

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
(CIBA-IPN TLAXCALA)

DOCTORADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO SOBRE LA
ISOMERÍA DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL AGUACATE.”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN TECNOLOGÍA AVANZADA**

PRESENTA

M. T. A. JOSÉ ALBERTO ARIZA ORTEGA

DIRECTORES DE TESIS

DR. RAÚL RENÉ ROBLES DE LA TORRE

DRA. MARÍA DEL CARMEN CRUZ LÓPEZ

TEPETITLA DE LARDIZÁBAL, TLAX. A 16 DE DICIEMBRE DEL 2010

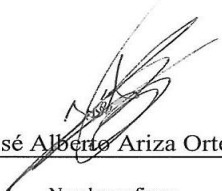


*INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO*

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 7 del mes enero del año 2011, el (la) que suscribe José Alberto Ariza Ortega alumno (a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada con número de registro A070485, adscrito al CIBA-unidad Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Raúl René Robles de la Torre y cede los derechos del trabajo intitulado “Estudio del efecto del campo eléctrico sobre la isomería de los ácidos grasos del aguacate”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rrenerdlr@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



José Alberto Ariza Ortega

Nombre y firma



"El presente trabajo forma parte de una investigación integral acerca de la aplicación de campo eléctrico sobre productos de aguacate, proyecto apoyado por FOMIX-MICHOACÁN, clave 2005-01-015"





TABLA DE CONTENIDO

	Página
TABLA DE CONTENIDO	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.	8
1.1 AGUACATE	8
1.2 LÍPIDOS	11
1.3 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS	14
1.3.1 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS (OMEGA 6 Y 3)	19
1.4 ÁCIDOS GRASOS SATURADOS	21
1.5 ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS.....	22
1.5.1 ÁCIDOS GRASOS MONO-INSATURADOS.....	24
1.5.2 ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS.....	25
1.6 COLESTEROL	26
1.7 ÁCIDOS GRASOS TRANS.....	28
1.7.1 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS.....	28
1.7.2 GENERACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS	30
1.7.3 METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS EN EL ORGANISMO	32
1.8 ANÁLISIS DE LAS GRASAS Y LOS ACEITES	33
1.8.1 EXTRACCIÓN DE LA GRASA O ACEITE	33
1.8.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	36
1.8.2.1 METILACIÓN O DERIVATIZACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS	36
1.8.3 ANÁLISIS DEL EXTRACTO	38
1.8.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	40
1.8.3.1.1 PARTES QUE CONFORMAN UN CROMATÓGRAFO DE GASES.....	40
1.8.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	43
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.	47
2.1 FRUTAS Y HORTALIZAS.....	47
2.2 ENZIMAS DEL AGUACATE	47
2.3 CONSERVACION DE ALIMENTOS	49
2.3.1 MÉTODOS TRADICIONALES	49
2.3.2 MÉTODOS EMERGENTES.....	50
2.4 CAMPO ELÉCTRICO.....	51
2.5 FRECUENCIA	52
2.6 TIPO DE ONDA	52
2.7 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LA MATERIA	53
2.8 EQUIPO GENERADOR DE CAMPO ELÉCTRICO	55
2.9 MECANISMO PROPUESTO DEL CAMPO ELÉCTRICO PULSADO SOBRE LA MEMBRANA.....	56
2.10 MECANISMO DEL CAMPO ELÉCTRICO SOBRE LAS ENZIMAS	59
CAPÍTULO 3.	60



3.1	OBJETIVO GENERAL	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
3.3	HIPÓTESIS.....	61
3.4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	61
3.5	JUSTIFICACIÓN	62
CAPÍTULO 4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.1	OBTENCIÓN DE LA PULPA DE AGUACATE	63
4.2	EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE AGUACATE	64
4.2.1	EXTRACCIÓN CON DISOLVENTE A TEMPERATURA AMBIENTE	64
4.2.2	EXTRACCIÓN CON DISOLVENTE A 60°C.....	64
4.2.3	EXTRACCIÓN POR CENTRIFUGACIÓN.....	65
4.3	CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE AGUACATE	65
4.4	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	65
4.5	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER	66
4.6	TRATAMIENTO DEL ACEITE DE AGUACATE CON EL CAMPO ELÉCTRICO	67
4.7	ESTUDIO DEL EFECTO DE CAMPO ELÉCTRICO SOBRE EL ACEITE DE AGUACATE ALMACENADO A DIFERENTE TIEMPO	69
4.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
CAPÍTULO 5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
5.1	ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA PULPA DE AGUACATE.....	70
5.2	ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ACEITES DE AGUACATE Y SU RENDIMIENTO	71
5.3	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ACEITES DE AGUACATE EXTRAÍDOS POR LOS MÉTODOS PROPUESTOS.....	73
5.4	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ACEITES DE AGUACATE TRATADOS CON EL CAMPO ELÉCTRICO	81
5.5	EFFECTO DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO CON EL CAMPO ELÉCTRICO SOBRE EL ACEITE DE AGUACATE EVALUADO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y CROMATOGRAFÍA DE GASES	90
5.6	EFFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO SOBRE LOS ACEITES DE AGUACATE Y OLIVA, EVALUADO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	95
5.7	ANÁLISIS QUÍMICO Y POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO DEL EFECTO DEL CAMPO ELÉCTRICO Y EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL ACEITE DE AGUACATE.....	99
CAPÍTULO 6.	CONCLUSIONES	106
BIBLIOGRAFIA.....		108
ANEXOS.....		114



LISTA DE TABLAS

	Página
1. Aporte nutricional en minerales en 100 g de pulpa de aguacate	9
2. Composición de los aminoácidos en 100 g de pulpa de aguacate	10
3. Composición química en vitaminas en 100 g de pulpa de aguacate	10
4. Composición general de ácidos grasos en la pulpa de aguacate	12
5. Descripción de algunos ácidos grasos saturados	21
6. Especificación numérica de algunos ácidos grasos insaturados	23
7. Características físicas y clasificación de las lipoproteínas	28
8. Diferentes técnicas de metilación	37
9. Descripción de algunas técnicas instrumentales	39
10. Absorciones de algunos aceites comestibles analizados por FTIR	46
11. Diseño experimental de los tres aceites de aguacate tratado al campo eléctrico	68
12. Tratamientos de los aceites de aguacate y oliva tratados al campo eléctrico	68
13. Caracterización y comparación de la pulpa de aguacate con otras variedades	70
14. Análisis químico del aceite de aguacate y su comparación con aceites de referencia	71
15. Ésteres metílicos de los tres aceites de aguacate	80
16. Ésteres metílicos del aceite 1 tratado con campo eléctrico, extraído sin calor	83
17. Ésteres metílicos del aceite 2 tratado con campo eléctrico, extraído sin calor	84
18. Ésteres metílicos del aceite 1 tratado con campo eléctrico, extraído con calor	85
19. Ésteres metílicos del aceite 2 tratado con campo eléctrico, extraído con calor	86
20. Ésteres metílicos del aceite 1 tratado con campo eléctrico, obtenido por centrifugación	87
21. Ésteres metílicos del aceite 2 tratado con campo eléctrico, obtenido por centrifugación	89
22. Ésteres metílicos del aceite de aguacate a 5 kV/cm a diferente tiempo	92
23. Ésteres metílicos del aceite de aguacate a 9 kV/cm a diferente tiempo	94
24. Ésteres metílicos de los aceites de aguacate y oliva a 5 y 9 kV/cm a diferente tiempo	97
25. Propiedades químicas del aceite de aguacate	102



LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Composición general de la pulpa de aguacate	9
2. Estructura de un triacilglicérido	12
3. Ejemplos de algunos lípidos compuestos	13
4. Formación del malonil-CoA	14
5. Secuencia de cuatro pasos para alargar la cadena de acil graso	15
6. Proceso síntesis del palmitato	16
7. Ruta de síntesis de los ácidos grasos	17
8. Esquema general de la vía metabólica en la producción de aceite en plantas	18
9. Ruta de biosíntesis de los ácidos grasos omega 6 y 3	20
10. Estructura del ácido graso palmítico	22
11. Estructura del ácido graso oleico	24
12. Estructura del ácido graso linoleico	25
13. Estructura del colesterol	27
14. Ejemplos de ácidos grasos de configuración <i>cis</i> y <i>trans</i>	29
15. Proceso de la formación de los ácidos grasos <i>trans</i> durante la hidrogenación	31
16. Equipo de extracción de Soxhlet	35
17. Reacción de esterificación de un triacilglicérido	38
18. Esquema general de un cromatógrafo de gases	41
19. Espectro electromagnético	44
20. Esquema general de un espectrofotómetro con transformada de Fourier	45
21. Principales reacciones y compuestos formados por la enzima polifenoloxidasas	48
22. Orientación molecular de un sistema con y sin un campo eléctrico	54
23. Equipo generador de campo eléctrico	56
24. Mecanismo de permeabilización de la membrana celular por campo eléctrico	58
25. Comparación visual de los aceites de aguacate	72
26. Espectro del estándar del ácido elaídico	73
27. Espectros de los aceites de aguacate extraídos por los tres métodos	74
28. Cromatograma de los ésteres metílicos del estándar	75
29. Cromatograma de los EM-AG del aceite de aguacate extraído sin calor	76
30. Cromatograma de los EM-AG del aceite de aguacate extraído con calor	77
31. Cromatograma de los EM-AG del aceite de aguacate obtenido por centrifugación	78
32. Espectros de los aceites de aguacate tratados con campo eléctrico	81
33. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico a 5 kV/cm	91
34. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico a 9 kV/cm	93
35. Espectros de los aceites de aguacate y oliva a 5 kV/cm	95
36. Espectros de los aceites de aguacate y oliva a 9 kV/cm	96



37. Espectros del aceite de aguacate con campo eléctrico (3 kV/cm, 60 Hz y 10 s)	99
38. Espectros del aceite de aguacate con campo eléctrico (9 kV/cm, 720 Hz y 180 s)	100
39. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico 3200-4000 cm^{-1}	103
40. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico 2400-3400 cm^{-1}	104



RESUMEN

Al considerar la demanda mundial de aguacate y derivados y que es un producto altamente perecedero, se han buscado nuevas tecnologías para su conservación; el reto principal es disminuir la actividad de la enzima polifenoloxidasas, PFO, que provoca oscurecimiento del mesocarpio. En el presente trabajo se evaluó el efecto del campo eléctrico (CE), sobre los ácidos grasos del aguacate cuando se aplica para disminuir la actividad de la enzima PFO.

La importancia de esta investigación es que la pulpa de aguacate contiene una importante cantidad de aceite con ácidos grasos funcionales los cuales pueden ser afectados por el CE. Diferentes investigaciones indican que cuando se extraen los aceites por diferentes métodos se generan ácidos grasos *trans* (AGT). La idea fundamental del presente trabajo fue evaluar la posible formación de AGT en el aceite de aguacate después de someter al aceite y la pasta de este fruto al efecto del CE, obtenidos por tres diferentes métodos de extracción. En el trabajo previo para la inactivación de la enzima PFO en pulpa de aguacate, se encontró que el mejor tratamiento fue con 9 kV/cm a 720 Hz durante 3 min. Para la aplicación del CE en la pulpa y aceite, se utilizaron voltajes de 3 y 9 kV/cm, frecuencias de 60 y 720 Hz, y tiempos de 10 y 180 s, siguiendo un diseño factorial 2^3 .

Para el estudio se siguieron dos estrategias: El aceite fue tratado directamente al CE (Aceite 1), en la segunda, la pulpa de aguacate se expuso al CE y posteriormente se extrajo el aceite (Aceite 2). Para el análisis de los AGT se empleó espectroscopia de infrarrojo mediano (FTIR), región de 400-4000 cm^{-1} , y cromatografía de gases. En los análisis por FTIR en los Aceites 1 y 2 extraídos por los tres métodos propuestos y tratados al CE, se identificó una ligera intensidad en 968 cm^{-1} relacionada a los dobles enlaces *trans*, en comparación con la banda a 725 cm^{-1} que fue más intensa en todas las muestras, y que corresponde a los dobles enlaces *cis*. El mejor método de extracción fue por centrifugación a 15,557 g a 40 °C durante 10 min., se cuantificaron isómeros *trans* <0.5 g/100g, éste límite es el propuesto por la FDA para considerar un aceite como seguro para su consumo. La extracción con disolvente sin y con calor, repercutió en un mayor nivel de isómeros *trans* con 0.7 y 6.1% respectivamente, más que por la exposición al CE. En cuanto a los índices químicos del aceite obtenido se observó un mayor deterioro por causa del disolvente con calor. Con el incremento del voltaje y tiempo, se cuantificó un aumento en el rendimiento del aceite (6%), sin embargo, con el aumento de estas condiciones se generó ligeramente la formación de AGT en los Aceites 1 y 2.

Con los resultados obtenidos, se propone el CE como una alternativa para la conservación de la pulpa de aguacate, ya que mantiene su calidad y otros compuestos de interés como son los ácidos grasos insaturados del aceite de aguacate.



ABSTRACT

Avocado and avocado products are having increasing demand over the last decades, however avocado has a very short shelf life and new technologies are under current research. The main challenge is decrease the activity of the polyphenoxidase enzyme, PPO, which causes brown color in the avocado pulp. In the present work the effect of a electric field EF on the fatty acids of the avocado-oil was evaluated, when the EF is applied to diminish the activity of the PPO.

It is well known that the avocado oil contain an important amount of functional fatty acids which can be affected by the use of EF. Some related articles indicate that the extraction method of the oil could be a factor that increases the trans fatty acids, (TFA). The idea behind this work was to evaluate the possible TFA formation after three different extraction methods and application of different conditions of a EF. Previously it was stated that the PPO enzyme is inactivated at 9 kV/cm, 720 Hz and 3 min. In this work the following conditions were applied: voltages of 3 and 9 kV/cm, 60 and 720 Hz, and 10 and 180 s, using a factorial design 2^3 .

For this study two strategies were utilized, first the oil was extracted and then treated with the EF, (oil 1), second the pulp was first treated with the EF and the oil was extracted, (oil 2). The TFA were analyzed by infrared spectroscopy, (FTIR 400-4000 cm^{-1}) and gas chromatography, (GC). The FTIR results show that all the oils studied had very light amounts of TFA, evidenced by the 968 cm^{-1} band compared with the very high peaks at 725 cm^{-1} , corresponding to the cis form of the C-H bond. It was also observed that the best method of oil extraction was the centrifugation, (15,557 g at 40 °C during 10 min) reaching <0.5 g TFA /100g oil, although the yield was very poor, this amount is within the limits of several regulations. In practice, the centrifugated and CE treated avocado oil is safe to the consumer.

The traditional extraction method using dissolvent with or without heat had a light increase in the amount of TFA, with 6.1% and 0.7% respectively, compared with centrifugated and CE treated oil. On the chemical indexes of the oils, the oil extracted with dissolvent and heat had a major deterioration. Besides that, when the paste was treated with higher voltage and time of EF the yield of the oil was lightly superior, (6%), however, under these conditions the oils had more TFA.

With all these results it is proposed that the EF technology can be used to treat avocado pulp in order to extend their shelf life without apparent losses of the fatty acids and other valuable compounds.



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Aguacate

El aguacate, fruto del árbol del mismo nombre, pertenece al género *Persea* de la familia *Lauraceae*. Se conocen alrededor de 85 especies, entre las más conocidas se encuentran la mexicana, guatemalteca y antillana, actualmente estas tres especies se consideran dentro del género *Persea americana Mill* o *Persea gratísima Gaertn*. Existen muchas evidencias de que el aguacate es originario de México, en la región conocida como Mesoamérica (**Ortega, 2003**).

México es uno de los países con una amplia diversidad de tipos de aguacate, las variedades que se cultivan son Hass, Fuerte, Rincón, Bacon, Boot 7, Boot 8, Lula, Choquette, Hall, Edranol, Grana, Zutano, Wurtz, Waldin, Criollo, San Miguel, entre otras, todas estas se agrupan como aguacate no especificado. Sin embargo, en México la variedad Hass es la más cultivada, principalmente en Michoacán con 1 024 582 25 y Morelos con 25 372 toneladas respectivamente.

Del aguacate no especificado los principales productores son Nayarit con 26 726 67 y Puebla 7 807 60 toneladas respectivamente. Sumando toda la producción de aguacate en México, en 2008, se alcanza una suma de 1 162 428 92 toneladas cosechadas (**SAGARPA, 2008**).

Por lo anterior, nuestro país es el principal productor y exportador de aguacate a nivel mundial. En las últimas dos décadas se ha comenzado a diversificar el fruto en productos como guacamole, pulpa y aceite para exportación, sin embargo, esta producción es mínima. En otros países, aprovechan sus nutrientes para elaborar productos cosmetológicos y farmacéuticos.

En la **Figura 1** se observa que posee un alto contenido de agua, sin embargo el contenido de lípidos es considerable, lo que lo hace una fuente potencial de aceite.

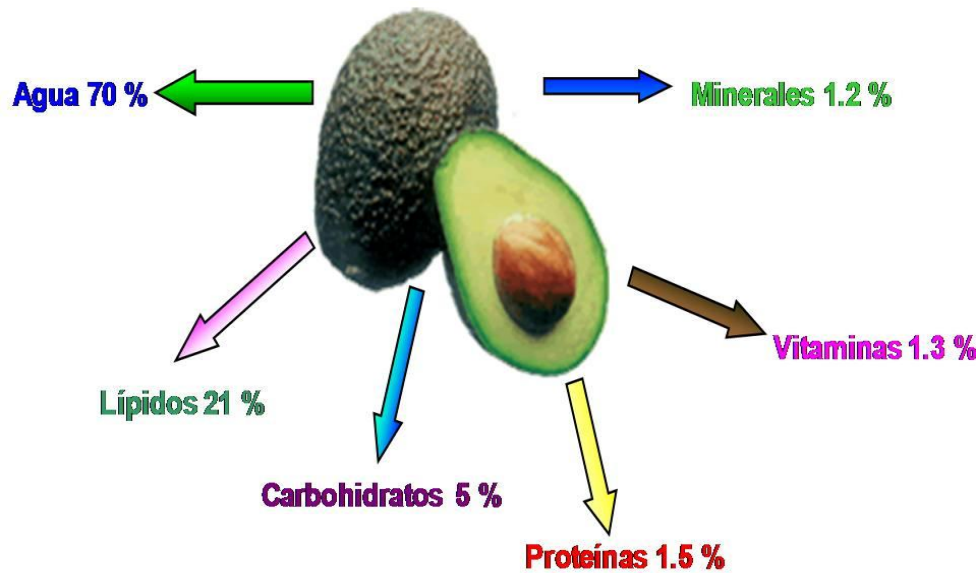


FIGURA 1. Composición general de la pulpa de aguacate (Ortiz y col., 2003).

Respecto a otros nutrientes presentes en la pulpa, son destacables los minerales, los aminoácidos esenciales y algunas vitaminas, estos se muestran en las **Tablas 1 a 3**.

Tabla 1. Aporte nutricional en minerales en 100 g de pulpa de aguacate.

Minerales	¹ (mg)	² Valor Recomendado (mg)
Potasio	340	340
Fósforo	38	42
Calcio	10	10
Sodio	3	3
Hierro	0.6	1

(¹Batista y col., 1993, ²CENEXA, 1991).

Tabla 2. Composición de aminoácidos por 100 g de pulpa de aguacate.

Aminoácidos	¹ (mg)	² Valor Recomendado (mg)
Valina	63	50
Lisina	59	55
Fenilalanina	48	60
Isoleucina	47	40
Leucina	46	70
Treonina	40	40
Metionina	29	35
Triptófano	-	10

(¹Ortega, 2003, ²FAO/WHO, 1973).

Tabla 3. Composición química en vitaminas en 100 g de pulpa de aguacate.

Vitaminas	¹ Pulpa de aguacate	² Valor Recomendado
Vitamina A	85 µg	900 µg
Vitamina D	10 µg	5 µg
Vitamina K	8 µg	110 µg
Vitamina E	3 µg	9 µg
Vitamina B1	0.1 mg	1.4 mg
Vitamina B2	0.2 mg	1.6 mg
Vitamina B6	0.4 mg	2.1 mg
Ácido pantoténico	1 mg	5.5 mg
Niacina	1.6 mg	16 mg
Biotina	10 µg	100 µg
Vitamina C	14 mg	60 mg
Ácido fólico	32 µg	200 µg

(¹Ortega, 2003, ²CENEXA, 1991).

En las Tablas anteriores se puede observar la composición química de la pulpa de aguacate por cada 100 g y su comparación recomendada de estos nutrientes reportada por diferentes Organizaciones enfocadas en la Nutrición humana.



En la **Tabla 1** se puede observar que el contenido en minerales presenta un alto porcentaje de potasio y un mínimo de sodio, en cuanto a los aminoácidos (**Tabla 2**) se observa que la pulpa de aguacate presenta siete de los ocho aminoácidos esenciales, con respecto a vitaminas, se puede observar en la **Tabla 3** la presencia de cantidades significativas de las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, por ejemplo, la vitamina D que está presente en 100 g de pulpa de aguacate contiene el 100% o más del requerimiento diario, mientras que de las vitaminas E, B6, C, y B2, 100 g de pulpa proporcionan porcentajes importantes del requerimiento diario, todo esto hace que la pulpa de aguacate se considere una fuente de antioxidantes, y por lo tanto, un alimento con beneficios a la salud (**Batista y col., 1993, Hernández y Porrata, 1999, Kritchevsky y col., 2003**).

Dentro de su composición nutrimental el aguacate también destaca por su contenido de lípidos, lo que lo hace que sea un excelente fruto al paladar, que resulta agradable y exquisito al consumidor. Además, el contenido de ácidos grasos saturados es muy bajo y el de ácidos grasos insaturados es alto, por lo que la pulpa de aguacate puede contribuir a combatir enfermedades cardiovasculares y a disminuir el colesterol (**Anderson y col., 2009**). Debido a la importancia de los lípidos para el presente trabajo se detallará su composición en las siguientes secciones.

1.2 Lípidos

Los lípidos se definen como un grupo de moléculas orgánicas de naturaleza heterogénea formados por C, H, O, N y P en menor proporción, su principal característica es la de ser insolubles en agua debido a su estructura hidrocarbonada y solubles en disolventes orgánicos. La principal fuente de lípidos son las grasas animales y los aceites en las semillas. La diferencia entre grasas y aceites reside en la proporción de ácidos grasos presentes. En la **Tabla 4** se muestra el contenido de lípidos del aguacate en relación a sus ácidos grasos.

Tabla 4. Composición general de ácidos grasos en la pulpa de aguacate.

Ácidos grasos	Porcentaje
Monoinsaturados	66-72
Saturados	16-22
Polinsaturados	8-11

(Ortiz y col., 2003).

Los lípidos se dividen en simples y compuestos, los primeros están formados por triacilglicéridos, que contienen C, H y O, como son los acilglicéridos que forman las grasas y los aceites, los segundos contienen otros elementos como N, P, S u otra biomolécula como algún tipo de azúcar (Allen y col., 1982). Los acilglicéridos están formados por ésteres de ácidos grasos con glicerol, que se forman mediante una reacción de condensación llamada esterificación. La estructura de los ácidos grasos unidos al glicerol son un factor determinante para las grasas y los aceites dando como resultado una gama completa en cuanto a propiedades físicas y químicas de los mismos. En la **Figura 2** se muestra la estructura de un lípido simple como un triacilglicérido, mientras que en la **Figura 3** se muestran algunos ejemplos de lípidos compuestos.

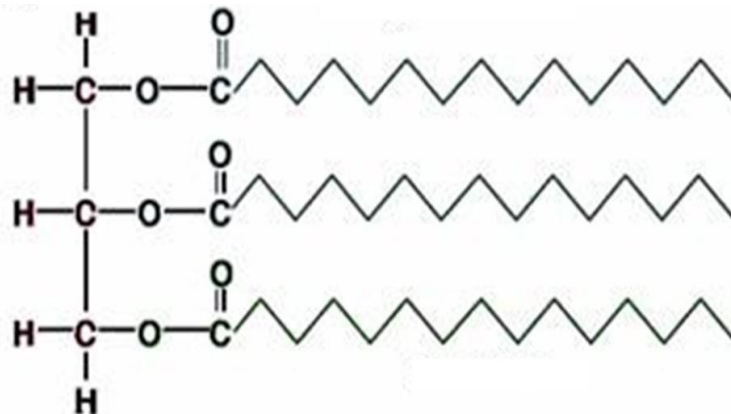


FIGURA 2. Estructura de un triacilglicérido.

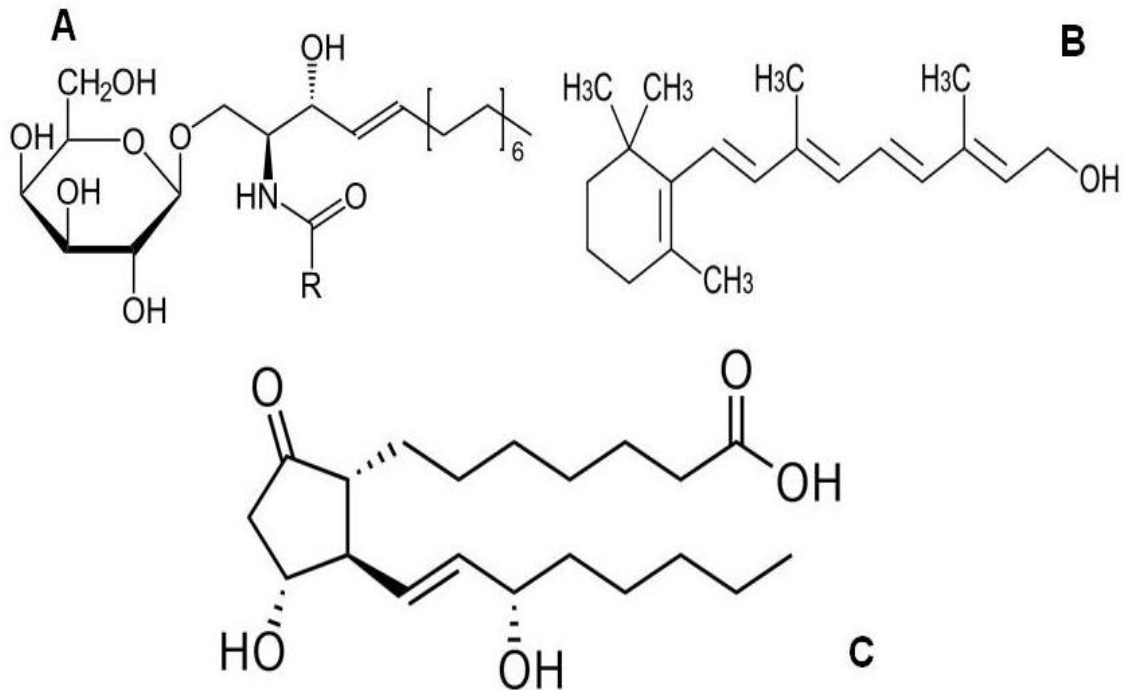


FIGURA 3. Ejemplos de algunos lípidos compuestos, A) Galactosilceramida, B) Vitamina A, y C) Prostaglandina.

En la Figura anterior, la galactosilceramida y la prostaglandina son lípidos saponificables, mientras que la vitamina A no lo es. Un lípido saponificable es todo aquel que está compuesto por un alcohol unido a uno o varios ácidos grasos. Esta unión se realiza mediante un enlace éster muy difícil de hidrolizar. Pero puede romperse fácilmente si el lípido se encuentra en un medio básico. En este caso se produce la saponificación alcalina y se obtiene como subproducto jabón y glicerina (**Allen y col., 1982**).

1.3 Biosíntesis de ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas muy importantes para los seres vivos. Son los principales constituyentes de los triacilglicéridos (aceites y grasas, que actúan como reserva de energía) y de los fosfolípidos (que forman parte de la estructura de las membranas celulares). En la **Figura 4** se puede observar que el malonil-CoA se forma a partir de acetil-CoA y de bicarbonato, reacción que consume ATP y que está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa, enzima que requiere biotina como cofactor.

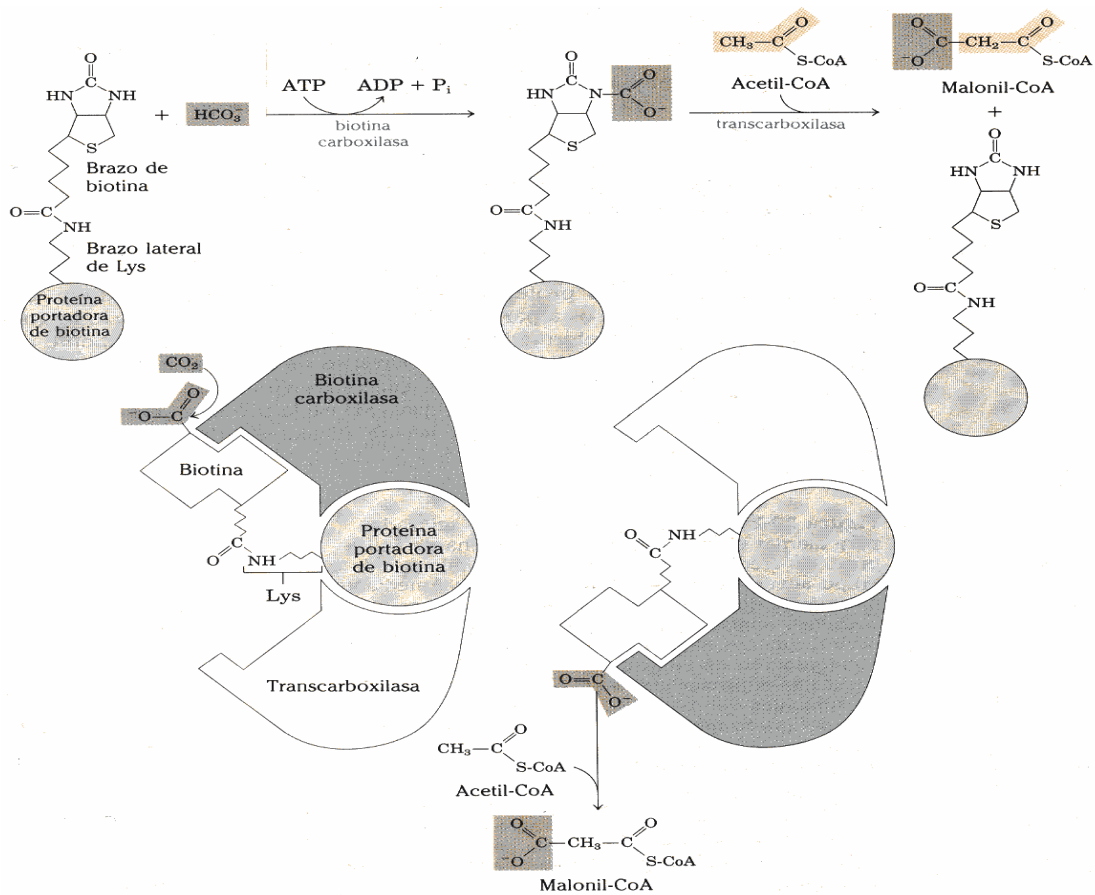


FIGURA 4. Formación del malonil-CoA a partir de la acetil-CoA catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (Nelson y Cox., 2001).

El principal precursor de los ácidos grasos es el malonil-CoA, una molécula que aporta dos de sus tres átomos de carbono al esqueleto carbonado del ácido graso en crecimiento. El malonil-CoA proviene, a su vez, del acetil-CoA. Todas las reacciones de síntesis de ácidos grasos tienen lugar en

el citosol de las células (Nelson y Cox., 2001). En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran las secuencias para formar el palmitato y la elongación de la cadena de los ácidos grasos.

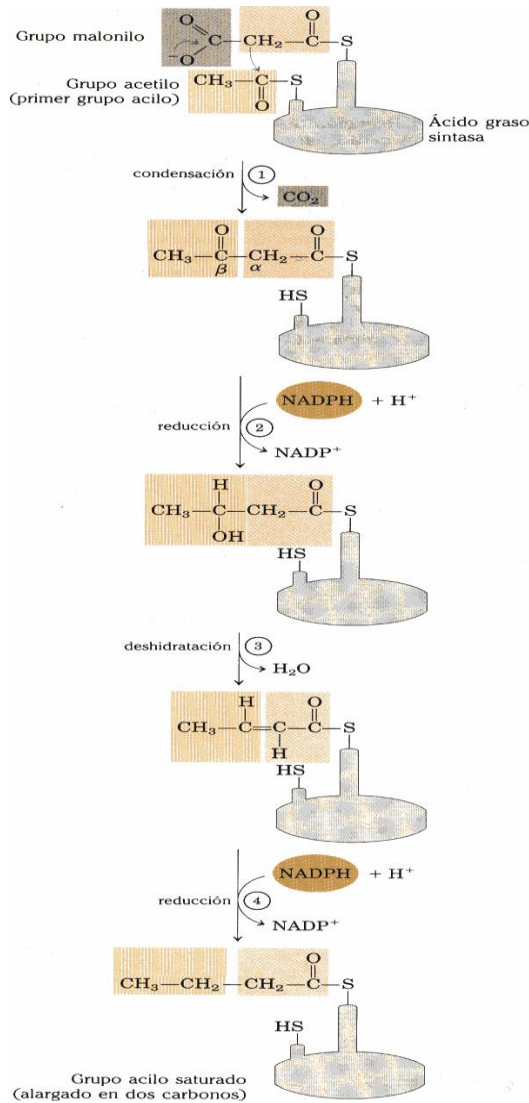


FIGURA 5. Secuencia de cuatro pasos utilizada para alargar en dos carbonos una cadena de acil graso en crecimiento (Nelson y Cox., 2001).

El crecimiento de la cadena del ácido graso ocurre a través de cuatro reacciones. El primer paso, es la condensación de un grupo acilo activado y dos carbonos provenientes del malonil-CoA, con eliminación de CO_2 del grupo malonilo, el efecto neto es la extensión de la cadena en dos

carbonos. El segundo, el producto β -ceto de esta condensación se reduce a continuación en tres pasos idénticos a las reacciones de la β -oxidación, pero en secuencia inversa, en donde el grupo β -ceto se reduce a alcohol. El tercero, la eliminación de H_2O crea un doble enlace. El cuarto, el doble enlace se reduce para formar el grupo acil graso saturado.

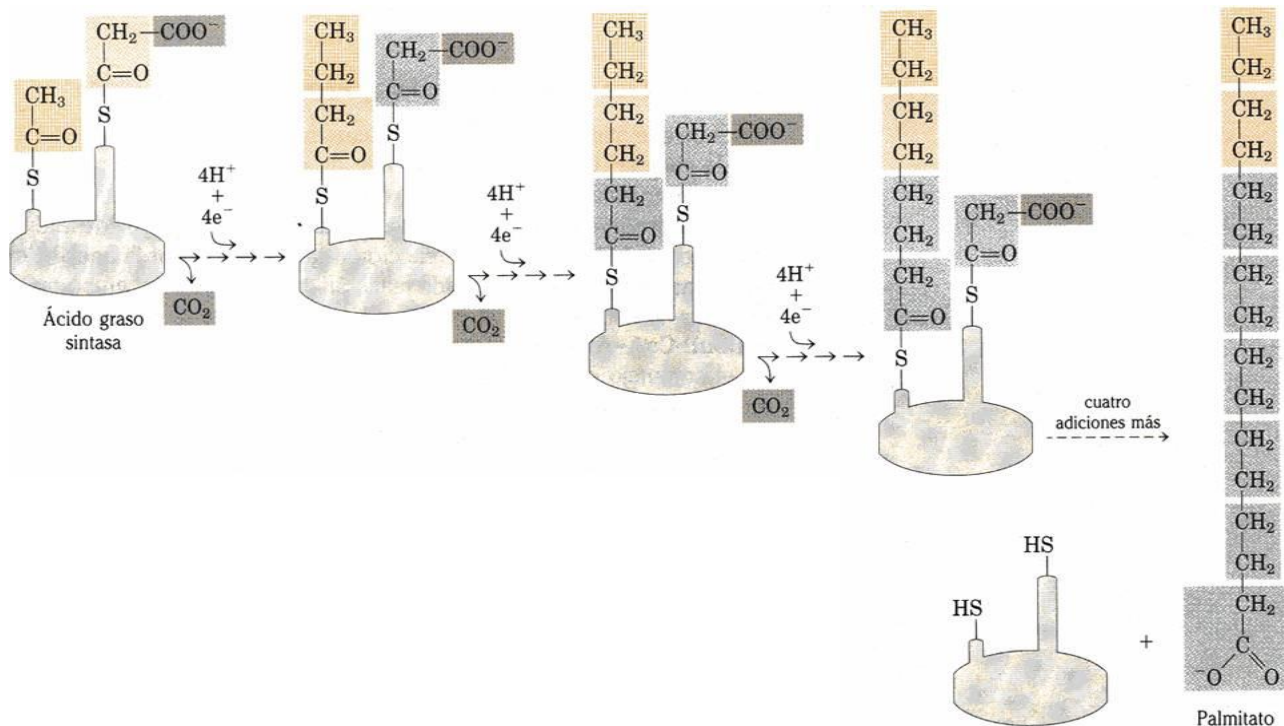


FIGURA 6. Proceso síntesis del palmitato (Nelson y Cox., 2001).

La cadena de acil graso crece en unidades de dos carbonos cedidas por el malonato activado con pérdida de CO_2 . Después de cada adición de dos carbonos, las reducciones convierten la cadena en crecimiento en un ácido graso saturado de cuatro, seis, ocho carbonos, así sucesivamente hasta formar el palmitato, como se observa en la **Figura 6 (Nelson y Cox., 2001)**. Los demás ácidos grasos se obtienen por modificaciones del ácido palmítico (C16:0), en la **Figura 7** se observa éste proceso.

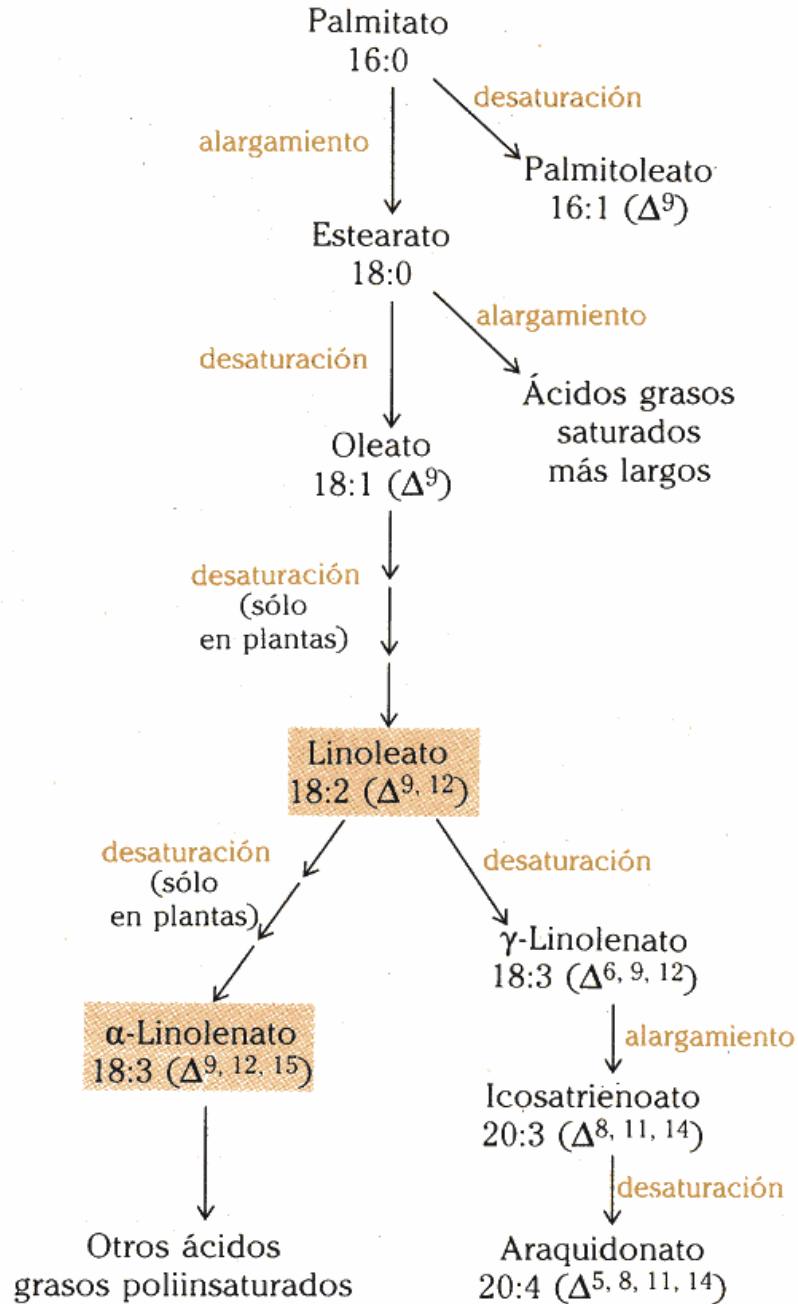


FIGURA 7. Ruta de síntesis de los ácidos grasos (Nelson y Cox., 2001).

En las plantas, la biosíntesis de los ácidos grasos se produce en los plástidos con consecutivas conexiones de dos unidades de carbono para hacer una cadena en crecimiento

derivados de la producción de ácidos grasos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1) como se observar en la **Figura 8**.

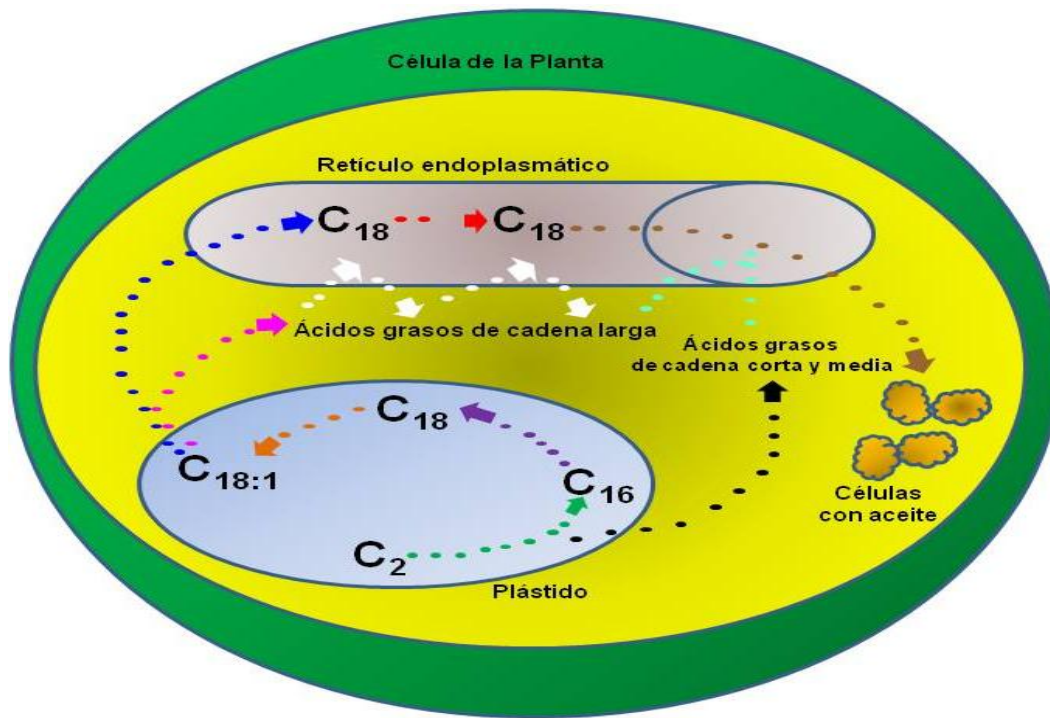


FIGURA 8. Esquema general de la vía metabólica en la producción de aceite en las plantas (Dyer y col., 2008).

Todos los ácidos grasos se sintetizan a partir del ácido palmítico, mediante la combinación del proceso de alargamiento y desaturación. El alargamiento de la cadena de los ácidos grasos, se realiza en el retículo endoplasmático y en la mitocondrias, en donde se adicionan unidades de dos carbonos hasta formar una cadena de C16:0 que corresponde al ácido palmítico, obteniéndose ácidos grasos de hasta C24:0 (ácido graso lignocérico). La desaturación de la cadena de los ácidos grasos, se produce en el retículo endoplasmático, en donde se introducen dobles enlaces *cis* en la cadena hidrocarbonada de ácidos grasos saturados.



Las semillas de algunas plantas contienen enzimas que detienen la cadena del proceso de alargamiento, lo que da como resultado la producción de ácidos grasos de cadena corta o media que se incorporan en los idioblastos, donde son almacenados en forma de aceite (**Dyer y col., 2008**).

1.3.1 Biosíntesis de ácidos grasos poli-insaturados (omega 6 y 3)

El término omega, se refiere al átomo de carbono terminal más alejado del grupo funcional del ácido carboxílico. Los ácidos grasos de la serie omega-6, como el ácido graso linoleico (C18:2) se encuentra en la mayoría de los aceites y esta asociado al ácido linolénico (C18:3) que es el precursor de los ácidos grasos de la serie omega-3. El ácido C18:2 se convierte en ácido C18:3, y éste en el ácido araquidónico (C20:4).

El ácido C20:4, es precursor directo para la síntesis de las prostaglandinas, tromboxanos, ácidos hidroxiperoxieicosatetraenoicos (HPETE), hidroxieicosatetraenoico (HETE) y leucotrienos, estos compuestos están relacionados con diversas funciones biológicas como son la activación de las plaquetas y leucocitos, estimulan el proceso de coagulación, mantienen abierto el ducto arterial en niños con cardiopatías congénitas, son constrictores extremadamente potentes de la musculatura lisa, aumentan la permeabilidad vascular, inducen el parto y previenen la úlcera gastroduodenal (**Rang y col., 2003**).

Por otro lado, los ácidos grasos de la serie omega-3 que son principalmente el linolénico (C18:3), eicosapentaenoico "EPA" (C20:5) y docosahexaenoico "DHA" (C22:6). En los humanos, el ácido C18:3 puede servir como precursor para la síntesis de EPA y DHA, sin embargo, esta vía está limitada en su capacidad y también varía entre individuos. Por lo tanto, estos ácidos grasos se obtienen directamente de la ingesta de alimentos como son algunas fuentes vegetales y animales (linaza, nueces y kiwis, y un pequeño porcentaje de la carne de aves y vacuno). Los alimentos que contienen una mayor concentración de EPA y DHA son los peces de agua fría (salmón, atún y arenque, entre otros), estos ácidos grasos son precursores de los lípidos compuestos, modulan la señalización celular, la expresión de genes y procesos anti-inflamatorios, entre otras funciones. En la **Figura 9** se observa el proceso de la biosíntesis de los ácidos grasos poli-insaturados.

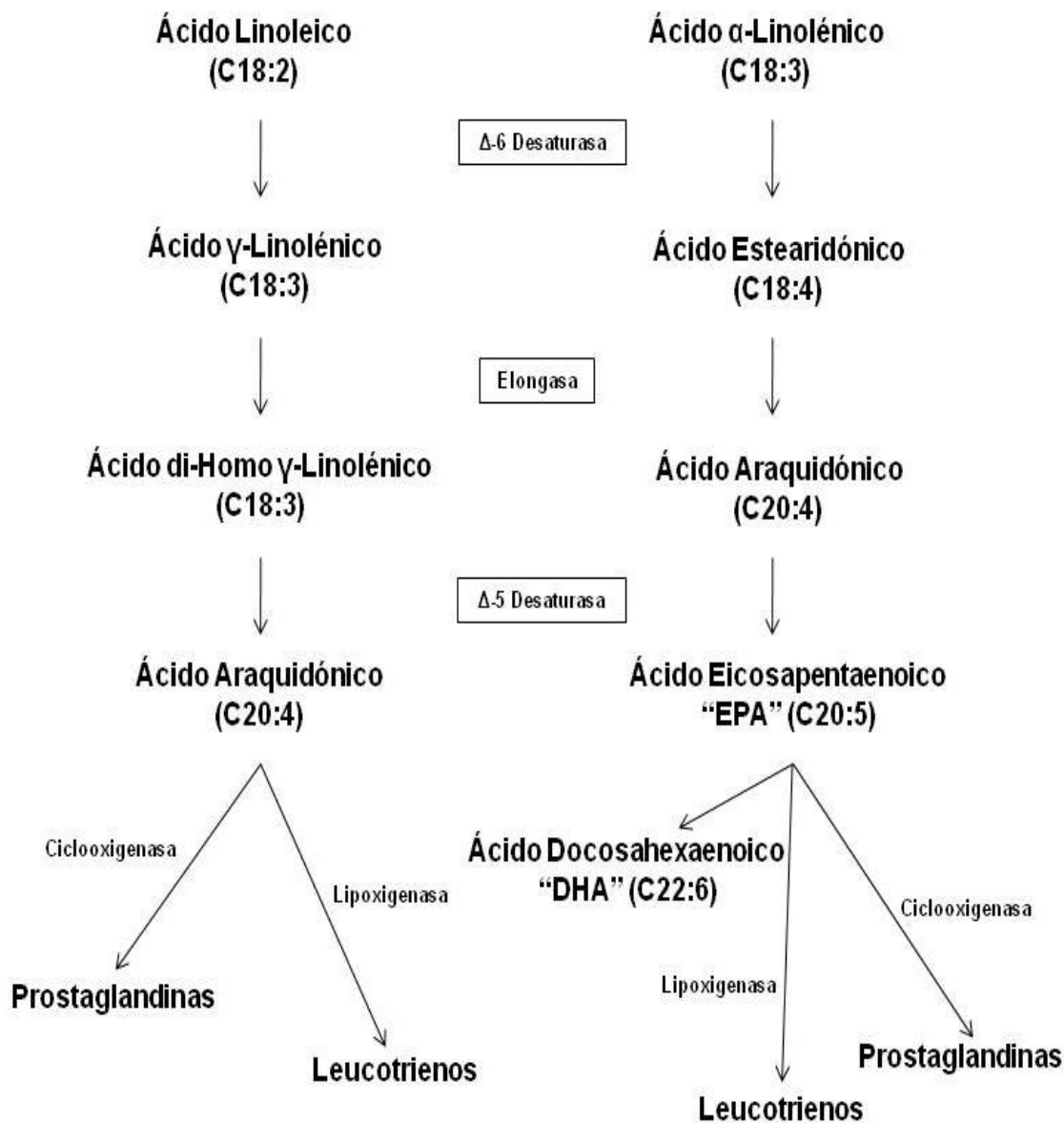


FIGURA 9. Ruta de biosíntesis de los ácidos grasos omega 6 y 3 para formar ácidos grasos poli-insaturados y otros lípidos compuestos (Carrero y col., 2005).

1.4 Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una cadena larga hidrocarbonada con un número par de átomos de carbono (**Allen y col., 1982, Fennema, 2000**). Su nomenclatura está basada en poner al ácido graso con el nombre del hidrocarburo con el mismo número de átomos de carbono, substituyendo la *o* al final en el nombre del hidrocarburo por la terminación *oico* (**IUPAC, 1990**), por ejemplo los ácidos saturados terminan en *anoico* (ácido pentanoico). En la **Tabla 5** se mencionan a algunos ácidos grasos saturados, su localización en la naturaleza, su notación común y científica.

Tabla 6. Descripción de algunos ácidos grasos saturados.

Ácidos Grasos	Fórmula	IUPAC	Fuentes naturales
Acético	$C_2 H_4 O_2$	Etanoico	Producto final de la fermentación y mantequilla
Butírico	$C_4 H_8 O_4$	Butanoico	
Caproico	$C_6 H_{12} O_6$	Hexanoico	
Caprílico	$C_8 H_{16} O_2$	Octanoico	Cantidades mínimas en vegetales
Caprico	$C_{10} H_{20} O_2$	Decanoico	
Laurico	$C_{12} H_{24} O_2$	Dodecanoico	Coco, canela, palma, laurel nuez y mirto
Mirístico	$C_{14} H_{28} O_2$	Tetradecanoico	
Palmítico	$C_{16} H_{32} O_2$	Hexadecanoico	En plantas y animales
Estearico	$C_{18} H_{36} O_2$	Octadecanoico	
Araquídico	$C_{20} H_{40} O_2$	Eicosanoico	Cacahuete

(Meyer y col., 1982)

En la **Figura 10** se muestra la estructura del ácido graso más abundante en los aceites y grasas.

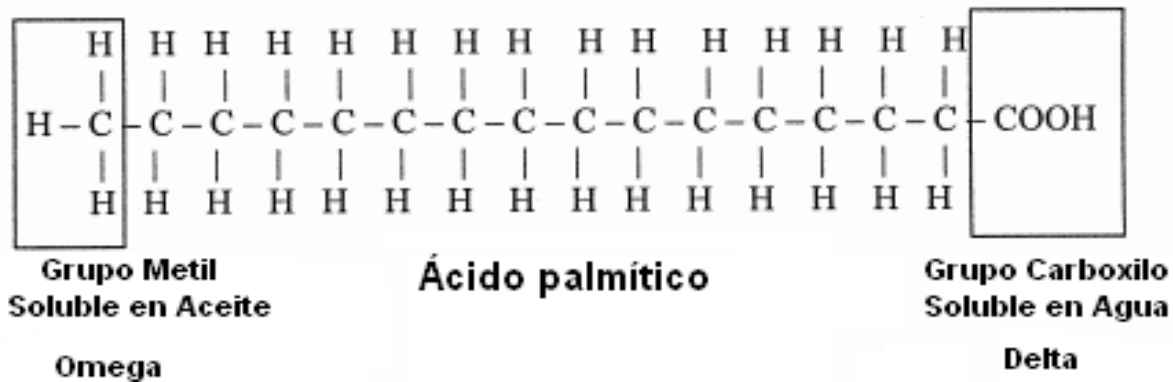


FIGURA 10. Estructura del ácido graso palmítico.

Diversos estudios relacionados en el consumo de ácidos grasos saturados, han indicado que una ingesta excesiva de grasas saturadas, ejerce un desequilibrio en la cantidad del colesterol que repercute en el aumento de presentar una enfermedad cardiovascular. Sin embargo, cuando estas grasas son sustituidas por ácidos grasos insaturados, disminuye la probabilidad y el riesgo de padecer estas enfermedades (Mozaffarian y col., 2006).

1.5 Ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados se diferencian de los ácidos grasos saturados, por la presencia de dobles enlaces en su estructura, en base a esto se clasifican en mono-insaturados o mono-enoicos y poli-insaturados o poli-enoicos, si presentan uno o más de un doble enlace en su estructura respectivamente.

La mayoría de los ácidos grasos mono-insaturados tienen su doble enlace entre los átomos de carbono 9 y 10, mientras que los poli-insaturados tienen el doble enlace entre los carbonos 9, 10 y los restantes están desplazados hacia el extremo metileno terminal de la cadena.

Para describir a los ácidos grasos insaturados se nombran con la terminación *enoico* por ejemplo ácido octadecadienoico (ácido linoleico), anteriormente se le designaba a partir de su procedencia (nombre común), actualmente para facilitar su nombre y clasificación se denotan científicamente de acuerdo a los normas de la IUPAC, por ejemplo, a los que contienen dos dobles enlaces en el ácido graso se llaman *dienoico*, si tiene tres *trienoico*, si posee cuatro *tetraenoico*, si contiene cinco *pentaenoico*, así sucesivamente (**Fennema, 2000**).

La manera más simple de especificar la posición del doble enlace es señalar el número del átomo de carbono en que se ubica, para ello se numera a partir del grupo carboxilo, (carbono número 1), al átomo del carbono adyacente al carbono carboxílico (número 2) se le conoce también como el carbono α , al átomo de carbono número 3 es el carbono β . Otra posible numeración consiste en iniciar con el metilo de la cadena hidrocarbonada y el carbono metílico terminal denominado carbono ω o carbono n e indicar el número de átomos de carbono entre éste y el que tiene el doble enlace. Asimismo, la nomenclatura sistemática utiliza el símbolo delta con el superíndice del número del átomo de carbono en donde se encuentra el doble enlace, por ejemplo: Δ^9 que indica que un doble enlace se encuentra entre los átomos de carbono 9 y 10 del ácido graso. En la **Tabla 6** se describen algunos de los principales ácidos grasos insaturados.

Tabla 6. Especificación numérica de algunos ácidos grasos insaturados.

Nombre	Fórmula	IUPAC	Serie	Fuentes naturales
Palmitoleico	C16:1 Δ^9	Hexadecenoico	ω -7	Mayoría de los aceites
Oleico	C18:1Δ^9	Octadecenoico	ω-9	
Linoleico	C18:2 $\Delta^{9,12}$	Octadecadienoico	ω -6	Maíz, cacahuate, algodón y soya
Linolénico	C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	Octadecatrienoico	ω -3	Linaza

(Meyer y col., 1982)

Como se podrá observar en las **Figuras 11 y 12**, en donde se describen brevemente dos de los ácidos grasos insaturados más importantes.

1.5.1 Ácidos grasos mono-insaturados

Los ácidos grasos mono-insaturados como el palmitoleico (C16:1) y el oleico (C18:1) se caracterizan porque contienen un doble enlace en su estructura.

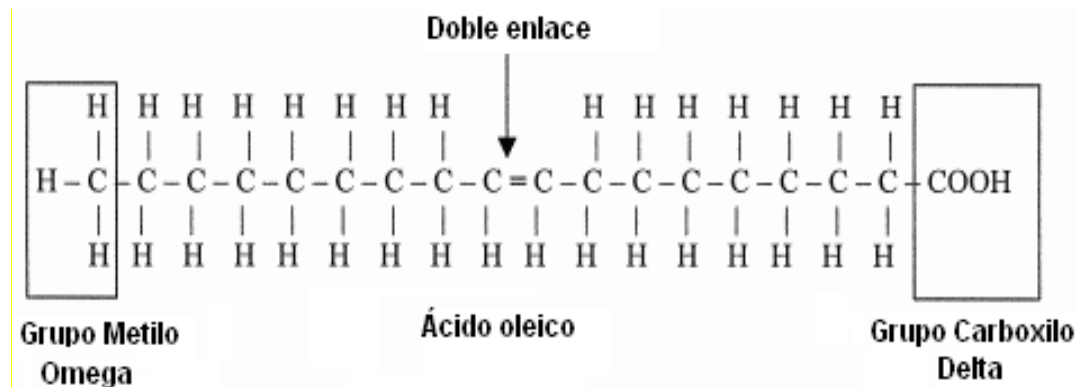


FIGURA 11. Estructura del ácido graso oleico.

El ácido palmitoleico es un ácido graso de la serie omega 7. Está presente en todos los tejidos, pero se encuentra en concentraciones más altas en el hígado. Las fuentes dietéticas donde puede ser encontrado el ácido palmitoleico incluyen una variedad de grasas animales, aceites vegetales y aceites marinos, algunos ejemplos son el aceite de nuez de macadamia (*Macadamia integrifolia*) y el aceite de espinillo amarillo (*Hippophae rhamnoides*) con un 17% y un 40% respectivamente.

El ácido graso oleico pertenece a la serie omega 9, es el más abundante en la naturaleza y en las semillas oleaginosas, se encuentra en todas los lípidos naturales (Meyer y col., 1982, Fennema, 2000).

1.5.2 Ácidos grasos poli-insaturados

Los ácidos grasos poli-insaturados se diferencian de los ácidos grasos insaturados porque contienen en su estructura dos o más dobles enlaces. Algunos ejemplos de estos ácidos grasos son los ácidos grasos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), que son los más conocidos. Un ejemplo de estos ácidos poli-insaturados se muestra en la **Figura 12**.

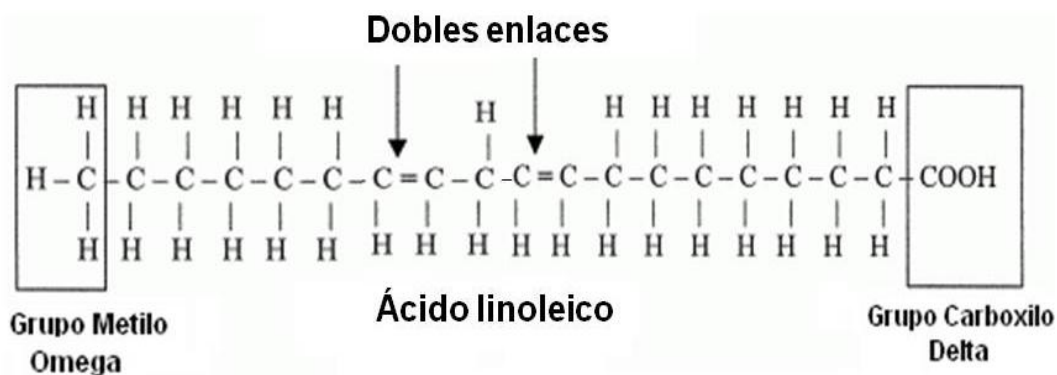


FIGURA 12. Estructura del ácido graso linoleico.

El ácido graso linoleico pertenece a la serie omega 6, es un ácido graso poli-insaturado con dos dobles enlaces como se puede observar en la **Figura 12**, es un ácido graso esencial para el organismo humano, porque el hombre es incapaz de sintetizarlos con la disposición de dobles ligaduras que se encuentran en ellos, y por lo tanto, se vuelven necesarios para el buen funcionamiento del organismo (**Corinne y col., 2002**), es el precursor de numerosos derivados, que se forman a partir de reacciones de elongación, de saturación o ambas (ver **Figura 9**).



Por otra parte, el ácido linolénico es un ácido graso esencial de la serie omega 3, es requerido en la dieta de todos los mamíferos, es precursor para la síntesis de EPA y DHA en los humanos como se mencionó.

Diversas investigaciones sobre la ingesta de estos ácidos grasos han indicado que promueven la disminución de la concentración sanguínea de triacilglicéridos, presión arterial y la agregación plaquetaria, como lo reportó **Mozaffarian (2008)**, éste investigador estudió estos ácidos grasos y concluyó que consumidos en una porción por semana (250 mg), reducen en un 36% de padecer una enfermedad cardiovascular, en comparación a no consumir ninguno de ellos. En otro estudio de **Mozaffarian y Clarke (2008)**, analizaron tres aceites con un alto contenido de omega 6, y concluyeron que sustituyendo un 10 y 25% de grasas saturadas por estos aceites, se reduce el efecto adverso del colesterol en el organismo.

En otro análisis pero con el ácido graso de la serie omega 3, se ha indicado que este ácido graso tiene un efecto protector sobre las enfermedades coronarias, como lo investigaron **Sabate y col., (2003)**, en su trabajo reportaron el efecto del omega 3 presente en la nuez, y concluyeron que cuando se consumen 40 g de nueces por día se reduce los niveles de colesterol en un 4% y el riesgo de adquirir una enfermedad cardiovascular es baja.

1.6 Colesterol

El colesterol tiene 27 átomos de carbono y su estructura básica es un isopreno (ciclopentano perhidrofenantreno), es el lípido compuesto más conocido debido principalmente al efecto negativo que ejerce en el organismo. No se requiere en la dieta de los mamíferos porque el hígado puede sintetizarlo, de lo cual una pequeña fracción se incorpora a las membranas de los hepatocitos y la otra se distribuye para formar el colesterol biliar, ácidos biliares y ésteres del colesterol (**Benveniste, 1986, Nelson y Cox, 2001**). En la **Figura 13** se muestra la estructura básica del colesterol.

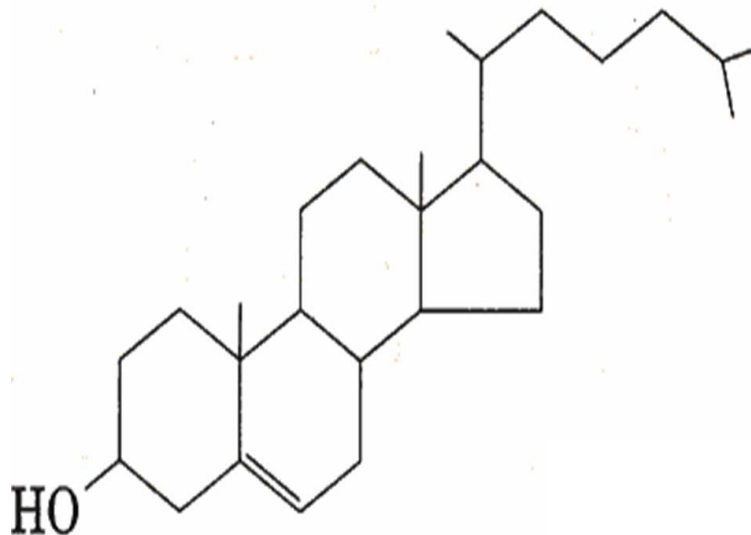


FIGURA 13. Estructura del colesterol (Carrero y col., 2005).

El colesterol y sus ésteres, al igual que los triacilglicéridos y fosfolípidos, son transportados en el plasma sanguíneo desde un tejido a otro en forma de lipoproteínas plasmáticas (agregados moleculares de proteínas denominadas apolipoproteínas) con diversas combinaciones de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles. Las apolipoproteínas se combinan con los lípidos formando diversas clases de partículas lipoproteínas que son agregados esféricos con lípidos hidrofóbicos en el núcleo central y las cadenas laterales hidrofílicas de aminoácidos de la proteína en la superficie. Las combinaciones variables de lípido y proteína producen partículas de diferentes densidades que van desde lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (*very low density lipoproteins*), baja densidad LDL (*low density lipoproteins*) y alta densidad HDL (*high density lipoproteins*). Cada clase de lipoproteína tiene una función específica, determinada por su sitio de síntesis, composición lipídica y contenido de apolipoproteína (Demonty y col., 2009). En la **Tabla 7** se resumen algunas de sus características físicas.

Tabla 7. Características físicas y clasificación de las lipoproteínas.

Lipoproteínas	A	B	Densidad (mg/dL)	Tamaño (nm)
Quilomicrones	90 - 95	2 - 5	< 0.95	80 - 1000
VLDL	50 - 65	20	< 1.006	30 - 80
LDL	5 - 7	45 - 65	1.019 - 1.063	18 - 28
HDL	6	40	1.063 - 1.125	8 - 13

A: Porcentaje de Triacilglicéridos, B: Porcentaje de Colesterol (Nelson y Cox, 2001).

1.7 Ácidos grasos *trans*

Como se mencionó, los ácidos grasos insaturados se caracterizan por presentar un doble enlace en su estructura, los dobles enlaces varían de acuerdo a su número, conjugación y configuración. La conjugación, se refiere a la localización de los dobles enlaces, y se caracteriza porque dos dobles enlaces están separados por un enlace C-C. En cuanto a la configuración, los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados se suele designar de acuerdo a su isomería, con los términos *cis* o *trans*, que indica que el átomo de hidrógeno está o no al mismo lado de la molécula (Allen y col., 1982).

1.7.1 Propiedades químicas y físicas de los ácidos grasos *trans*

En un ácido graso insaturado en conformación *trans*, el ángulo del doble enlace es más pequeño y la cadena de acilo es más lineal, lo que da como resultado una molécula rígida y recta, con un punto de fusión más elevado. Por otro lado, en la configuración *cis*, los átomos de hidrógeno están en el mismo lado de la cadena de carbono, dando lugar a un pliegue en la cadena de acilo y

origina un ángulo de 30° que permite a la molécula ser más flexible, como se observa en la **Figura 14**.

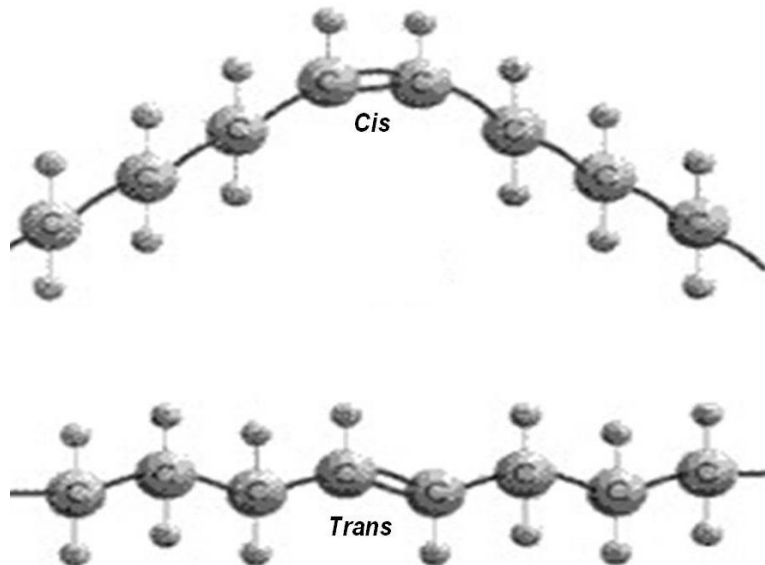


Figura 14. Ejemplos de ácidos grasos con isomería *cis* y *trans*.

Debido a lo anterior, la estructura espacial de los ácidos grasos *trans* se encuentra entre la de los ácidos grasos saturados y los insaturados, proporcionándole diferentes características, por ejemplo, el ácido oleico (C18:1) tiene su punto de fusión a los 13°C , su isómero *trans* el ácido elaídico (C18:1t) a 44°C , comparándolo con el ácido esteárico (C18:0), que es un ácido graso saturado, tiene una estructura recta y su punto de fusión es a 72°C .

Si los triacilglicéridos contienen ácidos grasos saturados, estos se acumulan fácilmente y forman una red cristalina, lo cual origina su estado sólido a temperatura ambiente. En contraste, si los triacilglicéridos presentan más ácidos grasos insaturados, estos presentan en su estructura una molécula curva, que impide la formación de cristales y no son introducidos en los triacilglicéridos, esto explica por qué los aceites son líquidos a temperatura ambiente y aún a temperatura más baja (**Allen y col., 1982**).



1.7.2 Generación de los ácidos grasos *trans*

La manteca de cerdo fue una de las principales grasas para la producción de diversos alimentos para el consumo humano, debido a su elaboración sencilla, fácil adquisición, bajo costo, excelente vida de anaquel y sus propiedades nutritivas. Con el desarrollo industrial y al creciente interés por mantener la salud, surgió la preocupación sobre los peligros que puede provocar en el organismo, por las altas concentraciones de ácidos grasos saturados que contiene, y un consumo en exceso puede provocar problemas cardiovasculares, circulatorios y obesidad. Por tal motivo, se estimuló los esfuerzos para encontrar una fuente alternativa de una materia grasa. Los aceites son esa alternativa, pero carecen de estabilidad en comparación con la manteca de cerdo, ya que presentan una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados. Para resolver ese problema se desarrolló el proceso de hidrogenación para modificarlos, y por lo tanto, estas grasas serían sustitutos adecuados de la manteca de cerdo (**Patterson, 1990**).

En la industria de los aceites vegetales, la hidrogenación es un proceso químico mediante el cual los aceites se transforman en grasas sólidas y semisólidas mediante la adición de hidrógeno a alta presión y temperatura, y en presencia de un catalizador. La hidrogenación sólo puede tener lugar cuando los tres reactivos se han reunido, el aceite con ácidos grasos insaturados (un líquido), el catalizador (que es un sólido) y el hidrogeno (un gas). La hidrogenación de los dobles enlaces carbono-carbono parece ser muy simple, pero es extremadamente compleja. En general, la reacción implica los siguientes pasos, a) la difusión de los reactivos a la superficie del catalizador, b) la reacción de adsorción superficial, c) la desorción y la difusión de los productos a la superficie del catalizador. En la **Figura 15** se muestra un esquema de este proceso.

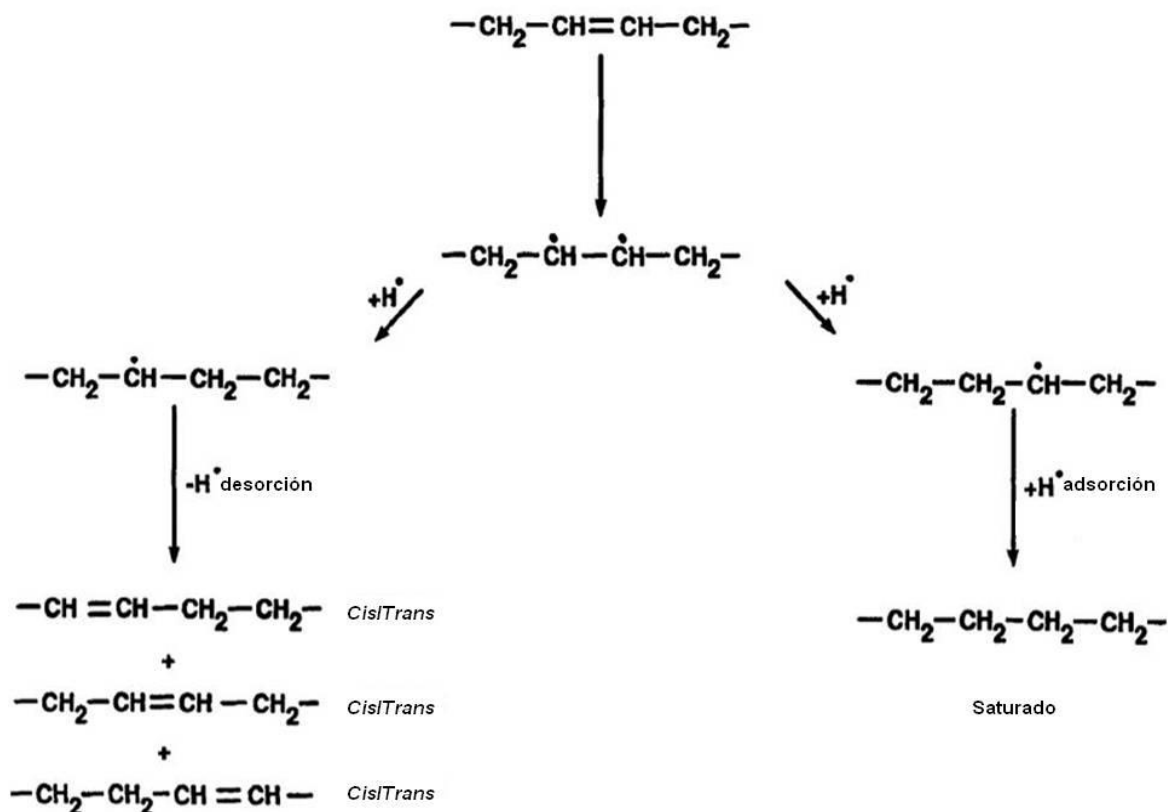


FIGURA 15. Reacciones involucradas en la hidrogenación de aceites y la formación de ácidos grasos *trans* (Deman, 1990).

Los grupos insaturados, puede transferir un electrón entre la superficie del catalizador, y pueden ser adsorbidos. Cada grupo adsorbido puede reaccionar con un átomo de hidrógeno para formar un complejo inestable que es un doble enlace parcialmente hidrogenado. Algunos de los complejos pueden reaccionar con otro átomo de hidrógeno para completar la saturación del doble enlace. Si el complejo no reacciona con otro átomo de hidrógeno, un átomo de hidrógeno se elimina de la molécula adsorbida y el nuevo enlace insaturado se separa de la molécula (desorción). Si los grupos insaturados no son adsorbidos en la superficie del catalizador, la difusión no es completa en todos los ácidos grasos insaturados del aceite. Así, pueden ser isomerizados a nuevas posiciones o formas geométricas (Horiuti y Polanyi, 1934, Deman, 1990, Davidek y col., 1990).



El objetivo del proceso de hidrogenación es aumentar el punto de fusión y la estabilidad oxidativa de las grasas, por medio de la saturación de los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos linoléico (C18:2) y linolénico (C18:3) principales responsables del deterioro por oxidación. Los principales productos que se obtienen son la margarina y la manteca vegetal (**Deman, 1990**). Sin embargo, diversas investigaciones reportan que en estos productos se generan ácidos grasos *trans* alrededor del 30% (**CODEX, 2004**) debido al tipo y a la cantidad del catalizador, temperatura de reacción, velocidad de agitación y presión de hidrógeno. Así, como la calidad y la cantidad de los ácidos grasos poli-insaturados y su mezcla con otros aceites (**Horiuti y Polanyi, 1934, Deman, 1990, Davidek y col., 1990**).

Otros procesos en los que se generan ácidos grasos *trans* es en las operaciones de extracción y desodorización de los aceites vegetales, como lo investigaron **Ortiz y col., (2003)**, en su estudio reportaron el contenido de ácidos grasos *trans*, en los aceites extraídos de la pulpa de aguacate obtenidos por cuatro diferentes métodos. Los autores concluyeron que el método que causó la menor cantidad de ácidos grasos *trans* en el aceite de aguacate, fue con el método que combina microondas y prensado con 0.33 g/100 g. En otro estudio publicado por **Eder (1982)**, investigó la formación de ácidos grasos con isomería *trans*, por espectroscopia de infrarrojo en aceites con un contenido elevado de ácidos grasos insaturados, e indicó que la formación de ácidos grasos *trans* es de 1% o menos por hora cuando se desodoriza a 240-250 °C.

1.7.3 Metabolismo de los ácidos grasos *trans* en el organismo

Los ácidos grasos *trans* se absorben fácilmente en la dieta y se incorporan en la mayoría de los tejidos de los mamíferos incluidos en los órganos humanos (**Ohlogge y col., 1981**), aumentando las lipoproteínas de baja densidad LDL (*low density lipoproteins*) en un grado similar a la de las grasas saturadas (**Mensink y Katan, 1990**). El incremento en la concentración de las LDL se ha atribuido en parte al descenso de regulación del receptor de LDL (**Hayashi y col., 1993**). En contraste con otras formas de grasas, los isómeros *trans* disminuyen a las lipoproteínas de alta densidad HDL (*high density lipoproteins*). El mecanismo de esta disminución se ha postulado que es debido a la estimulación de la actividad de la lipoproteína de transferencia éster de colesterol, que transfiere



ésteres de colesterol de HDL a las lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (*very low density lipoproteins*) y de baja densidad (LDL) originando así los problemas circulatorios, al incrementar el colesterol en la sangre (**Abbey y Nestel, 1994**).

Debido a lo anterior, algunos países han regulado y legislado su contenido en los alimentos, entre estos se encuentra la Unión Europea (Ministerio de Sanidad Danés), que indica que los productos alimenticios deben contener una cantidad máxima de 1 g/100 g de lípido (**CODEX, 2004**). En Estados Unidos la FDA señala que la concentración debe presentar un máximo de 0.5 g por porción (**FDA, 2002**). En México, sólo se cuenta con la Norma Mexicana (**SECOFI, 2005**), donde se establece que se deberá de informar acerca de la importancia de limitar al mínimo la posible ingestión de alimentos con alto contenido de ácidos grasos *trans*, entre otros. Sin embargo, solo se aplica para los productos de exportación.

1.8 Análisis de las grasas y los aceites

El análisis de las grasas y los aceites se puede resumir en cuatro pasos, I. Extracción y aislamiento de la grasa o aceite, II. Preparación de la muestra, III. Análisis del extracto, IV. Interpretación de los resultados, mismos que se describen brevemente a continuación.

1.8.1 Extracción de la grasa o aceite

El primer paso es extraer la grasa o aceite de la muestra original, la elección de una técnica de extracción esta determinado por la naturaleza de la sustancia que se extrae, el sustrato sobre el que se adsorbe y los análisis realizados posteriormente. El costo y el trabajo implicado, también puede ser un factor que influye en la selección de la técnica (**Stauffer, 2005**).



Todos los procesos de extracción, tienen los siguientes objetivos: a) extraer la grasa o el aceite sin oxidación y lo más libre posible de impurezas indeseables, b) obtener la grasa o aceite con un rendimiento que sea compatible con la economía del proceso (**Allen y col., 1982**).

Los tejidos grasos de los animales consisten en gran medida de grasa y agua, y se extraen de las partes sólidas del tejido con calentamiento y un método mecánico como la centrifugación.

La extracción de aceites vegetales es más difícil. Los fuentes vegetales, en particular algunas de las semillas oleaginosas, contienen una gran proporción de material sólido, para la extracción del aceite se inicia con un tratamiento térmico y la aplicación de una fuerte presión, con la finalidad de obtener una eficiente separación del aceite de los sólidos. Incluso después del prensado más eficiente, el material sólido contiene una cantidad de aceite generalmente 2.5-5% en peso. En el caso de las semillas u otros alimentos, como la soya, puede contener hasta 15-20% de aceite total. Para aumentar el rendimiento, se extraen con disolventes y se reduce el aceite residual en el material sólido a menos del 1% (**Allen y col., 1982**).

La eficiencia de la extracción con disolvente se debe a que los aceites están constituidos por lípidos, que son solubles en disolventes no polares orgánicos. Hay muchas técnicas de extracción con disolvente que se han desarrollado para extraer los aceites de diferentes sustratos y que se han utilizado en la industria alimentaria durante muchos años, la más conocida es la extracción con un equipo de Soxhlet, en donde el disolvente se coloca en un matraz de bola, el disolvente se calienta y se volatiliza hasta un condensador a reflujo, el disolvente se enfría, se condensa y cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. Este proceso continua hasta la cantidad de veces que sea necesario y logre extraer la totalidad de la muestra. Una vez extraído el aceite si el volumen de disolvente es grande, la reconcentración es posible, especialmente con los disolventes con punto de ebullición bajo, como pentano o hexano, ya que el disolvente puede ser lentamente volatilizado a temperatura ambiente, pero no debe ser calentado drásticamente porque puede degradar a los ácidos grasos insaturados de la muestra (**Stauffer, 2005**). El equipo de extracción de Soxhlet se muestra en la **Figura 16**.



FIGURA 16. Equipo de extracción de Soxhlet.

Las desventajas principales de la extracción con disolventes son el alto costo inicial del equipo y el hecho de que algunas semillas oleaginosas se desintegran bajo la influencia del disolvente y el calor, en consecuencia, son difíciles de manejar y algunas no se pueden aprovechar para la elaboración de piensos (**Allen y col., 1982**). Además, en las industrias de extracción de aceite debido al uso del hexano se generan compuestos orgánicos volátiles alrededor de 100 toneladas por año, y son precursores de la formación de ozono, que afecta a la salud y contribuye a generar un calentamiento en la superficie de la tierra (**Wan y col., 1995**).

Existen diversas investigaciones enfocadas en la extracción del aceite de aguacate, por ejemplo **Curiel (1983)**, quien investigó la extracción con acetona a una temperatura de 25-55 °C. En otro estudio, **Ortiz y Dorantes (2005)**, propusieron un método a base de microondas para obtener un aceite extra-virgen sin el uso de disolventes y reactivos químicos, lo cual disminuye la producción de aguas residuales y la optimización de gasto de energía.



Otros investigadores se basan en la refinación del aceite como **Davis (1982)**, en su trabajo reportó que el aceite extraído por maceración, calefacción y por presión, es refinado por un tratamiento en un filtro de tierra de diatomeas.

1.8.2 Preparación de la muestra

La preparación de la grasa o aceite dependerá de la técnica analítica, por ejemplo, si es analizada por espectroscopia de infrarrojo, la preparación es mínima. Sin embargo, no es el caso para otras técnicas como la cromatografía de gases que implican una separación y un paso extra que es la metilación o derivatización de los triacilglicéridos (**Stauffer, 2005**).

1.8.2.1 Metilación o derivatización de los triacilglicéridos

La metilación o derivatización de los triacilglicéridos tiene como objetivo separar los ácidos grasos del glicerol y presenta otras ventajas como una disminución en la reactividad, y la segunda, un aumento en la volatilidad. Además, la separación por esta técnica hace únicos a los ácidos grasos, permitiendo su análisis y cuantificación (**Kuksis, 1966**).

La mayoría de los derivados son ésteres metílicos de ácidos grasos, que son ésteres que presentan un peso molecular bajo y por lo tanto, la elución de los ésteres metílicos en la columna cromatográfica se lleva a cabo a temperaturas relativamente baja. Cada técnica puede ser adecuada para una determinada grasa o aceite. El analista puede mejorar la metilación eligiendo la técnica más apropiada. No hay bibliografía para la optimización de los procedimientos de metilación, a falta de dicha información, la preparación por diferentes técnicas de los ésteres metílicos de ácidos grasos sólo se pueden presentar con sus ventajas y desventajas. Aunque la decisión final sobre la mejor técnica se deja al analista (**Stauffer, 2005**). En general, las técnicas catalizadas con bases son más simples, rápidas y seguras que las ácidas. En la **Tabla 8** se describen las técnicas de metilación, así como sus ventajas y desventajas.

Tabla 8. Diferentes técnicas de metilación.

Métodos catalizados con ácido		
Técnica de metilación	Ventajas	Desventajas
^{1,2} HCl en MeOH	Los reactivos son de fácil adquisición	Pérdida de tiempo (>1h). La preparación de los reactivos puede ser incomoda
^{2,3a} H ₂ SO ₄ en MeOH	Los reactivos son de fácil adquisición	Puede llevar mucho tiempo. Los ésteres metílicos podrían descomponerse si el disolvente se volatiliza
^{4a,5} BF ₃ en MeOH	La solución de BF ₃ /MeOH se puede comprar ya elaborada.	Puede traer picos adicionales en el cromatograma. El reactivo debe ser reciente, bien preparado y no es muy seguro
^{1,6b} BCl ₃ en MeOH	Eficiente como BF ₃ /MeOH Más seguro que BF ₃ /MeOH y no trae picos adicionales en el cromatograma	Casi nunca se utiliza
Métodos catalizados con base		
Técnica de metilación	Ventajas	Desventajas
^{7b,8} NaOCH ₃ en MeOH	Simple y rápido	-
⁷ KOCH ₃ en MeOH	Mejor catalizador que el sodio	Puede reaccionar vigorosamente con metanol y ser peligroso
^{9c} KOH en MeOH	Extremadamente simple, rápido y la solución presenta una larga vida útil	No es muy eficiente con un aceite con acidez >2

(¹Kuksis, 1966, ²Supelco, 1997, ^{3a}Supelco, 1999, ^{4a}Christie, 1990, ⁵Metcalfe, 1961, ^{6b}Supelco, 1999, ^{7b}Christie, 1990, ⁸Christie, 1994, ^{9c}Supelco, 1999,).

La reacción de metilación consiste generalmente en la hidrólisis de los triacilglicéridos en ácidos grasos libres, seguido por la esterificación de los ácidos grasos libres en ésteres metílicos de ácidos grasos, este procedimiento incluye una etiqueta particular del producto y el contenido de los ácidos grasos (Stauffer, 2005). En la **Figura 17** se puede observar la reacción de metilación.

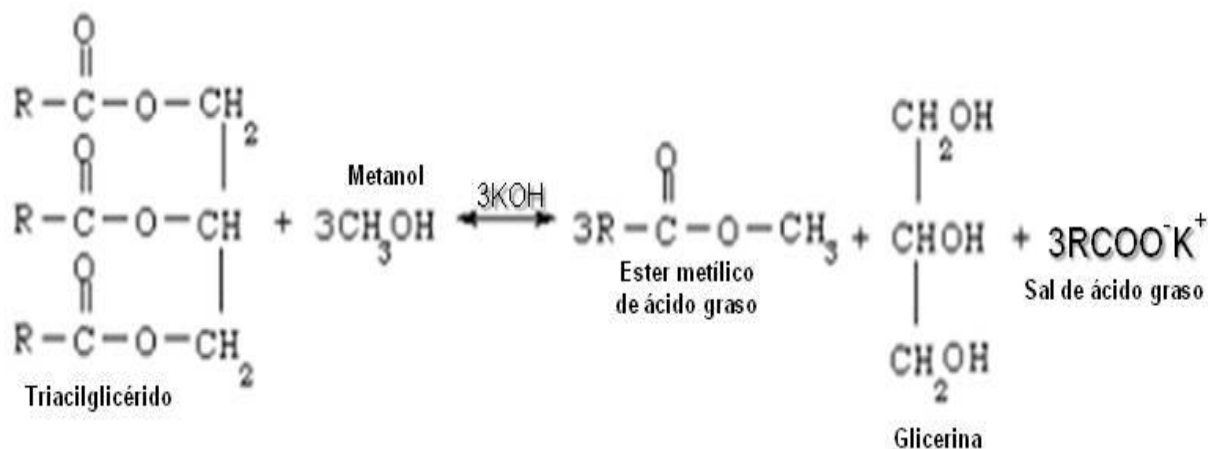


FIGURA 17. Reacción de esterificación de un triacilglicérido.

1.8.3 Análisis del extracto

Una vez obtenido el aceite es necesario iniciar el proceso de análisis para conocer sus características químicas, ya que estas están directamente relacionadas con sus triacilglicéridos y éstos con sus ácidos grasos, para analizarlos, se emplean métodos químicos y técnicas instrumentales. Los métodos químicos permiten extraer conclusiones acerca de la identidad, composición (pureza, autenticidad) y calidad (vida útil) de la grasa o aceite de forma cuantitativa. Entre los métodos químicos, se encuentran el índice de acidez, que cuantifica la cantidad de ácidos grasos libres en el aceite o la grasa. El índice de peróxido, que es una medida directa del oxígeno unido a los aceites en forma de peróxido, y proporciona por lo tanto información acerca del grado de oxidación de la muestra. El índice de yodo, que determina la cantidad de dobles enlaces de los ácidos grasos presentes en el aceite (Allen y col., 1982). Las técnicas instrumentales, se basan en la posibilidad de medir y obtener datos cualitativos y cuantitativos. Además, son más rápidos y versátiles, algunos de ellos no usan reactivos químicos y no contaminan. Varias técnicas instrumentales de análisis para las grasas y los aceites han sido descritas en la literatura, entre estas se encuentran las cromatografías de gases, líquidos y capa fina, espectroscopias de infrarrojo con

transformada de Fourier y UV-visible, resonancia magnética nuclear y rayos X de dispersión (Kuksis, 1966 y Brondz, 2002). En la **Tabla 9** se muestran algunas de las técnicas instrumentales.

Tabla 9. Descripción de algunas técnicas instrumentales.

Técnicas Ópticas					
<i>Espectroscópicas</i>					
Absorción	<i>Espectrofotocopias:</i> UV e Infrarrojo	Emisión	Espectrofotocopias-de llama, Espectrofluorimetría, Espectrofosforimetría Espectroscopias de-emisión de Rayos X	Raman	Espectroscopia de Raman
	<i>Espectroscopias</i> Absorción-Atómica, Microondas, Dicroísmo-Circular, Absorción de-Rayos X				
<i>No Espectroscópicas</i>					
Nefelometría, Interferometría, Difracción de Rayos X, Dispersión Refractiva, Refractometría, Medida de la Reflexión, Turbidimetría y Polarización.					
Técnicas Térmicas					
Termogravimetría, Análisis Térmico Diferencial, Calorimetría Diferencial de Barrido y Termooptimetría.					
Técnicas Magnéticas					
Resonancia Magnética Nuclear y de Spín Electrónico.					
Técnicas Separativas					
Precipitación, Volatilización y Destilación, Electrodeposición, Electroforesis, Extracción Líquido-Líquido, Diálisis y Cambio Iónico.					
Cromatografía					
Líquida, Plana, en Columna, Líquida de Absorción (Afinidad), Partición Líquido- Líquido, Cambio Iónico, Exclusión y Gases.					
Técnica de Espectroscopia de Masas					

En éste trabajo se utilizaron principalmente la cromatografía de gases y la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, a continuación se describirán éstas técnicas.



1.8.3.1 Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica analítica adecuada para separar y detectar a los ácidos grasos de diferentes constituyentes de una grasa o aceite. Proporciona al analista datos cualitativos y cuantitativos con respecto a los ácidos grasos presentes en una mezcla. Un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama y dotado de la adecuada columna es suficiente para realizar este tipo de análisis, y si no está equipado con la columna óptima se recurre a un cromatógrafo de gases equipado con un espectrómetro de masas que proporciona un nivel adicional de información **(Stauffer, 2005)**. La cromatografía de gases se inicia cuando la muestra se inyecta y se volatiliza en la columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. La fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, su única función es transportarlo a través de la columna. En la cromatografía de gases ocurren dos fenómenos muy importantes y que son prácticamente los rectores del proceso de separación, la adsorción y la absorción. La adsorción, es un proceso por el cual los átomos, iones o moléculas son retenidas en la superficie de un material. Por otro lado, la absorción es la atracción y la retención entre sus moléculas los componentes de otra sustancia líquida o gaseosa **(Skoog y col., 2001)**.

1.8.3.1.1 Partes que conforman un cromatógrafo de gases

El componente básico de un cromatógrafo de gases es la columna, que es el lugar donde ocurre la separación. Las columnas cromatográficas están elaboradas de los siguientes materiales cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio o teflón, entre otros. Los factores que afectan la eficiencia de la columna son su longitud, diámetro, temperatura, velocidad del gas portador, tamaño de las partículas del relleno, material de elaboración, enrollado, naturaleza, cantidad de fase estacionaria y

muestra inyectada (Skoog y col., 2001). En la **Figura 18** se muestra un esquema general del cromatógrafo de gases.

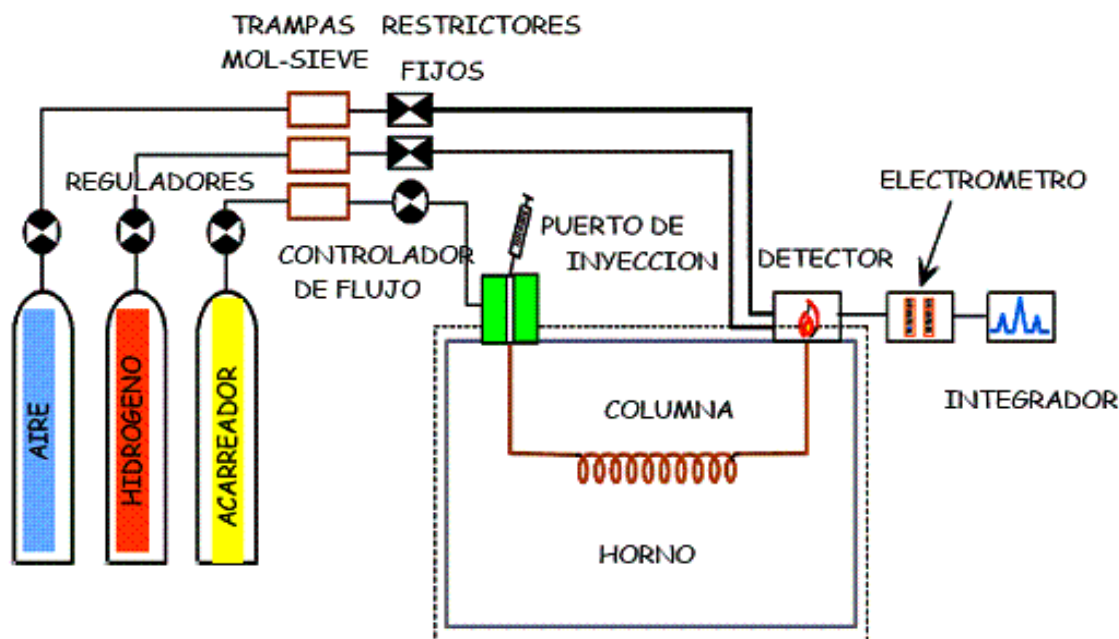


FIGURA 18. Esquema general de un cromatógrafo de gases.

La función del soporte o relleno de la columna, es mantener la fase estacionaria, está elaborado generalmente de diatomita, sílice, que son los más empleados. El relleno puede ser un sólido o un líquido recubierto en un sólido y se pueden clasificar en columnas empacadas y capilares. La Asociación Oficial de Químicos Analíticos (método oficial 963.22) recomienda el uso de una fase estacionaria líquida polar como dietilenglicol con el fin de facilitar la resolución requerida para separar y detectar a los ésteres metílicos de los ácidos grasos de las grasas y los aceites (AOAC, 1995). Estas columnas se venden bajo el nombre de DB-WAX, HP CERA o Supelcowax™ (Supelco, Bellefonte, PA). David y col., (2005) compararon tres diferentes columnas cromatográficas para analizar a los ésteres metílicos de ácidos grasos y llegaron a la conclusión que la columna DB-WAX (glicol-polietileno) es útil para la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos de las grasas y



aceites comestibles. Sin embargo, no separa los isómeros *cis* y *trans*. La columna DB-23 (con 50% cianopropil-metilpolisiloxano) proporciona una excelente separación de mezclas complejas de ácidos grasos como son los aceites de pescado, así como una separación parcial de los isómeros *cis* y *trans*. Por último, la columna HP-88 (90% bis-cianopropil polisiloxano ofrece una completa separación de los isómeros *cis* y *trans* (**David y col., 2005**).

El soporte debe reunir las siguientes características que son estabilidad térmica, dureza mecánica suficiente para que pueda resistir los procedimientos de revestimientos y relleno, inactividad química o de adsorción, baja resistencia al paso de la fase móvil y una elevada superficie por unidad de volumen. La selección del soporte va a depender de la naturaleza de la muestra, la fase móvil, su uso y precio (**Skoog y col., 2001**).

Los gases empleados, por ejemplo el aire y el hidrógeno ayudan al encendido de la flama, mientras que el gas acarreador, cumple dos propósitos que es transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. Las condiciones que deben reunir los gases es que deben ser inertes para evitar interacciones con la muestra y la fase estacionaria, disponibles, puros, económicos y adecuados para el detector.

El detector, es un dispositivo para revelar la presencia de las sustancias transportadas a la salida de la columna cromatográfica. En cromatografía de gases, un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas acarreador y el mismo gas llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico o integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes (**Skoog y col., 2001**). Los detectores más usados son el de conductividad térmica (mide la conductividad térmica del gas portador, ocasionada por la presencia de las sustancias transportadas), captura electrónica (se basa en la electronegatividad de las sustancias transportadas, y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones), fotometría a la flama (mide la intensidad de la emisión molecular de la fluorescencia de heteroátomos en las moléculas orgánicas), ionización a la flama (determina las variaciones de la corriente de ionización en una flama oxígeno-hidrógeno debido a la presencia de las sustancias transportadas), entre otros.

Por último, para la identificación y cuantificación de los ésteres metílicos se puede estimar con el uso de estándares internos. La técnica de análisis se controla generalmente bien y el operador es consciente de sus límites de la detección, la selectividad y la sensibilidad. Los ésteres metílicos son transformados en señales eléctricas (picos en el cromatograma) y para su interpretación, existen varios métodos que se basan en la normalización del área que pueden integrarse por un programa de computo, y que se relaciona con la cantidad de metabolito transportado y por lo tanto, no presentan muchos problemas en la interpretación de los resultados (**Skoog y col., 2001, David y col., 2005**).



1.8.3.2 Espectroscopia de Infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo (IR), mide la intensidad y la longitud de onda de la energía radiante, cuando ésta incide sobre un átomo o molécula que es absorbida provocando una transición entre estados de distinta energía, que al volver a su estado fundamental se produce una emisión de radiación que da origen a los espectros (**Skoog y col., 2001**).

Cuando un enlace particular de una molécula o un grupo funcional es activo al IR, el enlace vibra de una forma característica y luego regresa esa energía dando lugar a un pico o banda de absorción en el espectro, que puede considerarse como su huella digital, ya que estas vibraciones varían muy poco al pasar de unos compuestos a otros, apareciendo la banda correspondiente siempre en la misma zona. Prácticamente todas las sustancias orgánicas e inorgánicas, absorben en la región del infrarrojo, exceptuando únicamente las moléculas monoatómicas y las homopolares (Ne, He, O₂, H₂ y N₂). La frecuencia de las vibraciones puede estar asociada con un tipo particular de enlace, las moléculas diatómicas simples tienen solamente un enlace, el cual se puede estirar. Las moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el Infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a su huella digital. Los átomos en un grupo metileno (CH₂), encontrado comúnmente en compuestos orgánicos pueden vibrar de seis formas distintas, estiramientos simétricos y asimétricos, flexiones simétricas y asimétricas en el plano (scissoring y rocking, respectivamente), y flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (wagging y twisting, respectivamente). En la **Figura 19** se muestra un esquema del espectro electromagnético.

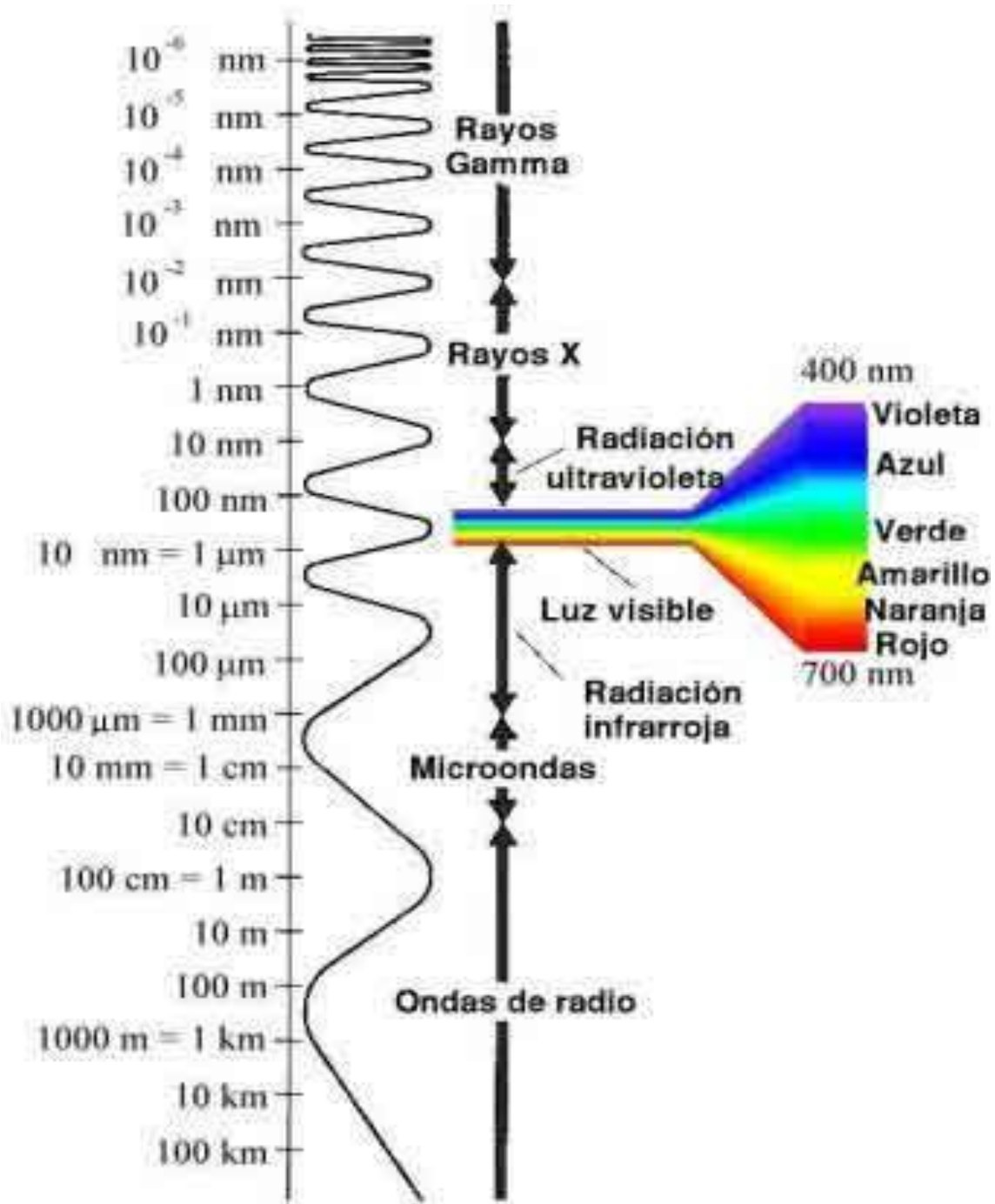


FIGURA 19. Espectro electromagnético.

Para medir la absorción de luz en IR de una muestra, un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda, que en el caso del infrarrojo se maneja el inverso de ésta y se conoce como número de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático, el cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez, mediante una ecuación matemática (espectroscopia FTIR). A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual indica en un diagrama a cuales longitudes de onda la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación del tipo de enlaces que están presentes (Skoog y col., 2001). En la **Figura 20** se muestra un esquema de un espectrofotómetro con transformada de Fourier (FTIR).

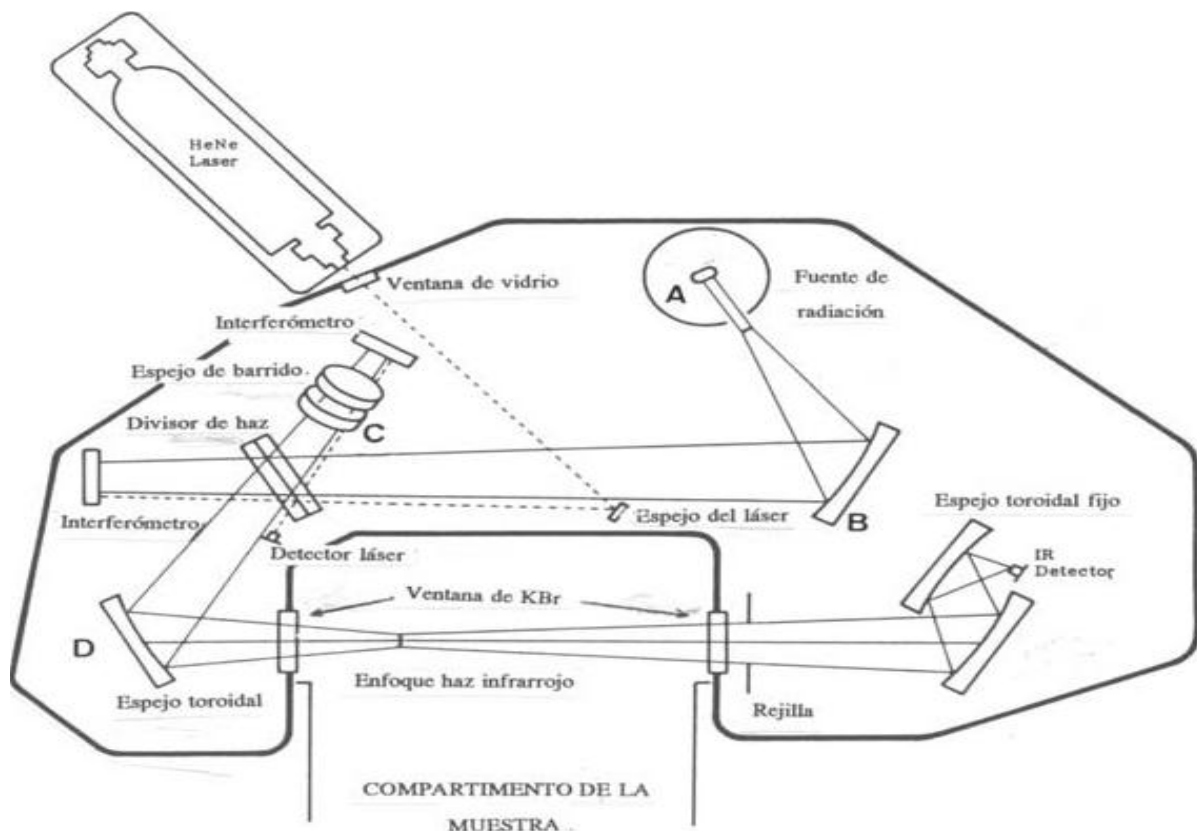


FIGURA 20. Esquema general de un espectrofotómetro con transformada de Fourier.

Diversos estudios realizados en grasas y aceites con FTIR, han reportado que las principales bandas de absorción del espectro del material oleaginoso son las que se presenta en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Absorciones de FTIR reportadas para algunos aceites comestibles.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Modo de Vibración	Autor
723	-CH ₂ , -HC=CH- (<i>cis</i>)	Balaceo	1 y 2
968	-HC=CH- (<i>trans</i>)	Flexión fuera del plano	1 y 3
1163	-C=O	Alargamiento	1
1465	CH ₂ o CH ₃	Balaceo	1 y 2
1746	C=O	Simétrica	3 y 4
2924	CH ₂	Tensión asimétrica	
2953	CH ₃		
3006	-HC=CH- (<i>cis</i>)	Estiramiento	1
3010			
3025	-HC=CH- (<i>trans</i>)	Estiramiento	1
3040			2

(¹Guillén y Cabo, 1998, ²Coates, 2000, ³Ratnayake y Pelletier, 1996, ⁴Mossoba y col., 1996).

Con la espectroscopia de infrarrojo se puede observar la presencia de los ácidos grasos insaturados y otros compuestos. Los ácidos grasos insaturados muestran una absorción ligeramente diferente alrededor de 700 y 3000 cm⁻¹ (**SensIR Technologies, 1999**). La ventaja del uso de esta técnica radica en la facilidad relativa de la preparación de la muestra. Sin embargo, el principal inconveniente es que se requiere una muestra pura, que no es fácilmente disponible cuando se encuentra combina con otros compuestos que interfieren con la interpretación del espectro. En segundo lugar, no es posible determinar con suficiente satisfacción la naturaleza y cantidad de los diferentes ácidos grasos presentes. Por lo tanto, el uso de técnicas de IR, al menos que vaya precedida por una técnica de separación como la cromatografía de gases, no se recomienda realizar (**Stauffer, 2005**).



CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

2.1 Frutas y Hortalizas

Las frutas y las hortalizas son productos altamente perecederos debido a su composición nutricional, a su elevado contenido de humedad, y que una vez cosechados continúan su metabolismo. Se ha mostrado que debido a ello se pierde alrededor del 23% de la cosecha, esta pérdida es provocada por diversos factores: deterioro fisiológico, pérdida de agua, daño mecánico, transporte, ataque microbiológico, lo que en su conjunto se conoce como pérdida postcosecha **(Alzamora y col., 1998)**. En los diversos cambios fisiológicos están involucradas las enzimas naturales del fruto u hortaliza, las enzimas son proteínas de estructura compleja, determinada por cuatro niveles de organización, con una actividad metabólica altamente específica, son catalizadores biológicos y actúan dentro del metabolismo natural de cada fruto, la actividad enzimática puede tener una acción favorable o dañina en el producto según la reacción particular **(Nelson y Cox, 2001)**. Por otro lado, cualquier caída o rozamiento durante el transporte facilita el ataque microbiano que buscará, a través de su propio sistema enzimático, encontrar el alimento para su sobrevivencia.

2.2 Enzimas del aguacate

La pulpa de aguacate es altamente perecedera y muy susceptible de ser oxidado debido a la presencia de la enzima polifenoloxidasas (EC 1.10.3.1) entre otras. La polifenoloxidasas, es una enzima que cataliza dos tipos de reacciones, la primera de hidroxilación y la segunda de deshidrogenación. En la **Figura 21** se muestra el proceso de las reacciones de la enzima polifenoloxidasas.

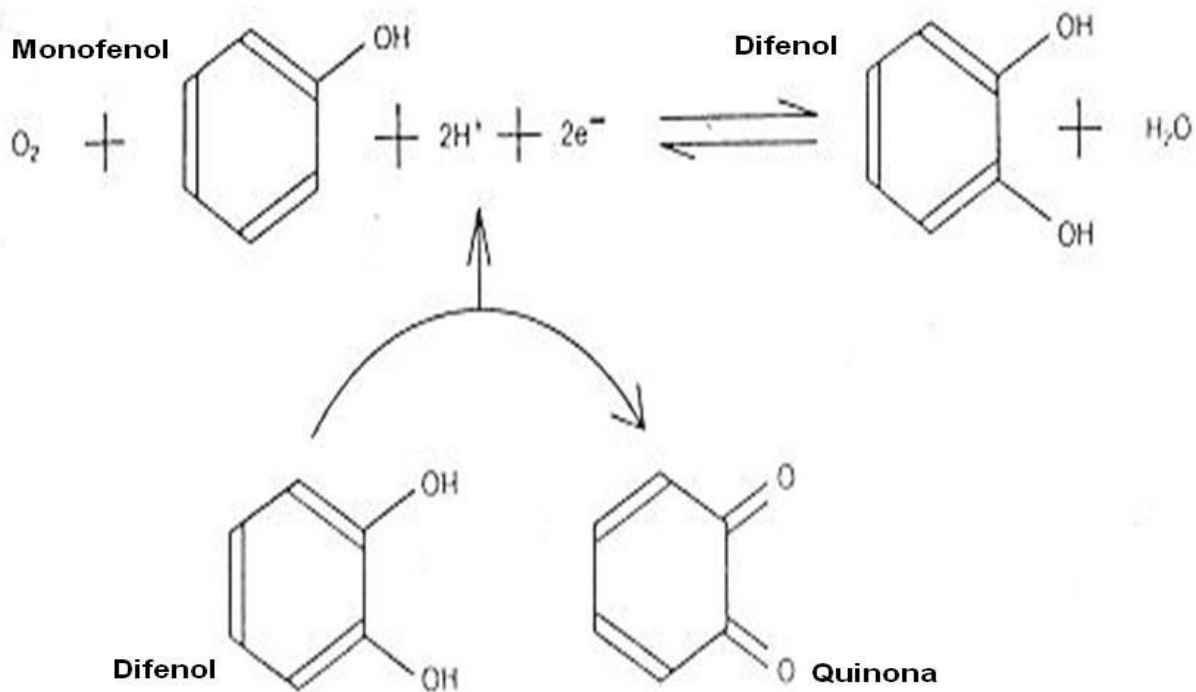


FIGURA 21. Principales reacciones y compuestos formados por la enzima polifenoloxidasas.

Estas dos reacciones se inician cuando el sustrato monofenol, es oxidado con ayuda de la enzima para formar el compuesto difenol, posteriormente la enzima oxida el difenol para formar la quinona, la cual luego polimeriza para formar complejos coloridos que son denominados genéricamente como melanina (Yoruk y Marshall, 2003).



2.3 Conservacion de alimentos

Las frutas y las hortalizas frescas son productos perecederos, altamente susceptibles al deterioro como se mencionó, y debido a ello se buscan procesos para su conservación, con la finalidad de disminuir las pérdidas de nutrientes, sus características sensoriales y de calidad (**Orsat y col., 2001**). Los procesos de conservación de los alimentos se clasifican en métodos tradicionales o emergentes.

2.3.1 Métodos tradicionales

Los métodos tradicionales por lo general consisten de secuencias de operaciones simples (lavado, desinfección, eliminación de cáscara y semilla, corte, procesos térmicos y envasado). Sin embargo, si se quiere extender la vida útil se recomienda una combinación de tratamiento, por ejemplo, de refrigeración, adición de conservadores, prácticas correctas de fabricación y manipulación (**Jacxsens y col., 2001**).

Muchos de los métodos tradicionales de conservación como la aplicación de calor no son aptos para la gran parte de las frutas y hortalizas (**Jacxsens y col., 2001**). Por esta razón, la industria está buscando nuevas alternativas o tecnologías para mantener la mayoría de las características sensoriales, nutritivas y prolongar la estabilidad de almacenamiento (**Allende y col., 2002**).



2.3.2 Métodos emergentes

Un gran número de métodos emergentes están siendo investigados y algunas de las tecnologías más importantes que se pueden aplicar para conservar los alimentos procesados son: alta presión hidrostática, atmósferas modificadas, ultrasonido, irradiación, liofilización, microondas, campo electromagnético pulsado y campo eléctrico. La selección del método dependerá de las propiedades del producto y del que resulte más económico, y para aumentar la eficiencia del tratamiento de conservación se combinan con otros parámetros y métodos (disminuyendo o aumentando) por ejemplo: pH, calor, la actividad de agua, entre otros (**Raso y Barbosa-Cánovas, 2003**).

Estudios previos han indicado que la utilización de métodos emergentes pueden tener solución a la problemática antes descrita, como lo reportaron **López-Malo y col., (1999)**, en su trabajo emplearon la alta presión hidrostática para reducir los microorganismos patógenos e inactivar la enzima polifenoloxidasas en el puré de aguacate, reportan una actividad de la enzima polifenoloxidasas <45% almacenado el producto a 5 °C, lo cual mantuvo un color aceptable durante 60 días. En otro estudio publicado por **Guzmán (1998)**, que se basa en la aplicación del método de microondas a la pasta de aguacate con la adición de antioxidante, y concluyó que la pasta mantuvo su color verde por 7 días.

Por otra parte **Yongguang y col., (2007)**, utilizaron el campo eléctrico más la adición de zinc en el puré de espinaca, el cual mantuvo sus características sensoriales, almacenado a temperatura ambiente, con la aplicación de éste método emergente se ahorró energía y el puré presentó una mayor calidad en comparación con el proceso térmico a 121 °C por 1 h.

Además de inactivar enzimas y microorganismos, el campo eléctrico también se ha aplicado con el propósito de mejorar el rendimiento en la extracción de jugos y aceites, como lo mencionaron **Amunziata y col., (1999)**, en su trabajo aplicaron el campo eléctrico sobre rebanadas de manzana, observaron un aumento en la extracción del jugo mejorando además sus características sensoriales.

Todas estas técnicas ayudan a la industrialización de los alimentos para que sean seguros y saludables y así, satisfacer la demanda del consumidor actual.



2.4 Campo eléctrico

El concepto de campo eléctrico fue introducido en la teoría electromagnética para describir las fuerzas existentes entre las cargas eléctricas, dos cargas de diferente signo tienden a juntarse, mientras que dos cargas de igual signo tienden a repelerse una de otra, si por alguna razón física las cargas están inmóviles, se dice que en el espacio entre las cargas existe un campo eléctrico, se comprende que la fuente de dicho campo son las propias cargas. Si una tercera carga, cae en el centro del campo, esta será atraída hacia la carga que tenga el signo contrario, esa atracción será con una fuerza determinada, según sea las cargas que lo determinen, se comprende entonces que el campo eléctrico se puede definir como un campo de fuerza que experimenta una unidad de carga situada en el espacio **(Zemasky, 1998)**.

La materia está formada por átomos, y estos contienen un núcleo con partículas neutras y partículas cargadas positivamente (protones). Alrededor del núcleo y en constante movimiento están las partículas con carga negativa, los electrones. En el Sistema Internacional de Unidades la unidad de carga eléctrica es el Coulombio (C), que es la carga equivalente a un conjunto de 6×10^{18} electrones. Los iones, protones y electrones son los portadores de la electricidad. La palabra electricidad describe de manera genérica un conjunto de fenómenos físicos en los que intervienen cargas eléctricas, en movimiento o en reposo, si las cargas están en movimiento tenemos un fenómeno eléctrico que genera una corriente eléctrica, y forma un campo magnético. Si las cargas están en reposo se genera un fenómeno electrostático y por lo tanto se crea un campo eléctrico.

Si entre dos puntos A y B, existe una diferencia de cargas, se tendrá una diferencia de potencial, que es la fuerza impulsora para que las cargas fluyan en dirección decreciente del potencial, este fenómeno es similar a la transferencia molecular de masa, calor y momentum, la diferencia de potencial se conoce como fuerza electromotriz, tensión o voltaje, el flujo de las cargas por un conductor es la corriente eléctrica **(Zemasky, 1998)**.

El voltaje se mide en Volts (V) y representa el trabajo requerido para mover las cargas eléctricas, al considerar la distancia el voltaje representa la energía utilizada.

La corriente eléctrica representa el número de cargas en movimiento que al considerar el área donde circulan y el tiempo en que lo hacen se tendrá el amperio (A), que es la unidad de medida de la corriente eléctrica o la intensidad de corriente **(Zemasky, 1998)**.



2.5 Frecuencia

La corriente eléctrica medida en amperes, es el movimiento de los electrones a lo largo de un conductor dentro de un circuito eléctrico originada por una diferencia de potencial, medido en Volts. Existen dos tipos de corriente eléctrica, a) Continua, donde el flujo de electrones pasa a través de un conductor entre dos puntos de distinto potencial, las cargas eléctricas circulan siempre en el mismo sentido, y b) Alterna, donde el flujo de electrones cambia periódicamente de sentido, para describir estos cambios se utiliza la frecuencia.

La frecuencia es una medida que se utiliza generalmente para indicar el número de repeticiones de cualquier fenómeno o suceso periódico en la unidad de tiempo, el resultado se mide en Hertz (Hz), que mide un suceso o fenómeno repetido una vez por segundo. La frecuencia tiene una relación inversa con el concepto de longitud de onda (que es la distancia que hay entre dos crestas consecutivas de dicho tamaño), a mayor frecuencia menor longitud de onda y viceversa (**Zemasky, 1998**).

2.6 Tipo de onda

Una onda, es una propagación de una perturbación de alguna propiedad de un medio, a través del espacio transportando energía. Por medio de dispositivos electrónicos como un generador de funciones, es posible seleccionar el tipo de onda, la forma más utilizada es la onda cuadrada, debido a que la energía es constante y por lo tanto, más eficiente (**Zemasky, 1998**).

2.7 Propiedades eléctricas de la materia

Los materiales existentes en la naturaleza pueden clasificarse como conductores, semiconductores y aislantes, debido a su facilidad o dificultad de conducir la corriente eléctrica, a los últimos también se les denomina como dieléctricos, algunos materiales dieléctricos cuando son sometidos a alto voltaje se dice que rompen su rigidez dieléctrica y permiten el paso de corriente y se vuelven conductores. Cada material tiene cierta capacidad de ser conductor o aislante, según sea expuesto a un bajo o alto voltaje, esta propiedad se expresa en términos de la constante dieléctrica. En un entorno biológico complejo, siempre habrá moléculas, iones y sus cargas que estarán separadas por agua o por otras moléculas. La existencia de un medio dieléctrico entre las cargas tiene un efecto atenuador sobre el campo existente, de modo que la fuerza real es siempre inferior a la que se obtiene con la ecuación de Coulomb (1).

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon} \frac{qq'}{r^2} \quad (1)$$

La constante dieléctrica (ϵ) que es un número adimensional, se basa en la fuerza F que ejercen las cargas entre ellas, q y q' , r^2 es la distancia, π es la constante de Coulomb. Entre más elevado sea el valor de ϵ , más débil será la fuerza entre las cargas separadas.

Un alimento se considera como un sistema complejo, compuesto por moléculas que forman dipolos orientados al azar, cuando no existe campo eléctrico, como se indica en la **Figura 22**.

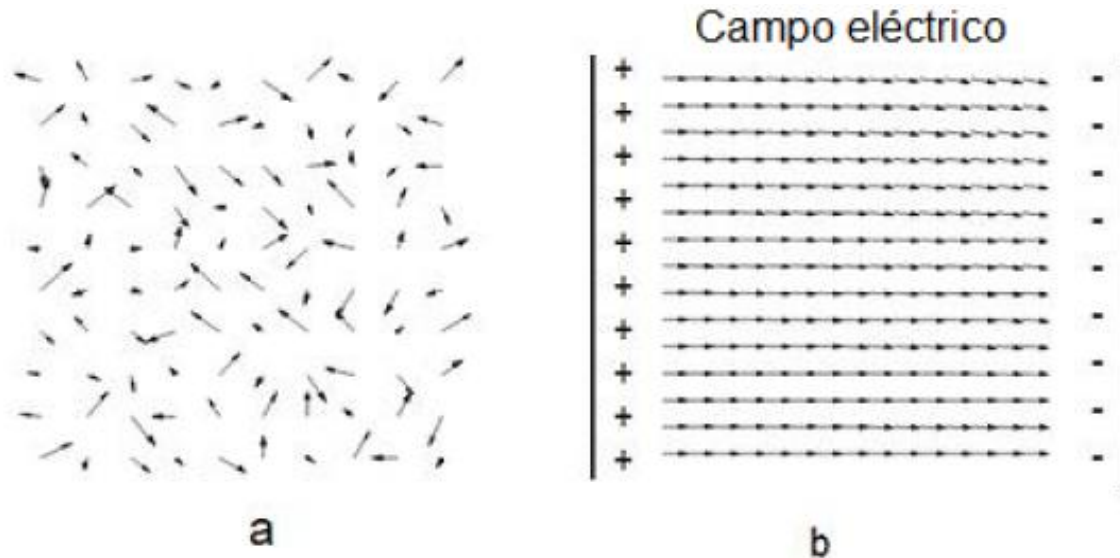


FIGURA 22. Orientación molecular de un sistema con (a) y sin (b) un campo eléctrico.

Cuando el alimento se coloca entre dos electrodos bajo la acción de un campo eléctrico externo, se produce cierto grado de orientación y cuanto más intenso es el campo, mayor es el número de dipolos que se orientan en la dirección del campo como se observa en la **Figura 22b**, este fenómeno es conocido como polarización de orientación bajo la acción de un campo eléctrico, las cargas negativas y positivas se desplazarán en sentidos contrarios formando un dipolo eléctrico.

Cuando un conjunto de cargas o sistema biológico, con dipolos permanentes, es expuesto a un campo eléctrico oscilatorio y pulsado a baja frecuencia se produce un proceso de relajación, las moléculas tienden a orientarse en dirección al campo externo, pero si la frecuencia es elevada los dipolos no podrán seguir al campo externo y la polarización de orientación no se producirá, entonces la energía que se trasmite al medio es absorbida y se manifiesta como un incremento de temperatura. El otro efecto que se origina a muy alta frecuencia produce resonancia con los iones o electrones que absorben más energía.

Dentro de las propiedades eléctricas de la materia destaca también la conductividad, ésta define la facilidad o dificultad de un material para conducir la corriente eléctrica, los metales por ejemplo tienen una alta conductividad, dentro de la compleja composición de los alimentos hay una gama de valores de conductividad, entre más contenido de sales tenga un alimento será más



conductor que otro que tenga menor contenido de iones o compuestos polares. La conductividad resulta importante sobretodo para el calentamiento óhmico (**Goullieux y Pain, 2005**).

2.8 Equipo generador de campo eléctrico

Los primeros equipos para generar campo eléctrico fueron diseñados y construidos considerando el arreglo de un Circuito Resistencia-Capacitancia. Posteriormente, a dicho circuito se adicionaron dispositivos para que el campo fuera pulsado, es decir que tenga un carácter de intermitente, esto se logró con la incorporación de interruptores para liberar con cierta frecuencia los pulsos de corriente (**Qinghua y col., 1994**).

La tensión de carga (U_0) necesaria para generar los pulsos con la suficiente fuerza del campo eléctrico depende en gran medida de la distancia de los electrodos. En placas paralelas la intensidad de los dos electrodos que generan el campo eléctrico (E) se calcula por medio de la ecuación (1).

$$E = \frac{U}{d} \quad (1)$$

Donde U es la tensión (kV) y d (cm) la distancia entre los electrodos.

En términos generales se ha descrito que las partes más importantes de un equipo generador de campo eléctrico son cuatro:

- i) Equipo de alto voltaje con capacitores, almacena la energía generada.
- ii) Generador de funciones, que produce el voltaje en una onda pre-determinada, dependiendo de las características específicas del sistema, permite monitorear la forma de onda, cuadrada, exponencial, triangular, en la que se propaga la energía del campo eléctrico.
- iii) Interruptor o switch, descarga la energía hasta el alimento en la cámara de tratamiento.
- iv) Cámara de tratamiento, equipada con dos electrodos en configuración paralelo, en donde se distribuye el campo eléctrico.

Martínez y col., (2007) describen un nuevo sistema para aplicar un campo eléctrico a alimentos líquidos o sólidos sin el contacto con los electrodos, este sistema fue el que se utilizó en el presente trabajo. El ensamble de estos cuatro elementos se muestra en la **Figura 23**.

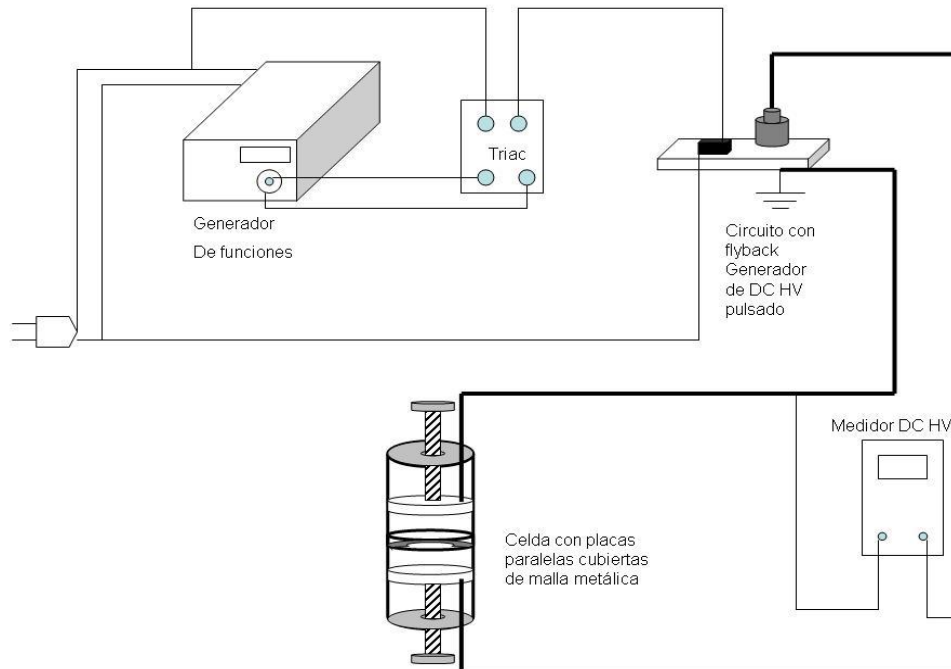


FIGURA 23. Equipo generador de campo eléctrico (Martínez y col., 2007).

2.9 Mecanismo propuesto del campo eléctrico pulsado sobre la membrana

Existen diferentes teorías sobre el modo en que las membranas celulares son inactivadas por el campo eléctrico, en la mayoría de los casos la ruptura de la membrana celular es la que citan diversos investigadores, como la reportada por **Zimmerman (1986)** que propone el modelo electromecánico para la función del campo, en este modelo la membrana es considerada como un material dieléctrico que separa grupos iónicos y cargas libres en ambos lados de la membrana, la



concentración diferencial de las cargas causa un potencial transmembrana intrínseco que esta presente en forma natural en la célula microbiana.

Cuando las células son sometidas a un campo eléctrico externo se induce una nueva redistribución de cargas que aumenta el potencial transmembrana. Cuando se supera el umbral crítico de 1 Volt transmembrana, la fuerza de atracción entre cargas de distinto signo superan la resistencia mecánica de la membrana dando lugar a la aparición de poros que se cierran casi instantáneamente al cesar el campo eléctrico (*poros reversibles*), pero si la fuerza es mayor el número y tamaño de los poros es tal que pueden no cerrarse tras el tratamiento (*poros irreversibles*).

La teoría de Zimmerman recibe el nombre de rompimiento dieléctrico de la membrana celular. El efecto reversible del tratamiento con campo eléctrico es la base de la *electroporación* mientras que el efecto irreversible ha sido utilizado con la finalidad de destruir células microbianas en alimentos **(Raso y Heinz, 2006)**.

La formación de poros depende del tamaño y la geometría de la célula, hay reportes que para células vegetales el parámetro es alrededor de 1-2 kV/cm y para las células de los microorganismos, por ejemplo *E. coli* esta entre 10-14 kV/cm **(Jacob y col., 1981)**.

En la **Figura 24** se ilustra el proceso del campo eléctrico pulsado en la inactivación de la membrana.

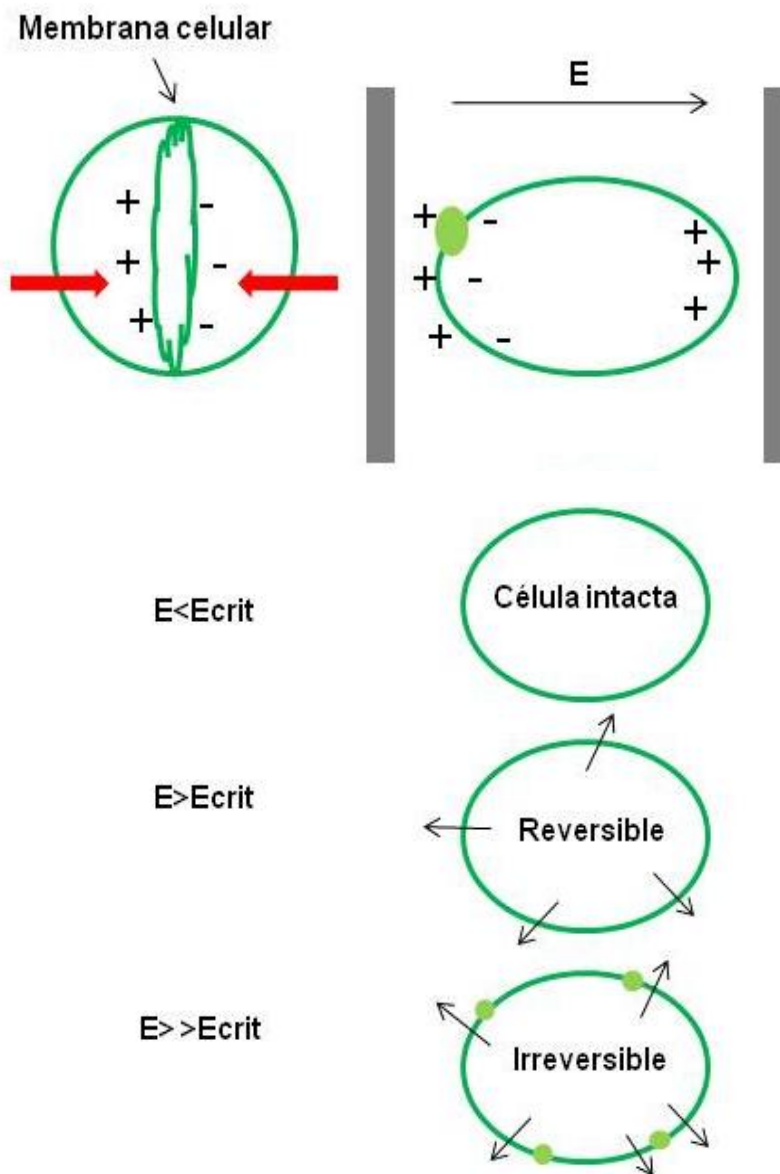


FIGURA 24. Representación esquemática de un mecanismo de permeabilización de la membrana por la fuerza inducida por un campo eléctrico externo (Zimmerman y col., 1984).



2.10 Mecanismo del campo eléctrico sobre las enzimas

Se ha propuesto que cuando una proteína es expuesta a un campo eléctrico intenso, se pueden ver afectados los enlaces que le dan estabilidad a la proteína (**Tsong, 1990**), ya que el campo eléctrico rompe los puentes de hidrógeno que afecta principalmente la estabilidad de la estructura secundaria de la proteína, lo que causa su cambio conformacional que altera el sitio activo de la enzima (**Yeom y col., 2002**), semejante a las reacciones de oxido-reducción como las que existen entre los grupos de los enlaces disulfuro (**Barsotti y col., 1999, Yeom y col., 2002**).

La presente investigación forma parte de un proyecto integral sobre conservación de aguacate por medio del campo eléctrico.

Dentro de este trabajo ya se ha demostrado el efecto del campo sobre la actividad de la enzima polifenoloxidasas, sin embargo, se desconoce el efecto que pueda tener el campo eléctrico sobre otros compuestos presentes en la pulpa de aguacate, algunos de ellos con puentes de hidrógeno o dobles enlaces, como vitaminas y ácidos grasos, por lo que la idea fundamental fue evaluar la posible formación de isómeros *trans* en el aceite de aguacate después de someter al aceite y la pasta de este fruto al efecto del campo eléctrico.



CAPÍTULO 3.

3.1 Objetivo General

Estudiar el efecto del campo eléctrico sobre la isomería de los ácidos grasos insaturados del aceite de aguacate.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Desarrollar metodologías de extracción que minimicen la formación de ácidos grasos *trans*.
- 3.2.2 Caracterizar el aceite de aguacate mediante índices químicos.
- 3.2.3 Establecer las condiciones de tratamiento de aceite y pulpa de aguacate con el campo eléctrico, que minimicen la generación de ácidos grasos *trans*.
- 3.2.4 Determinar y cuantificar los ácidos grasos *trans* en aceite y pulpa tratada.



3.3 Hipótesis

El campo eléctrico que se ha utilizado para la disminución de la actividad de la enzima polifenoloxidasas de la pasta de aguacate y para disminuir poblaciones microbianas en pan y tortilla, puede ser un método alternativo de conservación sin afectar otros compuestos de interés de la pulpa de aguacate, como los ácidos grasos insaturados, importantes en la dieta por su valor nutritivo.

3.4 Planteamiento del Problema

México es el principal productor y exportador de aguacate a nivel mundial. Sin embargo, el aguacate que no cumple con los requisitos de exportación es desechado, lo que genera un excedente de producción que satura el mercado nacional, éste podría ser una opción para preservarlo e industrializarlo, en productos como guacamole, pulpa y aceite, demandados en diversos países.

Diversas investigaciones enfocadas en el proceso industrial de la pulpa de aguacate, señalan que los métodos tradicionales para obtener productos a base de aguacate disminuyen sus propiedades sensoriales y los métodos de extracción para obtener aceites generan ácidos grasos con isomería *trans*, y su consumo en exceso tiene un efecto perjudicial para la salud, ya que estos presentan un efecto similar a los ácidos grasos saturados.

También, a partir del año 2007 la FDA y otras normas internacionales publicaron restricciones para el contenido máximo de ácidos grasos *trans* y establece como límite máximo el parámetro de 0.5 g/100g para los productos lipídicos, para que estos sean seguros para su consumo.



3.5 Justificación

Los productos a base de aguacate son apreciados en diversos países, también la sociedad actual demanda alimentos lo menos procesados para su conservación. Es por eso que surge la necesidad de presentar nuevas alternativas de conservación de alimentos, que incluyan en lo posible, sólo procesos físicos para aumentar su vida útil. Entre los métodos alternativos para la conservación de los alimentos se encuentra la aplicación del campo electromagnético pulsado (CEP) y el campo eléctrico (CE) que elimina o disminuye poblaciones microbianas, y la actividad de enzimas que degradan las propiedades sensoriales y nutritivas; debido a que son tratamientos que se aplican por corto tiempo, lo que redundaría en beneficio del producto al no tener incrementos de temperatura, por esta razón estas tecnologías se han clasificado como “procesamiento no térmico de alimentos”.

En el presente trabajo se aplicará el campo eléctrico a la pasta de aguacate, para evaluar si con el tratamiento existe la formación de isómeros *trans* en los ácidos grasos insaturados del aguacate, toda vez que se ha demostrado que este tratamiento presenta inhibición del oscurecimiento enzimático en la pulpa de aguacate, al inhibir la enzima polifenoloxidasasa de la pulpa del aguacate.



CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

La parte central del presente estudio fue exponer a los ácidos grasos y a la pulpa del aguacate al efecto del campo eléctrico de alto voltaje, para ello se usaron dos estrategias: i) extraer el aceite, tratarlo con el campo eléctrico y analizarlo, ii) tratar la pulpa de aguacate, extraer el aceite y analizarlo. En ambos casos el campo eléctrico se estableció considerando las condiciones de voltaje, frecuencia y tiempo del trabajo anterior que fue sobre la actividad enzimática de la enzima polifenoloxidasas. Para el análisis de los ácidos grasos se empleó espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía de gases (CG).

4.1 Obtención de la pulpa de aguacate

Se utilizó aguacate variedad Hass (*Persea americana Mill*) del Estado de Puebla, México. El fruto se lavó con agua y jabón y se eliminó la cáscara y la semilla. A la pulpa de aguacate se le realizó el análisis proximal para caracterizarla, por medio de los análisis de humedad, proteínas, lípidos, fibra, cenizas y carbohidratos por diferencia, empleando las técnicas de la **AOAC (2006)**. Cada análisis se realizó por triplicado.



4.2 Extracción del aceite de aguacate

Dado que se ha reportado que la extracción con disolventes puede generar isómeros *trans*, la extracción del aceite de aguacate se realizó con disolvente a temperatura ambiente y a 60°C, y por centrifugación.

4.2.1 Extracción con disolvente a temperatura ambiente

La extracción del aceite de aguacate con disolvente sin la aplicación de calor se realizó colocando la muestra dentro de un cartucho y posteriormente se sumergió en el disolvente dentro de un frasco cerrado durante 24 horas.

4.2.2 Extracción con disolvente a 60°C

La extracción del aceite de aguacate con disolvente (hexano) se llevó a cabo por el método Soxhlet **963.15 AOAC (2006)** a 60 °C durante 4 horas.

El proceso de extracción se inicia cuando el disolvente al calentarse se volatiliza y al llegar al refrigerante se enfría y condensa dentro del cartucho que tiene la muestra, ocurre el contacto con la muestra y la extracción sólido-líquido, al subir el nivel del reflujo, el disolvente cae nuevamente al matraz con disolvente, para iniciar un nuevo ciclo, condensación mezcla con la muestra y reflujo, de esta forma el aceite extraído por el disolvente va quedando en el matraz junto con el disolvente.



4.2.3 Extracción por centrifugación

Se utilizaron 100 g de pulpa de aguacate y se homogenizó. La extracción del aceite por centrifugación se realizó: A) Se centrifugó a 1157 g, durante 10 minutos a 20, 25, 30, 35 y 40 °C (Centrifuga 5804 R eppendorf). B) Se centrifugó a 1157, 2057, 3214, 4629, 6300, 8228, 10414, 12 857 y 15557 g a 40 °C durante 10, 20, 30 y 35 minutos.

4.3 Caracterización del aceite de aguacate

El aceite de aguacate se caracterizó por medio de los siguientes análisis: índice de acidez, cuantifica la cantidad de ácidos grasos libres en el aceite (^aSECOFI, 1987), índice de peróxido, proporciona información acerca del grado de oxidación de la muestra (^bSECOFI, 1987) e índice de yodo, determina la cantidad de dobles enlaces de los ácidos grasos presentes en el aceite (SECOFI, 1981).

4.4 Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases

En general, los triacilglicéridos son saponificables por reflujo con una solución metanólica de hidróxido de potasio, y se extraen los ésteres metílicos de ácidos grasos con un disolvente no polar (por ejemplo, hexano) para el análisis por cromatografía de gases. Los ésteres metílicos de ácidos grasos individuales se identifican de acuerdo con su tiempo de retención y su comparación con un estándar.



El análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos, se calculó como el porcentaje de los ésteres metílicos totales por cromatografía de gases con un cromatógrafo HP-5890 (Hewlett-Packard Company, Wilmington) equipado con un detector de ionización de flama.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon añadiendo 20 mL de KOH metanólico al aceite y la solución se colocó a reflujo a 60 °C durante 15 minutos. Los ésteres metílicos se extrajeron con 10 mL de heptano, y se añadió 10 mL de agua destilada, las dos fases se separaron. El residuo fue solubilizado en heptano (**IUPAC, 1990**). Se tomó 2 μ L de los ésteres metílicos de ácidos grasos y se inyectaron en una columna cromatográfica (RT-2560) de 100 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 micras de espesor de soporte de sílice fundido de biscianopropil de polisiloxano (Restek Corporation) acoplado a un detector de ionización de flama.

El inyector y el detector se mantuvieron a 230 y 250 °C respectivamente. El gas portador fue nitrógeno 1.2 mL/min con un sistema de inyección de división (20:2).

Para calibrar el sistema de cromatografía de gases para los análisis, se utilizó una mezcla de ésteres metílicos con 37 componentes (Industria de Alimentos FAME Mix).

4.5 Análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La técnica de infrarrojo (IR) determina la presencia de elementos estructurales, este tipo de modificaciones se comprueba mediante la posición específica de la banda de absorción de IR característica de la molécula. Para el caso del doble enlace de los ácidos grasos *trans* la banda de absorción de IR es a 960 y 3040 cm^{-1} .

Para el análisis espectroscópico de los aceites de aguacate se empleó un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), en el modo de medición de reflectancia total atenuada (ATR), de la marca Bruker Modelo Vertex-70. Se depositaron 20 μ L de aceite en el cristal del equipo, y se tomó el disolvente hexano como línea base para el aceite de aguacate obtenido bajo el mismo disolvente y para el aceite centrifugado se tomó el aire como línea base. Se utilizó un tiempo de integración de 60 segundos (1 segundo por barrido) realizándose automáticamente el promedio de las señales. La región de medición fue el mediano infrarrojo (4000-400 cm^{-1}) con una resolución de 4 cm^{-1} , equipado con el programa OPUS para la adquisición de los datos.



4.6 Tratamiento del aceite de aguacate con el campo eléctrico

En un trabajo previo realizado en el CIBA para la inactivación de la enzima polifenoloxidasas en la pulpa de aguacate con la aplicación del campo eléctrico, se estableció que al tratar pulpa de aguacate con campo eléctrico a 720 Hz con 9 kV/cm durante 3 minutos, se obtenía la inactivación de la enzima (**Castorena, 2008**). La muestra se colocó entre dos electrodos a 20 kV y 2 cm de distancia (10 kV/cm), la forma de la onda fue cuadrada y la corriente eléctrica fue de 5 mA.

Para la aplicación del campo eléctrico en la pulpa y el aceite de aguacate, se empleó un diseño experimental factorial con arreglo 2^3 , en donde se tomó el mínimo y máximo valor de intensidad de voltaje 3 y 9 kV/cm, con frecuencia de 60 y 720 Hz, y con un tiempo de tratamiento de 10 y 180 s.

Para el estudio del efecto del campo eléctrico sobre el aceite de aguacate, se siguió la siguiente estrategia:

- 1) El aceite obtenido por los tres métodos en estudio fue tratado directamente con el campo eléctrico.
- 2) La pulpa de aguacate se expuso al campo eléctrico y posteriormente se extrajo el aceite con los tres métodos de extracción propuestos.

Para corroborar el efecto del campo eléctrico en el aceite de aguacate extraído por centrifugación, se comparó con un aceite de oliva extra virgen (marca comercial), de acuerdo a algunas investigaciones, el aceite de oliva contiene una concentración importante de ácido oleico (C18:1), similar al aceite de aguacate, estas muestras obtenidas fueron tratadas con el campo eléctrico.

Las condiciones de los diseños experimentales se observan en las **Tablas 11 y 12**.

TABLA 11. Diseño experimental del aceite de aguacate tratado al campo eléctrico.

Tratamientos	Voltaje (kV/cm)	Frecuencia (Hz)	Tiempo (s)
A	3	60	10
B	3	60	180
C	3	720	10
D	3	720	180
E	9	60	10
F	9	60	180
G	9	720	10
H	9	720	180
Testigo	-	-	-

TABLA 12. Tratamientos de los aceites de aguacate (AA) y oliva (AO) expuestos al campo eléctrico cada uno con un voltaje de 5 y 9 kV/cm durante diferente tiempo.

Tratamientos	Tiempo (min.)
AA y AO	5
	10
	15
	20
	25
Testigo	-



4.7 Estudio del efecto de campo eléctrico sobre el aceite de aguacate almacenado a diferente tiempo

Los aceites durante su almacenamiento se deterioran por la auto-oxidación de los ácidos grasos insaturados por el oxígeno, que da origen a la formación de los hidroperóxidos (**Allen y col., 1982**).

Por tal motivo, se realizó el siguiente estudio para evaluar el efecto del campo eléctrico en la calidad del aceite de aguacate y su estabilidad a diferente tiempo. El aceite fue tratado con campo eléctrico a un voltaje de 3 y 9 kV/cm, con una frecuencia de 60 y 720 Hz, y con un tiempo de exposición de 60 y 180 s., posteriormente el aceite fue almacenado a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a 4, 13, 28, 90 y 365 días, y fueron analizadas con FTIR siguiendo la metodología indicada en el párrafo 4.5. Para determinar la calidad del aceite se analizó mediante índices químicos como en el apartado 4.3 en un tiempo cero, 90 y 365 días.

4.8 Análisis estadístico

Se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de T para los aceites de aguacate extraídos por los tres métodos propuestos y un análisis de varianza, para los aceites de aguacate y oliva ($\alpha=0.05$).



CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Análisis bromatológico de la pulpa de aguacate

El resultado del análisis bromatológico de la pulpa de aguacate en base húmeda se muestra en la primera columna de la **Tabla 13**, junto con los valores reportados en la literatura.

TABLA 13. Caracterización y comparación de la pulpa de aguacate con otras variedades.

Determinaciones (%)	Hass	¹ Hass	² Margarida
Humedad	63.8 ± 3.1	77.3	58.3
Proteína	1.4 ± 0.02	1.6	2.5
Lípidos	25.3 ± 2.2	15.8	26.3
Fibra	0.51 ± 0.01	0.4	4.8
Cenizas	1.5 ± 0.02	1.3	0.6
Carbohidratos	7.49 ± 1.2	5.6	7.25

¹Cultivado en México (Ortiz y col., 2003),

²Cultivado en Brasil (Salgado y col., 2008).

Diferentes investigaciones sobre las variedades de aguacate han indicado que la cantidad de los diversos componentes están relacionadas con la zona de cultivo, condiciones de crecimiento, tiempo de recolección y almacenaje, estas características son únicas para cada variedad (**Gaydou y col., 1987, Requejo-Tapia, 1999**).

5.2 Análisis químico de los aceites de aguacate y su rendimiento

A continuación en la **Tabla 14** se muestran los resultados de los índices químicos de los aceites de aguacate.

TABLA 14. Análisis químico de los aceites de aguacate, y su comparación con otros aceites.

Índice	Extraído con Hexano sin calor	Extraído con Hexano con calor	Extraído por centrifugación	¹ AH	² AF	³ AO	⁴ NMX
IA	0.86±0.02	1.29±0.02	0.75±0.05	0.65	2.45	3.3	1.5
IP	2.31 ± 0.11	3.79 ± 0.04	2.46 ± 0.03	10.68	1.40	≤20	10
IY	82.12 ± 0.06	84.65 ± 0.09	86.67 ± 2.14	82.1	77.6	94	90

IA: Índice de acidez, expresado como porcentaje de ácido oleico. IP: Índice de peróxido (Meqkg^{-1}). IY: Índice de yodo (análisis mediante el reactivo de Wijs). ¹Aceite de Aguacate variedad Hass (**Ortiz y col., 2003**). ²Aceite de Aguacate variedad Fuerte (**Bora y col., 2001**). ³Aceite de Oliva Virgen (**CODEX, 1981**). ⁴NMX Norma Mexicana, valor máximo permitido para el Aceite de Aguacate (**SECOFI, 2008**).

De los resultados anteriores, se observa que el índice de acidez en el aceite que se extrae con disolvente tiene un valor más alto comparándolo con el que se extrae por centrifugación y con disolvente sin calor. **Bora y col., (2001)** reportaron un índice de acidez de 2.45% en el aceite de aguacate extraído con hexano, se puede observar que el valor estimado en los aceites extraídos en este trabajo son más bajos, debido probablemente a que es otra variedad. Sin embargo, si se comparan los resultados obtenidos para el índice de acidez con la Norma Mexicana los tres aceites extraídos por los distintos métodos están dentro del valor permitido 1.5 expresado como porcentaje de ácido oleico.

Con respecto al índice de peróxido, el aceite extraído con hexano con calor presentó un valor más alto que el aceite obtenido por el método de centrifugación y sin calor, al comparar los resultados con lo reportado por la Norma Mexicana, se puede observar que están por debajo del valor permitido. Además, estos valores fueron más bajos comparándolos con los reportados por **Ortiz y col., (2003)**, **Bora y col., (2001)** y con aceite de oliva virgen ≤ 20 (**CODEX, 1981**). Por lo tanto, los aceites presentan un mínimo de oxidación de sus ácidos grasos, debido probablemente a su contenido de antioxidantes, como lo han propuesto algunos autores.

Los resultados obtenidos para el índice de yodo están dentro de los parámetros reportados por la **Norma Mexicana (SECOFI, 2008)**. Esto indica que las composiciones de los ácidos grasos en los aceites de aguacate y oliva son muy similares. De los resultados anteriores, se observa que el mejor método de extracción es por centrifugación debido a que mantuvo su color verde característico, no se necesita un disolvente para extraerlo y se observa que los ácidos grasos no se oxidan significativamente, aunque el rendimiento es notablemente bajo.

En la **Figura 25** se muestran los aceites de aguacate extraídos por los tres métodos propuestos.

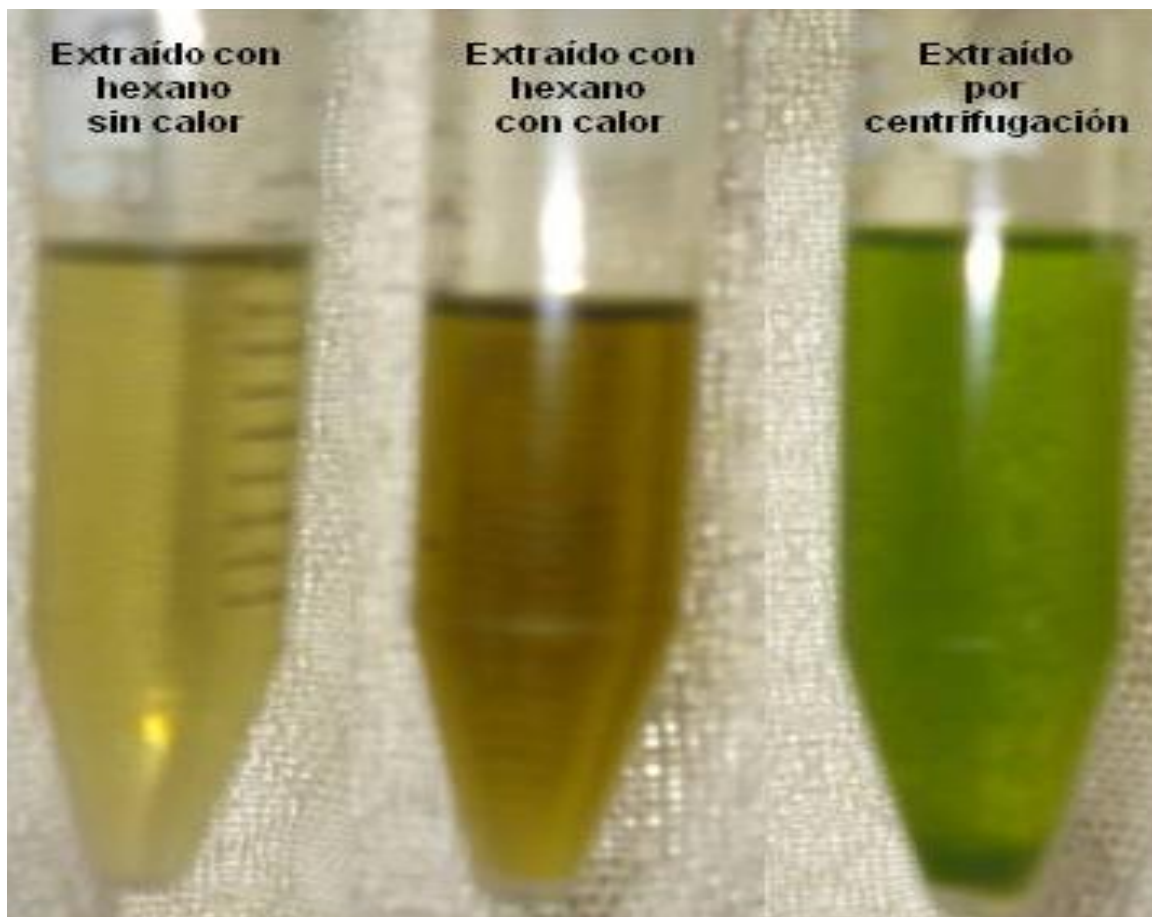


FIGURA 25. Comparación visual de los aceites de aguacate.

Con el método con disolvente con y sin calor se obtuvo un rendimiento de 78 y 58% de aceite respectivamente. Con la extracción por centrifugación el mejor resultado fue a 40 °C, 15 557 g,

durante 10 minutos con un 38.3%, aunque los rendimientos son bajos la finalidad de nuestro trabajo fue que no se generaran ácidos grasos *trans*.

5.3 Análisis por espectroscopia de infrarrojo y cromatografía de gases de los aceites de aguacate extraídos por los métodos propuestos

Para facilitar el análisis de los aceites de aguacate extraídos por centrifugación y con hexano con y sin calor por espectroscopia en el infrarrojo, se analizó primeramente un estándar del ácido graso elaídico, que es un aceite C18:1t en configuración *trans*, para identificar las bandas de absorción características al enlace *trans*. En la **Figura 26** se muestra el espectro del ácido elaídico.

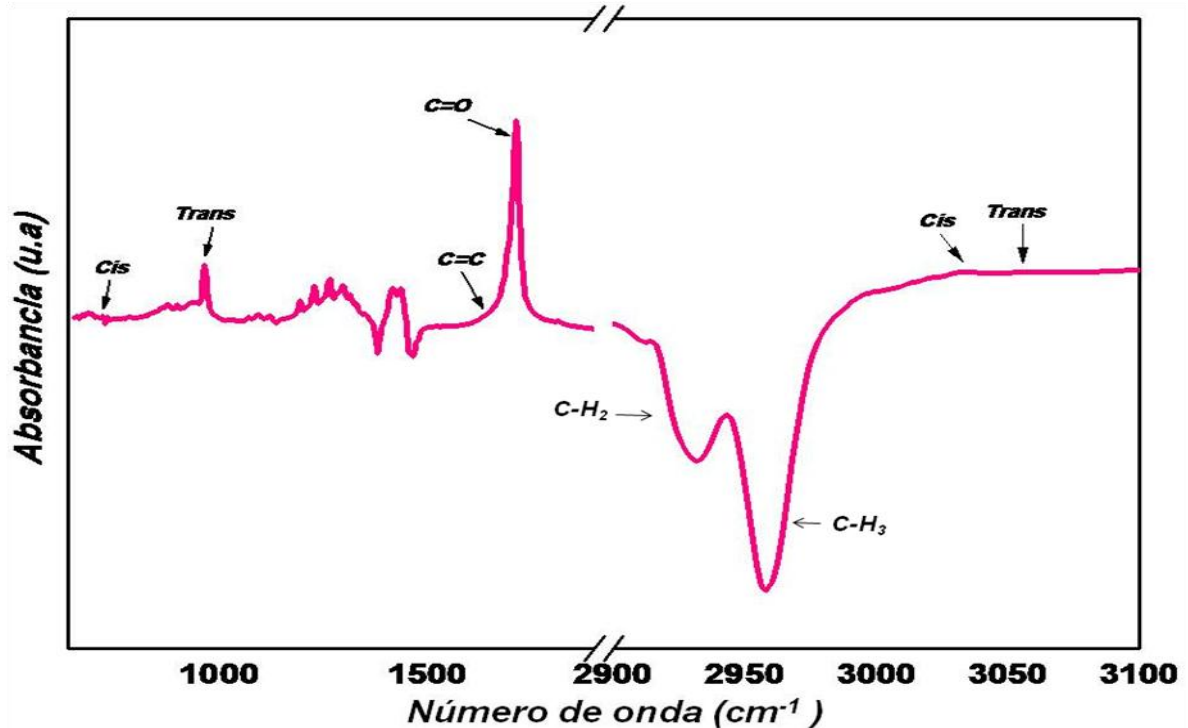


Figura 26. Espectro de FTIR del estándar del ácido elaídico.

En la **Figura 27** se muestra el espectro de los aceites de aguacate.

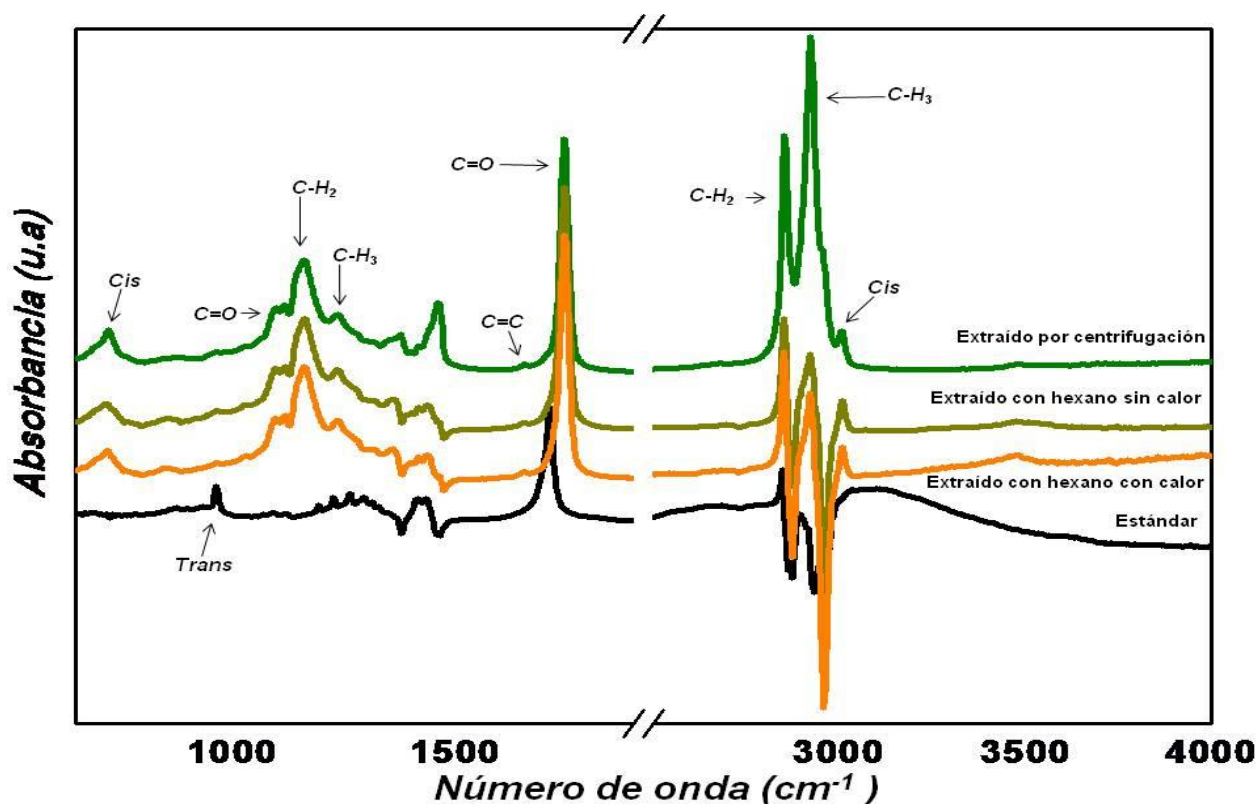


Figura 27. Espectros de FTIR de los aceites de aguacate.

Comparando las bandas de absorción del estándar con los espectros de los diferentes aceites de aguacate, se observa que se identifican bandas de absorción encontradas en el estándar, por ejemplo, a 968 cm^{-1} que se asocian al doble enlace *trans*.

Se puede inferir que los métodos de extracción propuestos generan esa pequeña intensidad, o que los isómeros *trans* puede ser que ahí estaban antes de la operación, como lo investigó **Brühl (1996)**, en su trabajo comparó diversos aceites obtenidos por prensado en frío con aceites refinados. Las semillas de los aceites fueron recolectadas a diferentes latitudes en Alemania, y todas contenían ácidos grasos *trans*. Además, observó que los niveles de estos eran bajos en los aceites obtenidos por prensado en frío, pero aumentó con el secado de las semillas, presumiblemente por la destrucción de los hidroperóxidos. Para la Unión Europea, el total admisible de ácidos *trans* nativos en las semillas oleaginosas secas es de 0.05%, y que estos probablemente se desarrollaron en las plantas para repeler insectos (**Ackman, 1997**).

Para corroborar, identificar y cuantificar los ácidos grasos en los aceites, se empleó la cromatografía de gases, para ello se analizó un estándar con diferentes ésteres metílicos de ácidos grasos.

En las **Figuras 28, 29, 30 y 31** se muestran los cromatogramas del estándar, y el de los ésteres metílicos de ácidos grasos de los aceites de aguacate involucrados en el presente estudio.

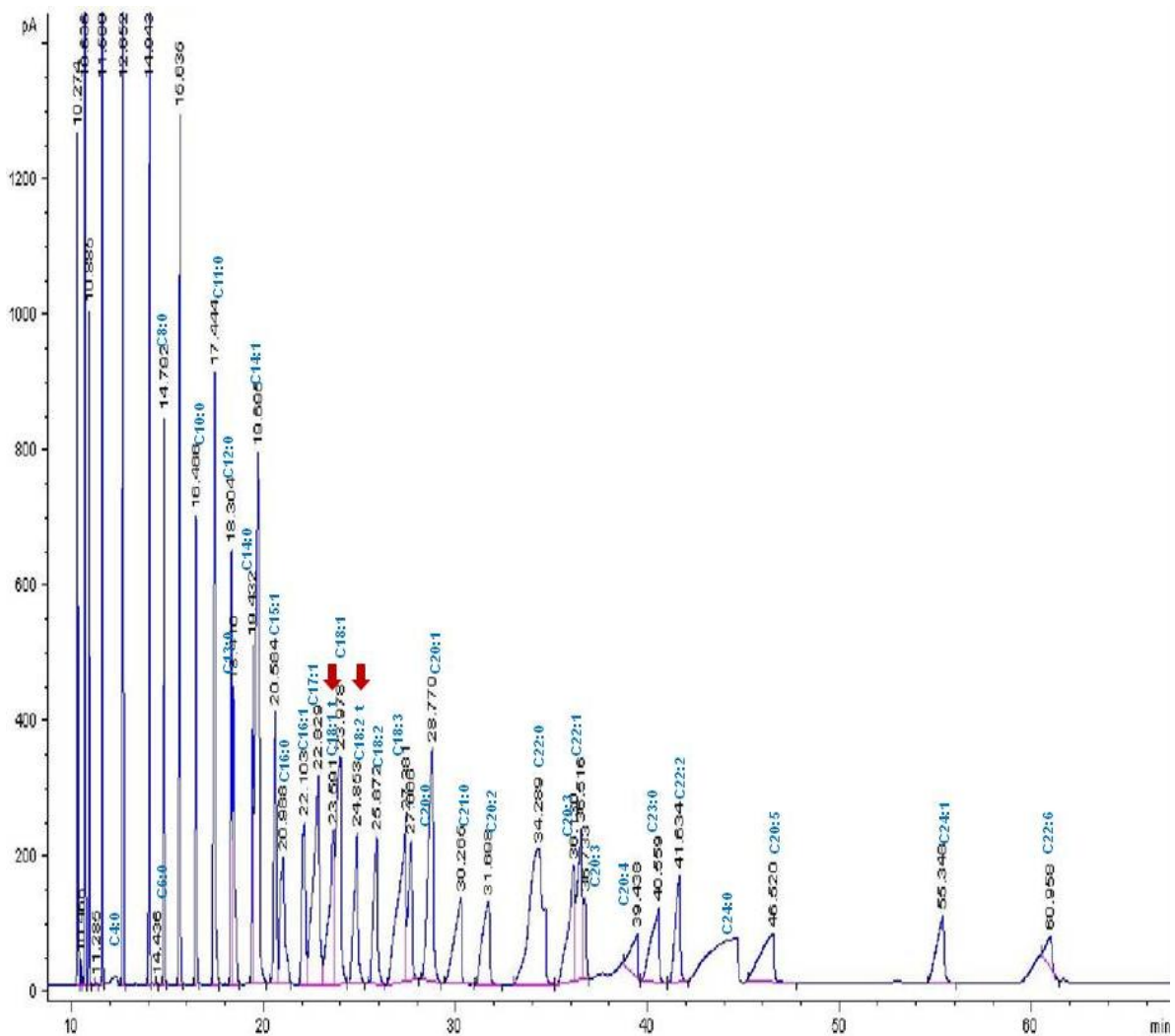


FIGURA 28. Cromatograma obtenido de los ésteres metílicos del estándar.

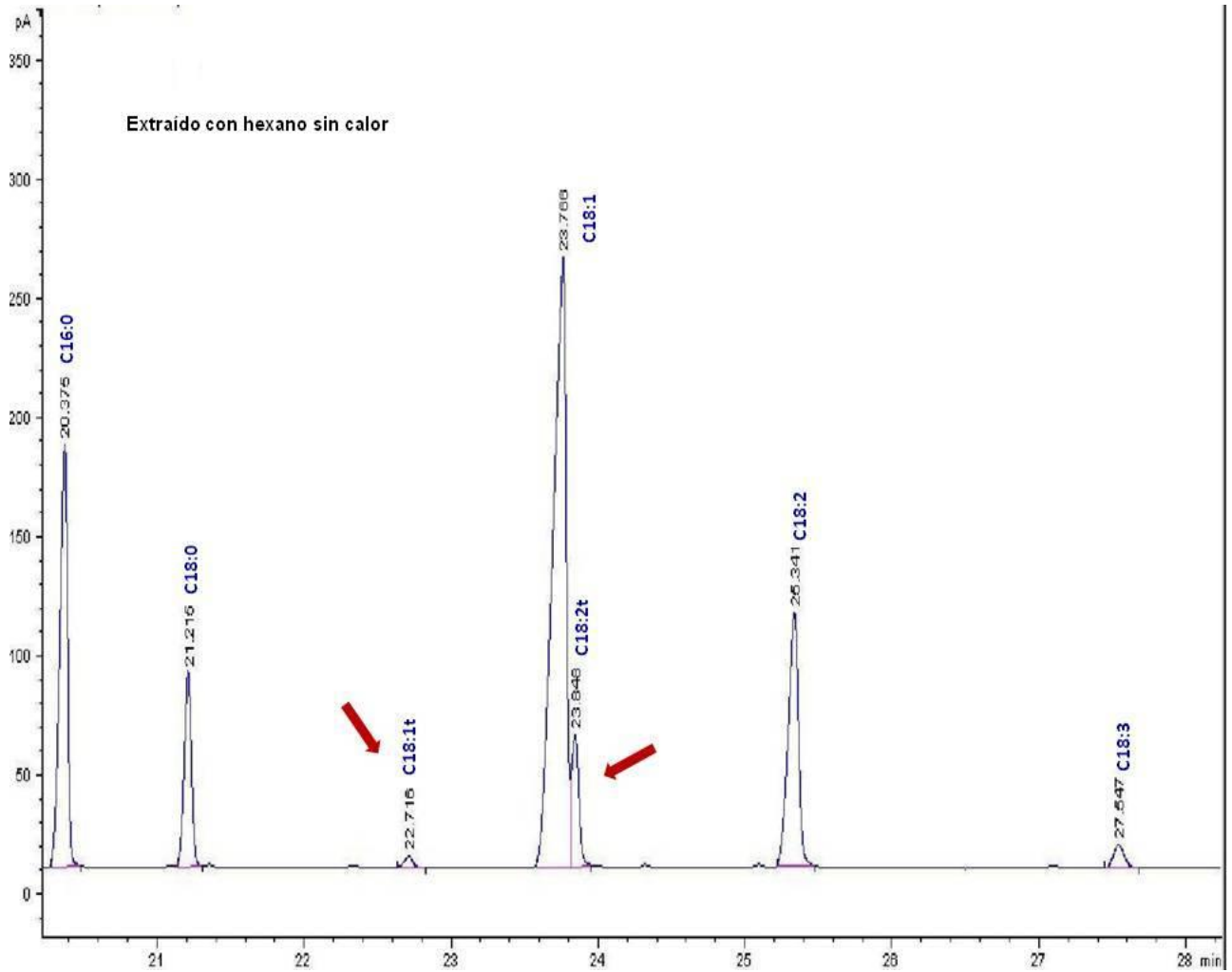


FIGURA 29. Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del aceite de aguacate extraído con hexano sin calor.

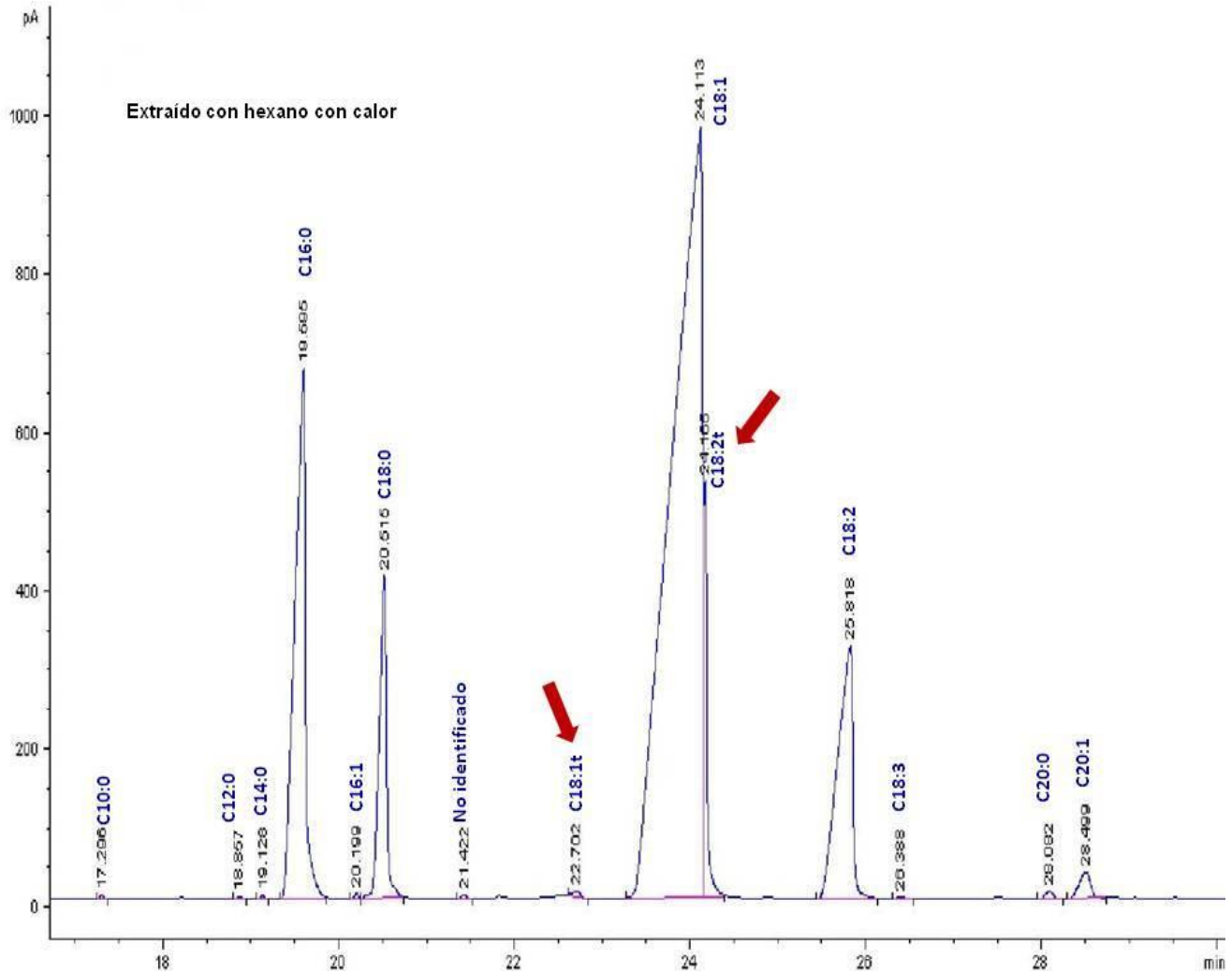


FIGURA 30. Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del aceite de aguacate extraído con hexano con calor.

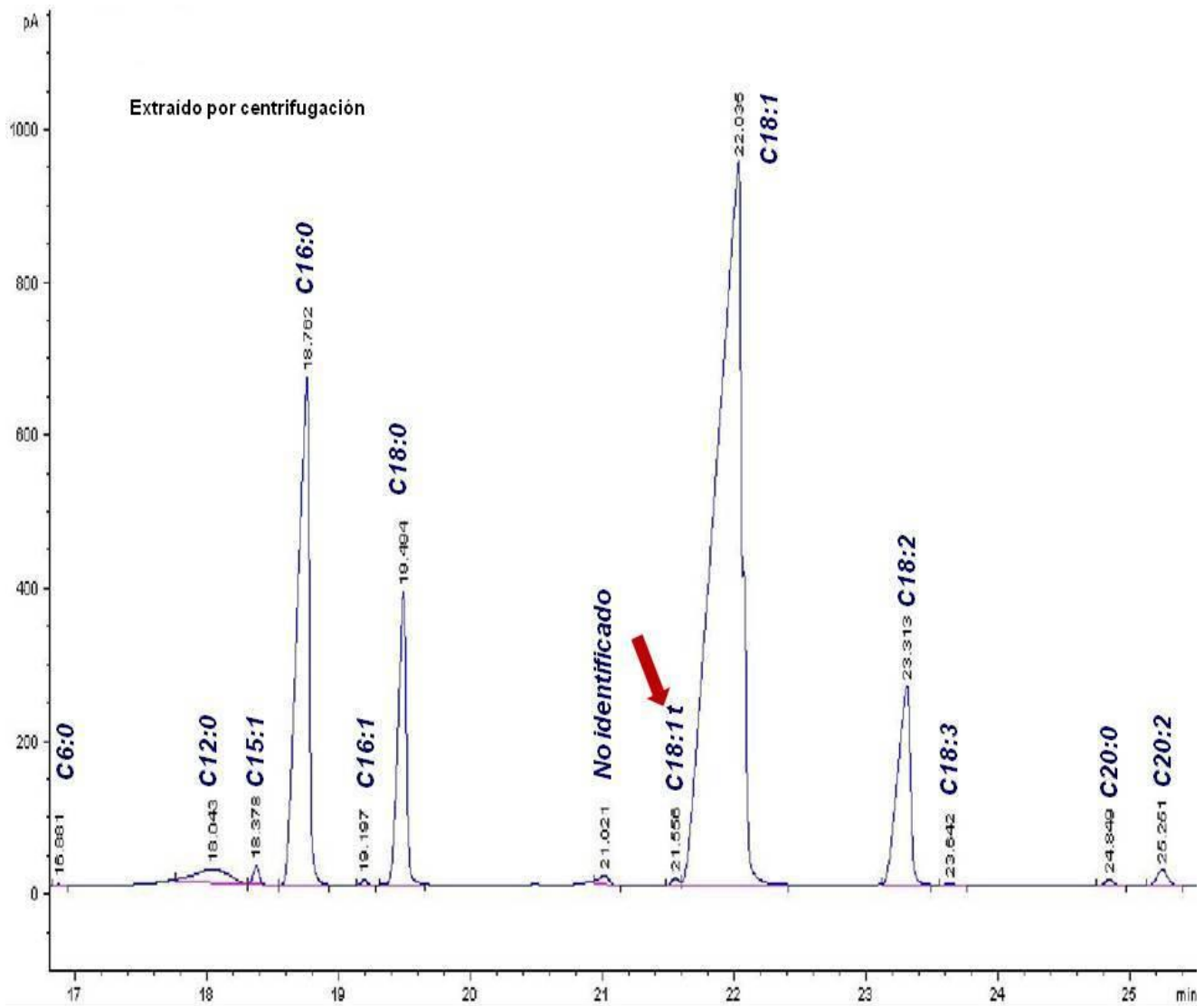


FIGURA 31. Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del aceite de aguacate extraído por centrifugación.

En el cromatograma se identificaron los picos de cada éster metílico de ácidos grasos que incluye el estándar, así como su tiempo de retención a las condiciones de operación, a cada pico se



ha señalado el tipo de ácido graso con iniciales, por ejemplo, C4:0 para indicar el metil butirato, así sucesivamente.

Además, se puede observar que existen algunas diferencias en los tiempos de retención comparados con los del proveedor, mismas que las cuales podrían deberse a las condiciones locales de operación.

Al igual que en el cromatograma del estándar, en los cromatogramas de los aceites problema cada pico muestra su tiempo de retención y su identificación, de acuerdo a los resultados obtenidos con el estándar. Se identificaron y cuantificaron un total de 9 ésteres metílicos en el aceite extraído sin calor, 14 ésteres metílicos en el aceite extraído con calor y 12 ésteres metílicos en el aceite extraído por centrifugación. La cantidad de los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos, influyó la selección del método de extracción y la temperatura aplicada en cada tratamiento, como lo reportaron **Ortiz y col., (2003)**, estos investigadores estudiaron el efecto de diferentes métodos de extracción sobre las células que contienen el aceite, los idioblastos, que son de forma redonda y superficie lisa, y concluyeron que a una temperatura >100 °C estas células se transforma a una forma irregular y superficie rugosa, lo que afecta la extracción del aceite y por consiguiente su rendimiento.

En todos los aceites los ésteres metílicos con una mayor concentración fueron el C16:0 (metil palmitato), C18:1 (metil oleato) y C18:2 (metil linoleato). Sin embargo, el éster metílico que predominó fue el C18:1 con un porcentaje de 58.7 para el aceite obtenido por centrifugación, de 59.1 y 60.6% para los aceites extraídos con hexano con y sin calor respectivamente.

Comparando estas variaciones con los resultados reportados por **Ortiz y col., (2003)**, quienes investigaron y analizaron los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de aguacate de la variedad Hass. Estos investigadores extrajeron el aceite de aguacate por calentamiento por microondas (horno microondas Samsung, 900W, 2.450 MHz, con plato giratorio) hasta llegar a 95 °C en la pulpa, inmediatamente después, se extrajo el aceite presionando la pulpa de forma manual a través de un paño de malla, y concluyeron que el éster metílico que se encuentra en mayor concentración es el C18:1 con 60.28%.

En la **Tabla 15**, se muestran un resumen con los resultados porcentuales de los ésteres metílicos de ácidos grasos (EM-AG) de los diferentes aceites de aguacate.

TABLA 15. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los aceites de aguacate.

EM-AG	Extraído por centrifugación	Extraído con hexano sin calor	Extraído con hexano con calor	¹ Hass
C10:0	0.02±0.001	-	0.04±0.002	-
C12:0	1.3±0.05	-	0.02±0.001	-
C14:0	0.31±0.01	0.01±0.001	0.04±0.001	-
C16:0	17.06±0.2	17.0±1.1	13.7±0.1	15.71
C16:1	7.1±0.6	-	8.0±0.2	7.26
C18:0	6.9±0.4	5.1±0.1	5.5±0.1	0.72
C18:1t	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.3
C18:1	58.7±0.2	60.6±2.1	59.1±0.4	60.28
C18:2t	-	1.2±0.1	3.1±0.1	0.04
C18:2	7.3±0.3	10.3±1.2	9.2±1.1	13.66
C18:3	0.06±0.007	0.1±0.01	0.04±0.001	1.44
C20:0	0.1±0.02	0.9±0.02	0.17±0.01	-
C20:1	-	-	0.17±0.02	0.21
C20:2	0.48±0.008	-	0.73±0.01	0.11

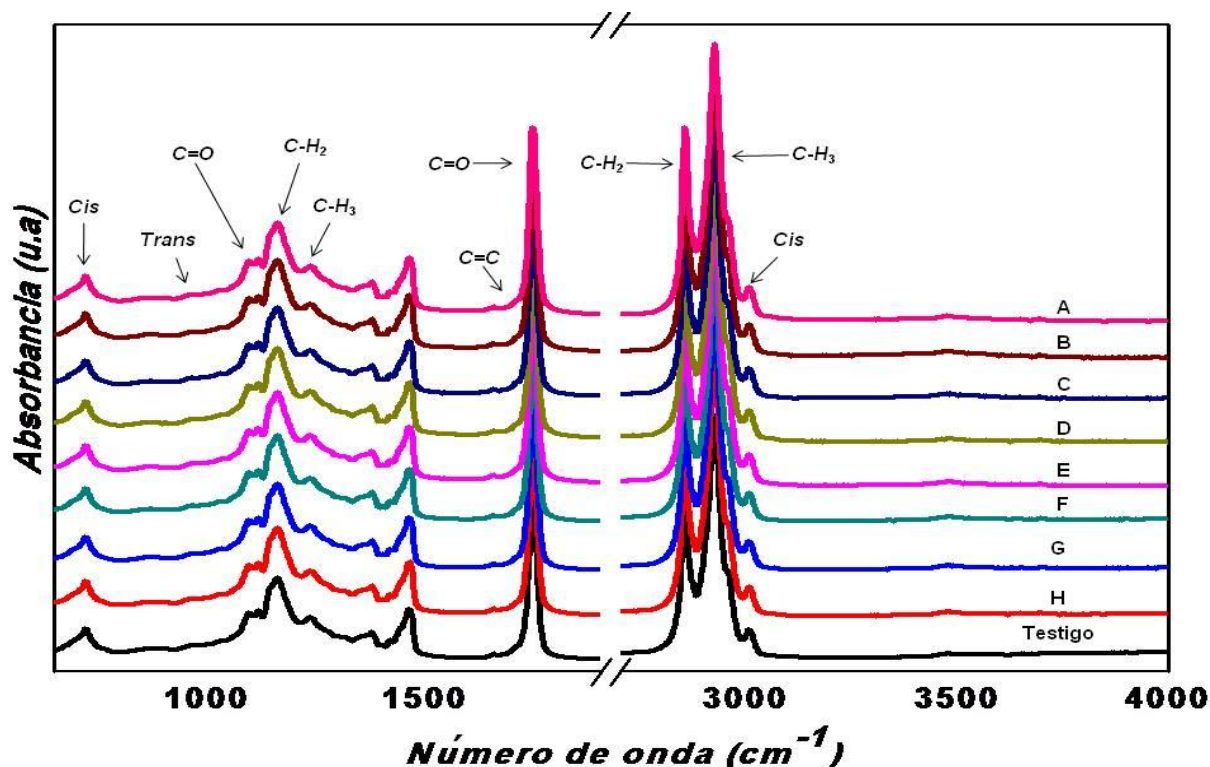
(¹Ortiz y col., 2003. Método de Microondas-Prensado)

En relación a los ácidos grasos *trans*, se observa que existe un 0.1% de C18:1t (metil elaidato) en los tres aceites, lo cual indica que probablemente se encuentre en forma nativa en el aceite. Con los métodos de extracción con hexano con y sin calor incrementaron los ácidos grasos *trans*, en un 3.1 y 1.2% de C18:2t (metil linoleaidato) respectivamente, observando su ausencia en el aceite obtenido por centrifugación. **Wolff (1993)** realizó una comparación de los isómeros *trans* del C18:3t entre los aceites refinados y prensados en frío de soya y canola de diferentes países (Bélgica, Gran Bretaña y Alemania). Para los aceites obtenidos por prensado mostraron trazas del C18:3t, y para las muestras refinadas contenían de 1.0 a 3.3%, semejante al obtenido en nuestro trabajo. En otro estudio **Ortiz y col., (2003)**, extrajeron aceite de aguacate con diferentes métodos y concluyeron que el método que generó la menor cantidad de ácidos grasos *trans* en el aceite fue con el método que combina microondas y prensado con 0.33 de C18:1t y 0.04 g/100g de C18:2t, con el método de centrifugación se obtuvo una concentración menor de ácidos grasos *trans* y solo del C18:1t, sin embargo, con los aceites extraídos con hexano se incrementaron tanto del C18:1t y C18:2t. Por lo

tanto, los ácidos grasos *trans* se encuentran en forma nativa en la pulpa de aguacate y se incrementan con el método de extracción.

5.4 Análisis por espectroscopia de infrarrojo y cromatografía de gases de los aceites de aguacate tratados con el campo eléctrico

Los espectros obtenidos en el infrarrojo indicados como Aceites 1 y 2 son muy similares, por tal motivo, en la **Figura 32** se presentan los resultados más representativos para los aceites extraídos por medio de disolvente sin y con calor, y por centrifugación, y tratados con el campo eléctrico.



A (V-, F-, t-), B (V-, F-, t+), C (V-, F+, t-), D (V-, F+, t+), E (V+, F-, t-), F (V+, F-, t+), G (V+, F+, t-), H (V+, F+, t+)

FIGURA 32. Espectros más representativos de los aceites de aguacate tratados con el campo eléctrico.



Se logró identificar diversos grupos funcionales característicos de las grasas y los aceites vegetales. Sin embargo, debido al tema de estudio de nuestro trabajo nos enfocaremos a los dobles enlaces *cis* y *trans*.

En forma general se logró identificar una banda de absorción a 725 cm^{-1} que fue asociada a los dobles enlaces *cis* éste pico es más intenso comparandolo con la banda característica con los dobles enlaces *trans* que corresponde a la frecuencia de 968 cm^{-1} , semejante a lo reportado por diversos investigadores, por ejemplo, **Coates (2000)**, que demostró que la absorbancia en el espectro a 723 cm^{-1} corresponde a los dobles enlaces *cis* con un modo de vibración de balanceo. En otro trabajo relacionado **Guillén y Cabo (1998)**, indicaron que la absorbancia en la región de 968 cm^{-1} se localizaron a los dobles enlaces *trans* con un modo de vibración de flexión fuera del plano, semejante a lo que se identificó en los espectros de los aceites de aguacate.

En todas las muestras tratadas con campo eléctrico de los Aceites 1 y 2, en los espectros de la **Figura 32** no se identificó la intensidad correspondiente a los dobles enlaces *trans* en las absorbancias de 3025 y 3040 cm^{-1} reportadas por **Guillén y Cabo (1998)** y **Coates (2000)** respectivamente. Sin embargo, en otro estudio cuando se incrementó el tiempo de exposición con el campo eléctrico, que se muestra más adelante, estas absorbancias si fueron localizadas en las **Figuras 33, 34, 35 y 36**.

Debido a lo anterior, los Aceites 1 y 2 tratados con el campo eléctrico y extraídos por los tres métodos propuestos, presentaron una ligera intensidad solo en la región de 968 cm^{-1} que esta relacionada a los dobles enlaces *trans*, pero esta intensidad es mínima en comparación con la banda a 725 cm^{-1} que fue más intensa en todas las muestras, y que corresponde a los dobles enlaces *cis*.

Para corroborar los resultados obtenidos por FTIR, se analizaron todos los aceites en estudio por medio de la cromatografía de gases. Los tratamientos con el campo eléctrico se realizaron como se indicó en el diseño experimental descrito en la **Tabla 11**. De acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, el aceite de la estrategia 1, -primero extraído luego tratado-, se identificó como Aceite 1, mientras que el aceite de la estrategia 2, pulpa tratada luego extraída-, se identificó como Aceite 2.

En las **Tablas 16 y 17** se muestran los resultados de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EM-AG) de los Aceites 1 y 2 tratados con campo eléctrico y extraídos con disolvente sin calor. Cada aceite se identificó con la misma nomenclatura descrita en el diseño experimental.

Tabla 16. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído con disolvente sin calor y tratado con CE (Aceite 1).

EM-AG	A	B	C	D	Testigo
C14:0	0.05±0.004	0.06±0.004	0.06±0.001	0.05±0.005	0.01
C16:0	16.1±1.3	18.1±1.4	17.7±1.0	17.5±1.4	11.0
C18:0	7.0±0.06	7.0±0.55	7.1±0.4	7.1±0.6	5.1
C18:1t	0.1±0.03	0.1±0.02	0.1±0.09	0.1±0.03	0.1
C18:1	42.1±3.5	46.0±3.5	43.3±2.6	45.6±3.5	40.6
C18:2t	0.1±0.03	0.1±0.02	0.4±0.02	0.7±0.03	0.2
C18:2	12.0±1.1	12.6±1.1	13.8±0.8	14.3±1.0	9.3
C18:3	0.1±0.09	0.1±0.01	0.1±0.07	0.2±0.01	0.1
C20:0	1.0±0.01	1.1±0.09	1.2±0.1	1.2±0.09	0.9
EM-AG	E	F	G	H	Testigo
C14:0	0.05±0.001	0.06±0.001	0.06±0.001	0.2±0.04	0.01
C16:0	16.8±1.3	18.5±1.4	17.6±0.01	13.4±1.3	11.0
C18:0	6.6±0.5	7.1±0.54	7.1±1.3	5.2±0.5	5.1
C18:1t	0.1±0.01	0.1±0.03	0.1±0.03	0.1±0.02	0.1
C18:1	43.3±3.4	46.1±3.5	45.1±3.2	43.6±3.5	40.6
C18:2t	0.7±0.03	0.7±0.02	0.1±0.04	0.2±0.03	0.2
C18:2	12.9±0.04	13.4±0.97	14.1±1.2	10.3±1.09	9.3
C18:3	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1
C20:0	1.1±0.09	1.0±0.08	1.2±0.11	1.0±0.09	0.9

En la Tabla anterior se observa que todos los tratamientos fueron diferentes ($p \leq 0.05$) al testigo en la concentración de los ésteres metílicos.

Con respecto a la concentración de los isómeros *trans*, en el C18:2t los tratamientos C (3 Kv/cm, 720 Hz y 10 s), D (3 kV/cm, 720 Hz y 180 s), E (9 kV/cm, 60 Hz y 10 s) y F (9 kV/cm, 60 Hz y 180 s) fueron diferentes ($p \leq 0.05$) al testigo. Por lo tanto, en el aceite de aguacate extraído con disolvente sin calor y cuando se expone directamente al campo eléctrico (Aceite 1) no se incrementan los isómeros *trans*, el incremento se debe al método de extracción como se mencionó anteriormente.

En la **Tabla 17** se puede observar los resultados de los ésteres metílicos del aceite de aguacate expuesto al campo eléctrico (Aceite 2) y extraído con disolvente sin calor.

Tabla 17. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído con disolvente sin calor y tratado con CE (Aceite 2).

ME-AG	A	B	C	D	Testigo
C16:0	19.3±1.4	19.8±1.3	19.5±1.4	19.2±1.5	17.2
C18:0	8.6±0.6	10.2±0.7	7.8±0.6	9.3±0.6	7.1
C18:1t	0.6±0.04	0.4±0.05	0.6±0.03	0.6±0.05	0.6
C18:1	43.8±3.4	40.1±3.4	45.7±3.5	43.2±3.5	40.4
C18:2t	0.5±0.02	0.6±0.04	0.5±0.04	0.4±0.04	0.5
C18:2	11.0±0.8	12.1±1.0	10.3±0.02	11.6±0.8	10.2
C18:3	0.9±0.07	0.9±0.01	0.8±0.08	1.0±0.06	0.9
ME-AG	E	F	G	H	Testigo
C16:0	19.1±1.4	19.3±1.5	19.6±1.7	19.4±1.5	17.2
C18:0	8.3±0.06	8.2±0.08	8.1±0.63	8.3±0.07	7.1
C18:1t	0.6±0.04	0.5±0.03	0.6±0.04	0.5±0.05	0.6
C18:1	44.8±3.4	44.8±3.1	45.0±3.5	45.1±3.4	40.4
C18:2t	0.3±0.04	0.3±0.05	0.2±0.04	0.3±0.04	0.5
C18:2	10.8±0.8	10.5±0.9	10.8±0.3	10.7±0.8	10.2
C18:3	0.9±0.02	0.8±0.07	0.8±0.07	0.9±0.07	0.9

En la cuantificación de los ésteres metílicos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceite 2), extraído con disolvente sin calor, todos los tratamientos fueron diferentes al testigo ($p \leq 0.05$).

En la determinación de los isómeros *trans* en el C18:1t el tratamiento B (3 Kv/cm, 60 Hz y 180 s) fue diferente ($p \leq 0.05$) en la concentración del éster metílico con respecto al testigo. Para el C18:2t, los tratamientos E (9 kV/cm, 60 Hz y 10 s), F (9 kV/cm, 60 Hz y 180 s), G (9 kV/cm, 720 Hz y 10 s) y H (9 kV/cm, 720 Hz y 180 s) fueron diferentes ($p \leq 0.05$) al testigo. Sin embargo, la concentración de ácidos grasos *trans* aunque son semejantes al testigo, la concentración no alcanza cantidades

importantes, como lo establecen el Ministerio de Sanidad Danés, con un máximo de 1 g /100 g de lípido, mientras que la FDA permite contenidos menores a 0.5 g/100g.

Comparando los resultados de cromatografía de gases y espectroscopia de infrarrojo se confirma que la presencia de isómeros *trans* se encuentra en mínimas concentraciones, por ejemplo, en la frecuencia de 968 cm⁻¹ en el FTIR se identificó esta absorbancia en todas las muestras. Por lo tanto, el aceite extraído por éste método esta dentro del límite máximo permitido por las normas internacionales.

Continuando con este análisis, en la **Tabla 18** se muestra los resultados de los aceites de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceites 1) y extraídos con hexano con calor.

Tabla 18. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído con disolvente con calor y tratado con CE (Aceite 1).

EM-AG	A	B	C	D	Testigo
C16:0	19.07±1.5	19.14±1.5	19.0±1.4	19.0±1.4	19.0
C18:0	7.9±0.6	7.3±0.6	8.1±0.6	8.3±0.6	6.2
C18:1t	0.54±0.04	0.59±0.03	0.5±0.04	0.3±0.04	0.1
C18:1	43.7±3.3	43.7±3.4	43.3±3.4	43.6±3.3	40.6
C18:2t	4.6±0.3	3.8±0.3	4.7±0.3	4.0±0.4	3.5
C18:2	12.9±1.0	12.2±0.2	13.0±1.0	13.1±1.0	12.0
C18:3	1.2±0.09	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.09	0.6
C20:0	-	-	-	-	-
EM-AG	E	F	G	H	Testigo
C16:0	19.4±1.5	19.4±1.5	19.1±1.4	18.5±1.5	19.0
C18:0	7.4±0.6	7.2±0.6	8.0±0.5	8.1±0.1	6.2
C18:1t	0.4±0.03	0.4±0.04	0.3±0.03	0.5±0.06	0.1
C18:1	45.7±3.5	44.6±3.6	46.2±3.6	45.4±3.4	40.6
C18:2t	3.4±0.2	3.5±0.3	4.4±0.3	4.6±0.4	3.5
C18:2	12.2±0.9	11.9±0.9	13.0±0.9	13.5±1.0	12.0
C18:3	1.2±0.09	1.2±0.08	1.2±0.06	1.3±0.09	0.6
C20:0	1.1±0.08	1.04±0.01	-	-	-

En la cuantificación de los ésteres metílicos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceite 1), extraído con disolvente con calor se encontró que los tratamientos C (3 kV/cm, 720 Hz y 10 s), D (3 kV/cm, 720 Hz y 180 s), G (9 kV/cm, 720 Hz y 10 s) y H (9 kV/cm, 720 Hz y 180 s) fueron diferentes ($p \leq 0.05$) en la concentración de los ésteres metílicos respecto al testigo.

En el análisis de los isómeros *trans* del C18:1t todos los tratamientos fueron diferentes al testigo ($p \leq 0.05$). Por lo anterior, las condiciones experimentales del campo eléctrico no afecta la formación de isómeros *trans*, pero sí las condiciones del método de extracción 60 °C durante 4 h.

En la **Tabla 19** se presentan los resultados de los ésteres metílicos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceite 2) y extraído con disolvente con calor.

Tabla 19. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído con disolvente con calor y tratado con CE (Aceite 2).

EM-AG	A	B	C	D	Testigo
C14:0	0.05±0.004	0.02±0.002	-	-	-
C16:0	20.1±1.3	19.8±1.4	20.0±1.5	18.8±1.5	19.1
C18:0	9.3±0.7	10.2±0.7	9.3±0.8	9.2±0.7	6.3
C18:1t	0.27±0.03	0.47±0.04	0.3±0.01	0.18±0.06	0.1
C18:1	33.6 ±2.6	40.1±3.3	41.4±3.3	39.6 ±3.2	40.2
C18:2t	4.43±0.4	6.2±0.2	4.1±0.2	3.3±0.3	3.1
C18:2	12.19±0.8	12.1±0.9	10.6±0.7	12.2±0.2	11.0
C18:3	0.13±0.06	0.97±0.07	0.13±0.04	1.2±0.8	0.1
EM-AG	E	F	G	H	Testigo
C14:0	-	0.2±0.001	0.01±0.002	0.05±0.004	-
C16:0	20.9±1.6	19.9±1.5	17.2±1.5	19.5±1.6	19.1
C18:0	10.6±1.3	9.6±0.8	8.9±0.7	10.0±0.7	6.3
C18:1t	0.8±0.01	0.53±0.03	0.36±0.04	0.16±0.02	0.1
C18:1	45.8±1.4	43.1±03.1	42.3±3.0	43.0±3.2	40.2
C18:2t	2.0±0.1	6.1±0.5	4.7±0.4	2.2±0.3	3.1
C18:2	16.1±0.2	11.9±0.9	10.9±0.8	12.2±0.9	11.0
C18:3	1.0±0.1	1.0±0.07	0.8±0.01	0.13±0.01	0.1

Se puede observar en la Tabla anterior que en el Aceite 2, del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico todos los tratamientos fueron diferentes con respecto en la cuantificación de los ésteres metílicos con respecto al testigo ($p \leq 0.05$).

En el análisis de los isómeros *trans* para el C18:1t los tratamientos B (3 kV/cm, 60 Hz y 180 s), C (3 kV/cm, 720 Hz y 10 s), E (9 kV/cm, 60 Hz y 10 s), F (9 kV/cm, 60 Hz y 180 s) y G (9 kV/cm, 720 Hz y 10 s) fueron diferentes respecto al testigo ($p \leq 0.05$). Mientras que para el C18:2t, los tratamientos B (3 kV/cm, 60 Hz y 180 s) y F (9 kV/cm, 60 Hz y 180 s) fueron diferentes ($p \leq 0.05$). Bajo estas condiciones de extracción del aceite de aguacate, hay un incremento del 6% de aceite con un voltaje, frecuencia y tiempo bajo. Por otra parte, no hay incremento de los isómeros *trans*.

En la **Tabla 20** se presentan los resultados de los ésteres metílicos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceite 1) y extraído por centrifugación.

Tabla 20. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído por el método de centrifugación y tratado con CE (Aceite 1).

EM-AG	A	B	C	D	Testigo
C14:0	0.02±0.007	0.02±0.005	0.02±0.002	0.02±0.009	0.13
C16:0	16.0±0.3	16.3±0.18	17.0±0.3	17.0±0.11	17.0
C16:1	7.1±0.2	7.07±0.9	7.01±0.8	7.04±0.1	7.01
C18:0	6.1±0.5	6.7±0.3	6.4±0.1	7.1±0.2	6.9
C18:1t	0.02±0.003	0.01±0.002	0.07±0.003	0.06±0.008	0.1
C18:1	57.0±0.1	57.2±0.1	58.1±0.44	57.0±0.1	58.7
C18:2t	0.1±0.006	0.05±0.001	0.1±0.002	-	-
C18:2	8.4±0.1	9.0±0.1	9.0±0.16	11.0±0.11	7.3
C18:3	0.9±0.001	0.3±0.008	0.9±0.005	0.1±0.007	0.06
C20:0	1.0±0.06	0.1±0.007	1.1±0.07	0.4±0.002	0.16
C20:1	0.3±0.004	0.5±0.001	0.7±0.005	0.6±0.007	0.05
C21:0	0.7±0.003	-	0.4±0.002	0.2±0.001	-
C20:2	0.4±0.001	-	0.1±0.001	0.10±0.013	-
C24:0	0.2±0.004	-	-	0.4±0.007	-

Tabla 20. Continuación de los resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído por el método de centrifugación y tratado con CE (Aceite 1).

EM-AG	E	F	G	H	Testigo
C14:0	0.14±0.01	0.01±0.008	0.07±0.004	0.02±0.003	0.13
C16:0	17.3±0.13	16.6±0.16	17.0±3.09	17.0±0.6	17.0
C16:1	7.06±0.1	7.02±0.3	7.02±0.1	7.01±0.1	7.01
C18:0	6.0±0.11	7.0±0.12	7.0±0.27	6.3±1.03	6.9
C18:1t	0.01±0.002	0.01±0.002	0.08±0.003	0.07±0.003	0.1
C18:1	59.0±0.5	55.2±1.8	58.4±1.4	56.0±2.5	58.7
C18:2t	0.03±0.004	0.07±0.001	-	0.09±0.001	-
C18:2	8.4±0.3	9.0±0.8	10.2±3.1	8.3±0.5	7.3
C18:3	0.11±0.002	0.10±0.001	0.01±0.001	0.9±0.005	0.06
C20:0	0.13±0.001	1.0±0.07	0.3±0.002	0.95±0.007	0.16
C20:1	1.30±0.08	0.7±0.001	0.9±0.001	0.9±0.001	0.05
C21:0	0.6±0.005	0.8±0.002	0.4±0.001	0.4±0.001	-
C20:2	0.3±0.001	0.3±0.005	-	0.2±0.005	-
C24:0	0.1±0.008	0.1±0.001	-	-	-

Los tratamientos del Aceite 1 de los ésteres metílicos del aceite de aguacate tratado con el campo eléctrico, extraído por el método de centrifugación, mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la cantidad de cada uno de los ésteres metílicos extraídos por éste método en comparación con el testigo.

Con respecto a los isómeros *trans*, el C18:1t y C18:2t todos los tratamientos mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con el testigo.

Para los ésteres metílicos C21:0, C20:2 y C24:0 fueron diferentes entre ellos ($p \leq 0.05$), excepto el C14:0 del tratamiento E que no fue diferente al testigo ($p > 0.05$). Por lo tanto, las condiciones aplicadas por el campo eléctrico no incrementan los isómeros *trans*.

En la **Tabla 21** se presentan los resultados de los ésteres metílicos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceite 2) y extraído por centrifugación.

Tabla 21. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate extraído por el método de centrifugación y tratado con CE (Aceite 2).

EM-AG	A	B	C	D	Testigo
C14:0	0.01±0.001	0.01±0.001	0.02±0.001	0.02±0.002	0.11
C16:0	19.0±0.2	19.1±0.3	19.5±0.2	19.1±0.2	19.2
C16:1	6.0±0.2	3.04±0.6	2.03±0.04	2.04±0.1	6.2
C18:0	9.5±0.5	8.6±0.3	9.0±0.5	10.0±0.9	7.1
C18:1t	0.01±0.001	0.02±0.005	-	-	0.1
C18:1	60.0±0.2	66.1±0.1	65.6±0.3	65.0±0.4	58.7
C18:2t	0.07±0.001	0.01±0.001	0.1±0.002	0.1±0.05	-
C18:2	4.2±0.3	2.14±0.6	3.41±0.1	3.11±0.8	7.1
C18:3	0.5±0.001	0.43±0.008	0.3±0.004	0.5±0.001	0.08
C20:0	0.1±0.006	0.4±0.003	0.1±0.006	0.1±0.001	0.06
C20:1	0.7±0.001	0.2±0.001	0.1±0.001	0.3±0.002	0.01
C21:0	0.2±0.009	0.1±0.003	0.5±0.003	0.1±0.001	-
C20:2	0.6±0.001	0.2±0.007	0.2±0.001	0.1±0.002	-
C24:0	0.10±0.001	0.8±0.003	0.8±0.002	0.1±0.004	-
EM-AG	E	F	G	H	Testigo
C14:0	0.02±0.009	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.003	0.11
C16:0	18.5±0.5	18.0±0.5	19.0±0.2	19.3±0.3	19.2
C16:1	5.09±0.1	5.11±0.3	3.04±0.1	3.04±0.1	6.2
C18:0	8.7±0.3	8.4±0.3	9.0±0.1	8.7±0.1	7.1
C18:1t	0.01±0.001	0.09±0.002	0.04±0.007	-	0.1
C18:1	66.8±0.1	66.3±0.2	57.2±0.2	61.0±0.2	58.7
C18:2t	0.06±0.002	0.03±0.009	0.02±0.002	0.1±0.002	-
C18:2	7.0±0.3	6.11±0.2	2.4±0.6	2.40±0.1	7.1
C18:3	0.7±0.001	0.1±0.001	0.3±0.002	0.4±0.006	0.08
C20:0	0.9±0.001	0.4±0.004	0.1±0.006	0.2±0.004	0.06
C20:1	0.7±0.001	0.6±0.001	0.1±0.004	0.1±0.001	0.01
C21:0	0.2±0.001	0.1±0.004	0.2±0.001	0.2±0.002	-
C20:2	0.5±0.006	0.1±0.001	0.2±0.006	0.8±0.004	-
C24:0	0.1±0.002	0.1±0.002	0.9±0.003	-	-



Los tratamientos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico (Aceite 2), fueron diferentes en la extracción del aceite en comparación con el testigo ($p \leq 0.05$). En el análisis del C18:1t y C18:2t, todos los tratamientos presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo. Por lo anterior, el campo eléctrico, incrementa el rendimiento en la extracción del aceite de aguacate bajo las condiciones propuestas en éste trabajo. Además, no se genera la formación de isómeros *trans*. Por lo tanto, los aceites obtenidos por centrifugación y tratados con campo eléctrico, están dentro del parámetro de acuerdo a la FDA con un máximo de 0.5 g/100g, y como lo establecen el Ministerio de Sanidad Danés, con un máximo de 1 g /100 g de lípido.

5.5 Efecto del tiempo de tratamiento con el campo eléctrico sobre el aceite de aguacate evaluado por espectroscopia de infrarrojo y cromatografía de gases

Como se comentó en la metodología, para analizar con más detalle el efecto del campo eléctrico, el aceite de aguacate extraído por centrifugación se trató a 5 y 9 kV/cm, durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos de exposición al campo eléctrico. Los resultados de FTIR y cromatografía de gases, se presentan a continuación. En la **Figura 33** se muestran los espectros del aceite a un voltaje 5 kV/cm, a diferente tiempo.

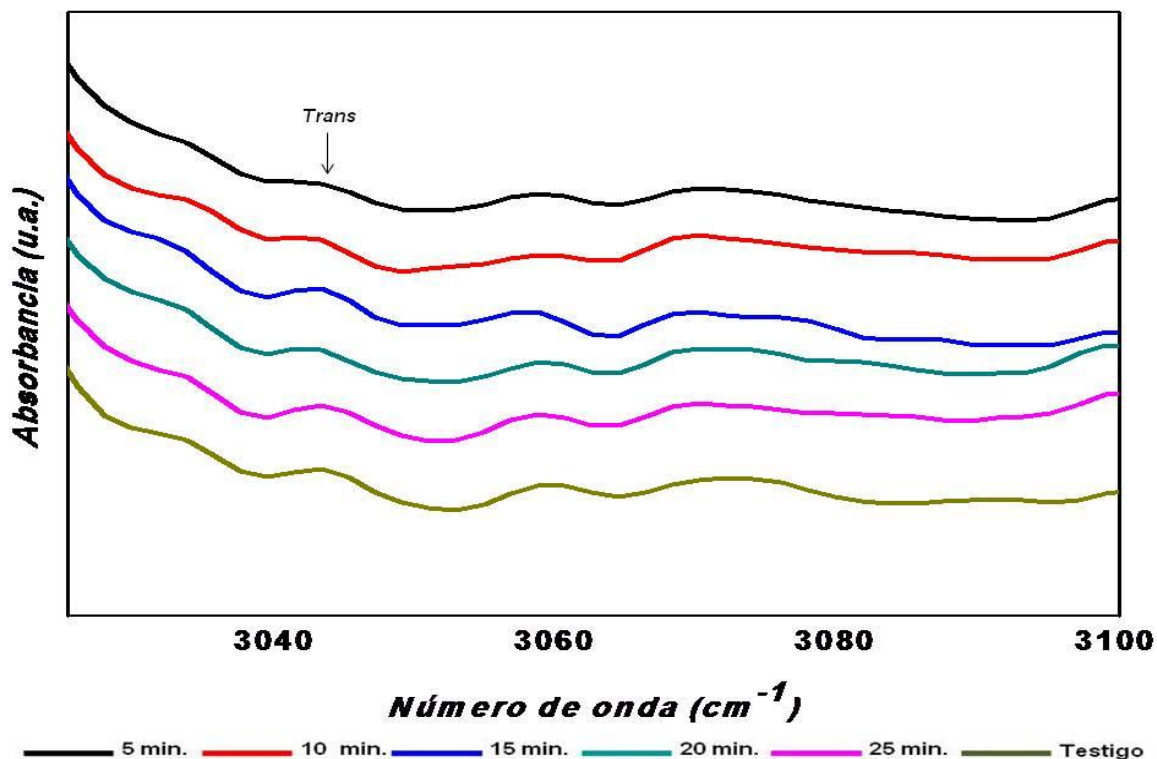


FIGURA 33. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico a 5 kV/cm.

Las muestras de aceite analizadas por FTIR, todos los espectros obtenidos mostraron una intensidad a 968 cm^{-1} por la presencia de los dobles enlaces *trans*, semejante a los espectros de la **Figura 27**. Además, se identificó otra intensidad a 3040 cm^{-1} relacionada con los dobles enlaces *trans*, sin embargo, este pico lo presenta el aceite usado como testigo, que no tuvo tratamiento, aproximadamente con la misma intensidad. Para corroborar lo anterior, se analizaron estos resultados por cromatografía de gases. En la **Tabla 22** se muestran estos resultados con 5 kV/cm a diferente tiempo de exposición al campo eléctrico.

Tabla 22. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate a 5 kV/cm.

EM-AG	5	10	15	20	25	Testigo
C14:0	0.8±0.02	0.9±0.03	0.4±0.03	0.6±0.01	0.2±0.01	0.1
C16:0	12.2±0.3	16.5±0.6	16.9±0.1	16.9±0.1	17.1±1.2	17.1
C18:0	9.3±0.8	8.8±0.3	8.9±0.7	8.9±0.5	7.4±0.6	7.5
C18:1t	0.2±0.03	0.2±0.01	0.2±0.02	0.2±0.06	0.2±0.05	0.1
C18:1	45.5±1.0	45.4±1.5	45.0±1.1	45.2±1.3	45.7±1.3	42.9
C18:2t	0.4±0.02	0.5±0.01	0.5±0.03	0.5±0.02	0.5±0.03	0.3
C18:2	11.1±0.8	12.3±0.4	12.0±0.2	12.2±0.5	10.9±0.5	10.9
C18:3	0.7±0.01	1.2±0.1	0.1±0.09	1.2±0.07	0.4±0.07	0.1
C20:0	1.2±0.1	-	1.1±0.1	-	0.1±0.06	0.9

Los ésteres metílicos del aceite de aguacate a 5 kV/cm fueron diferentes entre ellos y al testigo ($p \leq 0.05$).

Con respecto al C18:1t no presentó diferencia significativa al testigo ($p > 0.05$). Para el C18:2t los tratamientos a diferente tiempo fueron diferentes al testigo ($p \leq 0.05$). Por lo tanto, el efecto del campo eléctrico en estas condiciones experimentales, afecta ligeramente a los dobles enlaces del C18:2.

En la **Figura 34** se muestran los espectros del aceite de aguacate a un voltaje de 9 kV/cm durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos.

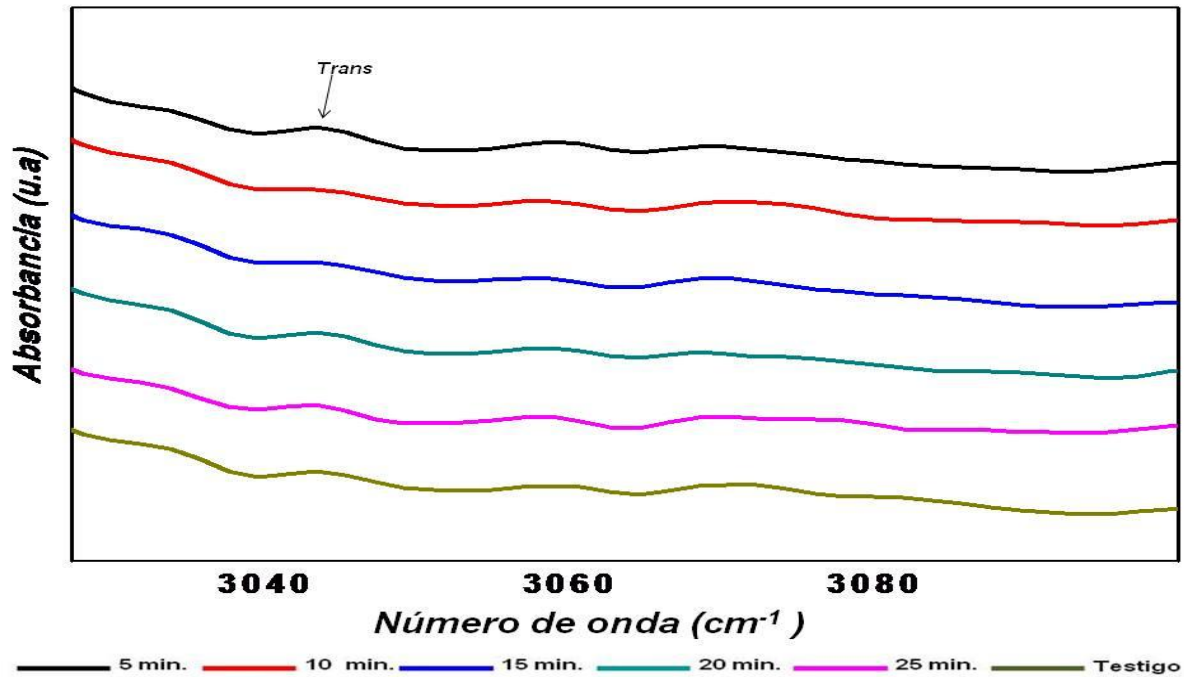


FIGURA 34. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico a 9 kV/cm.

En la **Figura 34** se observan los espectros de FTIR a 9 kV/cm a diferente tiempo de exposición con campo eléctrico, en donde se identificaron intensidades semejantes con los espectros de los tratamientos a 5 kV/cm que corresponde a los dobles enlaces *trans* a la frecuencia 3040 cm⁻¹, ésta intensidad se observó en el aceite usado como testigo. Para confirmar lo anterior, se analizaron las mismas muestras por cromatografía de gases. En la **Tabla 23** se observan los resultados de los ésteres metílicos del aceite de aguacate a 9 kV/cm durante 5, 10, 15, 20, y 25 minutos.

Tabla 23. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos del aceite de aguacate a 9 kV/cm.

ME-AG	5	10	15	20	25	Testigo
C14:0	0.2±0.01	1.2±0.1	1.9±0.05	1.9±0.1	1.0±0.1	1.3
C16:0	17.0±0.2	16.7±0.6	16.7±0.9	16.9±0.3	16.9±0.1	15.9
C18:0	7.9±0.8	8.9±0.5	8.6±0.3	8.7±0.1	8.5±0.5	8.6
C18:1t	0.35±0.01	0.36±0.03	0.37±0.03	0.35±0.04	0.35±0.06	0.30
C18:1	44.2±0.7	44.6±0.3	43.8±0.5	44.5±0.7	44.8±0.3	42.6
C18:2t	4.1±0.1	4.4±0.05	4.4±0.06	4.2±0.08	4.2±0.05	0.4
C18:2	11.7±0.9	12.1±0.7	12.0±0.2	11.9±0.2	11.9±0.7	12.0
C18:3	1.0±0.1	1.2±0.1	1.1±0.1	1.1±0.02	1.1±0.1	1.2

Los resultados de los ésteres metílicos del aceite de aguacate con un voltaje de 9 kV/cm, todos los tratamientos presentaron diferencia significativa entre ellos y con el testigo ($p \leq 0.05$).

En la cuantificación del isómero C18:1t todos los tratamientos no presentaron diferencia con el testigo ($p > 0.05$). Para el C18:2t todos los tratamientos fueron diferentes al testigo ($p \leq 0.05$). Por lo anterior, se puede decir que con un voltaje y un tiempo alto influye en el incremento de los isómeros *trans* del tipo C18:2t. Por otro lado, **Zulueta y col., (2007)** estudiaron el efecto del campo eléctrico pulsado de alta intensidad a dos voltajes 35 y 40 kV/cm durante 40 a 180 ms sobre el perfil de ácidos grasos de una bebida de jugo de naranja, adicionado con leche enriquecida con C18:1 y C18:3, y concluyeron que los cambios no fueron significativos en el contenido de ácidos grasos saturados, mono-insaturados y poli-insaturados, y que ésta tecnología puede ser propuesta como un método alternativo de conservación, debido a los cambios mínimos desde el punto de vista nutricional.

5.6 Efecto del campo eléctrico sobre los aceites de aguacate y oliva, evaluado por espectroscopia de infrarrojo y cromatografía de gases

Dado la semejante composición del aceite de olivo con el aceite de aguacate se realizó este estudio aplicando un campo eléctrico a ambos aceites, tal como se describió anteriormente. En las **Figuras 35 y 36** se muestran los espectros de los aceites de aguacate (AA) y Oliva (AO) ambos aceites tratados con campo eléctrico con un voltaje de 5 y 9 kV/cm a diferente tiempo.

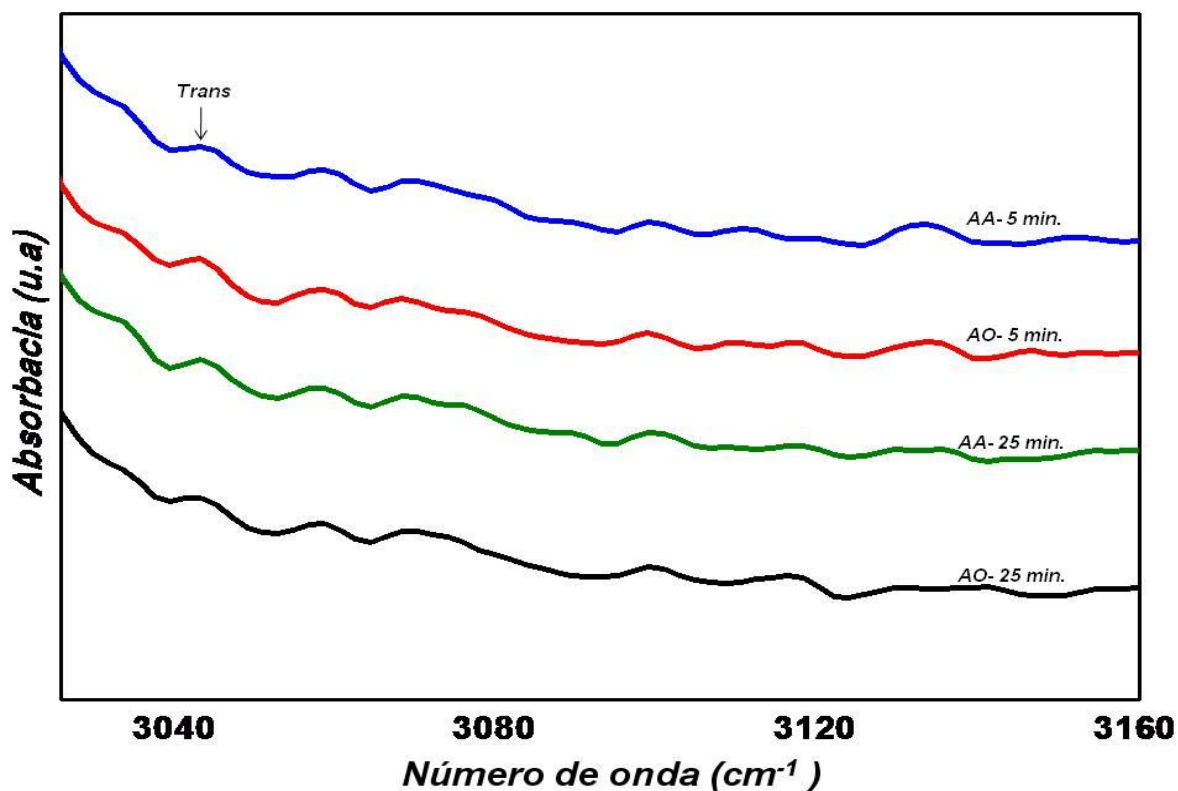


FIGURA 35. Espectros de los aceites de aguacate (AA) y oliva (AO) a 5 kV/cm.

En la **Figura 35** se identificó una intensidad relacionada a los dobles enlaces *trans* en la región de 3040 cm^{-1} , tal como lo reportó **Coates (2000)**.

En la **Figura 36** se muestra la ampliación de los espectros de los aceites de aguacate y oliva.

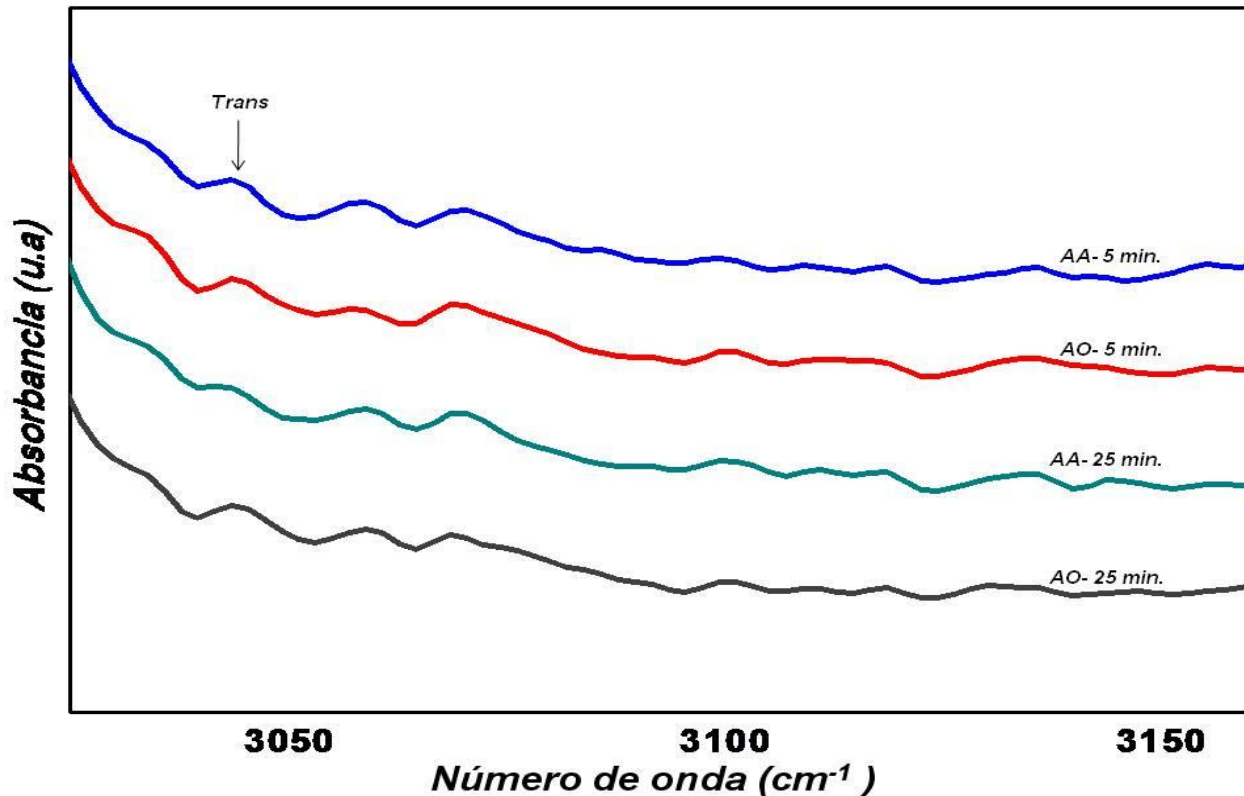


FIGURA 36. Espectros de los aceites de aguacate y oliva tratados a 9 kV/cm .

Con el incremento del voltaje a 9 kV/cm en los espectros de los aceites de aguacate y oliva se identificó a los dobles enlaces *trans*, semejante con la exposición de 5 kV/cm en todos los tratamientos a diferente tiempo.

En la **Tabla 24** se muestran los resultados de los ésteres metílicos de los aceites de aguacate y oliva a dos voltajes y tiempo de exposición al campo eléctrico.

Tabla 24. Resultados porcentuales de los ésteres metílicos de los aceites de aguacate (AA) y oliva (AO) a un voltaje 5 y 9 kV/cm* durante 5^a y 25^b minutos.

EM-AG	AA (5*-a)	AO (5*-a)	AA (5*-b)	AO (5*-b)
C14:0	0.02±0.001	0.01±0.001	0.03±0.005	0.5±0.001
C16:0	18.0±0.3	11.3±0.3	17.9±0.6	12.0±0.3
C16:1	-	0.04±0.001	-	0.1±0.01
C18:0	7.6±0.3	0.8±0.05	8.2±0.2	1.4±0.03
C18:1t	0.23±0.02	2.6±0.2	0.3±0.02	2.0±0.06
C18:1	53.0±0.3	64.1±0.4	52.6±0.1	64.5±0.3
C18:2t	-	-	-	-
C18:2	9.1±0.3	9.3±0.6	10.2±0.5	12.1±0.1
C18:3	0.09±0.002	0.42±0.003	0.13±0.01	0.16±0.003
C20:0	0.14±0.05	0.22±0.001	0.8±0.0 1	0.68±0.004
C20:1	0.7±0.01	0.4±0.003	-	-
C21:0	-	0.1±0.002	-	-
C20:2	-	0.4±0.001	-	-
EM-AG	AA (9*-a)	AO (9*-a)	AA (9*-b)	AO (9*-b)
C14:0	0.04±0.009	0.02±0.003	0.03±0.005	0.08±0.001
C16:0	18.4±0.5	11.2±0.8	17.4±0.3	11.9±0.1
C16:1	-	0.04±0.007	-	0.09±0.002
C18:0	8.2±0.5	1.1±0.08	8.6±0.1	1.3±0.05
C18:1t	0.3±0.07	2.0±0.01	0.4±0.06	2.8±0.07
C18:1	52.9±0.1	66.7±0.4	53.1±0.4	60.8±0.3
C18:2t	4.6±0.2	4.6±0.07	4.3±0.2	4.4±0.2
C18:2	10.5±0.6	10.4±0.1	11.2±0.4	10.7±0.5
C18:3	0.87±0.01	0.36±0.004	0.9±0.07	0.19±0.004
C20:0	-	0.20±0.001	-	0.49±0.001
C20:1	-	0.56±0.002	-	0.47±0.003
C21:0	-	0.1±0.003	-	-
C20:2	-	0.4±0.001	-	-



En los tratamientos del aceite de aguacate y oliva a dos voltajes y diferente tiempo presentaron diferencia entre ellos ($p \leq 0.05$). En los ésteres metílicos *trans* en ambos aceites para el C18:1t y C18:2t fueron diferentes significativamente entre ellos ($p \leq 0.05$). Por lo tanto, el voltaje y el tiempo influyen en la generación de ácidos grasos *trans* bajo estas condiciones experimentales. Sin embargo, la aplicación del campo eléctrico sigue siendo una opción importante como método alternativo para la conservación de la pulpa de aguacate, ya que el tiempo aplicado en los anteriores aceites no corresponde a las condiciones ideales de conservación.

5.7 Análisis químico y por medio de espectroscopia de infrarrojo del efecto del campo eléctrico y el tiempo de almacenamiento sobre el aceite de aguacate

En la **Figura 37** se muestran los espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico a 3 kV/cm, 60 Hz y 10 s, y analizado durante 4, 13, 28, 90 y 365 días (Aceites 1 y 2).

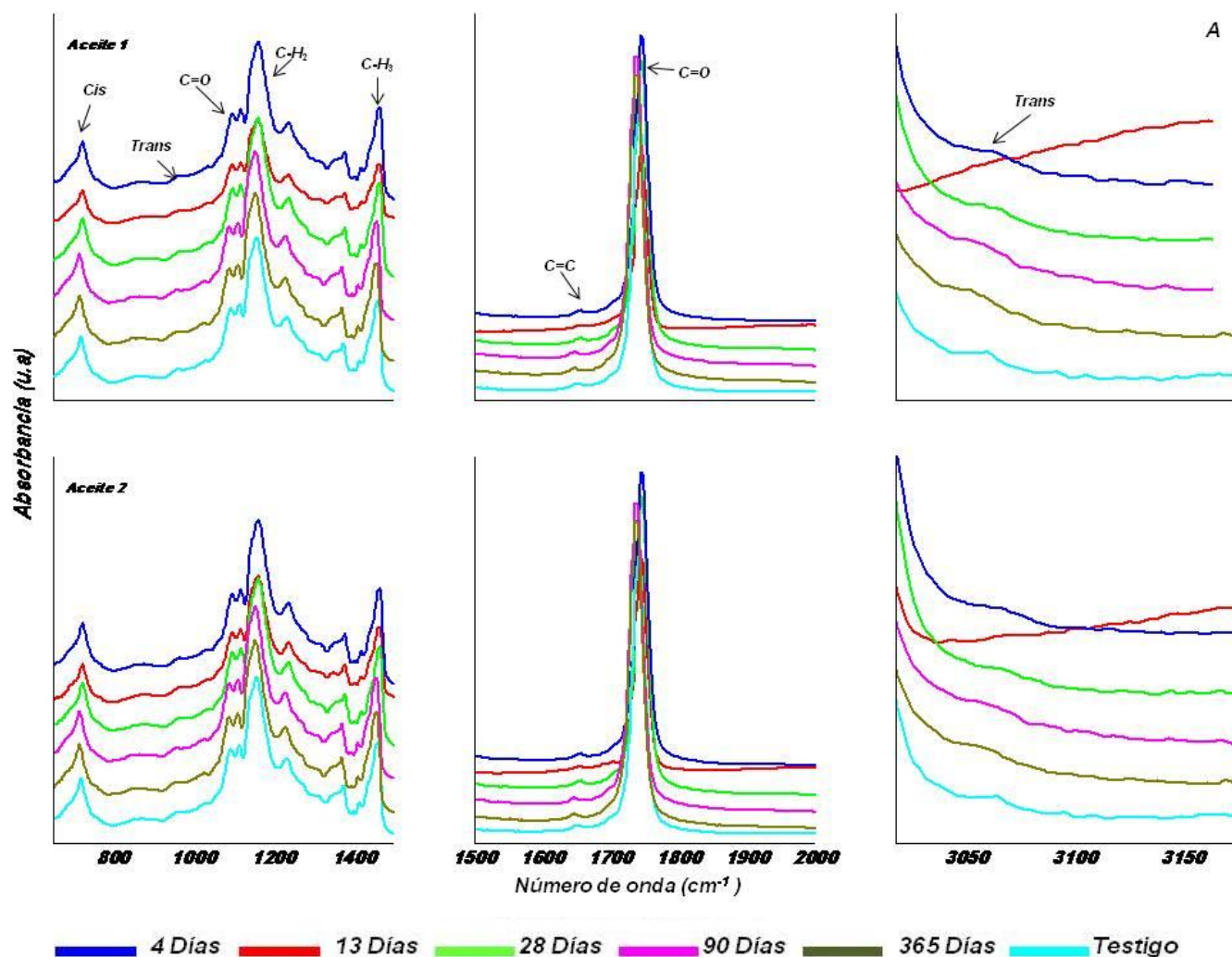


FIGURA 37. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico A) 3 kV/cm, 60 Hz y 10 s. de los Aceites 1 y 2.

Se observó en los espectros de los aceites de aguacate, al analizar la región por debajo de los 1000 cm^{-1} , que todos los espectros muestran la presencia del pico asociado a la forma *cis* a 725 cm^{-1} y un pico en el centro asociado a la forma *trans* a 968 cm^{-1} con una menor intensidad. En la región de 3000 a 3150 cm^{-1} de los espectros mencionados, se identificó el pico alrededor de los 3040 cm^{-1} en los Aceites 1 y 2, el cual se asocia a la vibración de estiramiento del enlace en posición *trans* presente en el aceite de aguacate. En la **Figura 38** se muestran los espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico a 9 kV/cm , 720 Hz y 180 s .

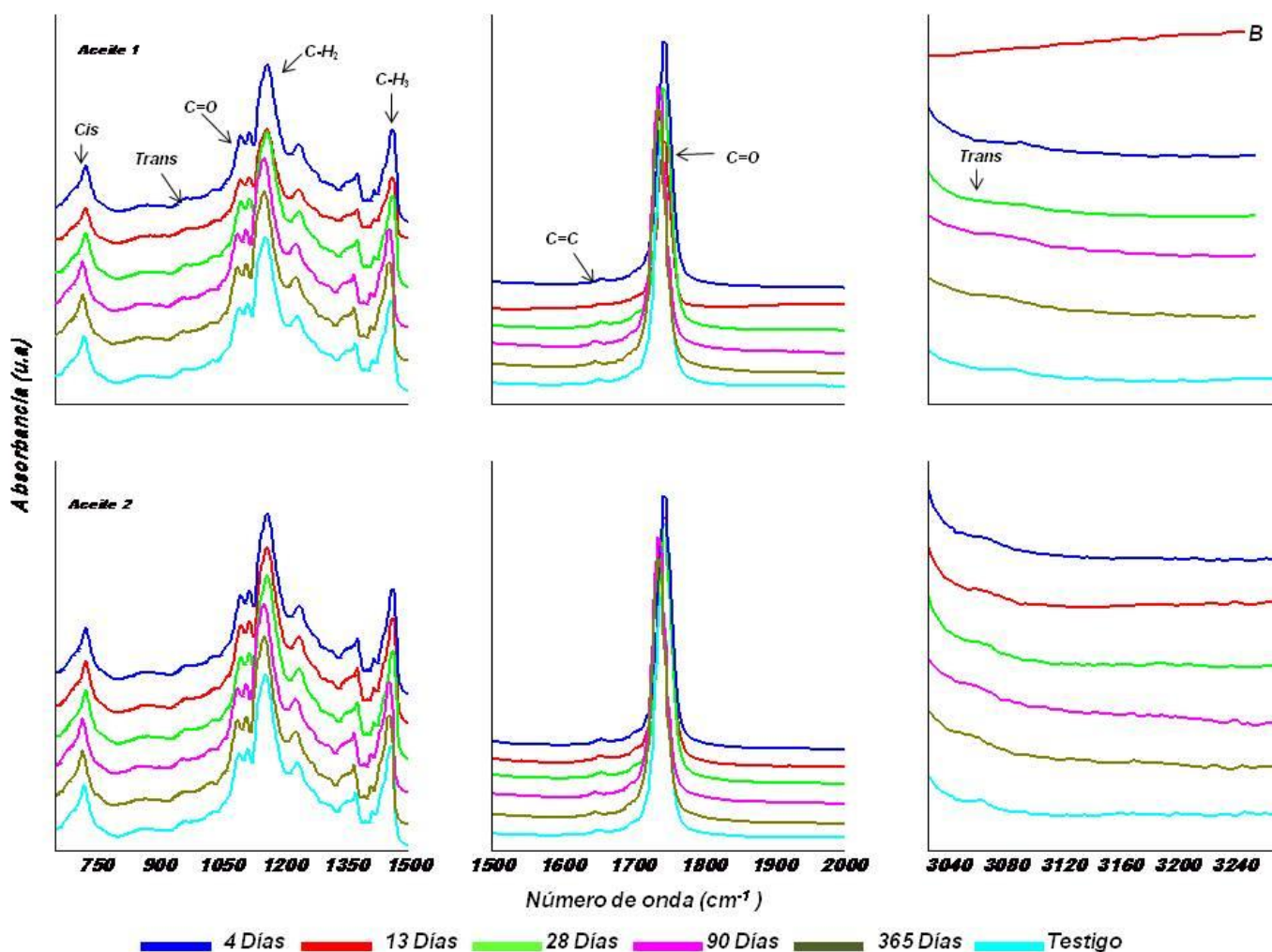


FIGURA 38. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico B) 9 kV/cm , 720 Hz y 180 s . de los Aceites 1 y 2.

En la **Figura 38** se identificó una banda de absorción a 725 cm^{-1} asociada a los dobles enlaces *cis*, éste pico es más intenso que el de 968 y 3040 cm^{-1} relacionado con los dobles enlaces *trans*, semejante a los espectros de la **Figura 32** de los Aceites 1 y 2, se puede decir que conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento del aceite de aguacate presentó un incremento en la intensidad.

En los espectros de las **Figuras 37 y 38** en la región de $1743\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ se observa un pico indicativo del grupo funcional carboxilo con un modo de vibración de estiramiento (**Coates, 2000**). En este pico se pudo observar un desplazamiento hacia frecuencias más altas y un incremento de intensidad, después de un periodo de almacenamiento de 90 días. **Yue y col., (2008)** estudiaron el deterioro de los triacilglicéridos en los aceites de oliva virgen y observaron un incrementó en la intensidad en $1726\text{-}1748\text{ cm}^{-1}$ en la región del grupo funcional carboxilo debido a la formación de los ácidos grasos libres. Por lo cual, el desplazamiento y el incremento en la intensidad se asocia al deterioro de los triacilglicéridos por efectos del almacenamiento del aceite y por la falta de conservadores en el mismo.

En los aceites estudiados de las **Figuras 37 y 38** se identificó la banda asociada a los dobles enlaces *trans* en la región de $3040\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ con campo eléctrico en los tratamientos A (3 kV/cm , 60 Hz y 10 s) y B (9 kV/cm , 720 Hz y 180 s) en los Aceites 1 y 2, se puede observar en ambos tratamientos que no se incrementa la intensidad.

De los resultados de las **Figuras 37 y 38**, podemos afirmar que con el tratamiento con campo eléctrico en el aceite de aguacate extraído por el método de centrifugación, la generación de ácidos grasos *trans* es mínima en comparación con la frecuencia a 725 cm^{-1} que corresponde a los dobles enlaces *cis*, y esta inhibición se mantiene por periodos de al menos un año de almacenamiento.

A continuación se muestran los resultados de los índices químicos del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico y almacenado durante un año. En la **Tabla 25** se presentan estos resultados.

TABLA 25. Propiedades químicas del aceite de aguacate.

Índice	C	CA	¹ NMX
IA	0.75 ± 0.05	0.84 ± 0.001	1.5
IP	2.46 ± 0.03	15.2 ± 0.30	10
IY	86.67 ± 2.14	80.2 ± 1.45	90

IA: Índice de acidez, expresado como porcentaje de ácido oleico.

IP: Índice de peróxido (Meqkg^{-1}).

IY: Índice de yodo (análisis mediante el reactivo de Wijs).

C: Aceite de Aguacate extraído por centrifugación, (día cero).

CA: Aceite de Aguacate extraído por centrifugación, tratado con campo eléctrico y almacenado durante un año.

¹NMX Norma Mexicana (**SECOFI, 2008**).

En el índice de acidez del aceite de aguacate almacenado por un año y tratado al campo eléctrico (CA), presentó un incremento mínimo, comparándolo con el aceite de aguacate sin tratamiento (día cero) y con el parámetro reportado por la Norma Mexicana. Por lo tanto, los aceites presentan un mínimo de ácidos grasos libres.

Con los análisis realizados con Infrarrojo, por ejemplo, en las **Figuras 37 y 38** en la región de $1743\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ relacionada al grupo funcional carbonilo del éster de los triacilglicéridos podemos corroborar lo anterior, con un desplazamiento de los espectros hacia altas frecuencias como se mencionó, y un ligero incremento de intensidad.

En el análisis del índice de peróxido, en el aceite de aguacate tratado (CA) presentó un incremento en la oxidación de los ácidos grasos, en relación con el aceite de aguacate sin tratamiento. Al comparar los resultados con la Norma Mexicana, se puede observar que estos valores se encuentran por encima del parámetro permitido.

Si analizamos estos resultados con los obtenidos en los espectros de FTIR podemos confirmar lo anterior, en la **Figura 39** se observan tres de los principales espectros que son los del día cero, 90 días y 365 días.

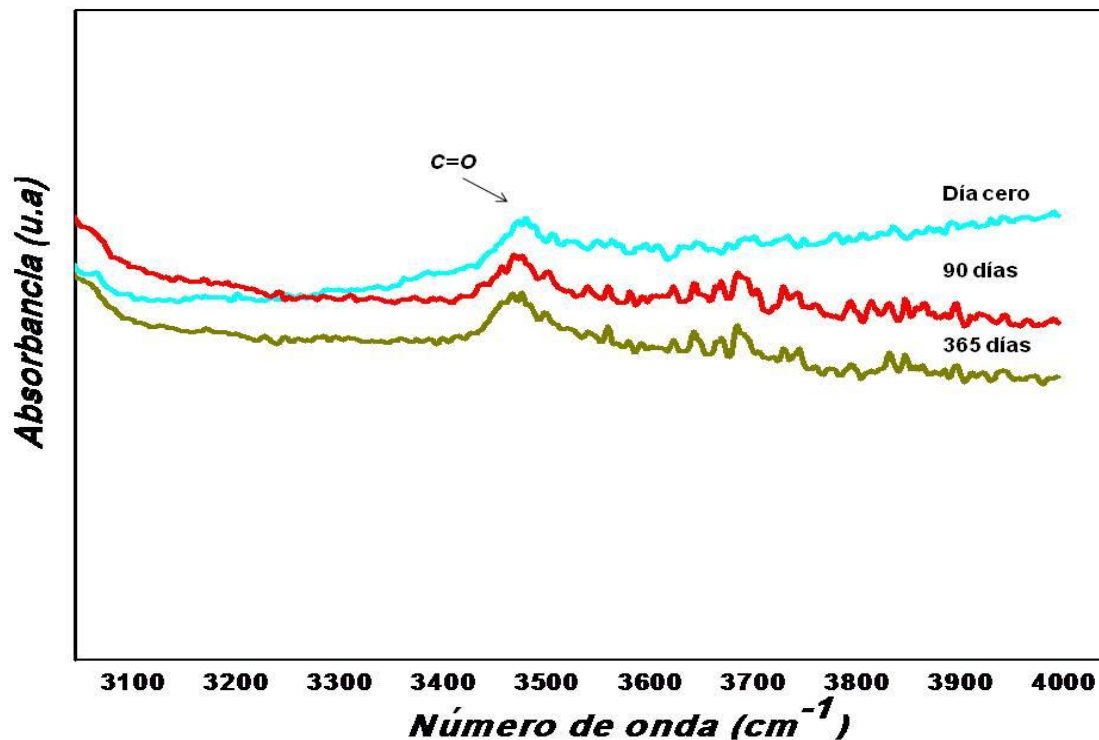


FIGURA 39. Espectros del aceite de aguacate tratado con campo eléctrico.

En la **Figura 39** se puede observar que los tres aceites presentaron una banda en la región de 3474 cm^{-1} relacionada al grupo funcional carbonilo del glicerol. Todos los aceites almacenados presentaron una banda en esa región. En un estudio realizado por **Guillén y Cabo (2000)** con FTIR en un aceite de girasol sometido a oxidación a 70 °C con aireación, observaron que a medida que aumenta el grado de oxidación del aceite, la banda cerca de 3471 cm^{-1} se ensancha e intensifica. Esto se debe a la superposición de las bandas originales con nuevas absorciones causadas por los hidroperóxidos generados en el proceso de oxidación. Por lo tanto, el aceite de aguacate tratado con campo eléctrico y almacenado durante un año presenta una oxidación de sus ácidos grasos, debido probablemente a las condiciones de almacenamiento y a la falta de antioxidantes.

En los resultados del índice de yodo, ambos aceites están dentro del valor permitido por la **Norma Mexicana (SECOFI, 2008)**. Por lo tanto, los aceites de aguacate presentan ácidos grasos

insaturados semejantes a los reportados para el aceite de oliva virgen con un índice de yodo de 75-94 (CODEX, 1981).

Analizando éste parámetro con FITR podemos corroborar éste resultado, por ejemplo, en las regiones de 725 y 1654 cm^{-1} relacionadas con los dobles enlaces *cis*, se pudo observar que no hay una diferencia significativa en la intensidad de la banda (**Figuras 37 y 38**). Algunos autores reportan que en la región de $3006\text{-}3010\text{ cm}^{-1}$ se puede apreciar y asegurar el cambio espectral de los dobles enlaces *cis*, en la **Figura 40** se puede observar esta región en particular.

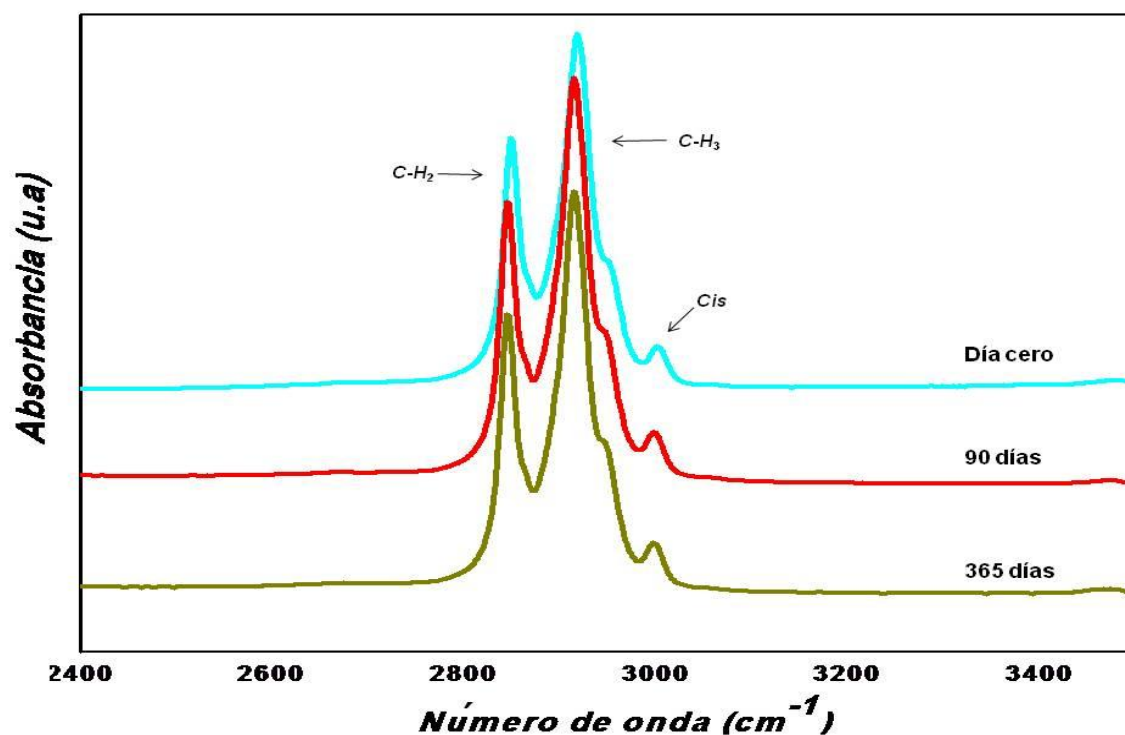


FIGURA 40. Espectros del aceite de aguacate ($2400\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$).

En la **Figura 40** en la región de 3006 cm^{-1} no se observaron cambios en la intensidad de los espectros analizados. **Xin-an y col., (2010)**, investigaron el efecto del campo eléctrico pulsado en el aceite de cacahuate y determinaron que durante el período de almacenamiento, las diferencias entre los índices químicos de las muestras tratadas con el campo eléctrico fueron inferiores a las del aceite



sin tratamiento, lo que implica que el tratamiento con campo eléctrico pudo disminuir la velocidad de la reacción de oxidación de los lípidos extendiendo su vida útil. Por lo tanto, el aceite de aguacate tratado con campo eléctrico y almacenado durante un año, conservó en su mayoría a sus ácidos grasos insaturados de acuerdo con los resultados de los índices químicos y la espectroscopia de FTIR.



CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Con los resultados del presente trabajo se puede concluir primeramente, que el mejor método de extracción es por centrifugación debido a que el aceite de aguacate mantuvo su color verde característico, no se necesita un disolvente para extraerlo y no se oxidan significativamente los ácidos grasos insaturados de acuerdo con los análisis químicos realizados. Además, con la cromatografía de gases y espectroscopia de infrarrojo se confirma que la presencia de isómeros *trans* se encuentra en mínimas concentraciones y por lo tanto, el aceite está dentro del límite máximo permitido por las normas internacionales.

Los aceites de aguacate extraídos por los tres métodos propuestos, tratados con campo eléctrico (Aceites 1 y 2) y analizados con cromatografía de gases y espectroscopia de infrarrojo, se logró demostrar que la aplicación del campo eléctrico bajo las condiciones propuestas para la inactivación de la enzima polifenoloxidasasa, puede ser una alternativa como método de conservación de la pulpa de aguacate, debido a que no se generan significativamente los isómeros *trans* en los Aceites 1 y 2, si influye los métodos y las condiciones de extracción del aceite.

Con el incremento del voltaje y tiempo, se cuantificó un aumento en el rendimiento de aceite, sin embargo, con este aumento se generó ligeramente la formación de isómeros *trans* en los Aceites 1 y 2.

Con los análisis instrumentales realizados en los aceites de aguacate y oliva tratados con campo eléctrico se demostró que ambos aceites presentan una semejanza en la composición de ácidos grasos. También se determinó que el voltaje, frecuencia y el tiempo influyen en la generación de ácidos grasos *trans* bajo las condiciones experimentales propuestas. Sin embargo, la aplicación del campo eléctrico sigue siendo una opción importante como método alternativo para la conservación de la pulpa de aguacate, ya que el tiempo de tratamiento no corresponde a la realidad, es decir, en este estudio se sobreexpuso el aceite al campo eléctrico.



La cromatografía de gases y la espectroscopia de FTIR son técnicas para determinar a los dobles enlaces *cis* y *trans* en los aceites, ya que los resultados presentados son cualitativos y cuantitativos, y ayudan a estimar la composición de varios grupos funcionales de ácidos grasos.

Por todo lo anterior, en éste trabajo se ha demostrado que el campo eléctrico puede ser una alternativa para la conservación de la pulpa de aguacate, ya que el método de conservación se realiza sin incremento de calor en la pulpa de aguacate manteniendo su calidad general y en otros compuestos de interés como son los ácidos grasos insaturados del aceite de aguacate.



BIBLIOGRAFIA

- Abbey M, Nestel PJ. (1994). Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is increased when *trans*-elaidic acid is substituted for *cis*-oleic acid in the diet. *Atherosclerosis*. 106:99-107.
- Ackman RG. (1997). Has Evolution and Long-Term Coexistence Adapted Us To Cope With *Trans* Fatty Acids?. *J. of Food Lipids*. 4, 295-318.
- Allen RR, Formo MW, Krishnamurthy RG, Mcdermott GN, Norris AF, Sonntag OV. (1982). Bailey's industrial oil and fat products. *In: Physical properties of fats and fatty acids*. Swern D (ed). John Wiley & Sons, New York, pp. 178-183, 666-679.
- Allende A, Jacxsens L, Devlieghere F, Debevere J, Artés F. (2002) Effect of super atmospheric oxygen packaging on sensorial quality, spoilage, and *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas caviae* growth in fresh processed mixed salads. *Journal Food Protection*, 65, 1565–1573.
- Alzamora SM, Tapia MS, Welti-Chanes J. (1998). New strategies for minimal processing of foods: the role of multi-target preservation. *Food Science and Technology International* 4: 353-361.
- Amunziata CM, Massaro M, Siculella L. (1999). Oleic acid inhibits endothelial activation. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 19:220-228.
- Anderson VHE., Cabrera S., Lozano R., González ILC. (2009). Efecto del consumo de aguacate (*Persea Americana Mill*) sobre el perfil lipídico en adultos con dislipidemia. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 22 (2): 84-89.
- Association Official of Analytical Chemists, Food Composition, Natives, Natural Contaminants. (1995) AOAC. EUA. Official Method 963.22. Methyl esters of fatty acids in oil and fats gas chromatographic method. *AOAC Official Methods Anal.* 41, 18–21.
- Association Official of Analytical Chemists, Food Composition, Natives, Natural Contaminants. (2006). AOAC. EUA. Vol. 2, 15^a ed., 963-967.
- Barsotti L, Cheftel JC. (1999). Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Review International*, 15 (2), 181–213.
- Batista CA, Cerezal MP, Fung LV. (1993). El aguacate (*Persea americana*, M). Valor nutricional y composición. *Alimentaria*, 63: 63-69.
- Benveniste P. (1986). Sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:275-308.
- Bora SP, Narain N, Rocha RVM, Queiroz MP. (2001). Caracterización de los aceites de la pulpa y semillas de aguacate. *Grasas y Aceites*. 52(3):171-174.
- Brondz I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal Chim Acta.* 465, 1–37.
- Brühl L. (1996). Determination of *trans* fatty acids in cold pressed oils and in dried seeds. *Fett/Lipid* 98, 380-383.
- CENEXA (1991). Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada. Publicado en: <http://www.cenexa.org/>

- Carrero JJ., Martín-Bautista E., Baró L., Fonollá J., Jiménez J., Boza JJ. y López-Huertas E. (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr. Hosp.* (1): 63-69.
- Castorena GJH. (2008). Aplicación de los campos electromagnéticos pulsantes para la inactivación de la polifenoloxidasas en la pulpa de aguacate de la variedad hass (*Persea americana Mill*). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Biotecnología *Avanzada*. Instituto Politécnico Nacional.
- Coates J. (2000). Interpretation of Infrared spectra, a practical approach in encyclopedia of Analytical Chemistry. Meyer, R.A. (ed). John Wiley & Sons Ltd., Chichester. pp. 10815-10837.
- CODEX. (1981). Norma del CODEX para los aceites de oliva vírgenes y refinados y los aceites refinados de orujo de aceituna No Regulados por Normas Individuales. (Ed.) *Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias*, 1-6. FAO., Roma.
- CODEX. (2004). Comisión del CODEX Alimentarios. del Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas Alimentarias. Comité del CODEX sobre Nutrición y Alimentos para regímenes especiales 26ª reunión. Bruckenforum Bonn, Friedrich-Breuer-Strasse 17, Bonn, Alemania 1-5 de noviembre del 2004. Documento de debate sobre una definición de ácidos grasos *trans*. Elaborado por Malasia y Dinamarca. pp: 1-6.
- Corinne HR, Wagley SE. (2002). Nutrición básica y dietoterapia, 1era. Ed. La prensa Médica Mexicana, pp:62-71.
- Curiel M. (1983). Patente. Clasificación Internacional C11B-001/010, C11B-001/004.
- Christie WW. (1994). Why I dislike boron trifluoride/methanol. *Lipid Technol.* 6, 66–68.
- ^aChristie WW. (1990). Preparation of methyl esters—part 2. *Lipid Technol.* 2, 79–80.
- ^bChristie WW. (1990). Preparation of methyl esters—part 1. *Lipid Technol.* 2, 48-49.
- David F, Sandra P, Vickers AK. (2005). Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters. Food analysis application. Palo Alto, CA: *Agilent Technologies*.
- Davidek J, Velisek J, Pokorny J. (1990). Chemical Changes During. Food Processing. pp. 169-229, Elsevier Science Pub. Co., New York.
- Davis RH. (1982). Patente. Clasificación Internacional C11B1/04, C11B1/06, C11B1/00, A61K35/78.
- Demam JM. (1990). Principles of Food Chemistry. pp. 36-88, Second Ed., Chapman & Hall, New York.
- Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Duchateau GS, Meijer L, Zock PL. (2009). Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J.Nutr.* 139(2):271-284.
- Dyer JM, Stymne S, Green AG, Carlsson AS. (2008). High-value oils from plants. *J. The Plant.* 54, 640–655
- Eder SR. (1982). Über die Bildung von Artefakten bei der Dämpfung von Speiseölen und-fetten. (Development of artifacts during processing of food oils and fats) *Fette Seifen Anstrichmittel. Fat-science technology.* 84: 136-141.
- FAO/WHO (1973). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. *Necesidades de energía y de proteínas*. Colección FAO. Alimentación y nutrición, FAO: reuniones sobre nutrición, WHO: serie de informes técnicos. Roma.
- Fennema OR. (2000). Química de los Alimentos, En: Lípidos. 2nd. Ed. Acirbia, España. pp:532-553.
- FDA (2002). Food and Drug Administration. *Trans fat now listed with saturated fat and cholesterol on the nutrition facts label*. Published in: <http://www.fda.gov>
- Gaydou EM, Lozano Y, Ratovohery J. (1987). Triglyceride and fatty acid compositions in the mesocarp of *Persea americana* during fruit development. *Phytochemistry*, 26(6), 1595–1597.
- Goullieux A, Pain JP. (2005). Ohmic heating. In: *Emerging Technologies for Food Processing*, Edited byr Da-Wen Sun. Academic Press, 2005. ISBN 0126767572.



- Guillén DM, Cabo N. (1998). Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier Transform Infrared Spectra. Role of some bands of the fingerprint region. *J. Agric. Food. Chem.* 46, 1789-1793.
- Guillén MD, Cabo N. (2000). Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *J. Sci. Food Agric.* 80, 2028–2036.
- Guzmán G. (1998). Cambios en el color y clorofila de aguacate (*Persea americana*, Mill), variedad Hass tratado con microondas. Tesis de Maestro en Ciencias de los Alimentos. *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, I.P.N. México, pp:20-55.
- Hayashi K, Hirata Y, Kurushima H, Saeki M, Amioka H, Nomura S, Kuga Y, Ohkura Y, Ohtami H, Kajiyama G. (1993). Effect of dietary hydrogenated corn oil (*trans*-octadecenoate rich oil) on plasma and hepatic cholesterol metabolism in the hamster. *Atherosclerosis.* 99:97-106.
- Hernández TM, Porrata CM. (1999). Calcio, Osteoporosis, Hipertensión arterial y Cáncer colorrectal. *Rev. Cubana Aliment Nutr.*, 13(1): 33-45.
- Horiuti I, Polanyi M. (1934). Exchange reactions of hydrogen on metallic catalysts. *Trans. Faraday Soc.*, 30, 1164-1172.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. (IUPAC,1990). Applied Chemistry division Commission on Oils, Fats and Derivatives. *In: Standard methods for the analysis of Oils, Fats and derivatives.* 6th ed. Section iii. Glycerines. A. Hautfenne. Université Catholique de Louvain Louvain-la-Neuve, Belgium. pp:13.
- Jacob HE, Förster W, Berg H. (1981). Microbiological implications of electric field effects. II. Inactivation of yeast cells and repair of their envelope. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 21(3), 225–233.
- Jacxsens L, Devlieghere F, Debevere J (2001) Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 197–210.
- Kuksis A. (1966). Quantitative lipid analysis by combined thin layer and gas–liquid chromatographic systems. *Chromatogr Rev.* 8, 172–207.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Wright S, Czarnecki SK, Wilson TA, Nicolosi RJ. (2003) Cholesterol vehicle in experimental Atherosclerosis 24: Avocado oil. *J. American College of Nutrition.* 22(1):52-55.
- López-Malo A, Palou, E, Barbosa-Cánovas GV, Welti-Chanesa J, Swansonc BG. (1999). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 31:8, pp. 549-556.
- Martínez MF, Castorena GJH, Robles GR, Robles TRR. (2007). Diseño, construcción, operación y validación de los equipos para generar: los campos electromagnéticos pulsantes. Trabajo de Exposición Congreso celebrado en Chile.
- Mensink RP, Katan MB. (1990). Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 323:439-445.
- Metcalfe LD, Schmitz AA. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem.* 33, (3):363–4.
- Meyer P, Martín WWD, Rodwell AV. (1982). *Bioquímica de Harper (Antes el Manual de Química–Fisiología).* El Manual Moderno, pp: 197-302.
- Mossoba MM, Yurawecz MP, McDonald RE. (1996). Rapid Determination of the Total Trans Content of Neat Hydrogenated Oils by Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1003-1009.
- Mozaffarian D, Clarke R. (2008). Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. *Eur J Clin Nutr.* 79:147-152.



- Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. (2006). *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 354:1601–1613.
- Mozaffarian D. (2008). Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death. *Am.J.Clin.Nutr.* 87(6):1991-1996.
- Nelson LD, Cox MM. (2001). *Lehninger Principles of Biochemistry. The enzymes.* 4 Edition, U. of Wisconsin–Madison. pp147-160.
- Ohlogge JB, Gulley RM, Emken EA. (1981) Occurrence of octadecenoic fatty acid isomers from hydrogenated fats in human tissue lipid classes. *Lipids.* 17:551-557.
- Orsat V, Gariépy Y, Raghavan GSV, Lyew D (2001) Radio-frequency treatment for ready-to-eat fresh carrots. *Food Research International*, 34, 527–536.
- Ortega TMA. (2003). Actas del V Congreso Mundial del Aguacate. Valor nutrimental de la pulpa fresca de aguacate hass. pp:741-748.
- Ortiz MA, Dorantes AL. (2005). Patente. Clasificación Internacional PCT/MX2005/000047.
- Ortiz MA, Dorantes L, Galíndez J, Guzmán RI. (2003). Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana Mill*) oil. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2216-2221.
- Patterson HB. (1990). Hydrogenation of fats and oils: theory and practice. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Quinghua Z, Fu-Ju Ch, Gustavo V, Barbosa-Cánovas B, Swason G. (1994). Inactivation of Microorganisms in a semisolid model food using high voltage pulsed electric fields. *Food Sci. and Tech.* 2(6):538-543.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore P. (2003). *Pharmacology* 5th ed., Churchill Livingstone pp.234 y 235.
- Raso J, Barbosa-Cánovas G. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Food Science and Nutrition*, 43(3):265-285.
- Raso J, Heinz V. (2006). Pulsed electric fields technology for the food industry, fundamentals and applications. ISBN 0387310533, 9780387310534. 3: 73-93.
- Ratnayake WMN, Pelletier G. (1996). Methyl Esters from a Partially Hydrogenated Vegetable Oil is a Better Infrared External Standard than Methyl Elaidate for the Measurement of Total *Trans* Content. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1165-1169.
- Requejo-Tapia CL. (1999). International trends avocado and avocado oil production and seasonal variation of fatty acids in New Zealand-grown cv. Hass. Thesis of Master. Science in Agribusiness, University New Zealand, pp: 8-9, 39-53, 174-177.
- Sabate J, Haddad E, Tanzman JS, Jambazian P, Rajaram S. (2003). Serum lipid response to the graduated enrichment of a Step I diet with almonds: a randomized feeding trial. *Am.J.Clin.Nutr.* Jun;77(6):1379-1384.
- SAGARPA (2008) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *En: Anuario Estadístico de Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Por Cultivo.*, Secretaría de Salud, p. 65.
- Salgado JM, Flávia D, Aparecida M, Regitano-D'arce B, Frias A, Mansi ND. (2008). The avocado oil (*Persea americana Mill*) as a raw material for the food industry. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.* 28(10):20-26.
- SECOFI (1981). Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-152-1981. *En: Determinación del índice de yodo.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.
- ^aSECOFI (1987). Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-101-1987. *En: Determinación del índice de acidez.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.
- ^bSECOFI (1987). Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-154-1987. *En: Determinación del índice de peróxido.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.



- SECOFI (2005). Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-043-SSA2-2005. *En: Servicios básicos de Salud. Promoción y Educación para la Salud en materia Alimentaria. Criterios para brindar orientación. Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-21.*
- SECOFI (2008). Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Mexicana NMX-F-052-SCFI-2008. Aceites y Grasas-Aceite de Aguacate, Especificaciones. Diario Oficial de la Federación. pp:1-12.
- SensIR Technologies (1999). The analysis of natural oils by FT-IR with a micro ATR. Applications brief AB-026. Danbury, CT: *SensIR Technologies.*
- Skoog AD, Holler FJ, Neman AT. (2001). Principios de análisis instrumental. *En: Sección II. Espectroscopia atómica. Capítulo 6. Introducción a los métodos espectrométricos. Capítulo 7. Componentes de los instrumentos para espectroscopia óptica. Sección III. Espectroscopia molecular. Capítulo 16. Espectrometría de absorción en el infrarrojo. Capítulo 17. Aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo. Sección V. Métodos de separación. Capítulo 26. Introducción a las separaciones cromatográficas. Capítulo 27. Cromatografía de gases. 5ª. Edición. Electrónica. Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. pp: 122-181, 409-461, 730-784.*
- Stauffer E. (2005). A Review of the Analysis of Vegetable Oil Residues from Fire Debris Samples: Analytical Scheme, Interpretation of the Results, and Future Needs. *J Forensic Sci.* 51(5): 1016-1032.
- Supelco. (1997). Methanolic H₂SO₄ (10% v/v) product specification. Report T497018A. Bellefonte, PA: Supelco.
- ^aSupelco. (1999). BF₃-methanol, 10% w/w product specification. Report T496125C. Bellefonte, PA: Supelco.
- ^bSupelco. (1999). Methanolic base, 0.5 N product specification. Report T497007A. Bellefonte, PA: Supelco.
- ^cSupelco. (1999). Methanolic HCl, 0.5N and 3N product specifications. Report T497099B. Bellefonte, PA: Supelco.
- Tsong TY. (1990). Electrical modulation of membrane proteins: Enforced conformational oscillations and biological energy and signal transductions. *Annual Reviews in Biophysics and Chemistry*, 19, 83–106.
- Wan PJ, Hron RJ, Dowd MK, Kuk MS, Conkerton EJ. (1995). Alternative Hydrocarbon Solvents for Cottonseed Extraction: Plant Trials. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72 (6): 661-665.
- Wolff RL. (1993). Further studies on artificial geometrical isomers of α -linolenic acid in edible linolenic acid-containing oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 219-224.
- Xin-an Z, Zhong H, Zhi-hong Z. (2010). Effects of pulsed electric field treatments on quality of peanut oil. *Food Control.* 21 (5): 611-614.
- Yeom HW, Zhang QH, Chism GW. (2002). Inactivation of pectin methyl esterase in orange juice by pulsed electric fields. *J. of Food Science*, 67 (6), 2154–2159.
- Yongguang Y, Yong H, Jingbo L. (2007). A novel protecting method for visual green color in spinach puree treated by high intensity pulsed electric fields. *Food Engineering.* 79:1256–1260.
- Yoruk R, Marshall MR. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. of Food Biochemistry.* 27:361-422.
- Yue L, García-González DL, Xiuzhu Y, van de Voort FR. (2008). Determination of Free Fatty Acids in Edible Oils with the use of a variable filter array IR Spectrometer. *J. of the American Oil Chemists' Society*, 85:599-604.
- Zemansky S. (1998). Física. *En: Ondas Mecánicas. Capítulo 13. Vol.2. Ed. 11. pp. 547-590.*
- Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F. (1984). Dielectric breakdown in cell membranes. *J. Biophysical*, 14:881–899.



- Zimmermann U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electro fusion. *Phys. Biochem. Pharmacol.* 105, 176-256.
- Zulueta A, Esteve MJ, Frasquet I, Frigola A. (2007). Fatty acid profile changes during orange juice-milk beverage processing by high-pulsed electric field. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 109 (1): 25-31.

May 2010, Volume 4, No.5 (Serial No.30)
Journal of Materials Science and Engineering, ISSN 1934-8959, USA



Study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Avocado Oils of the Varieties Hass, Criollo and Fuerte

José Alberto Ariza-Ortega, María Guadalupe Méndez-Ramos, Joel Díaz-Reyes, Raúl Jacobo Delgado-Macuil and Raúl René Robles-de-la-Torre

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda de San Juan Molino, Km. 1.5. Tepetitla, Tlaxcala 90700, México

Received: September 12, 2009 / Accepted: October 26, 2009 / Published: May 25, 2010.

Abstract: Edible oils are obtained by two procedures: by pressing the fruit and with organic solvents. However, there are reports that indicate that the use of solvents affect the quality of the fatty acids inducing the formation of *trans* isomers, which are banned in many countries because these consumed in large quantities are cause of cardiovascular diseases and increase the cholesterol. The purpose of this work is to apply FTIR to study the *trans* fatty acids in the avocado oils of the varieties Hass, Fuerte and Criollo extracted by centrifugation (AHC, AFC and ACC, respectively) and with hexane (AHH, ACH and AFH, respectively). The Infrared spectra were obtained with Fourier Transform Infrared (FTIR) in the mid region ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). The AHC, AFC and ACC Oils IR spectra show a very intensity band at the frequency 723 cm^{-1} , which corresponds to the functional group *cis* with a bending vibration mode. For the AFH the *trans* functional group was identified in the band sited at 968 cm^{-1} with a strong intensity. The centrifuge method is an alternative for obtaining avocado oil, because the degradation of the fatty acids is minimum and the green color is maintained.

Key words: Avocado oil, infrared spectroscopy, *trans* fatty acids.

1. Introduction

The Mexican avocado is a fruit recognized world-wide level due to the high quality of its nutrients [1]. The main problem of the producers is the short time of maturation and oxidation that presents this fruit, because of it has been demonstrated that the visual appearance a product is the first impact that takes the consumer to acquire it [2].

The avocado in Mexico has begun to industrialize in products such as paste and oil. The main avocado variety cultivated is the Hass, but other varieties such as the Fuerte and Criollo are also important, the last one is in danger of extinction because of it is being replaced in most of orchards by the variety Hass [3]. Various researchers have reported that avocado oil is similar to olive oil in many chemical compounds; however, the

avocado oil has a higher content of β -sitosterol (1-0.45%), vitamin E (130-200 mg/Kg) and chlorophyll (40-60 ppm) [4]. However, the high levels of chlorophyll in the avocado oil affect its stability and quality causing a rapid formation of oxidation products by means of singlet oxygen [5]. The green color in the oil has been identified by the consumers as desirable because it retains almost all the natural components of fruit.

Several investigations are focused on the extraction of oil, with the purpose of minimizing the adverse effects and to obtain a suitable product for the consumers. Generally, edible oils are extracted by drying, mechanical pressure at high temperatures and organic solvents. The use of organic solvents in a commercial scale has been discussed due to air pollution problems. In addition, the solvents affect the quality of the unsaturated fatty acids inducing the formation of *trans* isomers [6], which are banned in

Corresponding author: José Alberto Ariza-Ortega (1975-), male, professor, research fields: oils and fats. E-mail: ariza_ortega@yahoo.com.mx.

62 Study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Avocado Oils of the Varieties Hass, Criollo and Fuerte

several countries because if they are consumed in great quantities they could be cause of cardiovascular diseases and increase the cholesterol [7]. Therefore, alternative methods in the production of avocado oil are sought, they may include: centrifugation, supercritical fluids and combined methods. For fatty acids analysis from oils chemical and instrumental methods have been used. In the first one are included the acidity indices, peroxide and iodine, but no one of these are able to analyze the type and concentration of fatty acids. However, instrumental methods such as Infrared Spectroscopy not only allow knowing these parameters faster and in versatile way, but also they do not use chemical reagents and it is non-polluting [8]. The aim of this study was to determine the degree of deterioration of the unsaturated fatty acids in the avocado oils extracted by the centrifuge and Hexane methods using infrared spectroscopy.

2. Experimental Details

The Hass avocado oils were extracted by centrifugation and solvent methods. The centrifugation procedure was as to continuation describes: by 10 minutes the sample was centrifuged at 15.500 gravities and at 40 °C of temperature, these conditions were applied to Fuerte and Criollo avocado varieties. The solvent procedure was the method reported by AOAC at 70 °C for 4 h [9].

Fig. 1 shows images of the oils obtained for both techniques. In this figure, it is possible to observe how by the centrifugation procedure an oil of clear green

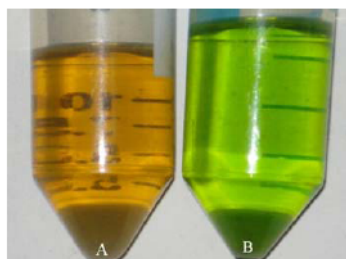


Fig. 1 Avocado oil variety hass extracted with solvent (A) and by centrifugation (B) procedures.

Table 1 Main vibrational frequencies of the commercial oils [10].

Frequency (cm ⁻¹)	Functional group	Vibrational mode
723	-HC=CH- (cis)	Bending
968	-HC=CH- (trans)	Bending
1654	-C=C- (cis)	Stretching
1746	-C=O (ester)	Stretching
3006	-HC=CH- (cis)	Stretching
3025	-HC=CH- (trans)	Stretching

color is obtained, whereas when the solvent procedure is used an oil of brown color is obtained.

Transform Infrared Spectrometer (FTIR Bruker Vertex-70) was used in the measurement mode called Attenuated Total Reflectance (ATR). The crystal used was a ZnSe of one reflection. And the exposure time was 150 seconds for each sample. Only 20 µL of each sample were placed in the ATR crystal. The infrared absorbance was measured in the mid-infrared region from 4000 to 600 cm⁻¹.

3. Results and Discussion

Guillen and Cabo [10] analyzed some edible oils and fats by Infrared vibrational Spectroscopy. In Table 1, their results are summarized.

The band at 723 cm⁻¹ is caused by the bending of the functional group *cis* [10, 11] and the band at 968 cm⁻¹ is associated to functional group *trans*, both in the bending symmetric mode outside the plane [10-13]. In the region of 1033-1163 cm⁻¹ is the carboxyl functional group with symmetrical vibration [10, 11, 14]. The group CH₃ in asymmetric vibration mode was found in the region of 1430-1470 cm⁻¹, and the absorption band from 1445 to 1485 cm⁻¹ corresponds to a methylene group in the bending vibration mode [10, 11, 15]. The vibrational bands above of 3000 cm⁻¹ are associated with the functional group *cis* at 3006 cm⁻¹ [10, 11] and to the functional group *trans* at 3040 cm⁻¹ [15]. Fig. 2 shows the absorbance spectra of the avocado oil varieties Hass, Fuerte and Criollo, obtained by centrifugation and hexane methods.

Avocado oils spectra are very similar, even though small differences occur in the intensities of their bands and the absorbance peak frequency that makes to them

Study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Avocado Oils of the Varieties Hass, Criollo and Fuerte

63

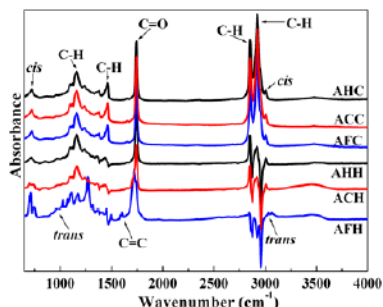


Fig. 2 Infrared spectra of avocado oil varieties hass, fuerte and criollo obtained by centrifugation and hexane methods (AHC, AFC and ACC, AHH, AFH and ACH, respectively).

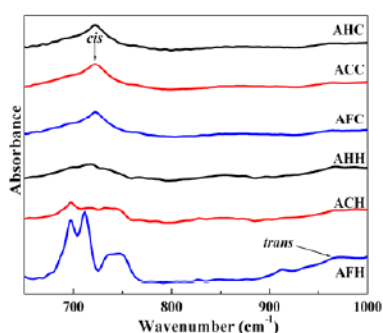


Fig. 3 Infrared spectra avocado oils for the region from 600 to 1000 cm^{-1} .

different in each case. It should be noted that due to these differences, the nature and quality of the product can be determined [10]. In the IR spectra shown in Fig. 2 present almost all peaks in strong or weak intensity predicted by Refs. [10, 11]. In fact the *trans* peak at 968 cm^{-1} is possible observe in all avocado oils samples, but the peak at 3040 cm^{-1} is not present in our avocado oils samples. One can see that there are differences of intensity in the regions from 600 to 1000 cm^{-1} and from 3000 to 3050 cm^{-1} in the IR spectra. In Figs. 3 and 4, these regions are analyzed at detail. Fig. 3 shows an intense band at 725 cm^{-1} that was associated to the functional group *cis*, this peak is more intense for the avocado oils extracted by centrifugation (AHC, ACC and AFC). The *trans* peak at 968 cm^{-1} is present only in the avocado oils samples extracted by Hexane solvent, in fact, it is much better to be defined in hass and fuerte

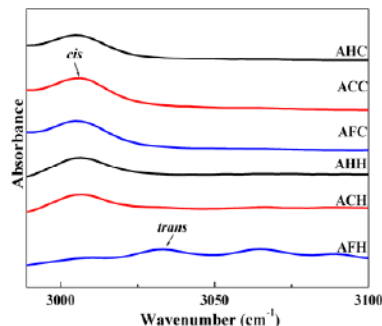


Fig. 4 Infrared spectra avocado oils for the region from 3000 to 3100 cm^{-1} .

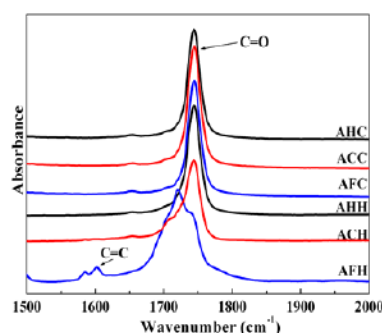


Fig. 5 Infrared spectra of the Avocado Oils in the region from 1500 to 2000 cm^{-1} that show the carboxylic acid functional group.

varieties (AHH and AFH). Privett et al. [16], Chan and Levett [17] reported that *trans* and *cis* systems absorb close to 988 and 950 cm^{-1} , respectively. According with these researchers, one can say that the oils (AHH and AFH) present fatty acids with chemical bonds of conjugated diene. Therefore, they are more reactive to the addition of free radicals.

For the other region, 3000 to 3050 cm^{-1} , the first peak close to 3006 cm^{-1} is associated to the stretching vibration mode of the *cis* position in the oils extracted by the two different methods used in this work (Fig. 4). It is also possible to observe a small spectral shift and less intense peaks in the case of the avocado oil from the variety Fuerte. However, none of the avocado oils extracted by centrifugation shows the functional group in the *trans* mode at 3040 cm^{-1} in agreement with

64 Study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Avocado Oils of the Varieties Hass, Criollo and Fuerte

Coates [15]. The sample that shows the *trans* stretching peak was the AFH, which is shifted to 3033 cm^{-1} .

Finally, the double bond region from 1500 to 2000 cm^{-1} was analyzed (Fig. 5). A peak was only observed at the frequency of $1743\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ in all oils. This peak is indicative of the ester functional group with a stretching vibration mode. For the avocado oil variety Fuerte a shift to higher frequencies was observed and the intensity increase approximately 15% for the C=O peak. Yue et al. studied the degradation of triacylglycerols in olive virgin oils and they found an increase in the intensity or the peak associated to the C=O bond at $1726\text{-}1748\text{ cm}^{-1}$ (region of carboxylic acid functional group) due to the formation of free fatty acids [18]. Therefore the shift and increase in intensity observe in the Fuerte oil spectrum for the C=O bond, may be associated with deterioration of triacylglycerols by the effect of solvent extraction.

The only sample that shows the peak associated to the C=C bond is the Fuerte Avocado oil extracted by solvent (Fig. 5).

4. Conclusions

The Centrifugation method can be an option for the extraction of Avocado Oil because the treatment does not increase significant deterioration of unsaturated fatty acids and green color is maintained. In addition, the FTIR analysis identified a band of lower absorption associated to fatty acids with *trans* isomer in the band 968 cm^{-1} for the samples of the avocado oils extracted by centrifugation. The sample that shows a higher concentration of *trans* was the Fuerte variety Avocado oil extracted by Hexane solvent.

References

- [1] R. Schwentesius, M.A. Gómez, Supermarkets in Mexico: impacts on horticultural systems, *Journal of Development Policy Review* 20 (2002) 487-502.
- [2] J.A. Guerrero-Beltrán, B.G. Swanson, G.V. Barbosa-Cánovas, Shelf life of HHP-processed peach puree with antibrowning agents, *Journal of Food Quality* 28 (2005) 479-491.
- [3] J. Sánchez-Pérez, Recursos genéticos de Aguacate (*Persea americana* Mill.) y Especies afines en México, *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5 (1999) 7-18.
- [4] O.B. Ashton, O.M. Wong, T.K. Mcghee, R. Vather, Y. Wang, C. Requejo-Jackman, P. Ramankutty, A.B. Woolf, Pigments in avocado tissue and oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 10151-10158.
- [5] M.J. Werman, I. Neeman, Oxidative stability of avocado oil, *Journal of the American Oil Chemists Society* 63 (1986) 355-360.
- [6] M.A. Ortiz, L. Dorantes, J. Galindez, R.I. Guzmán, Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*persea americana* mill.) oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 2216-2221.
- [7] A.D. Mooradian, M.J. Haas, K.R. Welmeier, N.C.W. Wong, Obesity-related changes in high-density lipoprotein metabolism, *Journal of Obesity* 16 (2008) 1152-1160.
- [8] F.R.V.D. Voort, A.A. Ismail, J. Sedman, G. Emo, Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Journal American Oil Chemistry Society* 71 (1994) 243-253.
- [9] A.O.A.C. Association Official, Analytical Chemists, Food Composition, Natives, Natural Contaminants, Oils and Fats. A.O.A.C. E.U.A. (2006) 963-967.
- [10] M.D. Guillén, N. Cabo, Relationships between the composition of edible oils and Lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier Transform Infrared Spectra, role of some bands of the fingerprint region, *Journal of Agricultural and Food, Chemistry* 46 (1998) 1789-1793.
- [11] H. Yang, J. Irudayaraj, M.M. Paradkar, Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman Spectroscopy, *Journal of Food Chemistry* 93 (2005) 25-32.
- [12] D. Firestone, L.P. Bouliere, Determination of isolated *trans* isomers by Infrared Spectroscopy, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 48 (1965) 437-443.
- [13] R.T. Sleeter, M.G. Matlock, Automated quantitative analysis of isolated (nonconjugated) *trans* isomers using Fourier Transform Infrared Spectroscopy incorporating improvements in the procedure, *Journal American Oil Chemistry Society* 66 (1989) 121-127.
- [14] F.A. Ahmed, R.O. Osman, H.M. Nomany, S.S. Saadany, Infrared and Ultraviolet Spectra of some lipids of different structures, *Revista Grasas y Aceites* 37 (1986) 250-253.
- [15] J. Coates, Oils and Fats, Interpretation of Infrared Spectra, a practical approach, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons Ltd., 2000, pp. 10815-10837.
- [16] O.S. Privett, W.O. Lundberg, N.A. Khan, W.E. Tolberg, D.H. Wheeler, Structure of hydroperoxides obtained from autoxidized methyl linoleate, *Journal American Oil Chemistry Society* 30 (1953) 61-66.
- [17] H.W. Chan, G. Levett, Autoxidation of methyl linolenate: analysis of methyl hydroxylinolenate isomers by high performance liquid chromatography, *Journal of Lipids* 12 (1977) 837-840.
- [18] L. Yue, D.L. García-González, Y. Xiuzhu, F.R.V.D. Voort, Determination of free fatty acids in edible oils with the use of a variable filter array IR Spectrometer, *Journal of the American Oil Chemists Society* 85 (2008) 599-604.

June-2010, Volume 4, No.6 (Serial No.31)
Journal of Materials Science and Engineering, ISSN 1934-8959, USA



Analysis Spectroscopic by Fourier Transform Infrared of Butter Made from Vegetable Oil and Pure Cow Milk Subjected at Thermo-Oxidation Processes

José Alberto Ariza-Ortega, Joel Díaz-Reyes, Raul Rene Robles-De-La-Torre and Raul Jacobo Delgado-Macuil
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda de San Juan Molino, Km. 1.5. Tepetitla, Tlaxcala 90700, México

Received: September 12, 2009 / Accepted: October 13, 2009 / Published: June 25, 2010.

Abstract: During the hydrogenation process of vegetable, oils originates isomer with *trans* fatty acids (TFA). Various investigations have been made to know the effect of TFA on health and it has been reported in the literature that if they are consumed in large proportions increases low density lipoprotein causing an imbalance in cholesterol, which causes cardiovascular problems. As a result, some countries have legislated and regulated the TFA content in foods. The purpose of this work is to study the FA of the butters produced from hydrogenated vegetable oil (MV) and pure cow's milk (MPV) with and without oxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectroscopy. The butters were acquired at a local supermarket and oxidized at 200 °C by 30 min. Infrared Radiation (IR) measurements were carried out in the Attenuated Total Reflectance mode and in the region of 400-4000 cm⁻¹. IR spectra of the two butters with and without oxidation present absorption bands around 968 and 3006 cm⁻¹, which are characteristic of the functional groups *trans* and *cis*, respectively. The MV presented a greater intensity; in addition, it was more stable to heat treatment. With FTIR is possible to define precisely the peak associated with the functional group *cis*.

Key words: Butter, *trans* fatty acids, infrared spectroscopy, thermo-oxidation.

1. Introduction

Fats and edible oils during the thermal process originate various chemical reactions that lead to the formation of hydroperoxides, volatile and aromatic compounds [1]. Furthermore, when the temperature increases above of 220 °C *trans* fatty acids are generated, as it was reported by Eder [2], who investigated the formation of *trans* fatty acids with infrared spectroscopy in unsaturated oils and indicated that the formation of *trans* fatty acids is 1% or less per hour when deodorizes at 240-250 °C. *Trans* fatty acids are also formed during the hydrogenation process of vegetable oils up to 60% [3]. Various investigations carried out to study the effect of *trans* fatty acids on health have reported that these

fatty acids consumed in high quantities causing an imbalance in cholesterol, situation more harmful than the consumption of saturated fatty acids [4]. *Trans* fatty acids and other compounds as cytotoxic α and β -unsaturated aldehydes are considered as potential promoters of degenerative diseases such as Cancer, Atherosclerosis, and Alzheimer's disease, as these components can be absorbed through fried foods made from oxidized fats and oils [5].

Edible oils and fats have been analyzed using chemical and instrumental methods. Firstly, the main values are acidity, iodine and peroxide. Secondly, stands gas chromatography and infrared spectroscopy [6] are the main techniques. However, the chemical methods do not describe the total fat content or type of glycerides of fatty acids and also are expensive; they carried out in a long time and require great amounts of

Corresponding author: José Alberto Ariza-Ortega (1975-), male, master in advanced technology, research fields: oils and fats. E-mail: ariza_ortega@yahoo.com.mx.

Analysis Spectroscopic by Fourier Transform Infrared of Butter Made from Vegetable Oil and Pure Cow Milk Subjected at Thermo-Oxidation Processes 33

reagents [7]. The use of spectroscopic techniques can minimize these problems, because these methods are fast, the analysis time is short, and a great number of samples could be analyzed. Previous studies have shown that the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) is useful to analyze fats and oils by their molecular composition, because these molecules give characteristic bands of functional groups in the spectral region that are identifiable and quantifiable [8]. Therefore, the purpose of this study was analyzed using FTIR spectroscopy two types of butters subjected to thermo-oxidative processes.

2. Experimental Details

Two different butters were used, which were produced from vegetable oil (MV) and pure cow milk (MPV). Butters were obtained from a local supermarket of the Puebla State, in Mexico. It took 20 g of each sample and analyzed with and without thermo-oxidative treatment, which was performed at 220 °C by 30 min. The formation of *trans* fatty acids in butters were obtained by comparing using a standard of *trans* fatty acid. The standard was elaidic acid of chromatographic grade (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri). The Infrared Spectra were recorder in a Bruker Vertex-70 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) in the mid region (4000-400 cm^{-1}) using the Attenuated Total Reflectance (ATR) measurement mode. It was placed 20 μL of each sample in the ATR crystal.

3. Results and Discussion

Table 1 summarizes the main absorption bands and the functional group associated to the vibrational mode observed [9]. In Table 1, it is possible to observe that there are two regions of interest; the region below 1000 cm^{-1} and the region from 3000 to 3100 cm^{-1} . To make a comparison, a sample of the standard elaidic acid was initially analyzed, which corresponds to the *trans* form of oleic acid. In Fig. 1, we can identify the associated peaks with the cross functional group of the standard,

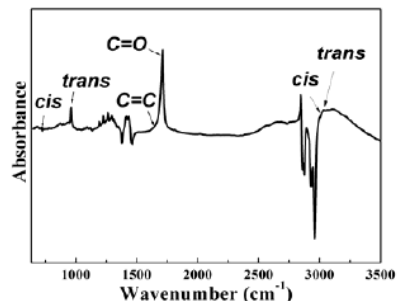


Fig. 1 Elaidic acid standard at 100 mg/mL.

as it was reported in Table 1.

Fig. 1 shows the main regions of the functional groups for the standard; one will notice that the peaks associated with the functional group *trans* present a higher intensity. Guillén and Cabo [9] studied various vegetable oils and fats and some bands of the main features functional groups were found at 723 and 968 cm^{-1} corresponding to the functional groups *cis* and *trans* in bending vibration mode, respectively. In the region of 1746 cm^{-1} was located the ester functional group with a stretching vibration mode.

In spectra of Figs. 2 and 3, it is possible to observe an intense band in the region of 725 cm^{-1} associated to the *cis* functional group, the peak centered at 968 cm^{-1} is associated to the functional group *trans*. Coates [10] reported that the band at 723 cm^{-1} is caused by the functional group *cis* in the bending mode and the peak at 968 cm^{-1} is caused by the functional group *trans* in the mode of symmetric bending out of plane. Moreover, in the region of 1033 to 1163 cm^{-1} is the functional group carboxyl with symmetrical vibration, in the region of 1430-1470 cm^{-1} was found a asymmetric vibration mode associates to group CH_3 , and absorption band between 1445 to 1485 cm^{-1} corresponds to the methylene group with a bending vibration mode. The butters without heat treatment showed IR spectra with a higher intensity in the region of 3400 cm^{-1} related to the functional group OH in a symmetric mode of vibration, unlike the thermal treatment.

34 Analysis Spectroscopic by Fourier Transform Infrared of Butter Made from Vegetable Oil and Pure Cow Milk Subjected at Thermo-Oxidation Processes

Table 1. Relationship of functional groups of the fats and oils committed its wave number and mode of vibration.

Wavenumber	Functional group	Vibration mode
723	-HC=CH- (<i>cis</i>)	Bending
968	-HC=CH- (<i>trans</i>)	Bending
1654	-HC=CH- (<i>cis</i>)	Stretching
1746	-C=O (ester)	Stretching
3006	-HC=CH- (<i>cis</i>)	Stretching
3025	-HC=CH- (<i>trans</i>)	Stretching

The IR spectra of fats seem to be similar. The regions were analyzed to determine the presence of forms *cis* and *trans* fatty acids. It should be noted that due to this difference, we can determine their nature and quality of the product.

By analyzing the region below 1000 cm^{-1} (Figs. 4 and 5), it can be seen that all IR spectra show the presence of the peak associated with the *cis* form at 720 cm^{-1} and the peak associated with the *trans* form at 968 cm^{-1} . The butter produced from pure cow's milk shows an increased presence of *trans* fatty acids, since its peaks centered at 968 cm^{-1} showed the highest intensity, because they occur naturally in ruminant animals through a partial biohydrogenation of unsaturated fatty acids, which is made by bacteria in the rumen and are about 4-6% [11].

By contrast the absorbance spectrum of the butter obtained from the vegetable oil does not present the well-defined peak at 968 cm^{-1} . To corroborate this one, the region was analyzed between 3000 and 3100 cm^{-1} , from the IR spectra shown in Figs. 2 and 3.

Figs. 6 and 7 show very clearly the peak around 3006 cm^{-1} associated with functional group *cis* with a stretching vibration mode. The butter produced from vegetable oil presented a higher intensity in this region because they are made with hydrogenated vegetable oil and they have a 93.2% of unsaturated fatty acids compared to butter made from cows' milk with 22.2% [12].

It should be noted that in Figs. 6 and 7, it is possible to observe the peaks between 3020-3040 cm^{-1} associated to the *trans* functional group in the butter produced from vegetable oil. It was identified by FTIR

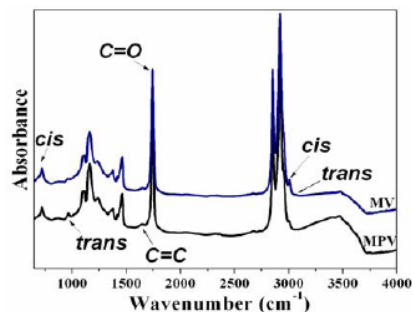


Fig. 2 IR spectra of the butters produced from vegetable oils (MV) and Pure Milk Cow (MPV).

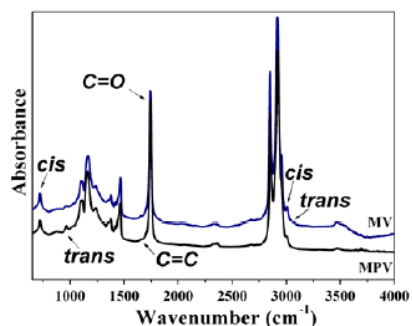


Fig. 3 Spectra of the two types of butter under the thermo-oxidative process at 200 °C.

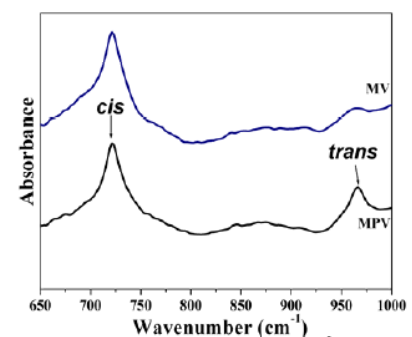


Fig. 4 Spectra of butter at 650-1050 cm^{-1} without heat treatment.

spectroscopy the presence of unsaturation in the butter of common use and shows that the butters with the lowest degree of unsaturation are prepared from cow milk.

Analysis Spectroscopic by Fourier Transform Infrared of Butter Made from Vegetable Oil and Pure Cow Milk Subjected at Thermo-Oxidation Processes 35

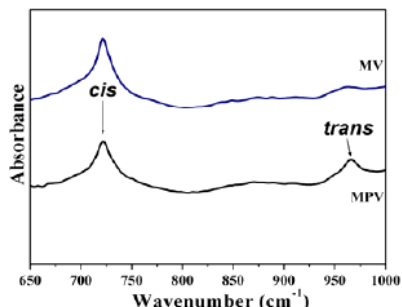


Fig. 5 Spectra of butter at 650-1050 cm^{-1} at 200 $^{\circ}\text{C}$.

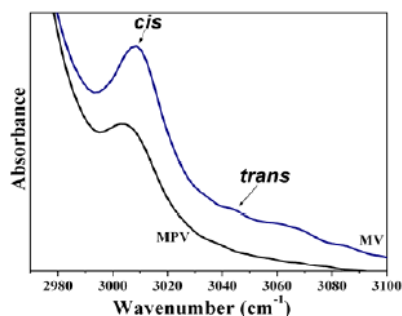


Fig. 6 Expansion of the spectra in the region of 2970-3050 cm^{-1} .

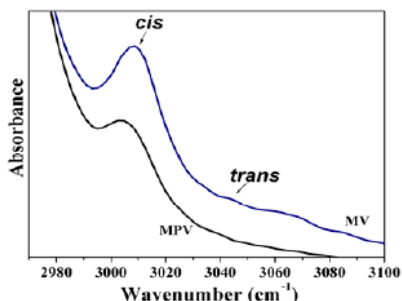


Fig. 7 Spectra of the butter with heat treatment measured in the region of 2970 to 3050 cm^{-1} .

On the other hand, the peaks that determine the quality or degree of unsaturation in the butters studied in this work were found in the wavenumbers of 725, 968, 3006 and 3040 cm^{-1} .

4. Conclusions

The FTIR spectroscopy is an optional technique to determine the presence of unsaturation in butters.

Moreover, the data presented here are informative and helpful to estimate the total intake of various fatty acids groups.

References

- [1] C. Ceballos, M.J.M. Moyano, I. Vicario, J.F. Heredia, Chromatic evolution of virgin olive oil submitted to an accelerated oxidation, *Journal Association Oil Chemistry Society* 80 (2003) 257-262.
- [2] S.R. Eder, Über die Bildung von artefakten bei der dämpfung von speiseölen und-fetten (development of artifacts during processing of food oils and fats) fette seifen anstrichmittel, *Journal Fat-Science Technology* 84 (1982) 136-141.
- [3] CODEX Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas Alimentarias. Comité del CODEX sobre Nutrición y Alimentos para regimenes especiales 26^a reunión. Bruckenforum Bonn, Friedrich-Breuer-Strasse 17, Bonn, Alemania 1-5 de noviembre del 2004, Documento de debate sobre una definición de ácidos grasos trans, Elaborado por Malasia y Dinamarca, 2004, pp. 1-6.
- [4] A. Katz, Trans fatty acid and sudden cardiac death, *Journal Circulation* 105 (2002) 669-671.
- [5] M.D. Guillén, E. Goicoechea, Detection of primary and secondary oxidation products by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in sunflower oil during storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 10729-10736.
- [6] R.R. Allen, M.W. Formo, R.G. Krishnamurthy, G.N. McDermott, A.F. Norris, O.V. Sonntag, *Physical properties of Fats and Fatty Acids*, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, John Wiley and Sons, 1982, pp. 666-679.
- [7] F.R. Van de Voort, A.A. Ismail, J. Sedman, G. Emo, Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Journal American Oil Chemistry Society* 71 (1994) 243-253.
- [8] M.D. Guillén, A. Ruiz, Formation of hydroperoxy and hydroxyalkenals during thermal oxidative degradation of sesame oil monitored by proton NMR, *European Journal Lipid Science Technology* 106 (2004) 680-687.
- [9] M.D. Guillén, N. Cabo, Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier Transform Infrared Spectra, role of some bands of the fingerprint region, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 1789-1793.
- [10] J. Coates, *Oils and Fats, Interpretation of Infrared Spectra, a Practical Approach in Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons Ltd, 2000, pp. 10815-10837.
- [11] F. Destailats, M. Wispelaere, F. Jofree, P. Golay, B. Hug, F. Guffrida, L. Fauconnot, F. Dionisi, Authenticity of milk fat analysis of triacylglycerols application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils, *Journal of Chromatography* 1131 (2006) 227-234.
- [12] H.K. Byung, R.I. Shewfelt, H. Lee, C.C. Akoh, Sensory evaluation of butterfat-vegetable oil blend spread prepared with structured lipid containing canola oil and caprylic acid, *Journal of Food Science* 70 (2005) 406-412.



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msebPhysical properties characterization of WO₃ films grown by hot-filament metal oxide depositionJ. Díaz-Reyes^{a,*}, R.J. Delgado-Macuil^a, V. Dorantes-García^b, A. Pérez-Benítez^c, J.A. Balderas-López^d, J.A. Ariza-Ortega^a^a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda de San Juan Molino, Km. 1.5, Tepetitla, Tlaxcala, 90700, Mexico^b Preparatoria "Simón Bolívar" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 Oriente 408, Col. Centro, Atlixco, Puebla, C. P. 74200, Mexico^c Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla, Puebla, C. P. 72570, Mexico^d Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Avenida Acueducto S/N, Col. Barrio la Laguna, Ticomán, Del. Gustavo A. Madero, México, D.F. 07340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2009

Received in revised form 19 March 2010

Accepted 25 March 2010

Keywords:

Compound semiconductors

Hot Filament Metal Oxide Deposition

Novel Materials and Technological

Advances for electrochromics

Semiconductors growth

WO₃ semiconductors

ABSTRACT

WO₃ is grown by hot-filament metal oxide deposition (HFMOD) technique under atmospheric pressure and an oxygen atmosphere. By X-ray diffraction obtains that WO₃ presents mainly monoclinic crystalline phase. The chemical stoichiometry is obtained by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). The IR spectrum of the as-grown WO₃ presents broad peaks in the range of 1100 to 3600 cm⁻¹. A broad band in the 2200 to 3600 cm⁻¹ region and the peaks sited at 1645 and 1432 cm⁻¹ are well resolved, which are originated from moisture and are assigned to ν(OH) and δ(OH) modes of adsorbed water and the corresponding tungsten oxide vibrations are in infrared region from 400 to 1453 cm⁻¹ and around 3492 cm⁻¹, which correspond to tungsten-oxygen (W–O) stretching, bending and lattice modes. The Raman spectrum shows intense peaks at 801, 710, 262 and 61 cm⁻¹ that are typical Raman peaks of crystalline WO₃ (m-phase) that correspond to stretching vibrations of the bridging oxygen, which are assigned to W–O stretching (ν) and W–O bending (δ) modes, respectively. By transmittance measurements obtains that the WO₃ band gap can be varied from 2.92 to 3.13 eV in the investigated annealing temperature range.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metallic oxides are important materials from the standpoint of both fundamental and applied science. Particularly, tungsten and molybdenum oxide films have been the focus of extensive scientific investigations due to their prospective technological applications in electrochromic devices [1], gasochromic sensors [2] and electrocatalysis [3]. However, their most intensively investigated property so far is the electrochromism. The characteristics of WO₃ films make them suitable for electrochromic (EC) devices or windows [4]. Depending on the deposition conditions and techniques, films may present considerably different structural, optical and electrical behaviours, and consequently different EC behaviours. The sputtering technique is the most widely investigated and large-scale deposition set available. Sputtered WO₃ films deposited on substrates are known to be amorphous or polycrystalline. Using tungsten (W) targets in direct current (D.C.) magnetron reactive

sputtering, thin film properties can be improved by controlling the reactive gas atmosphere.

In recent years, there have been strong development efforts in the area of EC devices because of various potential applications such as architectural glazings, automobile and building sun-roofs, displays for light regulation and energy saving, etc. [5,6]. Electrochromic devices have therefore attracted extensive attention among researchers involved in thin film preparation [7].

As it is known, the structural quality and components of the material dominate the physical properties of the thin films. Both IR and Raman spectroscopy are very powerful tools to analyze the structure, phase and components of materials such as tungsten oxides. They are suitable to study the vibration and rotation of molecules. With these techniques, it is possible not only to identify different oxide phases but also to detect intercalated H₂O. Such studies allow obtaining fundamental information about WO₃ films for their applications. Granqvist had given brief statements about vibrations in the range of 400 to 1200 cm⁻¹ [8]. The Raman vibration mode is related to the molecular structures by comparison with standard compound spectra or with Raman theoretical calculations. The use of Raman scattering to study thin film has

* Corresponding author.

E-mail address: jdiazr2001@yahoo.com (J. Díaz-Reyes).

been reported [9]. The accuracy, reliability, and interpretation of the Raman spectra of tungsten oxide catalysts has been discussed [10].

The purpose of this work is to characterize the material deposited by the alternative growth technique, which is called hot-filament metal oxide deposition (HFMOD), using a metallic filament heated in a rarefied oxygen atmosphere. This growth technique has some advantage compared with the conventional growth techniques, it is easily implemented in the laboratory and it is not expensive. The film is formed on a substrate positioned near the filament and the deposition rate is controlled by the filament temperature and the oxygen pressure. Both the thermochemistry of the process and the kinetics of film formation are currently under investigation. It is clear, however, that the film is formed from volatile Me_xO_y precursors, where Me is the metal, generated on the heated tungsten surface from reactions between oxygen and tungsten. The investigations so far carried out in our laboratory show that the films can be deposited with a good stoichiometric control, with relatively high deposition rates and present good adhesion to both metallic and dielectric substrates. The characterization of the deposited material is carried out by XPS, X-ray, FTIR and Raman spectroscopy, transmittance and photoluminescence.

2. Experimental details

The thin films are grown by Hot Filament Metal Oxide Deposition (HFMOD) technique at atmospheric pressure on corning glass at room temperature; its main characteristics have been reported in the literature [11], the tungsten (W) filament was obtained from a single light bulb. The filament is resistively heated by an AC supply. Oxygen is admitted to the growth chamber via an electronic mass flowmeter. From reactions between oxygen and the heated metal filament, volatile oxide species, W_xO_y , can be formed, condensing on a nearby substrate. Substrate temperature is measured using a Chromel–Alumel thermocouple. For determining the chemical stoichiometry used X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). For the XPS analyses, a hemispherical spectrometer using the unmonochromatized $K\alpha$ and X-ray line of aluminum was employed. To investigate the possible tungsten valence states, the 4f-doublet peak or the 3d-doublet peak, respectively, were fitted with Gaussian peaks corresponding to known bonding states of tungsten and oxygen. The crystalline phase and structure were determined with a Bruker D8 Discover diffractometer using the copper $K\alpha$ radiation (1.5406 Å) at 40 kV and 40 mA with parallel beam geometry. The infrared spectroscopy analysis was performed using a Bruker Infrared Spectrometer Vertex 70 in the Diffuse Reflectance (DR) mode, this same equipment was used for making the transmittance measurements. Raman scattering experiments were performed at room temperature using the 6328 Å line of a He–Ne laser at normal incidence for excitation. The laser light was focused to a diameter of 6.0 μm at the sample using a 50 \times (numerical aperture 0.9) microscope objective. The nominal laser power used in these measurements was 20 mW. Care was taken to avoid the heating of the sample inadvertently to the point of changing its Raman spectrum. Scattered light was analyzed using a micro-Raman system (Lambdam model of Dilor), a holographic notch filter made by Kaiser Optical System, Inc. (model superNotch-Plus), a 256 \times 1024-pixel CCD used as detector cooled to 140 K using liquid nitrogen, and two interchangeable gratings (600 and 1800 g/mm). Typical spectrum acquisition time was limited to 60 s to minimize the sample heating effects discussed above. Absolute spectral feature position calibration to better than 0.5 cm^{-1} was performed using the observed position of Si which is shifted by 521.2 cm^{-1} from the excitation line. Photoluminescence spectra were taken with a solid state laser 407 nm with 60 mW as excitation source and a SCIENCETECH 9040 monochromator was used to perform the

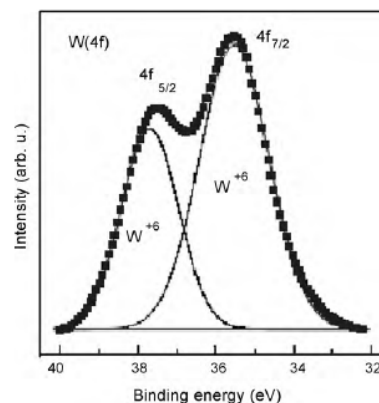


Fig. 1. W(4f) core level spectra of as-deposited WO_3 thin films.

sweep of wavelength at room and low temperature in a cryostat CRYOGENICS.

3. Results and discussion

The elemental and chemical characterizations of the WO_3 films were performed by XPS. Fig. 1 shows the W(4f) core level spectra recorded on the as-deposited WO_3 sample, and the results of its fitting analysis. To reproduce the experimental data, one doublet function was used for the W(4f) component. This contains $W(4f_{7/2})$ at 35.6 eV and $W(4f_{5/2})$ at 37.8 eV with a full-width at half-maximum (FWHM) of 1.75 eV. The area ratio of these two peaks is 0.75, which is supported by the spin–orbit splitting theory of 4f levels. Moreover, the structure was shifted by 5 eV towards higher energy relative to the metal state.

It is thus clear that the main peaks in the XPS spectrum are attributed to the W^{6+} state on the surface [1,12], indicating that the film is composed of stoichiometric WO_3 . In stoichiometric WO_3 , the six valence electrons of the tungsten atom are transferred into the oxygen p-like bands, which are thus completely filled. In this case, the tungsten 5d valence electrons have no part of their wavefunction near the tungsten atom and the remaining electrons in the tungsten atom experience a stronger Coulomb interaction with the nucleus than in the case of a tungsten atom in a metal, in which the screening of the nucleus has a component due to the 5d valence electrons. Therefore, the binding energy of the W(4f) level is larger in WO_3 than in metallic tungsten. If an oxygen vacancy exists, the electronic density near its adjacent W atom increases, the screening of its nucleus is higher and, thus, the 4f level energy is expected to be at a lower binding energy [1].

By increasing the annealing temperature up to 400 °C, it was observed that the position of the W(4f) peaks did not change appreciably, which indicates that WO_3 has not lost its chemical stoichiometry in the annealing temperature range. But for WO_3 thin film annealed at 500 °C, the W(4f) peaks moved to a lower binding energy so that the $W(4f_{7/2})$ position was observed at 35.0 eV. This behavior can be due to the presence of water in our layers which evaporates during annealing. Then, this effect can be related to oxygen vacancies at this high annealing temperature and the formation of W^{5+} .

By X-ray diffraction obtains that the as-grown WO_3 films present mainly two crystalline phases: monoclinic and orthorhombic. The main crystalline structure is monoclinic crystalline phase that is shown in Fig. 2 and whose lattice parameters were cal-

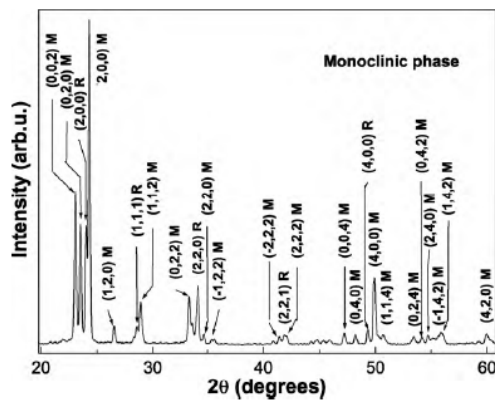


Fig. 2. XRD diffractograms of WO_3 films deposited by heating resistive on glass substrates.

culated using the software DICVOL04, obtaining the following lattice parameters values: $a = 3.8465 \text{ \AA}$, $b = 7.5449 \text{ \AA}$, $c = 7.3066 \text{ \AA}$, and $\beta = 90.924^\circ$ and its unit lattice volume is about 212.02 \AA^3 . Fig. 3 illustrates the surface morphology of typical as-deposited WO_3 film obtained by SEM-EDS, which reveals the uniform roughness surface nature of the layers grown by HFMOD.

Due to IR has high sensitivity in the presence of the OH groups, direct experimental proof of the presence of water in the as-deposited WO_3 films can be deduced from the diffuse reflectance (DR). This is an important fact due to the role-played by water in the EC mechanism. Fig. 4 shows a DR spectrum of as-deposited WO_3 powder, which presents bands in the region of 1000 to 3600 cm^{-1} . There is a broad band in the 2200 to 3800 cm^{-1} region, which is composed by six peaks. These bands and the two ones sited at 1645 and 1432 cm^{-1} are originated from moisture and are assigned to $\nu(\text{OH})$ and $\delta(\text{OH})$ modes of adsorbed water. Especially from peak sited at 1432 cm^{-1} it is deduced that an OH group is strongly bonded to either water molecules or to surface oxygen atoms [13,14]. The main WO_3 vibrations are found in the infrared region between 500 and 1453 cm^{-1} and at the band centred about 3492 cm^{-1} that correspond to tungsten–oxygen (W–O) stretching, bending and lattice modes. Besides, one finds also some relatively strong and weak bands sited at 528 , 700 , 893 , 962 and 1041 cm^{-1} , see inset in Fig. 3. The 528 cm^{-1} band is assigned to the strong coupling of the oxide lattice in hydrated $WO_3 \cdot nH_2O$ material [15,16]. The

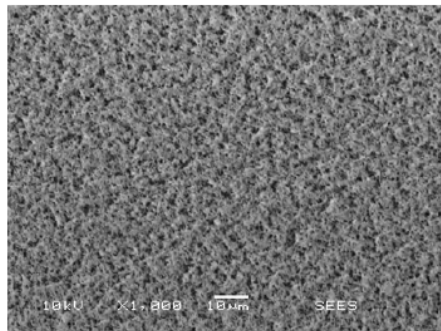


Fig. 3. Surface morphology obtained by SEM of an as-deposited WO_3 film.

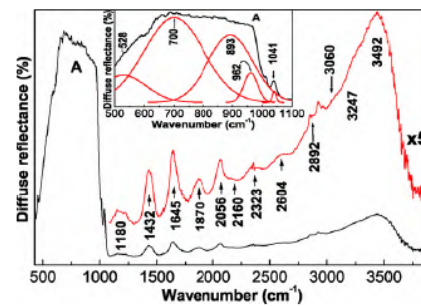


Fig. 4. Diffuse Reflectance spectrum of a typical WO_3 film deposited at RT. The inset illustrates an amplification of peak A for showing its vibrational components.

band sited at 700 cm^{-1} is assigned to the out of plane deformation tungsten–oxygen–tungsten (W–O–W) mode, when hydrogen atom is located at a coplanar square of oxygen atoms [16]. The relatively weak band sites at 1041 cm^{-1} , which is assigned to the plane deformational (bending) tungsten–Hydroxyl radical (W–OH) mode, this peak is assigned to $\delta(\text{OH})$ in W–OH group [15], because of the creation of weakly bonded W–OH groups are formed in the as-grown film. In the frequency range from 500 to 1100 cm^{-1} , the shoulder sited around 962 cm^{-1} is assigned to W=O terminal modes of surface grains [17] and W–O–W bridging mode situated at 893 cm^{-1} .

Vibration mode at 1432 cm^{-1} has been attributed to a stretching vibration of OH groups, while 1645 cm^{-1} vibration comes from a bending mode of adsorbed H_2O . Finally, 1870 and 2056 cm^{-1} vibrations are due to overtones or combinations of lower frequency vibrations. The band near 1870 cm^{-1} might correspond to the first overtone of the absorption detected around 962 cm^{-1} , and the band at 2056 cm^{-1} can be assigned to the first overtone of the weak band observed at 1041 cm^{-1} . The rest peaks have not been identified in the literature.

Raman spectrum of as-deposited WO_3 film is shown in Fig. 5a, which is sited at range of 70 to 1100 cm^{-1} . As is known the Raman bands of the transition metal (M) oxide in the range of 950 to 1050 cm^{-1} can be assigned to a symmetric stretching mode of short terminal M=O bands (metal double chemical bond oxygen), $\nu_s(\text{M=O terminal})$. The bands in the range of 750 to 950 cm^{-1} are attributed to either the antisymmetric stretch of M–O–M bonds (i.e., $\nu_{as}[\text{M–O–M}]$) or the symmetric stretch of (–O–M–O–) bonds (i.e., $\nu_s[\text{–O–M–O–}]$) [18]. As one observes in figure there is no feature at highest frequency to the peak of 801 cm^{-1} in the Raman spectrum, which is good evidence of the crystalline quality of the

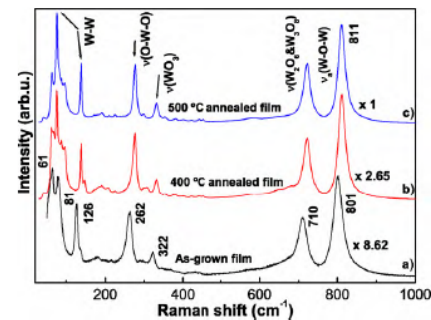


Fig. 5. Raman spectra of WO_3 films as function of the annealing temperature.

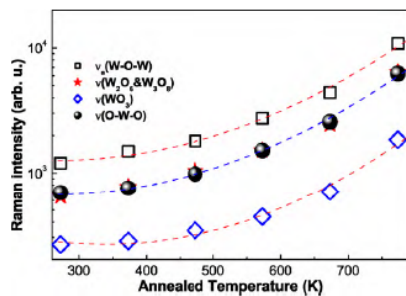


Fig. 6. Raman Intensity of the main peaks as function of the annealing temperature.

WO₃ film deposited by HFMOD, since WO₃ crystal does not have any double bond [18,19].

The Raman spectrum of the as-deposited WO₃ film presents seven main vibrational bands at range of 70 to 1000 cm⁻¹ sited at 801, 710, 322, 262, 126, 81 and 61 cm⁻¹. The intense peaks centred at 801 and 710 cm⁻¹ are typical Raman peaks of crystalline WO₃ of monoclinic phase (m-phase), which correspond to the stretching vibrations of the bridging oxygen [20,21] and these are assigned to W–O stretching (ν), W–O bending (δ) and O–W–O deformation (γ) modes, respectively [16,22]. Rougier et al. [13] proved the above mentioned results. Regragui reported that observed peaks at the range of 90 to 300 cm⁻¹ in his Raman spectra [23]. In our Raman spectrum, there are four vibrational modes sited at the range of 70 to 300 cm⁻¹, see Fig. 4. Similar vibration modes were obtained by Raman theories and are in agreement with the results of de Wijs et al. [21]. Most vibrational modes sited below of 200 cm⁻¹ in the WO₃ Raman spectrum are attributed to lattice modes, whereas the mid and high frequency regions correspond to deformation and stretching modes, respectively. The sharp peaks sited at 262 and 322 cm⁻¹ are assigned to the bending vibration δ (O–W–O) [13,16] and peak at 300 cm⁻¹ is assigned to ν (WO₃). The Raman peak at 262 cm⁻¹ is enough intense, which means that a great fraction of crystalline phase is present in the as-deposited films. The peaks sited at 801, 710 and 262 cm⁻¹ are very intense and are typical modes of the crystalline WO₃. All these peaks are in good agreement with what has been published on WO₃ grown by conventional techniques.

For corroborating the above discussion, we annealed the WO₃ samples at different temperatures in the range from 100 to 500 °C during 10 min in a nitrogen atmosphere. Fig. 5 shows the Raman spectra of annealing WO₃ samples that present vibrational bands more intense, which is indicative of a higher crystalline quality. Before and after annealing the films show similar Raman spectra. The peaks intensity increases as is increased the annealing temperature. All the background from the underlying glass slide in the spectra decreases after annealing of 300 °C, that is, the I_R/I_N ratio of Raman intensity (I_R) and noisy signal intensity (I_N) increased after annealing.

Fig. 6 shows the variations of the main Raman peaks as function of the annealing temperature, the behaviour of all ones is similar in the investigated temperature range, whose tendency is to increase. The vibrational modes are slightly displaced toward higher frequencies with the annealed. Gazzoli indicated that the vibrational bands positions in Raman spectrum depend on the tungsten content [24]: at higher the W content, higher the frequency at which the band appears and the removal of water causes a shift of the Raman bands at higher frequency. There is a difference in our Raman spectra before and after heat treatment. The peak sited at 801 cm⁻¹ shifts to higher frequency (811 cm⁻¹) after annealing. Due to above statements, the 811 cm⁻¹ peak indicate that the

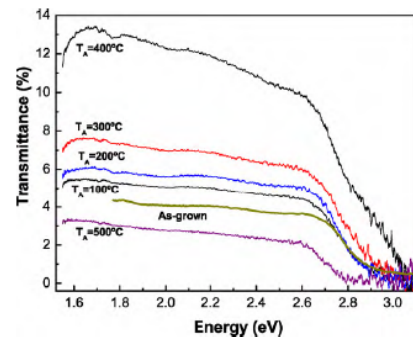


Fig. 7. Spectral transmittance of WO₃ films at different annealing temperatures.

WO₃ film presents more oxygen deficiency and the 801 cm⁻¹ indicates more moisture on the film before annealing, which had been found by XPS measurements. Since it is an ex-situ measurement, even if we remove the surface water molecules of the film they can be partly absorbed on surface again during the experiment after annealing. Hence we deduced that the shift comes from the internal structure or phase of the film, not from the surface of the film.

All the above facts support the hypothesis of an open (or porous) structure of the films with many inner empty spaces and inter-grain boundaries. This means that comparably small amounts of water were absorbed in the films. The results suggest that the formation of porous films is due to gas-phase reactions in the plasma, leading to a homogeneous nucleation of oxide particles on the substrate. Clearly the prepared films were not a typical crystalline WO₃ (m-phase) structure. In addition probably an increase of compressive residual stress of the film due to annealing causes Raman shift to higher wavenumbers. This phenomenon has also been observed in IrO₂ films [25], ZrO₂ films [26] and on the GaAs–SiO₂ interface [27]. Considering the residual stress and the Raman peak position before and after annealing, it can be concluded that the Raman peak position shifts to higher wavenumbers with the increase of compressive stress and it shifts to lower wavenumbers with the increase of tensile stress. To obtain a quantitative measurement of the residual stress of the WO₃ films, more detailed work is needed.

The transmittance spectra of WO₃ films have been recorded in the energy range of 1.52 to 3.12 eV. The effect of annealing temperature on the optical properties including percentage of transmittance (%) and energy band gap (E_G) are studied in detail. Fig. 7 shows the transmission spectra of WO₃ films prepared at room temperature, further heat treated (annealing) at the range from 100 to 500 °C on corning glass. It shows that the as-deposited films have low transmittance, and the difference of transmittance between it and the annealing ones increases with the increase of the temperature up to 400 °C and for sample annealed at 500 °C presents a lower transmittance. The decrease in transparency of the films with increased annealing temperature may be due to the formation of more oxygen-ion vacancies in the films. It is observed from the transmittance spectra that the absorption edge is also slightly shifted towards higher energy region for the films annealed at higher temperatures, owing to preferred colouration effect on the films. The colour of the films also changes with the annealing temperatures, due to the excellent electrochromic nature. It confirms that the improvement in crystallinity of the films increases with increasing annealing temperature but increases the defect density. Band gap energy was estimated by straight line extrapolation from the high-energy region. Using these results obtained the WO₃ band-gap as function of the annealing temperature, which

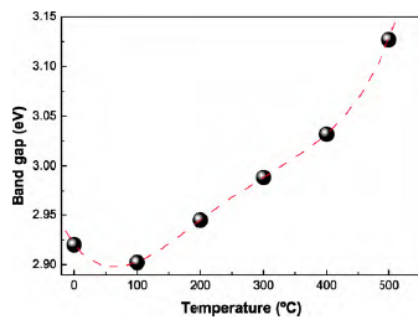


Fig. 8. Band gap of WO_3 films as function of the annealing temperature.

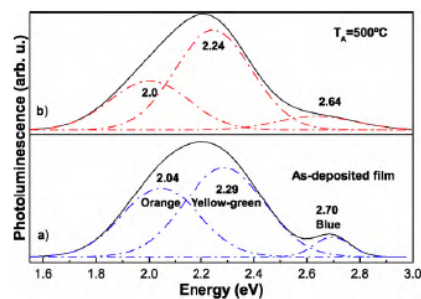


Fig. 9. Photoluminescence spectra of WO_3 films: (a) as-deposited one and (b) 500 °C annealing one.

is shown in Fig. 8. The dashed line is a figure-of-merit to follow the behaviour obtained by adjusted. As is observed in figure, the band-gap presents a minimum between 0 and 100 °C and therefore as increases the annealing temperature its behaviour is almost linear up to 400 °C, at highest temperatures occurs an abrupt slope shift, incremented the band gap that might indicate a highest crystalline quality. At low annealing temperature the composition of film is more stoichiometric and the defects concentration is probably lower. At higher (>400 °C) the composition has an oxygen deficiency and the tungsten interstitial is the predominant defect.

Fig. 9 shows the 300 K photoluminescence spectra. The emission peaks of the as-deposited WO_3 layers consist of two bands centred about 2.20 and 2.70 eV. The first one is a broad band that is constituted of two luminescence emissions sited at 2.04 and 2.29 eV, which correspond orange and yellow-green luminescent emissions, and the second one is associated to blue luminescent emission at 2.70 eV. The radiative transitions are in the range of impurity energies, which might be associated to oxygen vacancies and residual impurities. Although these have been reported these bands as band gap energies of WO_3 [1,28], so the blue emissions should be attributed to the indirect band–band transition of WO_3 . But this one is not the case, since the WO_3 band gaps are higher. As is observed in Fig. 9, the three radiative transitions shift lightly to lower energies as the annealing temperature is increased but the

yellow-green emission becomes dominant. This fact might indicate that the yellow-green radiative transitions have their origin in the oxygen vacancies and tungsten interstices.

4. Conclusions

In this paper, we have described in detail the growth and the effect of annealing temperature on structural and optical properties of hot-filament metal oxide deposition WO_3 films. By XPS found WO_3 grown by HFMOD is stoichiometric. The X-ray diffraction analysis clearly shows that the crystalline phase predominantly is monoclinic. The WO_3 Raman spectroscopy shows clearly that to anneal the samples improves its crystalline quality. The transparent nature of the films has been observed from the optical transmittance spectra. The decrease in transmittance with increasing annealing temperatures reveals the formation of oxygen vacancies in the films. The shift in absorption edge towards high energy region has been assigned to the coloration effect of the films. The increase in the evaluated optical energy band gap values towards the increasing annealing temperature may be due to the crystallization of the films. We believe that these preliminary characteristic observations on the hot-filament metal oxide deposition WO_3 films will be helpful to explore the device performance of the films for electrochromic and smart window applications.

References

- [1] C.G. Granqvist, in: P.J. Gellings, H.J.M. Bouwmesster (Eds.), *The CRC Handbook of Solid State Electrochemistry*, CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio, 1997.
- [2] S.H. Lee, H.M. Cheong, P. Liu, D. Smith, C.E. Tracy, A. Mascarenhas, J.R. Pitts, S.K. Deb, *J. Appl. Phys.* 88 (2000) 3076–3078.
- [3] J.F. Roland, F.C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* 336 (1992) 245–261.
- [4] A. Monteiro, M.F. Costa, B. Almeida, V. Teixeira, J. Gago, E. Roman, *Vacuum* 64 (2002) 287–291.
- [5] W. Demiryont, *SPIE* 323 (1990) 171–187.
- [6] N. Sbar, M. Badding, R. Budziak, K. Cortez, L. Laby, L. Michalski, T. Ngo, S. Chulz, K. Urbanik, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 56 (1999) 321–341.
- [7] Y. Li, Y. Aikawa, A. Kishimoto, T. Kudo, *Electrochim. Acta* 39 (1994) 807–812.
- [8] C.G. Granqvist, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 60 (2000) 201–262.
- [9] B.V. Kolesov, T.V. Basova, I.K. Igumenov, *Thin Solid Films* 304 (1997) 166–169.
- [10] B. Zhao, X. Xu, J. Gao, Q. Fu, Y. Tang, *J. Raman Spectrosc.* 27 (1998) 549–554.
- [11] J. Martínez-Juárez, J. Díaz-Reyes, *Proc. SPIE* 7142 (2008), 71420Q1–71420Q6.
- [12] P.R. Bueno, F.M. Pontes, E.R. Leite, L.O.S. Bulhões, P.S. Pizani, P.N. Lisboa-Filho, W.H. Schreiner, *J. Appl. Phys.* 96 (2004) 2102–2109.
- [13] A. Rougier, F. Portemer, A. Quéde, M. El Marssi, *Appl. Surf. Sci.* 153 (1999) 1–9.
- [14] G. Atanassov, R. Thielsch, D. Popov, *Thin Solid Films* 223 (1993) 288–292.
- [15] C.J. Wright, *J. Solid State Chem.* 20 (1977) 89–92.
- [16] M.F. Daniel, B. Desbat, J.C. Lassegues, B. Gerand, M. Figlarz, *J. Solid State Chem.* 67 (1987) 235–247.
- [17] J. Pfeifer, Cao Guifang, P.T. Tekula-Buxbaum, B.A. Kiss, M. Farkas-Jahnke, K. Vadasdi, *J. Solid State Chem.* 119 (1995) 90–97.
- [18] M.F. Daniel, B. Desbat, J.C. Lassegues, R. Garie, *J. Solid State Chem.* 73 (1988) 127–139.
- [19] L. Dixit, S.K. Kapoor, I.D. Singh, P.L. Gupta, *Indian J. Phys. B* 51 (1977) 116–121.
- [20] P. Tägtström, U. Jansson, *Thin Solid Films* 352 (1999) 107–113.
- [21] G.A. de Wijs, R.A. de Groot, *Electrochim. Acta* 46 (2001) 1989–1993.
- [22] E. Salje, *Acta Crystallogr. A* 31 (1975) 360–363.
- [23] M. Regragui, M. Addou, A. Outzourhit, J.C. Bernède, Eib. El Idrissi, E. Benseddik, A. Kachouane, *Thin Solid Films* 358 (2000) 40–45.
- [24] D. Gazzoli, M. Valigi, R. Dragone, A. Marucci, G. Mattei, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 11129–11135.
- [25] P.C. Liao, C.S. Chen, W.S. Ho, Y.S. Huang, K.K. Tiong, *Thin Solid Films* 301 (1997) 7–11.
- [26] A. Portinha, V. Teixeira, J. Carneiro, M.F. Costa, N.P. Barradas, A.D. Sequeira, *Surf. Coat. Technol.* 188–189 (2004) 107–115.
- [27] A.B.M. Harun-ur-Rashid, M. Kishi, T. Katoda, *J. Appl. Phys.* 80 (1996) 3540–3545.
- [28] B. Yang, Y. Zhang, E. Drabarek, P.R.F. Barnes, V. Luca, *Chem. Mater.* 19 (2007) 5664–5672.



Estudio de la Conservación del Aceite de Amaranth Utilizando Diversos Antioxidantes

José Alberto Ariza*, Fernando López, Claudia Montalvo, Amicla Arellano, Silvia Luna y Raúl Rene Robles.

Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada-IPN, Tlaxcala. Sn. J. Molino s/n km 1,5 carretera estatal Sta. I. Tecuexcomac-Tepetitla de Lardizábal. 90600

Tel. 01 (248) 487-0765, Fax. 487-0766.

e-mail: ariza_ortega@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Amaranthus hypochondriacus*, aceite de amaranto, ácidos grasos insaturados, conservación de aceites.

RESUMEN

La semilla de amaranto contiene ácidos grasos esenciales y escualeno. Refinado y con antioxidantes se lograría un aceite competitivo. En este trabajo se estudió la conservación del aceite de amaranto midiendo los peróxidos en presencia y ausencia de antioxidantes naturales (vitamina E y semilla de uva) y uno sintético (butilhidroxitolueno). Se determinó el punto de humo y se sometió a pruebas de foto-oxidación. En los tres casos los resultados fueron analizados estadísticamente por medio del ANAVAR y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Primeramente se encontró que la vitamina E al 0.02 (v/v) mostró un mayor efecto protector con 54% de poder antioxidante. En la segunda prueba el punto de humo se presentó a los 220 °C, por lo que se recomienda su empleo para freír. Sin embargo, se encontró que el índice de peróxido fue de 15 meq kg⁻¹ a un tiempo de 35 h, lo que indica la formación de los peróxidos, por lo que es necesario mantenerlo en oscuridad.

Key words: *Amaranthus hypochondriacus*, amaranth oil, unsaturated fatty acids, oil preservation.

ABSTRACT

The amaranth seed contains essential fatty acids and squalene. Refined and added with antioxidants it would be obtained a highly competitive oil. In this work, the preservation of amaranth oil was studied measuring the formation of peroxides with and without natural (vitamin E and grape seed) and synthetic antioxidants (butylated hydroxytoluene). The smoke point was also determined and the amaranth oil was submitted to the test photo-oxidation. In all three cases the results were statistically analyzed by the ANAVAR and Tukey test ($p \leq 0.05$). In the first case it was found that vitamin E at 0.02 (v/v) showed an increased protective effect of 54% for the conservation of oxidation. The smoke point was presented to the 220 °C, indicating that can be used for frying. For the photo-oxidation it was found a maximum rate of 15 meq kg⁻¹ at a time of 35 h, and the peroxides increasing, that is why this oil should be kept in dark conditions.

INTRODUCCIÓN

El amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae*, de la cual sólo se cultivan de manera importante *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus pumilus*, *Amaranthus tricolor*, *Amaranthus retroflexus* y *Amaranthus hybridus* (Tudor & Bean, 1985, Marcone, 2000). El amaranto es una planta herbácea de origen tropical, adaptable a climas templados y semiáridos (Marcone, 2000). En México la producción anual es de 4,227,000 Kg, siendo el Estado de Puebla el principal productor con 3,059,000 Kg (SAGARPA, 2004). Con la semilla de amaranto se elaboran diversos productos, pero se conoce principalmente por el dulce tradicional denominado "alegría". La semilla de amaranto contiene compuestos nutritivos, entre ellos se encuentran los lípidos, como el escualeno, ácidos grasos y tocoferoles. El primero tiene una concentración de 9.26-10.34%, en los segundos predominan los ácidos grasos del tipo 18:1 (22.70%), 18:2 (40.83%) y 18:3 (7.7%), y los terceros se encuentran en un 60.45 por g de semilla (Marcone, 2000). Diversos estudios han demostrado que el amaranto presenta diversas aplicaciones nutraceuticas, como es la disminución del nivel de glucosa en sangre, combinado con otros cereales equilibra el patrón de aminoácidos, minerales y presenta un efecto hipocolesterolémico (Chaturvedi *et al.*, 1997). Además, los ácidos grasos 18:2 y 18:3 son importantes para producir las prostaglandinas que regulan muchos procesos corporales, por ejemplo, la inflamación y la coagulación de la sangre. Por otro lado, el escualeno presenta propiedades biológicas que ayudan a disminuir la presencia de los radicales libres y aumenta la resistencia inmunológica. Además, se usa en la industria de cosméticos para la elaboración de cremas y

bronceadores (He *et al.*, 2002, Amunziata *et al.*, 1999, Lehmann, 1996).

Los aceites son más susceptibles que las grasas a sufrir reacciones de deterioro por su contenido de ácidos grasos insaturados. Estas reacciones son aceleradas por el calor, la luz, la humedad y por trazas de metales (Badui, 1998, Fennema, 2000).

La baja estabilidad de los aceites puede ser prevenida por la adición de antioxidantes, de los cuales se recomiendan el α -tocoferol, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbobutilhidroxiquinona (TBHQ), galato de propilo, tocoferoles mixtos y palmitato de ascorbilo (CODEX, 1981). El efecto protector depende de la composición y de las propiedades químicas del aceite o grasa.

Los aceites durante su almacenamiento sufren una degradación que afecta su vida útil. Para determinar los daños en el aceite se emplean métodos acelerados como el oxígeno activo, la bomba de oxígeno o la incubación en estufa. Además, para verificar la oxidación se usan pruebas sensoriales que son poco precisas y muy subjetivas, y los métodos fisico-químicos, que aportan más información acerca del grado de oxidación, por ejemplo: los carbonilos totales, el índice de anisidina, índice de peróxido, ácido tiobarbitúrico, fluorescencia y cromatografía de gases (Fennema, 2000).

La finalidad de este trabajo fue: i) evaluar el efecto de antioxidantes naturales (vitamina E y aceite comercial de semilla de uva) y uno sintético (BHT) sobre el aceite de amaranto y ii) determinar la actividad protectora de la vitamina E, sometiendo al aceite de amaranto a pruebas termo-oxidativas y foto-oxidativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó aceite de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) proporcionado por la industria San Miguel de Productos Agropecuarios, localizada en el Estado de Hidalgo, México; el aceite se refinó mediante el método de Ariza et al. (2004). El índice de acidez (IA) del aceite de amaranto refinado fue 0.05% expresado como porcentaje de ácido oleico y el índice de peróxido fue de 1.4 meq Kg⁻¹. Los disolventes utilizados fueron grado reactivo, los antioxidantes vitamina E y el BHT fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri. El antioxidante aceite comercial de semilla de uva, marca Medinatural, fue adquirido en una farmacia local, (Cd. de Puebla, México).

Efecto de los antioxidantes sobre el índice de peróxido del aceite de amaranto

Para determinar la actividad antioxidante de los aditivos empleados se desarrollaron pruebas de estabilidad, utilizando antioxidantes naturales como aceite de semilla de uva y vitamina E al 0.01 y 0.02 (v/v) y el antioxidante sintético BHT a 0.01 y 0.02 (g/L). Los antioxidantes fueron mezclados directamente en el aceite. Cada tratamiento se realizó por duplicado. La prueba de oxidabilidad se llevó a cabo por el método de Matissek et al. (1999). Para cuantificar el grado de oxidabilidad en el aceite, se realizaron 11 análisis en vasos de precipitado de 100 mL cada uno con 3g de muestra de aceite, se depositaron dentro de una estufa previamente calentada a 60 °C, donde se anotó el tiempo inicial (t=1), y se determinó el índice de peróxido usando la técnica de SECOFI (1987). Primero se cuantificó el índice de peróxido del aceite sin calentar (tiempo t=1). A continuación se llevaron a cabo los análisis de los 11 tratamientos restantes. Al cabo de 1 h se sacó uno de los vasos y se determinó el índice de peróxido (t=1 h). Se realizó la misma operación

en el resto de las muestras al cabo de 2, 3, 5, 7, 8, 20, 30, 40, 60 y 80 h (t=2 hasta 80 h).

Cuantificación de la actividad antioxidante de los conservadores en el aceite de amaranto

De la prueba anterior la actividad antioxidante (AA) de los conservadores se determinó por duplicado comparando la pendiente del índice de peróxido en función del tiempo de cada antioxidante: semilla de uva y vitamina E a 0.01 y 0.02 v/v, y BHT a 0.01 y 0.02 g/L (A_E), con la pendiente producida por el aceite sin conservador (A_C). Los valores obtenidos se sustituyeron en la ecuación reportada por Hudson & Mahgoub (1981) para obtener la gráfica que describe la capacidad de los antioxidantes para inhibir o disminuir el proceso oxidativo.

$$\%AA = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

Tratamiento termo-oxidativo en el aceite de amaranto

Una vez que se encontró que la vitamina E al 0.02 (v/v) era el mejor antioxidante, el aceite de amaranto se sometió a una prueba termo-oxidativa en presencia de dicha vitamina. Para ello se siguió la metodología reportada por Matissek et al. (1999). El tratamiento termo-oxidativo se realizó por duplicado en vasos de precipitado de 100 mL a temperatura de 50, 70, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 y 240 °C por 15 minutos. Se midió el color fotométrico inicial y final, empleando el método reportado por Allen et al. (1982) y el índice de acidez mediante la técnica de SECOFI (1987).

Tratamiento de foto-oxidación en el aceite de amaranto

La prueba de foto-oxidación se realizó sobre aceite de amaranto en presencia de vitamina E al 0,02(v/v) y se colocó dentro de una cámara

de luz incandescente (1650 luxes). El área de la cámara de luz fue de 120 cm², el aceite se depositó en frascos cerrados transparentes a 55 °C. Los tratamientos se realizaron por duplicado. La prueba de foto-oxidación, se determinó por el método de Matissek et al. (1999), que mide el índice de peróxido del aceite a dos temperaturas diferentes, la ambiental (24 °C) y a una temperatura superior (60 °C), de manera intermitente a diferentes tiempos para formar la cinética de oxidación; el índice de peróxido se cuantificó usando la técnica de SECOFI (1987).

Cuantificación del escualeno en el aceite de amaranto

La determinación del contenido de escualeno en el aceite de amaranto se realizó según la técnica del AOAC (1990).

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza mediante el procedimiento ANAVAR y se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey, $p < 0.05$, (SAS, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los antioxidantes sobre el índice de peróxido del aceite de amaranto

Los resultados de la cinética de oxidación del aceite de amaranto en términos del índice de peróxido con y sin antioxidantes a una concentración de 0.01 (v/v) y a 60 °C son mostrados en la Fig. 1.

Se observa un incremento del índice de peróxido en los diferentes tratamientos con

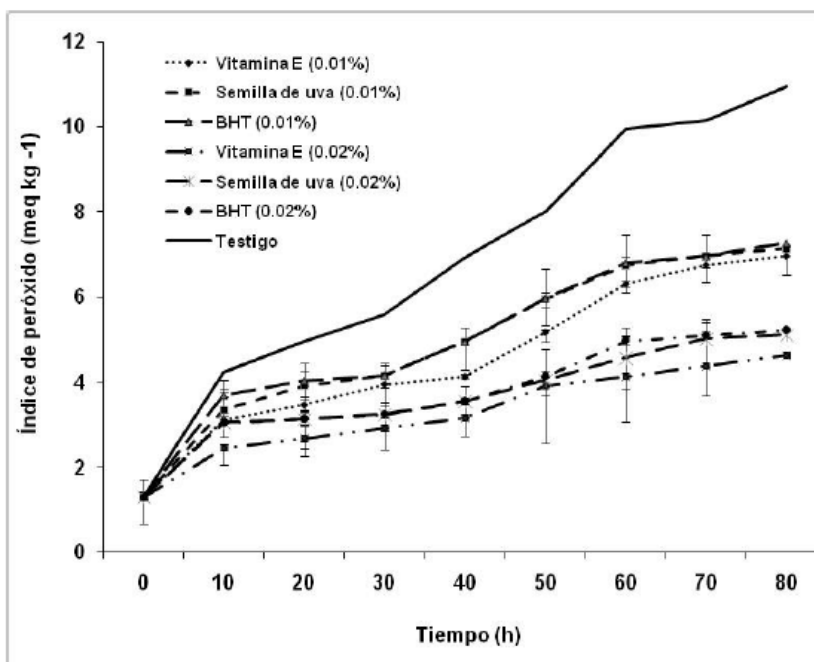


Fig. 1. Determinación del índice de peróxido del aceite de amaranto con antioxidantes naturales: vitamina E y semilla de uva al 0.01 y 0.02 (v/v) y un sintético: BHT (g/L), empleando el método

antioxidantes al 0.01 (v/v) con respecto al tiempo. A las 70 h el índice de peróxido aumentó en promedio 6.5 meq kg^{-1} en los tres antioxidantes probados; en este mismo lapso de tiempo el grupo testigo mostró un índice de peróxido de 10 meq kg^{-1} . Los tratamientos con los antioxidantes (vitamina E, semillas de uva y BHT), no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos, pero el grupo testigo sí fue diferente a los grupos tratados ($p \leq 0.05$).

Cuando se incrementó la concentración de los antioxidantes se observaron cambios cualitativos y cuantitativos (Fig. 1). En este estudio, se observó que a las 70 h el índice de peróxido de los tratamientos aumentó a 4 meq kg^{-1} , mientras que en el testigo el índice de peróxido fue de 10 meq kg^{-1} . La concentración de antioxidante de 0.02 (v/v) fue más efectiva ($p \leq 0.05$) que la de 0.01 (v/v) para preservar el aceite. Reische et al. (2002) estudiaron diferentes concentraciones de antioxidantes e indicaron que la estabilidad antioxidante del conservador debe presentar las siguientes características, tener una estabilidad oxidativa, adicionado a bajas concentraciones, obtener una máxima actividad antioxidante, y no ser prooxidante.

Por otro lado, Matissek et al. (1999) proponen una clasificación de las grasas y los aceites sometidas a pruebas aceleradas ($60 \text{ }^\circ\text{C}$ a 48 h): aceites con un índice de peróxido de 8 a 12 meq kg^{-1} se consideran estables, con un IP de 20 a 24 meq kg^{-1} la estabilidad esta condicionada de tres a cuatro meses, y si es mayor a 24 meq kg^{-1} los aceites deben refinarse ya que no son estables. Así se determinó que el aceite de amaranto refinado es estable por tiempos superiores a cuatro meses cuando se adicionan antioxidantes como los usados en este trabajo, debido a que su índice de peróxido es menor a 8 meq kg^{-1} a 70 h.

Cuantificación de la actividad antioxidante de los conservadores en el aceite de amaranto

Los resultados del efecto de los conservadores en el aceite de amaranto, se observan en la (Fig. 2).

Todos los conservadores mostraron actividad antioxidante a una concentración de 0.01 (v/v), dando una actividad antioxidante menor a

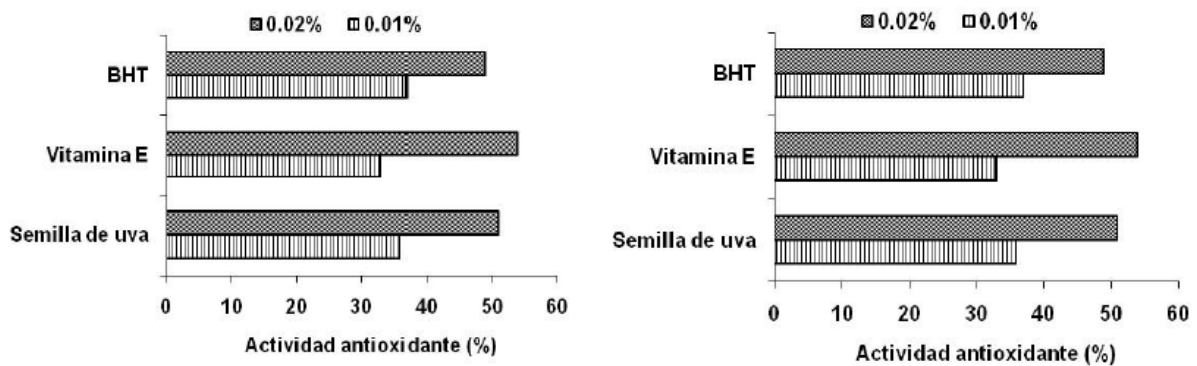


Fig. 2. Cuantificación de la conservación del aceite de amaranto con antioxidantes naturales: vitamina E y semilla de uva al 0.02 (v/v) y sintético: BHT (g/L), empleando el método acelerado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

35.3%; el antioxidante sintético (BHT) presentó una mayor actividad con 37%. Cuando la concentración de los conservadores se incrementó a 0.02 (v/v), la actividad antioxidante aumentó en la mayoría de los casos (51.3%). La vitamina E fue mejor al presentar 54% de actividad (Fig. 2), debido a que los tocoferoles donan un átomo de hidrógeno de su anillo cromano del grupo 6-hidroxi al radical peroxi, originando hidroperóxidos y radicales tocoferol-peroxi. El electrón no apareado del antioxidante se deslocaliza dentro del anillo aromático lo que estabiliza el compuesto formado y deteniendo de esta manera la oxidación del aceite (Liebler *et al.*, 1990, Simic, 1980).

El aceite de amaranto se preservó satisfactoriamente con vitamina E (α -tocoferol) a 0.02 (v/v) y 60 °C, es decir a una baja concentración del α -tocoferol y a una temperatura en la cual difícilmente se almacenaría. Al respecto, Jung & Min (1990), analizaron distintas concentraciones de tocoferoles para disminuir la oxidación del aceite de soya almacenado en la oscuridad a 55 °C, el mejor resultado fue a una concentración de 100 ppm en comparación con

las mejores concentraciones recomendadas a 250 y 500 ppm. Por otro lado, Hiroaki & Kenji (1997) utilizaron α -tocoferoles al 0.2 (m/m) sobre el aceite de sardina, el cual almacenaron a 40 °C, obtuvieron una actividad antioxidante de 71% en el aceite de sardina.

Según las Normas Mexicanas (SECOFI, 1985a y 1985b) la concentración máxima para el empleo de α -tocoferol es 0.03 (v/v) para preservar los aceites de maíz y cártamo. Entonces, se propone usar 0.02 (v/v) de α -tocoferol y almacenarlo a temperatura ambiente o en refrigeración. Al respecto, hay que mencionar que de acuerdo a la literatura, la semilla de amaranto de la especie *A. hypochondriacus* contiene 374 ppm de α -tocoferol, después de la extracción se reportan 370 ppm, (Sun *et al.*, 1997). Sin embargo se sabe que durante los procesos de refinación y blanqueo, debido al material empleado, gran parte del α -tocoferol se pierde.

Tratamiento termo-oxidativo en el aceite de amaranto

Los resultados de la prueba termo-oxidativa en el aceite de amaranto se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros realizados al aceite de amaranto.

Aceites	PH (°C)	Cfi (unidades)	Cff (unidades)	IAi	IAf	Ipi (meq kg ⁻¹)	Ipf (meq kg ⁻¹)
Testigo	150±0.047	3.2±0.087	4.6±0.033	0.05±0.004	1.87±0.051	1.4±0.072	15±0.080
AAE	220±0.032	3.2±0.010	4.3±0.021	0.05±0.007	0.88±0.030	1.4±0.011	11±0.045

PH: Punto de humo. Cfi y Cff: Color fotométrico, inicial y final, IAi e IAf: Índice de acidez, inicial y final (expresado como porcentaje de ácido oleico). Ipi e Ipf: Índice de peróxido inicial y final: Ipi e Ipf. Testigo: Aceite de amaranto sin antioxidante, AAE: Aceite de amaranto con vitamina E (0.02%).

Como se puede observar, el aceite de amaranto con vitamina E tuvo un índice de acidez de 0.88 expresado como porcentaje de ácido oleico y un punto de humo superior a los 215 °C, el aceite de amaranto sin antioxidante (testigo) presentó un índice de acidez de 1.87 y un punto de humo menor a 215 °C, (Tabla 1), éste último no es adecuado para freír porque se cuantificaron una mayor cantidad de ácidos grasos libres debido a la oxidación térmica, y estos no son un buen indicador de calidad del aceite, porque reaccionan rápidamente para formar polímeros y compuestos volátiles (Paul & Mittal, 1997). Por otra parte, Psomiadou & Tsimidou (2002) reportaron que el α -tocoferol a una concentración de 100 mg kg⁻¹ retardó la degradación del aceite de oliva, siendo más apropiada cuando los productos de oxidación alcanzan concentraciones críticas, ya que este antioxidante es consumido en las primeras etapas de la oxidación, preservando el aceite.

Con respecto al cambio en el color, los tratamientos de aceite de amaranto (testigo y con antioxidante) presentaron una oxidación en el color de 1 unidad, esto debido al contenido de pigmentos como carotenos, que al incrementar la temperatura se oxidaron rápidamente (Psomiadou & Tsimidou, 2002).

En la degradación de los ácidos grasos, el testigo presentó un incremento de 6 veces en el índice de peróxido y en el aceite con antioxidante se incrementó a 5 veces este índice. Romero *et al.* (2000), reportaron que los peróxidos presentan una mayor inestabilidad bajo condiciones extremas de temperatura y estos forman productos de oxidación secundaria (compuestos polares, volátiles y polímeros) y al cuantificarlos, éste valor es bajo porque los peróxidos tienden a descomponerse a 180 °C.

El aceite de amaranto con antioxidante y

posiblemente el contenido de escualeno se mantuvo estable, ya que se encontró un total 12 g de escualeno por kg de aceite; este hidrocarburo insaturado presenta propiedades antioxidantes, como lo reportaron Bolland & Hughes (1949), cuando investigaron la autooxidación del escualeno a 55 °C y dedujeron que por cada molécula oxidada de escualeno dos moléculas de oxígeno son consumidas, debido a la reacción del escualeno con el radical libre y la formación final de un diperoxido. Indicaron que los radicales ciclan de forma más eficiente la molécula de escualeno que un átomo de hidrógeno, debido al espacio entre los dobles enlaces del escualeno que favorece la ciclización de los radicales peroxi. Además, mencionan que los productos de la oxidación del escualeno permanecen invariables durante un parámetro de absorción de oxígeno, de modo que no pueden participar enérgicamente en la propagación de las reacciones. Hay que destacar que el contenido de escualeno en el aceite de amaranto se encuentra en el intervalo descrito en la Legislación de la Comunidad Europea, que es de 8 a 12 g kg⁻¹, para evaluar la calidad del aceite de oliva virgen (Lanzón *et al.*, 1994).

Tratamiento de foto-oxidación en el aceite de amaranto

Los resultados de la prueba de foto-oxidación en el aceite de amaranto se muestran en la Fig. 3. Como se puede observar, en general, existe un incremento del índice de peróxido en los diferentes tratamientos con el antioxidante al 0.02 (v/v) con respecto al tiempo. A las 35 h de estudio el índice de peróxido se incrementó en promedio 15 meq kg⁻¹ con el antioxidante probado, lo cual incrementó la oxidación de los ácidos grasos por la formación de los hidroperóxidos. La alta

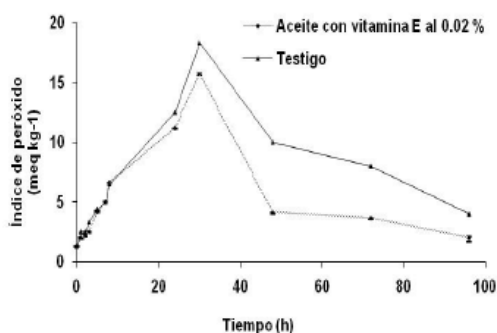


Fig. 3. Tratamiento de foto-oxidación del aceite de amaranto

reactividad del grupo metileno adyacente al doble enlace, es acelerado por la luz, debido a que la energía luminosa presenta longitudes de onda más corta que origina efectos perjudiciales en un menor tiempo en comparación con la oxidación por el oxígeno (Sattar *et al.*, 1976). En el aceite de amaranto se formaron reacciones de oxidación y esto ocasionó la presencia de olor a rancio, indicativo de la producción de compuestos carbonílicos, hidrocarburos, furanos sustituidos, aldehídos, alcoholes y cetonas (Ceballos *et al.*, 2003); por otro lado en este mismo lapso de tiempo el grupo testigo mostró un índice de peróxido de 18 meq kg⁻¹. Es decir, el antioxidante retardó la degradación del aceite ($p < 0.05$), sin embargo se presentó al mismo tiempo que en el testigo.

Es muy probable que la presencia de escualeno en el testigo (12 g kg⁻¹ de aceite) haya favorecido su conservación como reportan Psomiadou & Tsimidou (1999), quienes indican que 7 g kg⁻¹ de escualeno es suficiente para retardar los efectos de la oxidación en el aceite de oliva virgen.

CONCLUSIONES

La vitamina E a una concentración de 0.02 (v/v) proporcionó al aceite de amaranto un efecto protector de 54% de actividad antioxidante, lo cual mantuvo estables a los ácidos grasos y no presentó el olor a rancio característico de deterioro, ya que los productos de oxidación (hidroperóxidos) y los procesos de auto-oxidación de los ácidos grasos fueron mínimos. Por tanto, la vitamina E al 0.02 (v/v) es el mejor antioxidante de los tres estudiados y, además, es un producto natural. El resultado del 54% de efecto protector indica que el aceite de amaranto se puede almacenar por cuatro meses, de lo cual se infiere que si el aceite se almacena a temperatura ambiente, el índice de peróxidos sería menor y se podría almacenar por periodos más prolongados. El aceite de amaranto con vitamina E a una concentración de 0.02 (v/v), se puede utilizar para freír porque tiene un punto de humo de 220 °C, manteniendo su olor y sabor característico. Además, tiene un efecto protector sobre los ácidos grasos, sin embargo al exponerlo a la luz, el aceite incrementó los productos de oxidación (hidroperóxidos) y los procesos de auto-oxidación de los ácidos grasos y presentó el olor a rancio característico de deterioro, por lo tanto el aceite de amaranto debe almacenarse donde no incidan los rayos de luz directamente.

REFERENCIAS

Allen RR, Forno MW, Krishnamurthy RG, Mcdermott GN, Norris AF & Sonntag OV (1982) Bailey's industrial oil and fat products. *In*: Physical properties of fats and fatty acids. Swern D (ed). John Wiley & Sons, New York, pp. 666-679.

Amunziata C, Massaro M & Siculella L (1999) Oleic acid inhibits endothelial activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 220-228.

- AOAC (2005) Official methods of analysis of AOAC international. *In: Fats and oils*. Horwitz W (ed). AOAC International, Maryland, USA., pp. 963-967.
- Ariza OJA, López VF, Montalvo PC, Arellano HA & Luna SS (2004) Desgomado y neutralizado del aceite de amaranto. *C. Technol. Alim. (Cuba)*. 14: 28-32.
- Badui JS (1998) Química de los alimentos. *En: Lípidos*. Longman de México (eds). Alambra, España., pp. 158-200
- Belton PS & Taylor JRN (2002) Grain properties and utilization potential, pseudocereals and less common cereals. Springer-Verlag, Berlin.
- Bolland JL & Hughes H (1949) The primary thermal oxidation product of squalene. *J. Chem. Soc.* 26: 492-497.
- Chaturvedi A, Sarojini G, Nirmala G, Nirmalammay N & Satyanarayana D (1997) Glycemic index of amaranth grain, wheat and rice in NIDDM subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.* 50: 171-178.
- Ceballos C, Moyano MJM, Vicario I & Heredia JF (2003) Chromatic evolution of virgin olive oil submitted to an accelerated oxidation test. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 80: 257-262.
- CODEX (1981) Norma del CODEX para Grasas y Aceites Comestibles No Regulados por Normas Individuales, Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO, Roma., pp. 1-5.
- Fennema OR (2000) Química de los Alimentos. Acribia, España. Fritch CW (1981) Measurements of frying-fat deterioration: a brief review. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 54: 234-238.
- He H, Cai PY, Sun M & Corke H (2002) Extraction and purification of squalene from Amaranthus grain. *J. Agric. Food Chem.* 50: 368-372.
- Hiroaki S & Kenji I (1997) Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 74: 1531-1536.
- Hudson BJ & Mahgoub SE (1981) Synergism between phospholipids and naturally occurring antioxidants in leaf lipids. *J. Sci. Food Agric.* 32: 208-210.
- Jung MY & Min DB (1990) Effects of α -, γ -, and δ -tocopherols on the oxidative stability of soybean oil. *J. Food Sci.* 55: 1464-1465.
- King JM & Min DB (2002) Riboflavin-photosensitized singlet oxygen oxidation of vitamin D2. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 583-587.
- Lanzón A, Albi T, Cert A & García J (1994) The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 71: 285-291.
- Lehman JW (1996) Case history of grain amaranth as an alternative crop. *Cereal Foods World.* 41: 369-441.
- Liebler DC, Baker PF & Kaysen KL (1990) Oxidation of vitamin E: evidence for competing autoxidation and peroxy radical trapping reaction of the tocopheroxyl radical. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 6995-7000.
- Marcone FM (2000) First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (Seabeach Amaranth). *J. Agric. Food Chem.* 48: 378-382.
- Martirosyan DM, Miroshnichenko LA, Kulakova SN, Pogojeva AV & Zolodov VI (2007)

- Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis.* 6: 1-12.
- Matissek R, Schnepel MF & Sterner G (1999) Análisis de los Alimentos. *En: Fundamentos, Métodos y Técnicas.* Bosch JM (ed). Acribia, España., pp. 297-302.
- Paul S & Mittal GS (1997) Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat /oil food frying. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 37: 635-662.
- Peeled N, Gutfinger T & Letan A (1975) Effect of water and BHT on stability of cottonseed oil during frying. *J. Food Sci. Agric.* 26: 1655-1668.
- Psomiadou E & Tsimidou M (1999) On the role of squalene in olive oil stability. 2. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4025-4032.
- Psomiadou E & Tsimidou M (2002) Stability of virgen olive. 2. Photo-oxidation studies, *J. Agric. Food Chem.* 50: 722-727.
- Reische DW, Lillard DA & Eitenmiller RR (2002) Antioxidants. *In: Food lipids.* Akoh CC & Min DB (ed). New York: Marcel Dekker, pp. 489-516.
- Romero A, Cuesta C & Sánchez-Muñiz FJ (2000) Cyclic fatty acid monomers and thermoxidative alteration compounds formed during frying of frozen foods in extra virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1169-1175.
- SAGARPA (2004) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *En: Anuario Estadístico de Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos.* Por Cultivo., Secretaría de Salud, p. 65.
- SAS Institute (1996) SAS User's Guide Statistics. *Statistical Analysis System.* Cary NC versión 6.1.
- Sattar A, DeMan JM & Alexander JC (1976) Effect of wavelength on light-induced quality deterioration of edible oils and fats. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 9: 108-113.
- SECOFI (1985a) Norma Mexicana NMX-F-030-1985. *En: Alimentos-Aceite comestible puro de maíz.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., p. 7
- SECOFI (1985b). Norma Mexicana NMX-F-161-1985. *En: Alimentos-Aceite comestible puro de cártamo.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., p. 5.
- SECOFI (1987a). Norma Mexicana NMX-F-154-1987. *En: Determinación del índice de deperóxido.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.
- SECOFI (1987b). Norma Mexicana NMX-F-101-1987. *En: Determinación del índice de acidez.* Diario Oficial de la Federación. México, D.F., pp. 1-5.
- Simic MG (1980) Kinetic and mechanistic studies of peroxy, vitamin E, and anti-oxidant free radicals by pulse radiolysis. *In: Autoxidation in food biological systems.* Simic MG & Karel M (eds). New York: Plenum Press, pp. 17-26.
- Soren BE (1997) Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 74: 1495-1508.
- Sun H, Wiesenborn D, Rayas-Duarte P, Mohamed A & Hagen K (1997) Bench-scale Processing of amaranth seed for oil. *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 17: 413-418.
- Tudor F & Bean G (1985) A comparison of the fatty acids and sterols of seeds of weedy and vegetable species of *Amaranthus spp.* *J. Ass. Oil Chem. Soc.* 62: 89-91.