13 Análisis de varianza del contenido de Tocotrienoles totales en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	115996,0	6	19332,6	91,20	0,0000 *
Intra grupos	2967,59	14	211,971		
Total (Corregido)	118963,0	20			

**ANEXO 14 Análisis de varianza del contenido de  $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	112007,0	6	18667,8	89,70	0,0000*
Intra grupos	2913,44	14	208,103		
Total (Corregido)	114920,44	20			

\*P  $\leq$  0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 15 Análisis de varianza del contenido de  $\beta$ - tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	1,55112	6	0,258521	379,65	0,0000*
Intra grupos	0,00953333	14	0,000680952		
Total (Corregido)	1,56066	20			

\*P  $\leq$  0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 16 Análisis de varianza del contenido de  $\gamma$ - tocotrienol en aceite Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	69,9283	6	11,6547	110,73	0,0000*
Intra grupos	1, 4736	14	0,105257		
Total (Corregido)	71,4019	20			

\*P  $\leq$  0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 17 Análisis de varianza del contenido de  $\delta$ -tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	0,12319	6	0,0205317	10,54	0,0002*
Intra grupos	0,0272667	14	0,00194762		
Total (Corregido)	0,150457	20			

\*P  $\leq$  0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 18 Análisis de varianza del contenido de  $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin por clon, determinado por HPLC (ug/g).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	24518,6	5	4903,72	12,84	0,0002*
Intra grupos	4584,38	13	382,031		
Total (Corregido)	29103,0	17			

\*P  $\leq$  0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 19 Análisis de varianza del contenido de  $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin de cuatro clones, determinado por GC/MS (mg/kg).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	80509,4	3	26836,5	127,41	0,0000*
Intra grupos	1685,11	8	210,639		
Total (Corregido)	82194,5	11			

\*P  $\leq$  0,05 indica diferencias significativas

**ANEXO 20 Análisis de varianza del contenido de  $\alpha$ -tocotrienol en aceite de Gevuin de cuatro clones, determinado por HPLC (ug/g).**

Fuente	SC	GL	CM	F calculado	P-Valor
Entre grupos	16141,3	3	5380,44	13,45	0,0017*
Intra grupos	3200,8	8	400,1		
Total (Corregido)	19342,1	11			

\* $P \leq 0,05$  indica diferencias significativas