



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE COMPUESTOS
NUTRACEUTICOS PRESENTES EN EL ACEITE DE
LA SEMILLA DE CHIA
(*Salvia hispanica*)

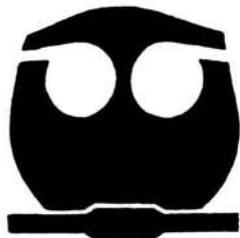
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

LUZ MAGALI ALVAREZ CHAVEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Ma. de los Ángeles Valdivia López
Vocal	Prof. Arturo Navarro Ocaña
Secretario	Prof. Alberto Tecante Coronel
1er. Suplente	Prof. Jorge Aburto Anell
2º. Suplente	Prof. Ma. de Lourdes Osnaya Suárez

Sitio donde se desarrolló el tema:

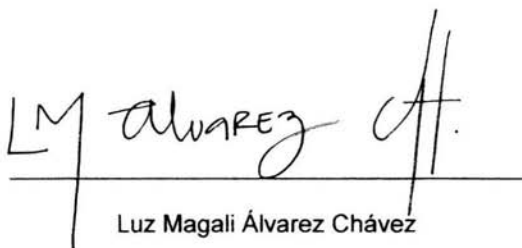
Laboratorio 323, Conunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:



M. en C. Ma. de los Ángeles Valdivia López

Sustentante



Luz Magali Álvarez Chávez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por propiciar el desarrollo y difusión de conocimientos integrales.

Al Centro Educacional Analítica S.C. (CEA) de Agilent Technologies, en especial a Lourdes Aburto, Edgar Vázquez, Lorena López y Linda Ramírez por darme el soporte técnico necesario y confiarme los espacios para el desarrollo de este trabajo, sin olvidar la participación de Alexandra Oropeza, Elizabeth Alarcón y José Ortiz.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por su apoyo financiero para participar en el proyecto IN211602: "La semilla de chía (*Salvia hispanica*) como fuente de aceite, polisacárido y proteína: Estudio para su valoración y aprovechamiento"

A la Universidad Autónoma de Chapingo, particularmente al Dr. Alfonso Hernández Gómez quien amablemente donó la semilla de chía procedente de Jalisco y Sinaloa para la realización de este estudio.

A la M. en C. Maria de los Ángeles Valdivia, al Dr. Arturo Navarro y al Dr. Alberto Tecante, por la asesoría y el tiempo dedicados al mejoramiento de este trabajo.

A Lucy Leyva y Liz Jimenez por su apoyo.

Dedicatorias

Sobre todo a mis padres por siempre buscar lo mejor para mi:

Papá, por ser la persona de mayor influencia en mi vida. Te admiro muchísimo.

Mamá, por ser mi mejor amiga e incondicional apoyo. Te adoro.

Sin ustedes nada de esto sería posible.

A mi hermano:

Fer, estoy segura que lograrás lo que te propongas.

"La luna ignora que es tranquila y clara y ni siquiera sabe que es la luna"

—J.L.Borges.

A mi familia:

Abue, por haberme rescatado en los momentos difíciles.

Tías, tíos, primos y primas, por inspirarme a luchar por lo que quiero.

A mis amigos:

Claudia, Gris y Paola, porque somos todas para una y una para todas.

Andrea, por tu consejo siempre objetivo.

Norma, por toda la historia.

Tavo, Juan Pablo, Naimeth, Inés y Jero, por los momentos que han compartido conmigo.

Ernesto, por ser incondicional amigo.

Gaby Aguilar, Gaby Stern, Tibi y Pepe, porque me la pasé increíble con ustedes, les deseo toda la suerte.

A Queta, José Luis, Gaby y Ale, mi segunda familia.

A Luis, "There will always be a spring..."

A Carlos, por los últimos kilómetros recorridos y todos los que faltan.

**"Hay dos formas de ver la vida:
una es creer que no existen milagros,
la otra es admitir que todo es un milagro."**

Albert Einstein

Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
Antecedentes.....	5
1 Chía.....	5
1.1 Historia de la chía.....	5
1.2 Descripción y distribución.....	5
1.3 Composición.....	7
1.4 Usos.....	7
2 Compuestos nutraceuticos en aceites vegetales.....	8
2.1 Ácidos grasos poliinsaturados.....	8
2.1.1 Estructura e importancia.....	8
2.1.2 Ácido linoleico.....	9
2.1.3 Ácido α y γ linolénico.....	10
2.1.4 Fuentes.....	10
2.2 Fitoesteroles.....	11
2.2.1 Estructura e importancia.....	11
2.2.2 Efectos en la salud.....	14
2.2.3 Usos.....	15
2.2.4 Dosis.....	16
2.2.5 Efectos secundarios.....	17
2.2.6 Fuentes.....	17
2.2.7 Efecto del procesamiento.....	18
2.2.8 Obtención industrial de fitoesteroles.....	19
2.3 Escualeno.....	19
2.3.1 Estructura e importancia.....	19
2.3.2 Efectos en la salud y usos.....	19
2.3.3 Fuentes.....	20
3 Determinación de compuestos nutraceuticos en aceites vegetales.....	21
3.1 Tratamiento de la muestra.....	21
3.1.1 Obtención de aceites vegetales.....	21
3.1.2 Saponificación del material lipídico.....	21
3.1.3 Tratamiento de la fracción saponificable.....	23
3.2 Identificación y cuantificación de los compuestos.....	23
3.2.1 Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.....	23
3.2.2 Determinación de escualeno y fitoesteroles por cromatografía de gases.....	25
3.2.3 Determinación de escualeno por cromatografía líquidos de alta resolución.....	27
3.3 Purificación de los compuestos de la fracción insaponificable.....	27

Materiales y métodos	29
4 Tratamiento de la muestra	30
4.1 Trituración o molienda.....	30
4.2 Extracción de la grasa.....	30
4.2.1 Método 1 soxhlet (ref 941.07 AOAC)	30
4.2.2 Método 2 agitación 24 h.....	30
4.2.3 Método 3 sonicación 1 h.....	31
4.3 Saponificación.....	32
4.3.1 Método extracción de fracción insaponificable	32
4.3.2 Recuperación de los ácidos grasos.....	32
5 Identificación y cuantificación	33
5.1 Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos.....	33
5.2 Perfil de ácidos grasos y presencia de ácido γ -linolénico:	33
5.3 Perfil de fitoesteroles y cuantificación de escualeno y fitoesteroles.....	34
5.3.1 Cromatografía de gases para cuantificación de escualeno y fitoesteroles.....	34
5.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificación de escualeno	35
6 Separación en columna	36
Resultados y discusión	38
7 Cuantificación de grasa y fracciones saponificable e insaponificable	38
7.1 Contenido de grasa.....	38
7.1.1 Comparación de los métodos de extracción.....	38
7.1.2 Comparación del contenido de grasa entre las muestras de semilla de chía	39
7.1.3 Comparación del contenido de grasa de chía en estudios previos.....	40
7.2 Contenido de fracción saponificable e insaponificable.....	42
8 Identificación y cuantificación de compuestos nutraceuticos	43
8.1 Perfil de ácidos grasos y presencia de ácido γ -linolénico:	43
8.2 Perfil de la fracción insaponificable y cuantificación de escualeno y fitoesteroles	49
9 Separación de escualeno y fitoesteroles	56
9.1 Separación en columna de extremo abierto de los compuestos.....	56
9.2 Análisis por cromatografía de gases de escualeno y fitoesteroles en las fracciones	59
Conclusiones	62
Bibliografía	64
Apéndice 1	68
Apéndice 2	71
Apéndice 3	81

Resumen

La semilla de chía, utilizada desde épocas prehispánicas, tiene un interesante contenido de aceite constituido principalmente por ácidos grasos poliinsaturados. El presente trabajo consistió en identificar y cuantificar en el aceite de la semilla de chía ciertos compuestos con una conocida actividad nutracéutica (un compuesto nutracéutico es aquel que genera beneficios en la salud o que previene enfermedades crónicas). Los compuestos estudiados incluyen el ácido γ linolénico, escualeno y esteroides vegetales llamados también fitoesteroides (estigmasterol, estigmastanol y β sitosterol). Estos fitoquímicos serán cuantificados con la finalidad de establecer las potencialidades del aceite de este cultivo de origen mexicano. Se realizó la extracción del aceite de muestras procedentes de las principales regiones de cultivo en México (Jalisco y Sinaloa), por agitación en frío con hexano y se obtuvieron porcentajes de aceite de 30% y 26% respectivamente para cada región. Cada extracto se saponificó y cada fracción por separado se analizó por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas. En la fracción saponificable de ambas regiones se determinó que el ácido graso predominante es el ácido α linolénico encontrándose en un porcentaje del 60% en relación con el resto de los ácidos grasos y no se detectó la presencia de ácido γ linolénico. En la fracción insaponificable se detectó la presencia de estigmasterol, estigmastanol, β -sitosterol y escualeno. Las cantidades determinadas de fitoesteroides fueron altas en comparación con otras oleaginosas, no resultando así para el caso de escualeno. Finalmente se realizó una separación de los compuestos de la fracción insaponificable mediante cromatografía en columna de extremo abierto, se logró aislar al escualeno de los fitoesteroides, sin embargo no se recomienda esta técnica de purificación por la pérdida de compuestos que son retenidos en la columna.

El contenido de fitoesteroides supera el reportado para otros aceites vegetales (girasol, ajonjolí) y por tanto ubica al aceite de semilla de chía como una fuente potencial alterna de estos compuestos nutracéuticos.

Introducción

México es el país de origen de la semilla de chía, siendo la *Salvia hispanica* la variedad más común. Los efectos benéficos en la salud que trae consigo el consumo de esta semilla eran conocidos desde la época anterior a la conquista, los aztecas la utilizaban como materia prima para la elaboración de alimentos, medicinas y pinturas. También estaba asociada al culto de algunas deidades paganas, motivo por el cual su cultivo fue prohibido por los conquistadores y las áreas dedicadas a su siembra fueron utilizadas para otros plantíos.

Después de siglos, el potencial de la semilla de chía, principalmente de su aceite, está siendo redescubierto, en la actualidad podría tener aplicaciones en la producción de cosméticos y utilizarse como ingrediente en la elaboración de complementos alimenticios.

Las áreas dedicadas al cultivo de la chía son limitadas, en México el área total cultivada asciende a 450 hectáreas por año. "Los Altos", en el estado de Jalisco, es una de las regiones de mayor importancia y sólo se conoce de su utilización en otros países como Argentina (Ayerza, 1995).

Entre los atractivos de esta semilla encontramos que tiene un alto porcentaje de aceite y que éste a su vez está conformado principalmente por ácidos grasos poliinsaturados esenciales, siendo predominante el ácido linolénico ω 3 (Ayerza, 1995)

En las últimas décadas se han estado estudiando compuestos denominados "nutracéuticos", los cuales se obtienen a partir de alimentos y se ha podido observar que tienen efectos fisiológicos benéficos, proporcionan protección contra enfermedades crónicas y generalmente se comercializan en formas medicinales (American Dietetic Association, 2004).

El propósito de este trabajo es determinar la presencia y cantidad de compuestos nutraceuticos en el aceite de la semilla de chía para conocer su potencial como fuente natural de estos.

Los nutraceuticos a determinar son el ácido γ linolénico, escualeno y esteroides vegetales también llamados fitoesteroides como el estigmasterol, estigmastanol y el β sitosterol. Llevar una dieta rica en estos compuestos fitoquímicos ayuda a reducir el colesterol en la sangre (Nguyen, 1999 y Bruni, et al. 2001)

Como parte de esta investigación se pretende efectuar una comparación de contenido de la fracción lipídica de la semilla procedente de las dos principales regiones de cultivo: Jalisco y Sinaloa.

La principal motivación para la realización de este trabajo deriva del potencial que puede tener el aceite de chía para la prevención de problemas cardiovasculares por su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados con posible presencia de escualeno y fitoesteroides. El aceite de chía puede situarse como un ingrediente interesante para ser incluido en la dieta, o como principio activo en el desarrollo de nuevos productos que tengan influencia favorable en la salud.

Objetivos

GENERAL

Determinar la presencia y cantidad de compuestos nutraceuticos (ácido γ linolénico, escualeno y fitoesteroles) en la fracción lipídica de la semilla de chía para valorar su potencial como fuente natural de dichos compuestos mediante técnicas cromatográficas.

PARTICULARES

- Determinar la presencia de ácido γ -linolénico en la fracción saponificable del aceite de la semilla de chía.
- Desarrollar una metodología de identificación, cuantificación, extracción y purificación de escualeno en la fracción insaponificable obtenida a partir del aceite de la semilla de chía.
- Desarrollar una metodología de identificación, cuantificación, extracción y purificación de fitoesteroles (stigmasterol, β -sitosterol, stigmastanol) en la fracción insaponificable obtenida a partir del aceite de la semilla de chía.
- Determinar los perfiles de ácidos grasos y concentraciones de escualeno y fitoesteroles en semilla provenientes de dos regiones de cultivo en el país.

Antecedentes

1 Chía

1.1 Historia de la chía

Cuando Colón llegó al Nuevo Mundo el amaranto, el frijol, el maíz y la chía eran los componentes principales de las dietas de las civilizaciones Azteca y Maya. La semilla de chía comenzó a usarse en la alimentación humana por el año 3.500 A.C., y años más tarde se convirtió en un cultivo básico en el área central de México. En la "*Historia general de las cosas de la Nueva España*", Fray Bernardino de Sahagún menciona que las civilizaciones precolombinas la cultivaban en chinampas y usaron sus semillas como alimento mezclada con otros cultivos, como bebida mezclada con agua, molida en harina y como medicina. Además su aceite fue utilizado como base de pinturas para el rostro y el cuerpo. Los aztecas recibían semilla de chía como parte del tributo anual de los pueblos conquistados y la ofrecían a los dioses como ofrenda en las ceremonias religiosas. Debido a esta relación religiosa con las deidades paganas, los conquistadores españoles reprimieron el cultivo de la chía destruyendo la mayoría de la producción agrícola y el sistema de comercialización existente, sustituyéndolo por otros productos. (Ayerza, 1993)

1.2 Descripción y distribución

La chía es una planta (*Figura 1.1.*) herbácea anual de verano originaria de las áreas montañosas que se extienden desde el oeste central de México hasta el norte de Guatemala. Crece en terrenos ligeros, profundos y arenosos y es propia de climas cálidos y templados (Flores, 1938).

Existen distintas variedades de chía (*Salvia polystachya*, *Salvia hispanica* L., *Salvia columbria Benth*), pero la más común es la *Salvia hispanica* L. (Scheer, 2000).



Figura 1.1 : Planta de *Salvia hispanica*

El cultivo y explotación de esta especie es de gran importancia económica en Argentina y en el estado de California en Estados Unidos de América. En la República Mexicana prácticamente sólo se cultiva en la región de Los Altos en el estado de Jalisco, aunque existen pequeños productores en los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Zacatecas y Sinaloa. El área total cultivada en México es de 450 hectáreas al año y en promedio un campo de cultivo no excede las 6.3 hectáreas. Las tendencias actuales son que esas pocas áreas destinadas al cultivo de chía se remplacen por cultivo de maíz que tiene un precio fijo en el mercado y está subsidiado por el gobierno (Ayerza, 1995).

El fruto de la planta de chía contiene cuatro semillas (*Figura 1.2*) ovoides de unos dos milímetros de largo por uno y medio de ancho, lisas, brillantes, color oscuro, con manchas irregulares, de color rojizo oscuro. Esta semilla oleaginosa está compuesta de tres capas, la más exterior no se diferencia hasta el momento en que la semilla tiene contacto con el agua y se observa una capa de gel conocida comúnmente como mucílago (Flores, 1938). Este mucílago, es un polisacárido principalmente constituido de ácido urónico y xilosas y llega a absorber una cantidad de agua de hasta siete veces el peso de la semilla. (Lin, 1994 y Scheer, 2000)



Figura 1.2 : Semillas de *Salvia hispanica*

1.3 Composición

La composición química de la semilla de chía (Tabla 1.1) y su valor nutrimental, le confieren un gran potencial para usarla dentro de los mercados alimenticios e industriales.

Tabla 1.1: Análisis proximal de la semilla de chía.

COMPONENTE	g / 100g semilla ^a
Humedad	4.31 ± 0.16
Grasa	29.80 ± 0.87
Fibra	18.00 ± 0.64
Cenizas	4.61 ± 0.03
Proteína	23.60
Carbohidratos	18.70
Fósforo	0.69 ± 0.01
Calcio	0.54 ± 0.01

^aBushway, et al., (1981)

Estos datos muestran que la semilla de chía posee un porcentaje de proteína comparable con el de otros granos como trigo (14%), maíz (14%) y amaranto (15%), también se ha demostrado que la semilla contiene una cantidad significativa de aceite (30%) mismo que está compuesto principalmente por ácidos grasos insaturados (Bushway, et al., 1981) (Tabla 1.2):

Tabla 1.2: Composición de ácidos grasos del aceite de chía.

ÁCIDOS GRASOS	g / 100g aceite ^a
Ácido palmítico 16:0	6.6
Ácido esteárico 18:0	3.3
Ácido oleico 18:1	7.6
Ácido linoléico 18:2	20.3
Ácido linolénico 18:3	60.2

^aAyerza, 1995

1.4 Usos

Se usa con agua o limonada como bebida refrescante, espolvoreadas sobre cereal, en ensaladas o salsas, como bocadillo, o bien molida y mezclada con harina para hacer panes o masas, además se utiliza como forraje. El aceite se usa como componente de pinturas ya que por su ligereza y cualidad secante es muy

útil (sustancia secante es aquella que al contacto con el oxígeno del aire se transforma en un material duro y resinoso). Se ha sugerido que los aceites esenciales podrían usarse en las industrias de sabores y fragancias pues su sabor similar al de la nuez, es muy agradable. Los aztecas la usaban simplemente molida para preparar una "patina" o "comalli", al polvo le agregaban agua y la agitaban hasta obtener una densidad agradable al paladar y conservaban la papilla por tiempos prolongados. También lo usaban para hacer "maque" o "charol" (mezcla de tierra y aceites) con la finalidad de fijar los colores o pigmentos y dar consistencia a las pinturas con las que decoraban jícaras, objetos de madera o sus propios cuerpos (Ayerza, 1993).

2 Compuestos nutraceuticos de aceites vegetales

No existe una definición formal para compuestos nutraceuticos, sin embargo varias instituciones como la International Food Information Council (IFIC), International Life Sciences Institute of North America (ILSI) y Health Canada tienen como común denominador la siguiente definición:

"Compuestos normalmente obtenidos a partir de alimentos y que además de nutrir tienen una actividad fisiológica benéfica demostrada proporcionando protección contra enfermedades crónicas" (American Dietetic Association, 2004).

2.1 Ácidos grasos poliinsaturados

2.1.1 Estructura e importancia

Existen ciertos ácidos grasos que son esenciales para el hombre, es decir no pueden ser sintetizados por el organismo y tienen que ser consumidos en la dieta. La deficiencia en su consumo ocasiona disminución del crecimiento, daños a riñones e hígado, alopecia y problemas en la piel. Los ácidos grasos que son esenciales son los poliinsaturados (PUFA's Polyunsaturated fatty acids por sus siglas en inglés) como el ácido linoléico (C 18:2 ω 6) y ácido α -linoléico (C 18:3 ω 3) (Chow, 1992) (Figura 2.1)

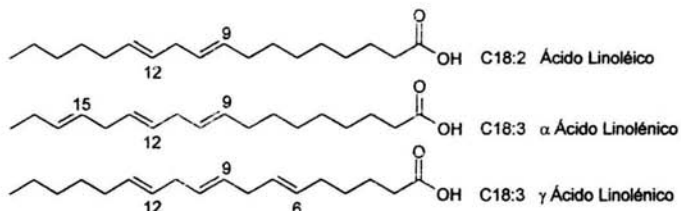


Figura 2.1 : Estructura de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's)

Estos ácidos grasos esenciales son materia prima para la síntesis de los llamados eicosanoides, que son otros ácidos insaturados como el ácido araquidónico, el eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), que a su vez, producen sustancias tipo hormonas como prostaglandinas y leucotrienos. Las prostaglandinas son sustancias que:

- intervienen en la función reproductiva,
- actúan como antiinflamatorios,
- activan la respuesta de linfocitos,
- actúan como vasodilatadores.

A nivel celular tienen la función de mantener todas las bicapas lipídicas de las membranas celulares, regulan la conformación de las proteínas en la membrana y participan en los eventos transduccionales (Chow, 1992).

2.1.2 Ácido linoleico

Las sales del ácido linoleico o ácido 9,12-octadecadienoico tienen usos muy variados en diferentes industrias. Los linoleatos de manganeso y cobalto se utilizan en la producción de lubricantes, pinturas y barnices como agentes secantes. El linoleato de calcio funciona como emulsificante y estabilizador en repostería; el linoleato de amonio en la manufactura de ceras pulidoras. Algunos productos de su oxidación se usan como saborizantes (champignon, papas fritas o tomate). Además su consumo tiene el efecto de reducir los niveles de colesterol, regular los niveles de glucosa en sangre, disminuir la probabilidad de padecer

cáncer y aterosclerosis hasta en un 30% (Gaona, 2000). La ingesta recomendada de este ácido es de 14 g/día (Chow, 1992)

2.1.3 Ácido α y γ linolénico

El ácido octadecatrienoico tiene dos isómeros: el α con insaturaciones en las posiciones 9,12 y 15 (ω 3) y el γ con las insaturaciones en las posiciones 6,9 y 12 (ω 6) que se sintetiza a partir del isómero α . Ambos tienen efectos benéficos en la salud y se utilizan en el tratamiento de enfermedades de origen diverso. El consumo de ácido α -linolénico está relacionado con el adecuado funcionamiento del sistema nervioso central y con el buen estado de la retina. Llama la atención el γ linolénico debido a que diversos estudios demuestran que su síntesis se encuentra reducida en condiciones como la edad avanzada, la diabetes, etc. Consecuentemente, las aplicaciones del γ linolénico se extienden a la elaboración de productos nutricionales destinados a determinados grupos de población (infantil, edad avanzada, hospitalaria, etc.), así como a la utilización clínica y en ensayos de laboratorio en estado de alta pureza. La ingesta recomendada de ácido linolénico es de 3 g/día (Chow, 1992).

2.1.4 Fuentes

La fuente vegetal más importante de ácido linolénico es la semilla de linaza, y en un porcentaje insignificante aparece la soya, pepita de calabaza y la nuez; las fuentes animales más importantes constituyen los aceites de pescado de agua fría como el atún, arenque, bacalao, sardina. Como fuentes de ácido linoleico se encuentran principalmente el azafrán y al maíz y como fuentes animales al arenque (Tabla 2.1)

Tabla 2.1: Concentración de ácidos grasos en diferentes alimentos (g/100g grasa)

Fuente		Saturados	C18:1 Oleico	C18:2 Linoleico	C18:3 Linolénico
Grasa animal	Mantequilla	67	27	4	1
	Lardo	43	48	6	2
	Arenque	20	2	20	52
Aceites Vegetales	Coco	78	6	1	-
	Maíz	14	50	34	-
	Oliva	9	85	5	-
	Palma	46	43	7	-
	Cacahuete	11	56	26	7
	Azafrán	6	19	76	-
	Linaza	9	18	17	55
	Girasol	12	64	20	4

En resumen las principales fuentes de ácidos grasos poliinsaturados son vegetales y algunos animales marinos.

2.2 Fitoesteroles

2.2.1 Estructura e importancia

Los esteroides encontrados en aceites vegetales se denominan fitoesteroides y se localizan en la fracción insaponificable de los lípidos (Normén, et al., 2002)

Son alcoholes policíclicos con un alcohol secundario en la posición C3, lo que los hace ligeramente polares. Su estructura y función es muy similar al colesterol, el esteroide de mayor predominancia en los animales. Los fitoesteroides se sintetizan a partir del escualeno (*Figura 2.5*) y están conformados por un anillo ciclopentanofenantreno y una cadena lateral en la posición C17 (*Figura 2.2*) (Cortarini, 2002). Mientras más larga es esta cadena lateral, los fitoesteroides adquieren un carácter más hidrofóbico (Piironen, et al., 2000).

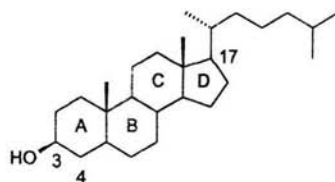


Figura 2.2: Estructura general de los esteroides

Existen distintos tipos de fitoesteroides dependiendo de la sustitución del C4: los 4-desmetil esteroides, los 4-monometil esteroides y los 4,4-dimetil esteroides, siendo los más abundantes y benéficos para la salud los primeros. Los 4-desmetil se dividen en 3 tipos dependiendo de sus estructuras:

- Esteroides de estructuras insaturadas (β -sitosterol, campesterol, estigmasterol)
- Estanoles la forma saturada de los esteroides (sitostanol, estigmasterol)
- Esteroides libres esterificados con ácidos grasos o con glicósidos (Moreau, et al., 2002).

En la literatura se han descrito más de doscientos cincuenta tipos de fitoesteroides, los principales son: campesterol, β -sitosterol, estigmasterol, campestanol y β -sitostanol (Figura 2.3). De estos cinco fitoesteroides los que se encuentran en mayor proporción en la naturaleza son el β -sitosterol y el campesterol, ver Figura 2.4:

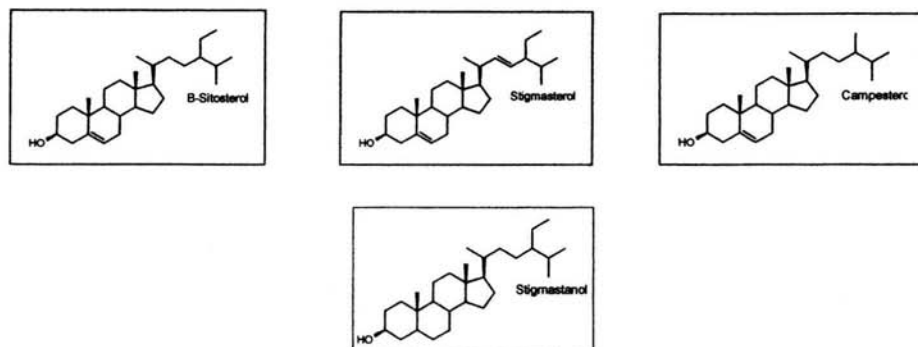


Figura 2.3: Estructura de los principales fitoesteroides encontrados en la naturaleza

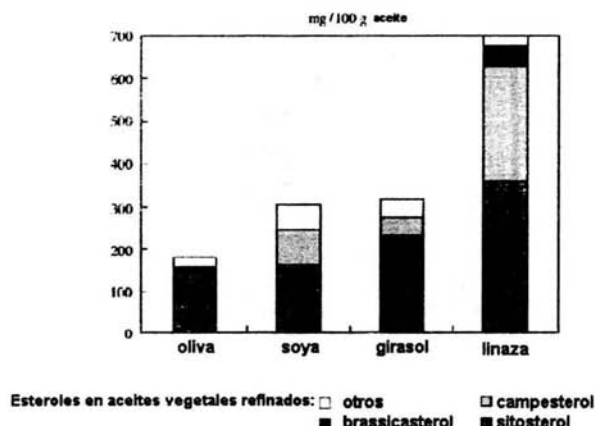
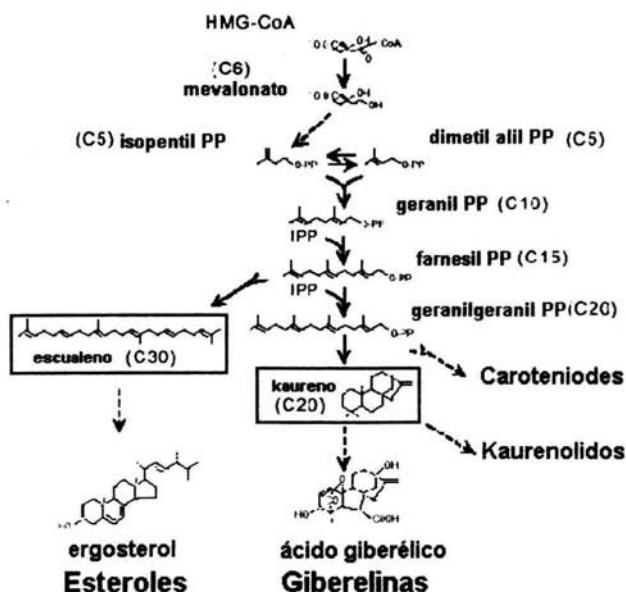


Figura 2.4 : Proporción de fitoesteroles en aceites refinados

Poseen estructuras anfífilas y se encuentran principalmente formando parte de las membranas celulares (mitocondrial y retículo endoplásmico) (Normén, e al., 2002), regulan la fluidez y la permeabilidad en estas y por tanto les dan estabilidad frente a la temperatura. (Piironen, et al., 2000)



^aFernández-Martin, R., (2000)

Figura 2.5: Principales pasos de la ruta biosintética de escualeno y esteroles

2.2.2 Efectos en la salud

Los efectos benéficos de los fitoesteroles se conocen desde al menos 1950. (Nguyen, 1999), pero fue hasta la década de los 90's que cobraron importancia como alimentos nutracéuticos (Quilez, et al., 2003). Algunos de los efectos son:

- Previenen enfermedades cardiovasculares.

Disminuyen los niveles de colesterol en sangre evitando su absorción principalmente en el intestino. El colesterol, tanto el que proviene de la dieta (entre 200 y 500 mg/día) como el que proviene de la circulación enterohepática (1 g/día) se reduce considerablemente en presencia de fitoesteroles.

El mecanismo exacto por el cual tienen este efecto no se ha entendido totalmente, sin embargo existe una hipótesis: "Los fitoesteroles en las condiciones apropiadas son eficientemente incorporados a las micelas en el lumen del intestino, desplazando al colesterol, lo que provoca su precipitación con otros fitoesteroles insolubles. El colesterol no absorbido de esta forma se excreta en las heces, mientras que los fitoesteroles que se encuentran en las micelas no son absorbidos debido a que la cadena lateral que tienen los hace hidrofóbicos y por tanto insolubles" (Nguyen, 1999, Hicks, 2001 y Moreau, 2001)

- Otros efectos son:

Awad, (2000) describe el efecto por el que los fitoesteroles previenen el desarrollo de cáncer de colon, seno y próstata, Wilt (1999) el efecto benéfico en la hiperplasia benigna en la próstata y Quilez, et al. (2003) su actividad como moduladores de la respuesta inmune y como antiinflamatorios. Además se ha observado que tienen actividad antioxidante y antirradicales libres (Normén, 2002).

2.2.3 Usos

- Son muy utilizados como emulsificantes en la industria de cosméticos.
- Como sustrato de la mayoría de intermediarios esteroidales y precursores utilizados para la producción de hormonas en el laboratorio.
- Algunos fitoesteroles con estructuras específicas inhiben el deterioro oxidativo de aceites, por tanto se usan como agentes antipolimerizantes de aceites para freído.
- Por su efecto hipocolesterolémico, algunas de sus aplicaciones comerciales son (Figura 2.6):
 - ✓ Aceites como el de fibra de maíz, que naturalmente contiene fitoesteranos esterificados a compuestos antioxidantes como lo es el ácido ferúlico. El nombre comercial del producto es "Amaizing oil™".
 - ✓ Se agregan como ésteres de ácidos grasos, por ejemplo: margarinas y aceites vegetales (CookSmart™), aderezos para ensaladas, bocadillos, productos dietéticos (Logicol, Cardio Aid-L) (Hicks, 2001) y como principio activo de algunos suplementos comerciales (Benecol™, Take Control™, Phytol, Prosterol, Cholestatin, ChoLESStolife). (Moreau, 2002)

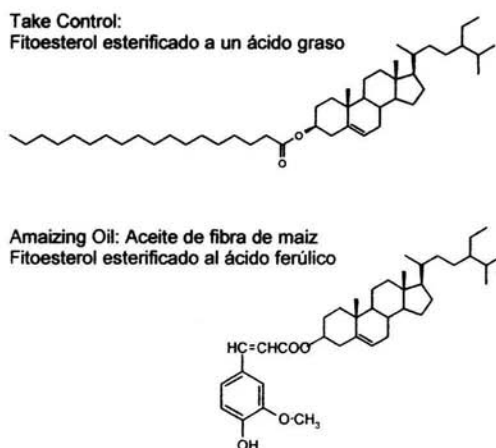


Figura 2.6: Estructura de los principios activos de productos comerciales

2.2.4 Dosis

Anteriormente se pensaba que la dosis necesaria de fitoesteroles para observar el efecto hipocolesterolémico era muy alta (10 a 25 g/día), esto aunado a su sabor a gis y a su estructura cristalina que dificulta su solubilidad fueron las limitantes de su uso. Era preferible utilizar medicamentos como los inhibidores de la 3-hidroxi-5-metilglutaril coenzima A reductasa llamados estatinas, que tienen también la función de disminuir el colesterol. Sin embargo más adelante los fitoesteroles generaron de nuevo interés cuando se comprobó que tan sólo 3 g/día, eran suficientes para tener el efecto hipocolesterolémico deseado. Actualmente se sabe que la dosis más efectiva de fitoesteroles es entre 1.5 y 3 g/día, misma que lleva a una reducción de entre 8% y 15% de LDL-colesterol en sangre y que a su vez a previene la arteriosclerosis hasta en 20% (Nguyen, 1999). En una ingesta diaria normal se consumen alrededor de 0.1 a 0.45 g/día de fitoesteroles lo que hace notar que es necesario el enriquecimiento de los alimentos o la toma de suplementos que contengan este tipo de compuestos nutracéuticos para obtener los beneficios que ofrecen estos compuestos (Normén, 2002).

Las estatinas tienen un efecto sinérgico con los fitoesteroles, pues en estudios recientes se observa que pacientes a los que se les administran combinados disminuyen la concentración de colesterol hasta en 67%. También el efecto hipocolesterolémico se incrementa cuando los fitoesteroles se esterifican con ácidos grasos ω -3. En el aspecto estrictamente nutricional una de las futuras líneas de investigación será encontrar los acarreadores adecuados para probar el efecto de los fitoesteroles combinados con otros ingredientes tales como las proteínas de soya y algunas fibras solubles de tal forma que se incremente el efecto hipocolesterolémico (Quilez, et al., 2003). Por ejemplo 1 g de sitostanol disminuye el colesterol 11% mientras que 300 mg de sitostanol en micelas de lecitina reduce el colesterol hasta en 34% (Hicks, 2001).

2.2.5 Efectos secundarios

Los fitoesteroles son compuestos sin efectos secundarios significativos, son reconocidos por la FDA como GRAS desde 1999 y se permite se agreguen hasta en un 20% en los alimentos.

No existe evidencia de actividad mutagénica "in vitro" o de alguna toxicidad crónica.

El principal efecto no deseable de los fitoesteroles es que interfiere con la absorción de carotenoides disminuyendo los niveles de estos en la sangre, sin embargo en algunos estudios se demuestra que esta disminución no es significativa y fácilmente puede revocarse con la adecuada adición de carotenoides en la dieta.

Excepto las personas que padecen sitosterolemia, enfermedad metabólica congénita, los fitoesteroles no tienen efectos dañinos para la salud (Nguyen, 1999)

2.2.6 Fuentes

En estudios anteriores se analiza el contenido de fitoesteroles de distintos tipos de alimentos (Piironen, 2000 y Phillips, 2002). En la *Tabla 2.2* se presenta un resumen del contenido de fitoesteroles por tipo de alimento y resulta evidente que la principal fuente de fitoesteroles son los aceites provenientes de semillas oleaginosas.

Tabla 2.2 : Contenido de fitoesteroles en varios alimentos

	Fuente natural	μmg/100 g grasa
Aceites	Colza	646 – 808
	Oliva	150 – 180
	Frijol de soya	280 – 300
	Girasol	290 – 330
Cereales	Centeno, trigo, cebada y avena	50 – 85
Vegetales	Papa	25
	Coliflor	200
Frutas	Frambuesas, naranja, uvas, manzana y moras	20 – 30
	Aguacate	75

El contenido de fitoesteroles de un alimento se puede ver afectado por:

- factores genéticos,
- de crecimiento (tipo de suelo, clima)
- almacenamiento
- procesamiento (Toivo, 1999)

2.2.7 Efecto del procesamiento

Se han realizado estudios en los que se determinan las pérdidas de fitoesteroles de un alimento que permanece en almacenamiento, los resultados demuestran que las pérdidas no son significativas si el alimento se mantiene en refrigeración.

Mientras que las pérdidas de fitoesteroles por efecto del procesamiento pueden llegar a ser hasta de 70%, cuando el proceso implica la exposición del alimento a altas temperaturas (240 °C).

Algunas de las reacciones por las cuales se degradan los fitoesteroles son: hidrólisis, isomerización, oxidación y deshidratación. (Piironen y Lindsay, 2000).

2.2.8 Obtención industrial de fitoesteroles

Algunos métodos para obtener fitoesteroles pueden ser:

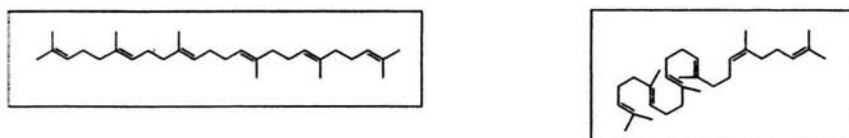
- En el proceso de deodorización de aceites vegetales.
- En el proceso de producción de papel, se obtienen de la fracción hidrofílica de hidrolizados de los árboles, las cuales poseen un alto contenido de estanoles (20%) (Quilez, et al., 2003).

2.3 Escualeno

2.3.1 Estructura e importancia

El escualeno es un hidrocarburo alifático altamente insaturado que pertenece al grupo de lípidos triterpenoides, también llamado 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno es un triterpeno que se localiza en la fracción insaponificable de los lípidos (Figura 2.7) (Guil-Guerrero, et al., 2000). El escualeno es un intermediario bioquímico del colesterol y esteroides vegetales (ver Figura 2.5 en la sección 2.2.1).

Figura 2.7: Estructuras del escualeno



2.3.2 Efectos en la salud y usos

En los últimos años se ha demostrado que el escualeno confiere algunos efectos benéficos entre los cuales podemos mencionar:

► Fotoprotector

En la Industria Farmacéutica se utiliza como agente humectante o emoliente para la producción de cosméticos, debido a su acción fotoprotectora pues actúa protegiendo a la célula contra las radiaciones (He, 2002).

► **Inhibidor de la oxidación**

Protege a las células de los radicales libres fortaleciendo al sistema inmune para disminuir el riesgo de padecer distintos tipos de cánceres (Lu, 2003) y también es un antioxidante natural de los aceites.

► **Hipocolesterolémico**

Disminuye los niveles de colesterol en sangre solo y en combinación con los tocotrienoles (Guil-Guerrero, et al., 2000).

► **Termoestable**

Es termoestable por lo cual es utilizado como lubricante para los discos de computadora (Bruni, et al., 2001)

2.3.3 Fuentes

La fuente principal de escualeno es el aceite de hígado de tiburón y ballena, de los cuales representa hasta un 80%. La obtención de escualeno a partir de animales marinos es muy costosa ya que la presencia de compuestos como el colesterol dificultan su purificación. Actualmente se buscan fuentes vegetales como alternativas para la obtención de este compuesto, a pesar de que en el aceite de oleaginosas el contenido no es tan alto como en animales. Dos de los cultivos considerados como una buena opción son la oliva con 0.3-0.7% (300 y 700 mg/100 g de aceite) y el aceite de amaranto que contiene entre un 6 y un 8% (8000 mg/100 g de aceite) de escualeno y el aceite de arroz con 320 mg/100 g de aceite (Guil-Guerrero, et al.,2000).

3 Determinación de compuestos nutraceuticos en aceites vegetales

3.1 Tratamiento de la muestra

3.1.1 Obtención de aceites vegetales

El método más utilizado para la extracción de materiales lipídicos en tejidos y oleaginosas se realiza con solventes. En este método los compuestos de interés son extraídos por afinidad al solvente. Los solventes más utilizados encontramos al: cloroformo, hexano, diclorometano o acetona (Moghadasian, 2000, Abidi, 2001 y Moreau, et al., 2002). El hexano es el solvente para el cual se obtienen los mejores rendimientos de extracción de fitoesteroles (Moreau, et al., 2002), escualeno (Bruni, et al., 2001) y ácidos grasos. Se mencionan métodos alternativos como la extracción con fluidos supercríticos, sin embargo tanto la extracción tradicional con solventes de polaridad óptima, como la alternativa con dióxido de carbono supercrítico tienen rendimientos de entre 95 y 100% de extracción con pérdidas mínimas de los componentes de la muestra. La ventaja de la extracción convencional con solventes es que resulta menos costosa (Abidi, 2001).

La extracción con solventes puede realizarse de diversas formas, para muestras de bajo contenido de humedad, se utilizan métodos como Soxhlet, el método más común, la extracción por sonicación o la extracción por agitación (Bruni, et al., 2001)

3.1.2 Saponificación del material lipídico

Posterior a la extracción es necesario realizar una hidrólisis alcalina de la muestra, mejor conocida como saponificación, con la siguiente finalidad:

- dividir a la fase lipídica en las fracciones que la conforman y

- liberar a los esteroides de sus ésteres correspondientes para la correcta cuantificación de éstos (Piironen y Lindsay, 2000).

Los grupos éster de los ácidos grasos reaccionan con una base (KOH) formándose como consecuencia la sal del ácido. Se obtienen dos fracciones una saponificable que es la que contiene las sales y otra no saponificable que es extraída con solventes orgánicos y es donde se localizan los compuestos que no reaccionaron con la base (Gaona, 2002).

Muchos autores desarrollan variantes del método de saponificación oficial establecido por la AOAC (Ref. 920.160, 1995) con el propósito de tener mejores rendimientos. Algunos de estos métodos poseen la ventaja de no exponer la grasa a altas temperaturas pues la saponificación se realiza dejando reaccionar la grasa con la base a temperatura ambiente durante toda la noche en agitación (Firestone, 1990 y Bruni, et al., 2001). La separación de las fracciones, es decir la extracción de la fracción insaponificable, en estos métodos alternativos se realiza de la misma forma que en el método oficial con éter de petróleo o hexano, aunque Toivo, et al., (1999) reconoce que el uso de cloroformo para la extracción es más efectivo.

Abidi, (2001), menciona que la saponificación también puede sustituirse por métodos de fraccionamiento con fluidos supercríticos, sin embargo en este método no se observa un aislamiento adecuado de los esteroides pues hay una co-extracción de otros componentes como triglicéridos

Toivo, et al. (2001), detectan que la cantidad total de fitoesteroides se subestima en muchas ocasiones debido a que los esteroides glicosilados no son cuantificados. Para evitar esta subestimación en las determinaciones propone una hidrólisis ácida previa a la saponificación para hidrolizar el enlace entre el esteroide y el carbohidrato que bajo las condiciones alcalinas de la saponificación no se rompe.

El problema que presenta este método es que existen ciertos fitoesteroles que son lábiles a las condiciones ácidas y pueden degradarse.

3.1.3 Tratamiento de la fracción saponificable

Las sales de los ácidos grasos contenidos en la fracción saponificable deben de nuevo transformarse en ácidos grasos, para esto después de la separación de la fracción insaponificable se acidifica el medio, normalmente con HCl. Después los ácidos grasos recuperados son esterificados, utilizando metanol y un catalizador, para su posterior cuantificación (Gaona, 2002). La esterificación de los ácidos grasos a sus ésteres metílicos es necesaria para su análisis en cromatografía de gases ya que los ésteres respectivos de los ácidos grasos son más volátiles, permiten una mejor separación, temperaturas de análisis menores y una mayor robustez y reproducibilidad de los datos cromatográficos obtenidos que si se inyectan en forma directa los ácidos grasos. Varios autores no realizan una recuperación de los ácidos grasos con el ácido, simplemente después de la saponificación realizan la esterificación de las sales de los ácidos grasos (Christie, 1989 y Bello, 1998)

3.2 Identificación y cuantificación de los compuestos

3.2.1 Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases

El análisis de los ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos se utiliza para la caracterización de la fracción lipídica de los alimentos. Se mencionan en la literatura métodos analíticos muy variados para estas caracterizaciones como: métodos enzimáticos, de titulación, etc. sin embargo el más utilizado y efectivo es el análisis cromatográfico en gases. La aplicación más prominente de la cromatografía de gases es precisamente el análisis de los esteres metílicos de los

ácidos grasos. Una de las ventajas que ofrece en comparación con otros métodos es que tiene una excelente resolución, es rápido y la detección es muy sensible para lo cual se utiliza comúnmente un detector de ionización de flama (Christie, 1989).

Las columnas cromatográficas más utilizadas para el análisis de estos compuestos son aquellas que tienen fases estacionarias polares hechas a base de polietilenglicoles o de cianopropil silicones (*Figura 3.1*) que permiten la separación de los ésteres dependiendo del número de carbonos y del grado de insaturación.

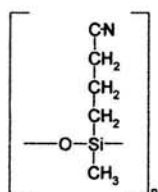


Figura 3.1: Estructura química de la fase estacionaria (cianopropil silicones)

Dos de las columnas utilizadas para el análisis son la DB-Wax y una columna con una fase de (50% cianopropil)-metilpolisiloxano comercialmente conocida como DB-23. La DB Wax separa ésteres que van desde los C4 hasta los C24 pero no separa isómeros de los ésteres y no tiene buena resolución para muestras complejas como de aceites de pescados, pero se utiliza para la separación de ésteres provenientes de aceites vegetales. Para el análisis de muestras complejas, que requieren la separación de isómeros y enriquecidas en ácidos altamente insaturados la opción de columna es la DB-23; las ventajas son las interacciones que se establecen entre el isómero y la fase estacionaria a través de uniones ciano-dipolo permitiendo que los isómeros trans se eluyan de la columna antes que los cis. En conclusión la DB-23 es una columna de alta polaridad que permite la separación entre isómeros del mismo número de carbonos y con diferente posición de las insaturaciones (Christie, 1989)

Los métodos de análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos utilizan programas de temperaturas que dependen del gas acarreador, de la relación de split, etc. Christie (1989), propone varios métodos de análisis dependiendo de la fase estacionaria utilizada. Se recomienda que posterior al análisis cromatográfico en gases se realice una identificación en el detector selectivo de masas para corroborar los resultados.

3.2.2 Determinación de escualeno y fitoesteres por cromatografía de gases

El método más común de análisis de esteroides es por cromatografía de gases y es reconocido como el más adecuado y que además permite a la par la cuantificación de ciertos hidrocarburos como el escualeno. Las nuevas columnas capilares son capaces de hacer una separación muy eficiente de los componentes de la matriz en comparación con las columnas empacadas utilizadas anteriormente. Otra de las metodologías de análisis puede ser la cromatografía de líquidos de alta resolución que ofrece una alternativa de análisis no destructiva de la muestra, la deficiencia de las técnicas por cromatografía de líquidos es que no son capaces de ser lo suficientemente selectivas para la separación de los esteroides y estanoles (Piironen y Lindsay, 2000).

Para el análisis de los fitoesteres muchos autores proponen una derivatización de estos compuestos previa a la inyección en el cromatógrafo de gases. Fenton, (1992) establece que el procedimiento de derivatización más utilizado es en el que se obtienen los trimetilsililéteres de los fitoesteres (TMS) y Bruni, et al., (2001) en su artículo describe la metodología. Aparentemente la derivatización hace a los compuestos más termoestables y menos polares mejorando la forma de los picos en el cromatograma, sin embargo se ha demostrado que el análisis directo de los fitoesteres es igualmente eficiente, sin la complicación que puede presentar la preparación de los derivados y el manejo de sustancias tóxicas como la piridina necesaria como catalizador en la preparación (Kovacs, 1990 y Tvřzickà, et al.,

1991). En conclusión la derivatización previene la deshidratación y descomposición de los fitoesteres cuando serán almacenados por algún tiempo pero la no derivatización es confiable y segura (Moreau, et al., 2002)

Abidi, 2001 en la revisión bibliográfica que hace de técnicas de análisis cromatográfico de esteroides en aceites vegetales, menciona al menos 41 técnicas cada una diseñada para el análisis de esteroides en diferentes matrices. La mayoría de los métodos utilizan columnas con fases de polisiloxano y detectores de ionización de flama con excelentes resultados.

Para el análisis de esteroides en plantas la mayoría de los laboratorios usan columnas de fase de polisiloxanos de características no polares como ejemplos comerciales se encuentran: DB-5, SPB-5, RTx-5, SE-52, HP 5MS, etc.. Se ha mostrado la separación eficiente de los esteroides principales β -sitosterol, estigmasterol y campesterol en esta fase. En particular se menciona una columna con una fase de 5%-fenil-metilpolisiloxano (Figura 3.2) para la cual se han reportado excelentes resultados, la ventaja de esta fase es que la volatilización de la fase estacionaria a las temperaturas de trabajo en el análisis es muy bajo, lo que la hace ideal para el análisis por cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas. Además presenta una excelente sensibilidad, y tiene un intervalo de temperaturas amplio para trabajar que va desde $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $325/350\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abidi, 2001)

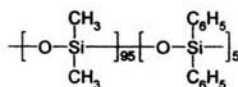


Figura 3.2: Estructura de la fase estacionaria (5%-fenil-metilpolisiloxano)

Para el análisis se utilizan en ocasiones programas de temperaturas en los hornos para hacerlo más rápido, pero Toivo, (2001) observó buenos resultados de separación usando una isoterma a $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el análisis de harinas de trigo. Igual que para los ésteres metílicos se recomienda la posterior identificación en el detector selectivo de masas para corroborar los resultados.

3.2.3 Determinación de escualeno por cromatografía líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) es un método alternativo para la cuantificación de escualeno. A diferencia del análisis de fitoesteroles por HPLC, el análisis de escualeno por esta técnica muestra buena eficiencia y resolución de los picos. Las metodologías más recomendadas proponen el uso de columnas con fases de nucleosil 100 y uso de detectores de arreglo de diodos. La longitud de onda para la detección de escualeno utilizada es a 214 nm (He, 2002).

3.3 Purificación de los compuestos de la fracción insaponificable

La materia no saponificable está formada por hidrocarburos alifáticos y aromáticos, escualeno, esteroides, tocoferoles, carotenoides y compuestos volátiles (Moreda, et al., 2001).

Para la separación de estos compuestos se propone una purificación en columna de extremo abierto empacada con sílica gel al vacío (Abidi, 2001). La elución se realiza con una mezcla de solventes orgánicos ajustados a las características particulares de los compuestos que se desea sean separados, se recomiendan los solventes como: hexano, éter etílico, éter de petróleo y acetato de etilo en distintas proporciones. Se realiza un gradiente de solventes de la fase móvil de tal manera que se va aumentando la polaridad de esta, y los compuestos son eluidos de la columna en función de su polaridad. El escualeno es un compuesto hidrofóbico que será eluido de la columna cuando la fase móvil sea no polar. Por su parte los fitoesteroides con una estructura más polar deberán ser eluidos con una fase móvil de características ligeramente más polares (Bruni, et al., 2001). Para la identificación de los compuestos de interés obtenidos en las fracciones de la columna, se hace un monitoreo con cromatografía en capa fina (CCF). Se recomienda colocar en la columna una cantidad de 1 g de fracción insaponificable por cada 60 g de sílica (Abidi, 2001).

Para el análisis de esteroides normalmente se incluye un estándar interno, que debe agregarse en las fases iniciales del tratamiento de la muestra para compensar las posibles pérdidas que pueda haber durante la extracción. Los estándares internos más utilizados son el 5 α -colestano y el colesterol (Piironen, 2000)

Cuando se desea hacer separación por clases de fitoesteroides como 4-desmetilesteroides, 4,4 dimetilesteroides y esteroides glicosilados en lugar de sílica se utiliza alumina desactivada o en una columna de fase inversa (Abidi, 2001) .

Materiales y métodos

Con el propósito de identificar y cuantificar los compuestos nutracéuticos de la semilla de chía, el esquema general de la investigación se encuentra en la *Figura 4.1*:

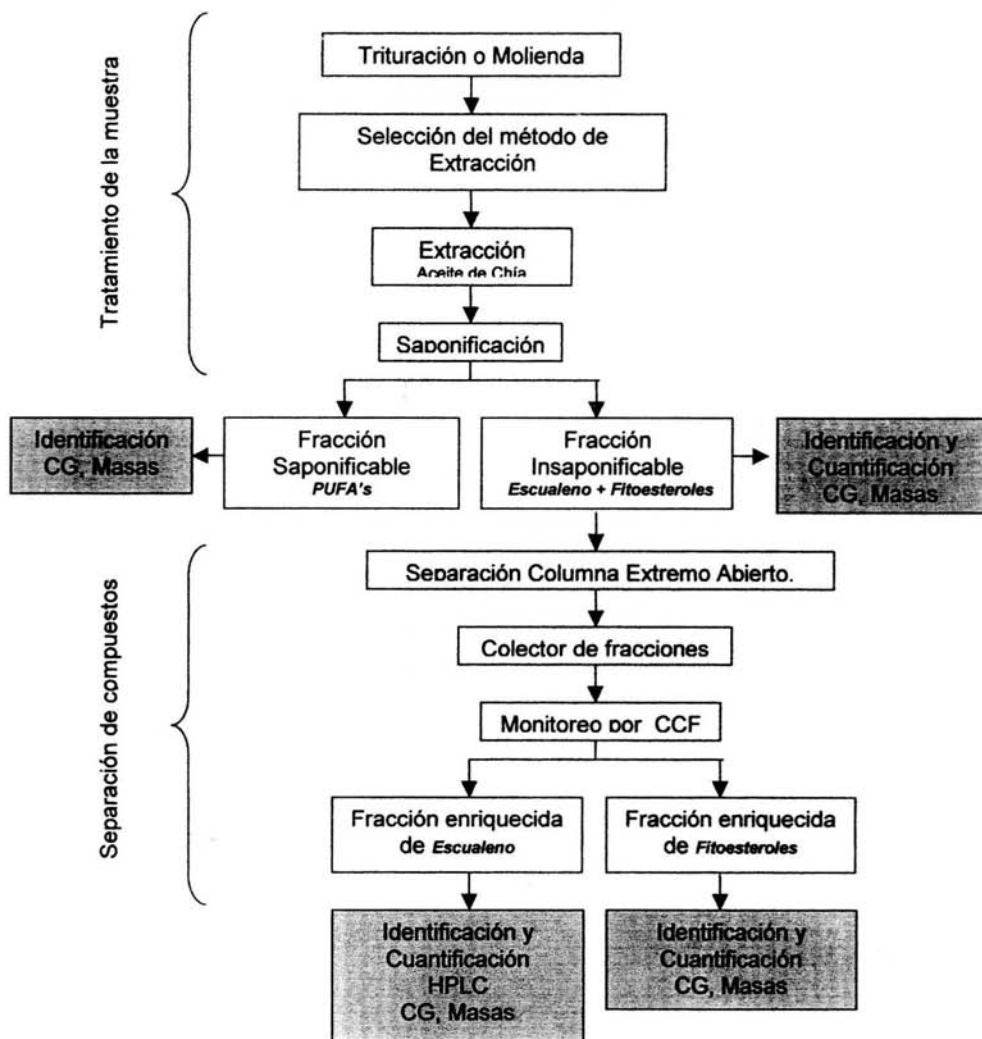


Figura 4.1: Esquema general de la metodología empleada

4 Tratamiento de la muestra

4.1 Trituración o molienda

Se seleccionaron dos muestras diferentes de semilla de chía: una proveniente del estado de Jalisco y otra del estado de Sinaloa, con la finalidad de comparar el contenido de los compuestos de interés. Las semillas se limpiaron y se molieron. El harina obtenida se almacenó por un máximo de veinticuatro horas en un frasco opaco y en refrigeración hasta la extracción para evitar el deterioro químico de los compuestos de la chía molida.

4.2 Extracción de la grasa

Se extrajo la grasa del harina por tres métodos distintos (Soxhlet, agitación por 24 h y sonicación por 1 h) con el propósito de evaluar por cual de ellos se obtenía un mejor porcentaje de grasa.

4.2.1 Método 1 Soxhlet (Ref 941.07 AOAC)

Se pesaron 1300 g de semilla molida y se colocaron en un cartucho de celulosa dentro de un extractor Soxhlet con capacidad para 10 L de solvente, cubriendo el extremo abierto del cartucho con algodón. Por el extremo superior de refrigerante se añadió hexano (Reasol, grado Q.P.) en cantidad suficiente para dos descargas del extractor (aproximadamente 7 L). La extracción tuvo una duración de doce horas manteniendo la temperatura del solvente en $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y ésta se suspendió en el momento que el solvente no tenía residuos de grasa antes de la descarga.

4.2.2 Método 2 Agitación 24 h

Se colocaron 30 g de semilla molida con 600 mL de hexano en un matraz erlenmeyer de 1 L. El matraz se colocó en una parrilla con agitación magnética por veinticuatro horas. Cada matraz se mantuvo aislado de la luz y en una atmósfera inerte con N_2 . Transcurrido el tiempo se filtró el contenido de cada matraz y el filtrado se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min en una centrífuga IEC modelo HT (Bruni, 2001)

4.2.3 Método 3 Sonicación 1 h

Se colocaron 5 g de semilla molida y 100 mL de hexano en un matraz erlenmeyer de 250 mL aislado de la luz. Se burbujeó N₂ para mantener una atmósfera inerte. El matraz fue colocado en un sonicador Cavitator Mettler Electronics (Modelo 4.6) a una frecuencia de 50/60 Hz y 85 watts por una hora. Transcurrido el tiempo se filtró el contenido de cada matraz y el filtrado se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min en una centrífuga IEC modelo HT (Bruni, 2001)

El extracto obtenido por cada método de extracción se concentró a sequedad evaporando el hexano en un rotavapor marca Büchi R-205 con baño B-490 a 40°C. El aceite obtenido se transfirió a matraces a peso constante y se pesó cada uno en una balanza analítica Marca Ohaus (sensibilidad de 0.0001 g) para evaluar el porcentaje de grasa obtenido por cada método. Una vez pesado el aceite, se distribuyó en frascos viales color ámbar de 25 mL, cerrados en una atmósfera de nitrógeno y sellados con parafilm. Todos los extractos se almacenaron a -4 °C hasta el momento de la saponificación.

Cálculos

Se calculó el porcentaje de grasa extraída en la muestra:

$$\%Grasa = \left(\frac{VG - v}{H} \right) 100$$

donde:

$VG = Masa(g) \text{ vial con grasa}$

$v = Masa(g) \text{ vial}$

$H = Masa(g) \text{ semilla molida}$

NOTA: Para los 3 métodos de extracción.

Antes de cada tratamiento de extracción de grasa, se seleccionaron determinadas muestras a las cuales se añadieron 10 mg de éster metílico del ácido γ -linolénico (Sigma al 99%) como estándar interno para evaluar el porcentaje de recuperación del éster.

4.3 Saponificación

En un matraz erlenmeyer de 2 L se colocaron 50 g de aceite de chía y 1 L de una solución de hidróxido de potasio (KOH) 0.5 M en etanol al 95% y 30 mg de colesterol (Sigma-Aldrich Co.) como estándar interno. El matraz se colocó en una parrilla de agitación magnética protegido de la luz y cerrado con una atmósfera inerte de N₂. Se mantuvo el contenido del matraz en agitación y a temperatura ambiente durante 20 h (Gaona, 2002)

4.3.1 Método extracción de fracción insaponificable

Transcurrido el tiempo de saponificación, se adicionaron al matraz 300 mL de hexano y 100 mL de agua destilada (el agua se agregó para romper la emulsión y observar la separación de fases) y se agitó. El contenido del matraz se colocó en un matraz de separación y se colectó la fracción de hexano. A la fracción acuosa se le volvió a agregar hexano (300 mL) dos veces más.

Se colectaron las fracciones de hexano en las cuales se encuentran los compuestos insaponificables.

4.3.2 Recuperación de los ácidos grasos

Al matraz con la fracción acuosa residual se le agregaron 100 mL de HCl 6 M. Se colocó de nuevo en la parrilla de agitación magnética y se mantuvo en agitación en la campana aproximadamente 5 min. A la mezcla todavía en agitación se le agregaron 200 mL de hexano. Se vertió el contenido a un matraz de separación y se colectó la fracción de hexano, este procedimiento se realizó una vez más.

Ambos extractos tanto el de la fracción insaponificable como el de la saponificable se pasaron por un filtro con sulfato de sodio anhidro, para deshidratar y en un rotavapor se les evaporó el solvente hasta sequedad. La materia obtenida se transfirió a frascos viales color ámbar de 25 mL a peso constante y se pesó cada uno en una balanza analítica marca Ohaus (sensibilidad de 0.0001 g) para evaluar el rendimiento. Una vez pesados se cerraron en una atmósfera de nitrógeno y se sellaron con parafilm. Todos los extractos se almacenaron a -4 °C (Gaona, 2002).

Cálculos

Se calculó el porcentaje de fracción insaponificable en la muestra, la fracción saponificable se calcula de la misma forma.

$$\%F_{Saponificable} \text{ o } F_{Insaponificable} = \left(\frac{VF - v}{G} \right) 100$$

donde

$VF = \text{Masa(g) vial con } F_{Saponificable} \text{ o } F_{Insaponificable}$

$v = \text{Masa(g) vial}$

$G = \text{Masa(g) grasa}$

5 Identificación y cuantificación

5.1 Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (AOAC)

Se colocan 350 mg de la fracción saponificada en un matraz bola de 25 mL y se le agregaron 7 mL de BF_3 14% en metanol (Sigma-Aldrich, Co.). El matraz se coloca sobre una mantilla de calentamiento. Se mantuvo en ebullición durante 2 min y después por el extremo superior del refrigerante se agregaron 5 mL de hexano y se dejó en ebullición por otro minuto más. Se enfrió el contenido y se agregaron 15 mL de una solución saturada de NaCl. Posteriormente se hicieron tres extracciones de los ésteres con 20 mL de hexano cada una. La fracciones de hexano se colectaron, se pasaron por un filtro con sulfato de sodio anhidro y luego se evaporó el hexano en el rotavapor. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se trasvasaron a un frasco vial ámbar puesto a peso constante, finalmente se pesó el vial, se cerró con una atmósfera inerte de N_2 y almacenó a temperatura de congelación.

5.2 Perfil de ácidos grasos y presencia de ácido γ -linolénico:

Una vez obtenidos los ésteres metílicos de los ácidos grasos, éstos se diluyeron a 1 mg/mL aproximadamente y posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Modelo: G1530A) con torreta de inyección automática de 100 viales (Modelo: 18593B). La detección se realizó en un detector de ionización de flama y la identificación cualitativa de los ácidos grasos se realizó por espectrometría de masas con un equipo Agilent 6850 (Modelo: G2630A) con

controlador Manual (Modelo: G2629A) y detector Selectivo de Masas Agilent 5973 (Modelo: G62577A). Se utilizó una columna Hewlett Packard DB-23 (Alta polaridad) 50%-Cianopropil-metilpolisiloxano (122-2361) con un diámetro interno de 0.25 mm, longitud de 60 m y película de 0.15 μm . Las condiciones del método de separación que se establecieron en el equipo se describen en la *Tabla 5.1*. El sistema de análisis de datos para la cuantificación en cromatografía de gases se realizó en el software ChemStation versión AA.05.02 673 MX95245561

Tabla 5.1: Condiciones de separación e identificación de PUFA'S por cromatografía de gases:

Inyector	T= 260°C; Presión constante Split 130:1 N ₂ =1mL/min (Acarreador ultra alta pureza)
Programa de temperaturas	Temperatura inicial 170°C Rampa=2.5°C/min hasta 190°C (por 1min) Rampa=1°C/min hasta 205°C (por 1min)
Detector FID	T=280°C H ₂ =40mL/min; N ₂ =30mL/min (Auxiliar); Aire= 450mL/min

Para la identificación y cuantificación de γ -linolénico se inyectó una curva patrón con el estándar.

5.3 Perfil de fitoesteroles y cuantificación de escualeno y fitoesteroles

5.3.1 Cromatografía de gases para cuantificación de escualeno y fitoesteroles

Las fracción insaponificable se diluyó a 1 mg/mL aproximadamente y posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Modelo: G1530A) con torreta de inyección automática de 100 viales (Modelo: 18593B). La detección y cuantificación se realizó en un detector de ionización de flama y la identificación cualitativa de los fitoesteroles se realizó por espectrometría de

masas con un equipo Agilent 6850 (Modelo: G2630A) con controlador Manual (Modelo: G2629A) y detector Selectivo de Masas Agilent 5973 (Modelo: G62577A). Se utilizó una columna Hewlett Packard HP-5MS Cross-Linked 5% Fenil metil polisiloxano (19091S-433) con un diámetro interno de 0.25 mm, longitud 30 m (27 m) y película de 0.25 μ m. Las condiciones del método de separación se encuentran en la *Tabla 5.2*.

Tabla 5.2: Condiciones de separación e identificación de escualeno y fitoesteroles por cromatografía de gases:

Inyector	T= 325°C; Presión constante Split 60:1 N ₂ = mL/min (Acarreador ultra alta pureza)
Programa de temperaturas	Temperatura constante de 280°C (por 20min)
Detector FID	T=325°C H ₂ =40mL/min; N ₂ =30mL/min (Auxiliar); Aire= 400mL/min

Para la identificación y cuantificación de escualeno y fitoesteroles se inyectó una curva patrón con los estándares de los compuestos: Escualeno, Estigmasterol 95% (Sigma S2424-5G), Estigmastanol 95% (Sigma S-4297) y β -Sitosterol (Sigma S-1270). El sistema de análisis de datos para la cuantificación en cromatografía de gases se realizó en el software ChemStation versión AA.05.02 673 MX95245561

5.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificación de escualeno

Las fracciones que contenían escualeno fueron diluidas con éter de petróleo: éter etílico (99:1) y analizadas también por HPLC en un equipo Beckman 421, la detección se realizó en un detector de arreglo de diodos Beckman 163 con una λ =214 nm. La columna utilizada fue una RP-C18 (Nucleosil 100-C18, 5 μ M, 250X4 mm i.d.), la elución fue isocrática con metanol-2-propanol-ácido acético (91.95:8:0.05) y el volumen de inyección y el flujo fueron respectivamente 20 μ L y 1 mL/min.

6 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS

La separación de la fracción insaponificable se realizó en una columna cromatográfica de vidrio de 5 cm de diámetro empacada al vacío con 60 g de sílica gel MN Kieselgel 60 (red: 230-400, partícula 0.04-0.063mm). Se colocó aproximadamente una porción de 0.8 a 1.0 g de materia insaponificable mezclada con 2.0 g de celita industrial en la parte superior de la columna y se desarrolló un gradiente de aumento de la polaridad de la fase móvil. Se comenzó la elución con éter de petróleo al 100% y gradualmente se aumentó la polaridad de la fase móvil agregando un porcentaje de acetato de etilo y una vez que los compuestos de interés salieron de la columna se lavó con metanol.

NOTA: El patrón de elución seleccionado como el óptimo para realizar la separación de los compuestos se expone en la sección de resultados.

Se colectaron fracciones de 150 mL en un matraz Kitasato de 250 mL conectado al vacío para acelerar la elución de cada componente en la columna a un flujo de 50 mL/min aproximadamente.

Cada fracción se sometió a una cromatografía en capa fina (CCF) en placas de aluminio con determinados patrones de elución y revelado (*Tabla 6.1*) para determinar la presencia de los diferentes compuestos mediante la comparación del R_f estándar contra el experimental.

$$\text{Cálculos: } R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (Frente de solvente)}}$$

Tabla 6.1 Condiciones de identificación en CCF.

Compuesto	Fase móvil (Camara)	Revelado
Escualeno	Éter de Petróleo: Éter etílico (99:1)	Sulfato Cérico
Fitoesteroles	Éter de Petróleo: Acetato de Etilo (75:25)	H ₂ SO ₄ 10%

Las fracciones que de acuerdo con su R_f contenían los mismos compuestos se agruparon y se evaporaron a sequedad en rotavapor y se almacenaron en viales ámbar previamente puestos a peso constante para determinar la cantidad de cada fracción y facilitar la posterior dilución para la inyección en el cromatógrafo de gases. Finalmente se cuantificaron los compuestos que contenía cada fracción por la metodología en cromatografía de gases antes descrita en la sección 5.3.

Resultados y discusión

7 Cuantificación de grasa y fracción saponificable e insaponificable

7.1 Contenido de grasa

7.1.1 Comparación de los métodos de extracción

Se comparó entre los porcentajes de grasa obtenidos por tres métodos diferentes de extracción para determinar cuál presenta mejores cantidades de grasa y de esta forma cuantificar en este extracto los compuestos de interés. Los métodos propuestos son el método tradicional Soxhlet y dos de los métodos descritos por Bruni, et al., (2001) que son, agitación 24 h y sonicación 1 h y que han mostrado buenos resultados en otros estudios.

Los métodos con más alto porcentaje de grasa extraída fueron: Soxhlet y agitación por 24 h. El método de sonicación por 1 h se descartó porque el rendimiento resultó menor que en los otros métodos y la cantidad de muestra que puede someterse a extracción es baja, sin embargo aunque la cantidad de grasa extraída es ligeramente menor comparada con los otros métodos el breve tiempo de extracción es una ventaja. El problema radica en que no es factible sonicar por más tiempo porque de lo contrario por el tipo de equipo utilizado la muestra se calentaría demasiado provocando la pérdida de compuestos de interés. En otros laboratorio existen equipos de sonicación que evitan el sobrecalentamiento de la muestra en cuyo caso se recomienda probar este método. El promedio de las extracciones realizadas por cada uno de los métodos se presentan en la *Tabla 7.1*.

Tabla 7.1: Porcentaje de grasa en chía por diferentes métodos de extracción.

MÉTODO	g grasa /100g semilla ^a
Soxhlet	29 ± 4.8
Agitación 24 h	30 ± 4.0
Sonicación 1 h	22 ± 5.1

^a Promedio de tres determinaciones

NOTA: La comparación de los métodos de extracción se realizó únicamente en la semilla de chía procedente del estado de Jalisco.

El método de agitación por 24 h presenta algunas ventajas sobre el método de Soxhlet que pueden hacerlo más atractivo, por ejemplo:

- el aceite no se expone a altas temperaturas;
- técnicamente, es posible mantener el medio de extracción en una atmósfera inerte de nitrógeno, minimizando la oxidación de la grasa, y

Por su parte, el método de Soxhlet, posee las siguientes ventajas:

- la extracción se realiza en menor tiempo, pues la extracción por este método tiene una duración de aproximadamente 15 h es decir 9 h menos que por el método de agitación.

Por las dimensiones del equipo con el que cuenta el laboratorio el método Soxhlet resulta más recomendable si se desea obtener una cantidad elevada de aceite y porque los porcentajes de extracción de grasa son muy similares al método de agitación 24 h, que es ligeramente más elevado. Sin embargo, dado que es parte del experimento determinar la presencia de ácido γ -linolénico y éste es muy susceptible a oxidación por temperaturas superiores a 60 °C, se decidió utilizar el método de agitación por 24 h en atmósfera inerte.

7.1.2 Comparación del contenido de grasa entre las muestras de semilla de chía

Una vez elegido el método de extracción, se realizó la extracción de la grasa de las semillas procedentes de Jalisco y Sinaloa, dos de los estados mayormente productores de semilla de chía en la República.

Se observó que la chía cultivada en Sinaloa presenta un contenido de 20 a 29% de grasa, mientras que la chía de Jalisco presenta un contenido de grasa de 23 a 32%. Los resultados se encuentran en la *Tabla 7.2*.

Para determinar si existe diferencia significativa entre el contenido de grasa de las dos muestras se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los datos obtenidos (Apendice 1 *TABLA 10.1*). En la tabla se detalla el procedimiento para

determinación de la diferencia significativa. Se incluye la desviación estándar de los datos obtenidos para el porcentaje de grasa de las dos muestras.

Tabla 7.2: Resultados obtenidos de porcentaje de grasa

g grasa / 100 semilla ^a		
	Sinaloa	Jalisco
1	18.72	26.17
2	20.77	23.53
3	29.40	31.19
4	27.62	30.82
5	28.51	32.22
6	28.07	34.37
X	25.51	29.71
σ	4.55	4.05

X= Promedio de seis repeticiones.

σ = Desviación estándar

^a Cada una de las repeticiones se hizo por duplicado

Entre el contenido de aceite de la muestra de Jalisco y la muestra de Sinaloa existe diferencia significativa (Nivel 5%), siendo la semilla procedente de Jalisco la que tiene un mayor contenido de grasa. Las diferencias entre las muestras respecto a su contenido de aceite pueden deberse al efecto de algunos factores ambientales, propios de la región donde fueron cultivadas como la temperatura, luz, tipo de suelo y cantidad de agua, incluso hasta la latitud y longitud de la zona afectan la composición de la semilla (Ayerza,1995). Aunque ambas semillas pertenecen a la misma variedad (*Salvia hispanica*), el lugar donde se cultiva cada una es un factor determinante de las variaciones en su composición.

7.1.3 Comparación del contenido de grasa de chía en estudios previos

En estudios previos sobre la composición proximal de semilla chía, el método utilizado para la determinación de grasa es Soxhlet (ver Tabla 7.3) y se han reportado valores de 30% para *Salvia hispanica* (Flores, 1938,) y 29.8% para *Salvia polystachya* (Bushway, 1981). Estos valores son similares al obtenido para la semilla *Salvia hispanica* del estado de Jalisco.

Tabla 7.3 : Valores del porcentaje de grasa en muestras (Jalisco y Sinaloa) contra valores reportados en otros estudios en chía.

Fuente	g grasa / 100g semilla	Método
Bushway (1981)	29.8 ± 0.87	Soxhlet
Flores (1938)	30.00	Soxhlet
Chía JALISCO	29.71 ± 4 ^a	Agitación 24 h
Chía SINALOA	25.51 ± 4 ^a	Agitación 24 h

^a Promedio de seis repeticiones, ver TABLA 7.2.

En comparación con otras fuentes de aceite vegetal (semillas oleaginosas) como la semilla de ajonjolí que contiene 55% de aceite o la semilla de girasol con 50%, la chía contiene un porcentaje menor (entre 26 a 30%) (Tabla 7.4). El aceite de linaza tiene características similares al aceite de chía, sin embargo la semilla de linaza contiene una cantidad ligeramente mayor de aceite.

Tabla 7.4: Promedio del porcentaje de grasa en muestras de chía (Jalisco y Sinaloa) contra otras semillas oleaginosas.

Linaza ^a	41
Ajonjolí ^a	55
Girasol ^a	50
Chía Sinaloa	26
Chía Jalisco	30

^a Chow, (1992)

7.2 Contenido de fracción saponificable e insaponificable

Los resultados obtenidos de la hidrólisis alcalina de la grasa extraída para cada una de las muestras (Jalisco y Sinaloa), se encuentran en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5: Resultados obtenidos del porcentaje de fracción saponificable e insaponificable

		g fracción saponificable en 100 g grasa	g fracción insaponificable en 100 g grasa
Sinaloa	1	76.72	7.84
	2	91.09	7.71
	3	71.48	5.08
	4	91.24	5.52
	5	75.20	10.89
	6	87.05	13.46
	X	82.13	8.42
σ	8.70	3.22	
Jalisco	1	90.94	7.21
	2	86.73	9.37
	3	90.29	5.86
	4	85.18	7.66
	5	90.84	9.97
	6	87.06	6.39
	X	88.51	7.74
σ	2.48	1.63	

X= Promedio de seis repeticiones.

σ= Desviación estándar

Se determinó que la fracción mayoritaria es la saponificable pues representa más de 80% de la grasa para ambas semillas, siendo ligeramente mayor para la chía de Jalisco (88%) que para chía Sinaloa (82%). La fracción insaponificable representa entre 8.4-9.4% de la grasa dependiendo de la variedad.

La manipulación de la grasa, debida a la reacción de saponificación y durante las extracciones posteriores, provoca la pérdida de cierta cantidad de materia por esto la suma del contenido de fracción saponificable y el contenido de fracción insaponificable no es igual a 100% de la grasa.

Al igual que en el caso del porcentaje de grasa, para determinar si existe diferencia significativa entre las muestras en cuanto al contenido de fracción saponificable y fracción insaponificable se realizó un ANOVA a los datos obtenidos. (Apéndice1 ver Tablas 10.2 y 10.3). Los ANOVAS demuestran que entre los porcentajes de fracción saponificable e insaponificable obtenidos para

cada muestra no existe diferencia significativa. El mismo ANOVA sirve para establecer que no hay diferencia significativa entre las repeticiones, es decir entre cada saponificación, lo que es un indicador de que el método alternativo al oficial que se utilizó para saponificar la muestra en frío es preciso.

Estudios anteriores reportan porcentajes de fracción insaponificable y saponificable muy similares a los obtenidos para la chía de Jalisco y la de Sinaloa (Tabla 7.6). Flores (1938), cuantifica la proporción de fracción saponificable e insaponificable por el método oficial (Ref. 920.160, AOAC, 1995), mientras que la determinación de la cantidad de fracción saponificable e insaponificable para la chía de Jalisco y la de Sinaloa realizada en este trabajo consistió en un método alternativo realizado en frío, lo cual probablemente es una de las causas de las diferencias observadas.

Tabla 7.6: Valores de fracción saponificable y fracción insaponificable contra valores reportados en otros estudios en chía

Fuente	g fracción saponificable en 100 g grasa	g fracción insaponificable en 100 g grasa
Flores (1938)	90	8.1
Chía Sinaloa	82.13 ^a	8.42
Chía Jalisco	88.51 ^a	7.74

^a Promedio de seis repeticiones, ver TABLA 7.5

8 Identificación y cuantificación de compuestos nutraceuticos

8.1 Perfil de ácidos grasos y presencia de ácido γ -linolénico:

La fracción saponificable esterificada, es decir, los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gases. El perfil de la fracción saponificable de la semilla de Jalisco se observa en la *Figura 8.1* y el de la semilla de Sinaloa en la *Figura 8.2*.

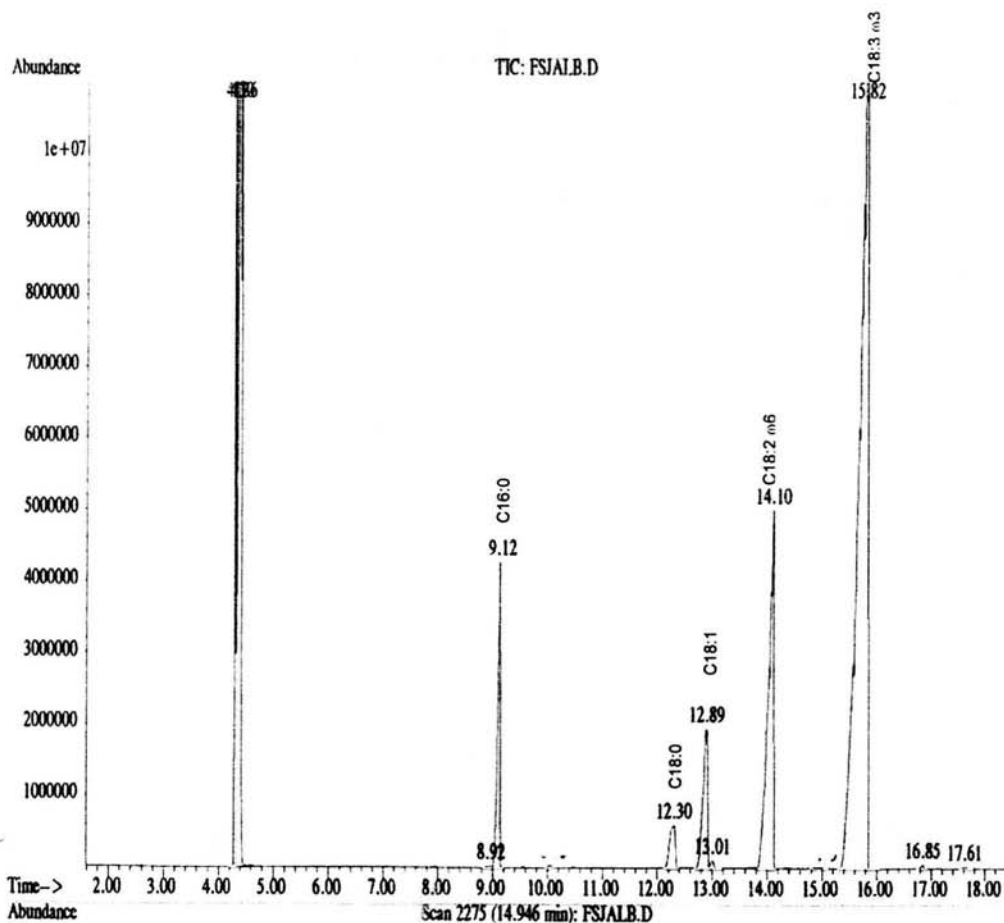


Figura 8.1: Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable Jalisco

Mediante espectroscopia de masas se identificó el compuesto que representaba cada pico al comparar, el espectro obtenido, con una base de datos incluida en el Software *ChemStation* versión AA.05.02 673 MX95245561, que contiene los espectros de los estándares de cada compuesto. El espectro obtenido también reporta un porcentaje de "Calidad" que representa la similitud o el porcentaje de identidad que tiene el espectro experimental en relación con el que contiene la biblioteca (100%= espectros idénticos).

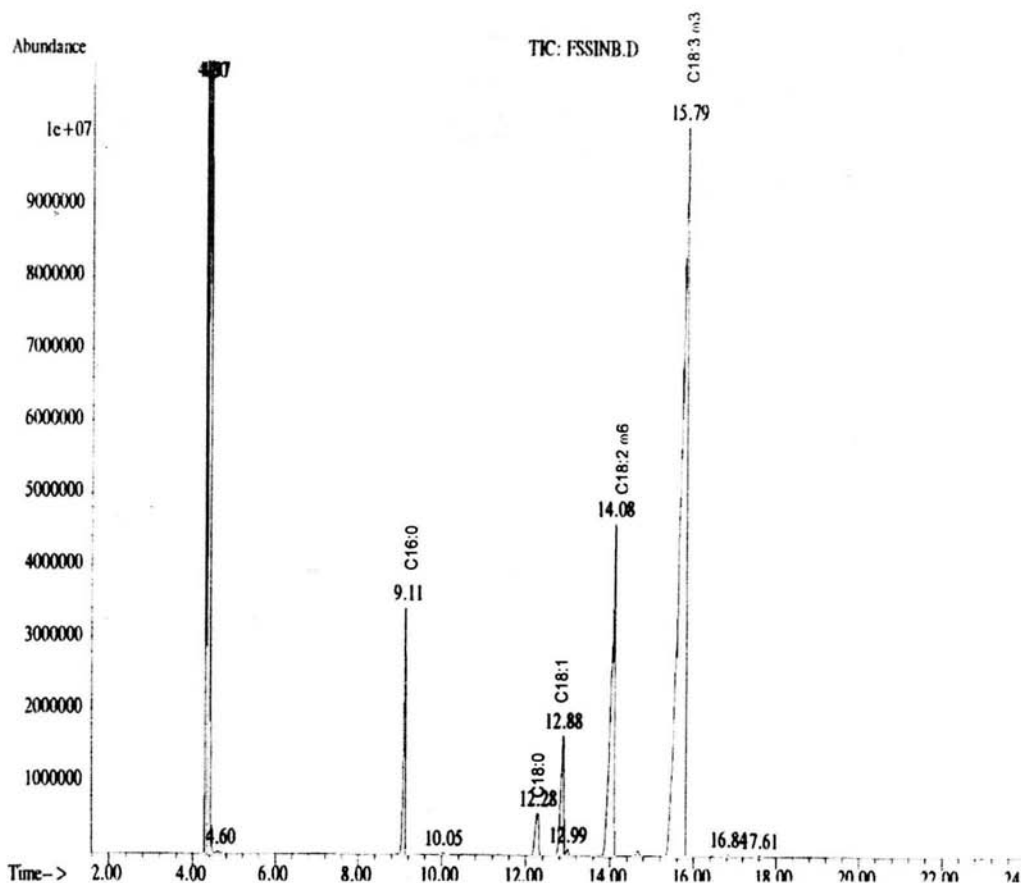


Figura 8.2: Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable Sinaloa.

En el Apéndice 2 se encuentran los espectros correspondientes a cada tiempo de retención.

En la *Tabla 8.1* se muestra un resumen del compuesto que corresponde a cada pico según el tiempo de retención, número de carbonos, cantidad de insaturaciones del ácido, el espectro de masas que corresponde (Apéndice 2) y la calidad de los espectros experimentales.

Tabla 8.1: Ácidos graso identificados en la fracción saponificable del aceite de chía.

Compuesto	#	#	t retención	Espectro	Calidad
Éster metílico del ácido:	Carbonos	Insaturaciones	(min)		
<i>Solvente (Hexano)</i>	-	-	4.3	-	-
Palmitico	16	0	9.1	1	99%
Esteárico	18	0	12.3	2	98%
Oléico	18	1	12.8	3	99%
Linoléico	18	2	14.1	4	99%
α -linolénico	18	3	15.8	5	99%
Eicosanoico	20	0	16.8	6	95%

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos van eluyendo de la columna en orden ascendente respecto al número de carbonos que tiene la cadena; para los ácidos grasos de igual número de carbonos, el orden de elución de la columna esta en función de la saturación, es decir se eluyen primero los más saturados.

Se determinó que los ácidos grasos predominantes son los insaturados y de los presentes, el mayoritario es el ácido α -linolénico. Estos resultados obtenidos tanto para la muestra de Jalisco como para la de Sinaloa son congruentes con los reportados por Bushway, et al. (1981) y Ayerza (1995), quienes determinaron que el aceite de la chía está formado principalmente por ácidos grasos insaturados.

Esta característica le da al aceite de chía un valor nutritivo muy importante, pues los ácidos grasos insaturados como se ha mencionado tales como el ácido linoleico y el ácido α -linolénico son esenciales y tienen efectos benéficos para la salud.

Se realizó la comparación de los cromatogramas de ambas semillas. Los resultados obtenidos para las dos muestras son similares. Tanto para la semilla cultivada en Sinaloa como para la de Jalisco el ácido graso predominante es el ácido α -linolénico que representa alrededor del 60% del total de ácidos grasos contenidos en el aceite, le sigue el ácido linoléico representando aproximadamente el 20% luego ácido oleico con 8%, el ácido esteárico se encuentra en una proporción del 3% y finalmente el ácido palmítico representando el 6% de los ácidos grasos, el porcentaje restante lo conforman isómeros de estos ácidos, ácidos grasos de cadena más larga como el ácido eicosanoico y algunos ácidos grasos de cadena impar, que en conjunto no representan más del 2%.

(Tabla 8.2)

Tabla 8.2: Proporción de los ácidos grasos en la fracción saponificable.

Compuesto Éster metílico del ácido:	Sinaloa		Jalisco	
	Area	%	Area	%
Palmítico	204	6.3	248	6.2
Estearico	99	3.09	120	3
Oleico	243	7.5	328	8.2
Linoleico	640	19.9	792	19.8
α -linolénico	1984	61.9	2536	63.4
Eicosanoico	32	0.99	40	1
Total	3202	100	4016	100

No se detectó la presencia de ácido γ -linolénico en ninguna de las dos muestras. Considerando que el ácido γ -Linolénico es muy susceptible a degradarse por factores como la luz, el oxígeno y la temperatura se hicieron determinaciones de porcentaje de recuperación para evaluar la efectividad del método (extracción de grasa, saponificación, recuperación de ácidos grasos y esterificación de los mismos).

En la *Tabla 8.3* se encuentran los resultados obtenidos para determinar la recuperación de ácido γ -linolénico por el método de tratamiento de la muestra establecido. Para una cantidad de 10 mg agregada al polvo de la semilla previo a la extracción de grasa, se recuperaron:

Tabla 8.3: Recuperación de γ Linolénico

Cantidad agregada inicialmente	10 mg
Cantidad recuperada	8.023 ^a mg
% Recuperación	80.23%

^a La determinación se llevó a cabo por triplicado con una dispersión de \pm 1.8%

El porcentaje de recuperación de ácido γ -linolénico fue del 80%. Este valor puede explicarse debido a que el procedimiento de cuantificación, desde la extracción,

involucra diferentes procesos en los cuales es probable que ocurra una pérdida. La cantidad recuperada presenta una dispersión del 1.8%. Se calculó el Coeficiente de variación para determinar si entre las repeticiones hechas existía un porcentaje mayor al estadísticamente aceptado de 5%.

$$C.V. = \left(\frac{\sigma}{\bar{X}} \right) * 100 = 2.24\%$$

C.V. = Coeficiente de variación

σ = Desviación estándar (1.8)

\bar{X} = Promedio % Recuperación (80.23)

El coeficiente de variación fue de 2.24% lo que indica que el método es reproducible y por tanto que la metodología de extracción, saponificación, recuperación de ácidos grasos y esterificación es estadísticamente adecuada. La curva patrón para la cuantificación de este ácido esta incluida en el Apéndice 3.

La *Figura 8.3* corresponde al perfil de la fracción saponificable con el estándar interno de ácido γ -linolénico adicionado. El pico que corresponde al ácido es el que eluye a los 14.67 minutos (espectro de masas 7, Apéndice 2). Aún en bajas concentraciones se observa una buena resolución de los picos de α -linolénico y γ -linolénico.

De los resultados anteriores, se puede concluir que con el esquema analítico realizado no fue posible identificar la presencia de ácido γ -linolénico en la muestras estudiadas, o bien, la cantidad de este es poco significativa.

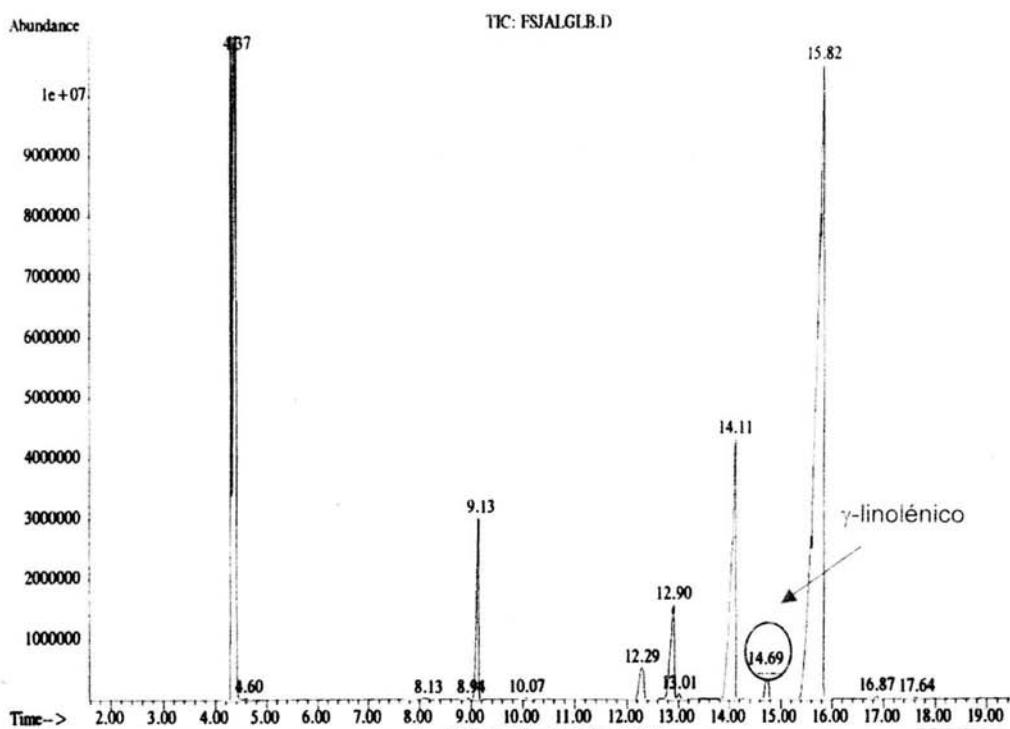


Figura 8.3: Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable con γ -linolénico adicionado.

8.2 Perfil de la fracción insaponificable y cuantificación de escualeno y fitoesteroles

La fracción insaponificable obtenida de la saponificación fue analizada por cromatografía de gases. El perfil de la fracción se observa en la *Figura 8.4*:

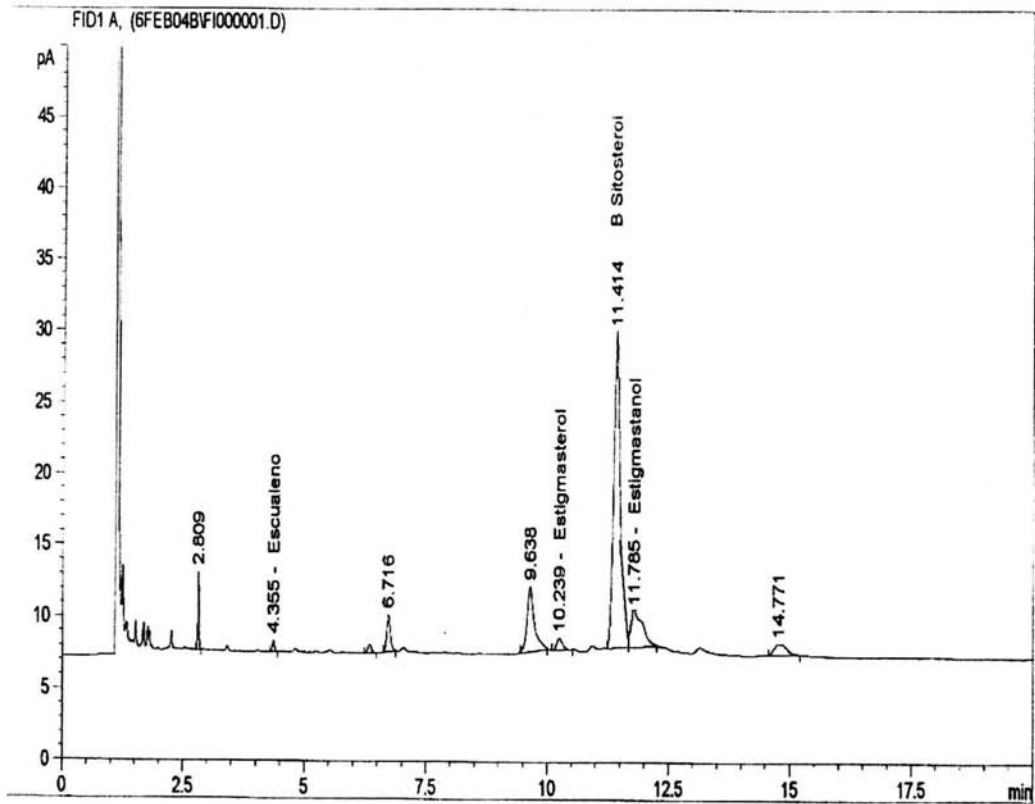


Figura 8.4: Cromatograma (por CG) de la fracción insaponificable completa

La identificación de algunos compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención con los de estándares inyectados previamente y de los compuestos restantes se realizó por comparación con los espectros de masas de una biblioteca de espectros (Tabla 8.4).

Tabla 8.4: Compuestos identificados en la fracción insaponificable del aceite de chía.

Compuesto	t retención (min)
Escualeno	4.3
Campesterol o giberelinas	9.6
Estigmasterol	10.2
β sitosterol	11.4
Estigmastanol	11.8
Farnesol	14.7

El escualeno, el estigmasterol, el β sitosterol y el estigmastanol fueron identificados por comparación con del tiempo de retención del estándar correspondiente. Para el escualeno y el β sitosterol, exclusivamente, se obtuvo además un espectro de masas (espectros 8 y 9, Apéndice 1) para la confirmación de las estructuras.

El pico de 14.7 minutos se identificó mediante el espectro de masas y corresponde a un compuesto llamado farnesol que es un intermediario en las síntesis de escualeno (espectro 10, Apéndice 2).

El pico de 9.5 minutos de acuerdo con el espectro de masas corresponde a productos de rutas alternas a la biosíntesis de escualeno y esteroides. Igual que el escualeno estos compuestos se derivan del farnesol y reciben el nombre de giberelinas.

Como suposición existe la probabilidad de que se trate de campesterol, considerando que:

- a) es el segundo fitoesterol más abundante en la naturaleza y*
- b) es el compuesto inmediato anterior al estigmasterol en ser eluido de una columna con fase de polisiloxanos (Abidi, 2001).*

El orden de elución de los compuestos depende de las características de polaridad de estos y de las propiedades de la columna. El escualeno es el más hidrofóbico y es por consiguiente el primero en ser eluido de la columna. El orden de elución de los fitoesteroides se ajustó al propuesto por Abidi (2001) para el tipo de columna utilizada en el análisis, que es:

Colesterol→Colectano→Brassicasterol→Campesterol→Campestanol→Estigmasterol→ Estigmastadienol→Sitosterol→Sitostanol→Estigmastanol.

Para la cuantificación de escualeno en la grasa de chía se utilizaron 2 métodos, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (CG). Los resultados obtenidos por la técnica de cromatografía de líquidos fueron muy bajos debido a la baja sensibilidad del método, por lo cual solo los resultados del análisis por la técnica por cromatografía de gases se encuentran en la *Tabla 8.5*.

Tabla 8.5: Resultados obtenidos de cantidad de escualeno por cromatografía de gases

Chía Sinaloa	[] (mg /100 g aceite) ^{a,b}
1	34.77
2	48.64
X	41.71
σ	9.81
Chía Jalisco	[] (mg /100 g aceite) ^{a,b}
1	0
2	0.36
X	0.18
σ	0.25

^a Cada repetición se inyectó por triplicado

^b Inyección de la fracción insaponificable completa.

X Promedio

Se detectó que el método por cromatografía de gases es más sensible. La muestra del estado de Sinaloa (41.7 mg/100 g) contiene una mayor concentración que la muestra de Jalisco (0.17 mg/100 g). Comparado con otras fuentes de escualeno, como el aceite de oliva (300 a 700 mg/100g de aceite) y el aceite de amaranto (6000 a 8000 g/100 g de aceite), el aceite de chía contiene cantidades poco significativas de escualeno.

La cuantificación de los fitoesteroles se llevó a cabo por cromatografía de gases exclusivamente. Los valores obtenidos para β sitosterol, estigmasterol y estigmastanol se presentan en la *Tabla 8.6* (*Gráfica 8.1*).

Tabla 8.6: Resultados obtenidos de cantidad de fitoesteroles

		mg / 100 g GRASA			
		Sitosterol	Estigmasterol	Estigmastanol	TOTAL
Sinaloa	1	437.14	69.69	283.76	790.59
	2	520.46	222.05	319.09	1061.6
	3	413.51	121.47	171.40	706.38
	4	465.18	138.27	96.36	699.81
	X	459.07	137.87	217.65	814.59
	σ	46.05	63.26	102.49	211.8
Jalisco	1	958.11	275.57	453.01	1686.69
	2	695.80	206.72	347.75	1250.27
	3	890.69	142.93	197.28	1230.9
	4	640.91	108.13	110.39	859.43
	X	796.38	183.34	277.11	1256.83
	σ	152.03	73.81	152.86	378.7

^a Cada repetición se inyectó por triplicado

X= Promedio de las cuatro repeticiones

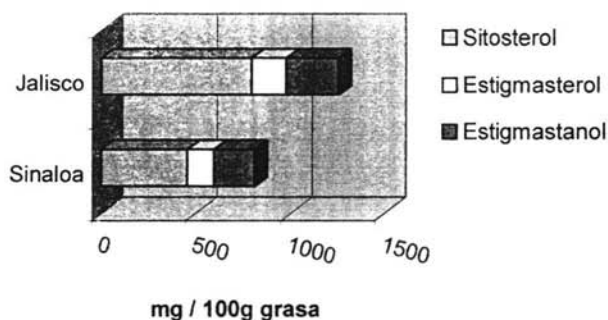
σ = Desviación estandar

NOTA: Inyección de la fracción insaponificable completa

El contenido de β sitosterol de la semilla de Jalisco es mayor por 340 mg/100g de grasa que la semilla de Sinaloa, sin embargo no se encontró que esta diferencia fuera estadísticamente significativa (nivel 5%). Para los otros dos fitoesteroles no se distingue la diferencia entre el contenido de fitoesteroles y se comprobó estadísticamente que no hay diferencia significativa entre las muestras para la cantidad de estigmasterol y estigmastanol (*Figura 8.5*).

Para determinar si existe diferencia significativa entre las dos muestras en cuanto al contenido de fitoesteroles, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los fitoesteroles encontrados (*Apéndice1 Tabla 10.4, 10.5 y 10.6*).

Figura 8.5: Cantidad de fitoesteroles para cada muestra



NOTA: El valor graficado es el promedio de las cuatro repeticiones de la inyección de la fracción insaponificable completa

En ambas semillas el β sitosterol es el fitoesterol mayoritario de los tres encontrados, seguido de estigmastanol y finalmente de estigmasterol con la menor proporción.

El β sitosterol representa casi 60% del total de los esteroides contenidos en aceites de origen vegetal, es decir es el fitoesterol mayoritario en la naturaleza (Phillips, 2001). En la chía el β sitosterol representa entre 66% (chía Sinaloa) y 74% (chía Jalisco) del total de los esteroides en la semilla (Tabla 8.7)

Tabla 8.7: Porcentaje que representa cada fitoesterol en el total de esteroides

	% total de fitoesteroides		% de cada fitoesterol en el total		
	en grasa		Sitosterol	Estigmasterol	Campesterol
Palma	0.04-0.05%		57-58%	11-12%	21-24%
Colza	0.48-1.10%		45-58%	0-1%	18-39%
Soya	0.18-0.4%		52-58%	16-19%	16-24%
Girasol	0.25-0.45%		56-63%	9-11%	7-13%
Chía Sinaloa	0.7- 1.06%		55-66%	9-20%	-
Chía Jalisco	0.86 - 1.69%		55-74%	11-16%	-

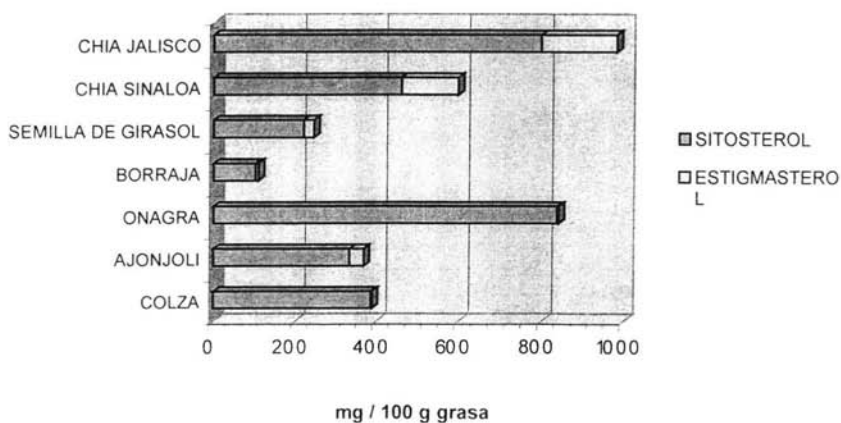
Comparado con otras fuentes de fitoesteroles como la semilla de girasol, colza o linaza y ajonjolí, la semilla de chia (Jalisco y Sinaloa) ofrece un contenido mayor de β sitosterol y estigmasterol. Únicamente la semilla de onagra, supera ligeramente el contenido. (Tabla 8.8 y Figura 8.6)

Tabla 8.8: Fitoesteroles contenidos en chia comparado con otras oleaginosas

	mg / 100 g aceite	
	Sitosterol	Estigmasterol
Linaza ^a	386.0	2.9
Ajonjolí ^a	333.3	34.9
Onagra o evening primerose ^a	835.2	4.1
Boraja ^a	101.5	7.7
Girasol ^a	219.8	24.7
Chía Sinaloa	459.07	137.86
Chía Jalisco	796.38	183.33

^a Phillips, et. al., 2001)

Figura 8.6: Comparación de la cantidad de fitoesteroles reportada para cada semilla.



9 Separación de escualeno y fitoesteroles

9.1 Separación en columna de extremo abierto de los compuestos

Para la separación de los compuestos por cromatografía en columna de extremo abierto se definió un patrón de elución en el que la polaridad de la fase móvil se va incrementando, de tal forma que los compuestos menos polares como el escualeno son eluidos primero de la columna y al ir aumentando la polaridad por adición de acetato de etilo en diferentes proporciones (5 a 25%), se favorece la elución de los fitoesteroles (Tabla 9.1). En total se corrieron seis columnas, tres de ellas para la muestra de Jalisco y tres para la muestra de Sinaloa.

Tabla 9.1: Patrón de elución de escualeno y fitoesteroles en columna empacada.

FRACCIÓN	COMPUESTO	
Éter de petróleo	15	Escualeno
Éter de petróleo: Acetato de Etilo (95:5)	35	Fitoesteroles
Éter de petróleo: Acetato de Etilo (75:25)	5	Lavado
Metanol	5	Lavado

La identificación de las fracciones que contenían los compuestos de interés se realizó mediante monitoreo por cromatografía en capa fina (CCF). En las placas (Figura 9.1 y 9.2) ya reveladas se observa la presencia de los compuestos de interés en cada fracción obtenida de la columna con ayuda de estándares.

Para identificar los compuestos el R_f de los compuestos revelados se compara contra el R_f de los estándares (Tabla 9.2).

Tabla 9.2 : R_f de los compuestos en CCF

Compuesto	R_f^b (reportado)	R_f (estándar)	R_f (experimental)
Fitoesteroles ^a	0.19	0.17	0.17
Escualeno	0.98	0.91	0.91

^a Los fitoesteroles β sitosterol, estigmasterol y estigmasterol tienen el mismo valor R_f

^b Gustone, 1996

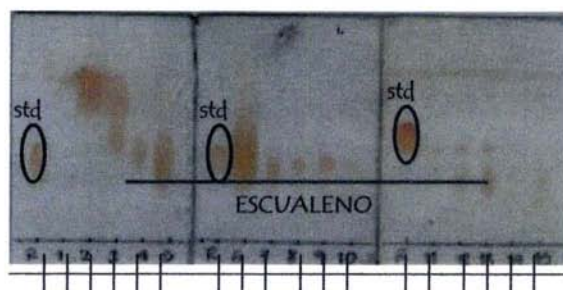


Figura 9.1: Cromatoplasmas para identificación de escualeno (fracciones de 1 a 15)

Eluyente: Éter de petróleo

En la *Figura 9.1*, correspondiente a las placas de las primeras fracciones obtenidas (1 a 15) por elución de éter de petróleo al 100% se detecta la presencia de escualeno. Las placas se eluyeron con éter de petróleo:éter etílico (99:1) y fueron reveladas por aspersion con sulfato cérico.

El escualeno es un hidrocarburo insaturado de cadena larga con carácter no polar, razón por la cual es eluido antes que compuestos como los fitoesteroles que son más polares. En la fracción insaponificable están presentes además del escualeno, compuestos no identificados aún más hidrofóbicos que éste, pues son eluidos en las primeras tres fracciones de la columna. Según lo observado el escualeno eluye en las primeras trece fracciones en las condiciones de trabajo utilizadas.

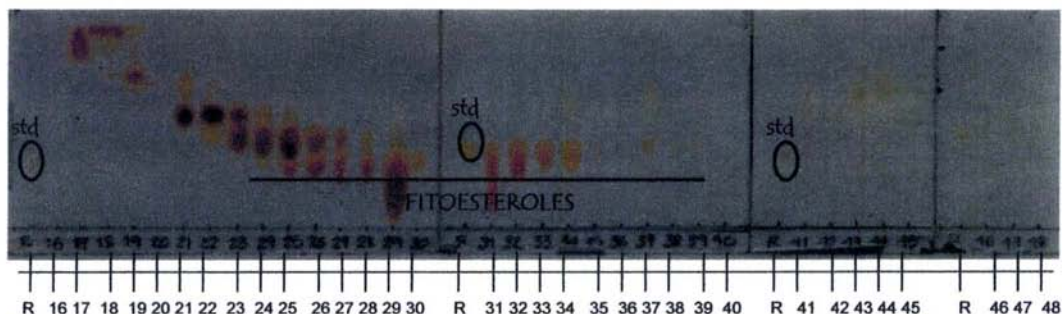


Figura 9.2: Cromatoplasmas para identificación de fitoesteroles (fracciones 16 a 48)

La *Figura 9.2* corresponde a las placas obtenidas para las fracciones eluidas con una polaridad mayor (éter de petróleo : acetato de etilo 95:5). Los fitoesteroles comienzan a eluir en la fracción 24.

Entre las fracciones 16 a 23 se encontró la presencia de compuestos no identificados, de polaridad intermedia respecto a los fitoesteroles y el escualeno. Moreda (2001) hace un análisis detallado de los posibles compuestos que se encuentran en la fracción insaponificable de los aceites comestibles y propone que estos compuestos pueden ser hidrocarburos precursores de menor peso molecular que el escualeno, como por ejemplo el farnesol. En el sistema de análisis por cromatografía de gases el primero en ser eluido de la columna es el compuesto más no polar, después los intermedios en polaridad y finalmente los más polares los fitoesteroles y en la columna de extremo abierto sucede lo mismo, es decir los compuestos son eluidos del más no polar al más polar (*Figura 9.3*).

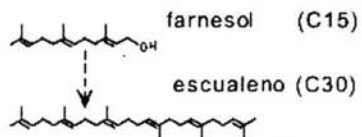


Figura 9.3: Estructura de farnesol (precursor del escualeno)

Otra probabilidad, es que se trate de ceras o alcoholes de cadena larga, como se ha encontrado en análisis de la fracción insaponificable de grasas (Gustone,1996). Este tipo de compuestos son ligeramente más polares que el escualeno por los grupos -OH que contienen en su estructura.

Respecto a los fitoesteroles, se observa que co-eluyen en la columna, es decir, no se logran distinguir de manera individual sino como varios compuestos con el mismo desplazamiento en la placa. En las fracciones 24 a 38 se revelan además otros compuestos no identificados de polaridad muy similar a la del estándar de

estigmasterol, por lo que probablemente se trate de otros fitoesteroles presentes en las muestras o algunos otros compuestos parecidos.

9.2 Análisis por cromatografía de gases de escualeno y fitoesteroles en las fracciones

La *Figura 9.4* corresponde al cromatograma obtenido de la inyección de las fracciones de la 5 a 13. En ellas se detectó la presencia de escualeno, el cual fue identificado por comparación con el tiempo de retención del estándar y por su espectro de masas (Apéndice 1 Espectro 8, ver Tabla 8.4)

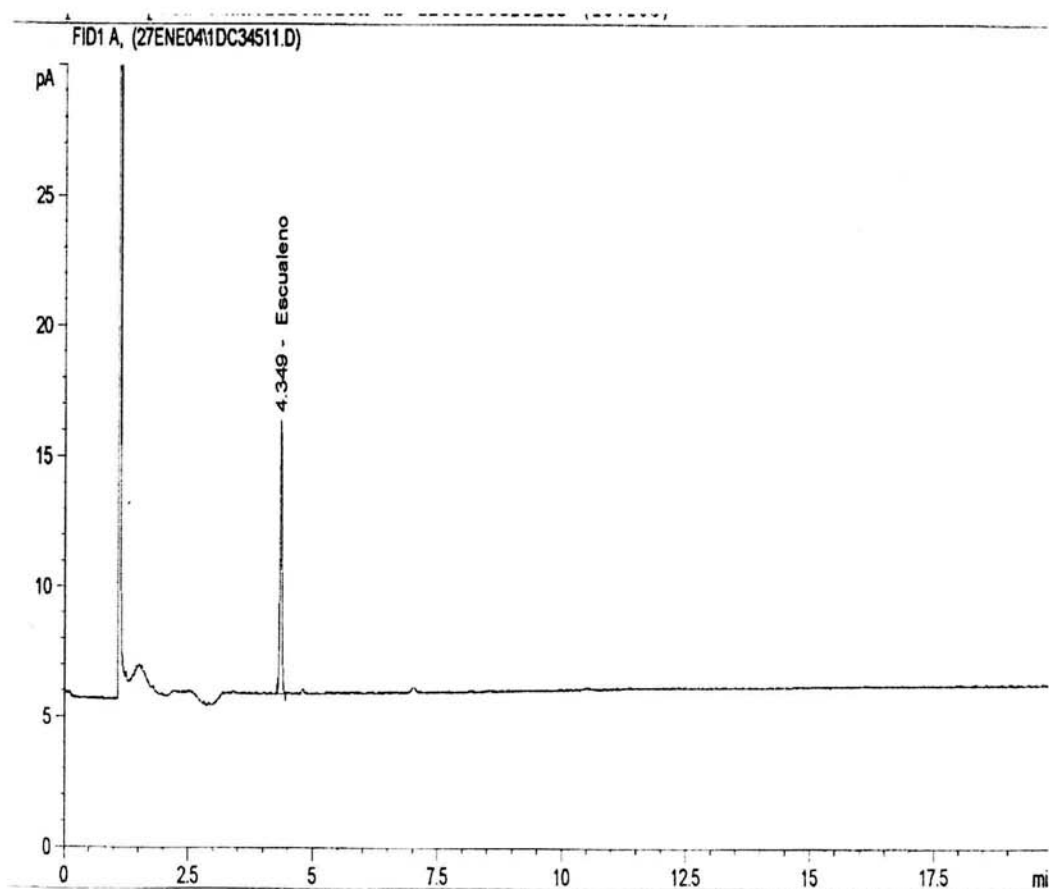


Figura 9.4: Cromatograma (por CG) de las fracciones 5 a 13.

En las fracciones 23 a la 38 fue detectada la presencia de fitoesteroles por TLC y se analizaron por cromatografía de gases (Figura 9.5). Los compuestos identificados fueron: giberelinas, estigmasterol, β -sitosterol, estigmasterol y farnesol. La identificación se realizó de igual manera que en el análisis de la fracción insaponificable completa (ver Tabla 8.4)

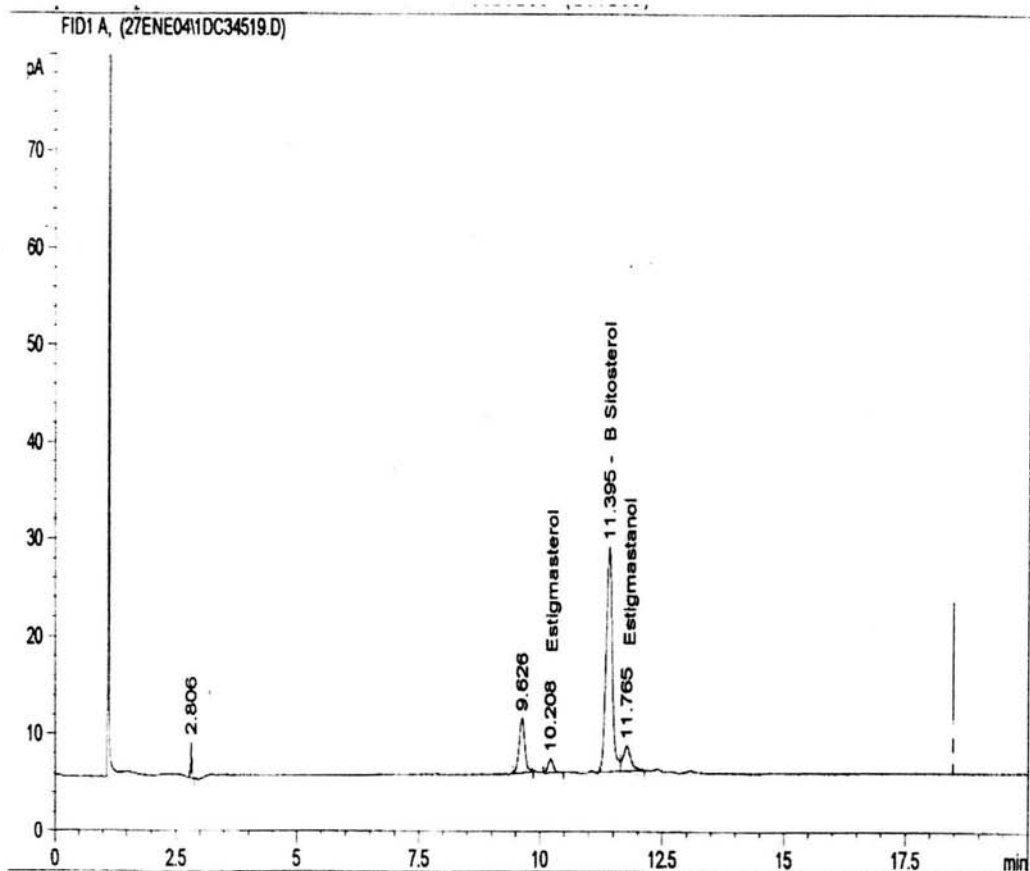


Figura 9.5: Cromatograma (por CG) de las fracciones de la 24-38

Las cantidades de cada uno de los compuestos en cada fracción son menores que las obtenidas en la inyección de la fracción insaponificable completa. Los resultados se exponen en la Tabla 9.1. En esta misma tabla se determinó el porcentaje de fitoesteroles que se pierden en la purificación por columna en el caso de la semilla de Sinaloa. La misma tendencia se observó en la semilla de Jalisco.

Tabla 9.1: Porcentaje de pérdida de compuestos en la columna.

	mg / 100 g grasa	
	Purificada	F. insaponificable completa
ESCUALENO	14.0	41.7
Estigmasterol	96.1	137.9
B Sitosterol	416.9	459.1
Estigmastanol	188.1	217.7
% PÉRDIDA EN LA PURIFICACIÓN	21%	

La pérdida en la purificación es del 21% en la columna. Probablemente esta pérdida se deba:

- A la retención de una porción de fitoesteroles y escualeno en la columna. Ya que pueden generarse interacciones de estos compuestos con la sílica de manera que no se permite la adecuada elución de estos compuestos de la columna.
- A que la exposición de la fracción insaponificable, durante la separación, al oxígeno y a la luz provoca que haya una degradación de los compuestos.

La purificación de los compuestos no fue el principal objetivo del presente trabajo, sin embargo se trabajó como análisis complementario. El método usado puede quedar descartado para futuros proyectos. Se sugieren otros métodos en los que se desarrollan fraccionamientos con metodologías de fluidos supercríticos (Abidi, 2001), o separación con cromatografía de líquidos de alta resolución (Moreda, 2001).

El resultado más importante obtenido es, que de acuerdo a los objetivos planteados para el presente trabajo, se demostró que la chía es fuente de fitoesteroles comparable y ligeramente superior a semillas previamente estudiadas como la onagra y la linaza. Ambas semillas son consideradas una buena fuente de estos compuestos. Para cumplir con la ingesta diaria recomendada de fitoesteroles (1.5 a 3 g/día), se deben consumir entre 120 a 300 g de aceite al día (dependiendo de la región de cultivo de la chía).

Como un resultado también sobresaliente corroboró el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el aceite que representan alrededor del 80% de la fracción saponificable del aceite, especialmente el ácido linolénico, el cual como antes se ha mencionado tiene la propiedad de favorecer la disminución de colesterol en sangre.

Conclusiones

- El alto contenido de fitoesteroles (β -sitosterol, estigmastanol y estigmasterol) y la alta proporción de ácidos grasos insaturados esenciales confirma que el aceite de la semilla de chía es una fuente atractiva de compuestos con actividad nutracéutica pues comparada con otras semillas conocidas como la onagra o la linaza y que son consideradas fuente de fitoquímicos con actividad nutracéutica, la chía tiene un contenido similar o superior de estos. La manera de utilizar el potencial del aceite de la semilla será tema de futuras líneas de investigación ya que se podrá determinar cuál es la mejor técnica de purificación de estos compuestos para ser adicionados en alimentos o en el desarrollo de productos medicinales. Estos estudios de la fracción lipídica en conjunto con otras investigaciones realizadas actualmente presentan a la chía como una fuente interesante de proteína y fibra (Bushway, 1981 y Ayerza, 1995) serán suficiente evidencia de que este cultivo ofrece características que deberán ser explotadas. La difusión que se haga de estos beneficios puede ser el punto de partida para que se promueva su cultivo entre los agricultores de manera que se abaraten los costos de producción que actualmente pueden resultar una limitante.
- Se determinó que los rendimientos de extracción de grasa para las semillas de chía fueron: 26% para la semilla del estado de Sinaloa y 30% para la semilla procedente del estado de Jalisco y se corroboró que existe diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de grasa de ambas semillas.
- Se estableció que la materia saponificable representa un promedio de 82.1% del aceite extraído de la muestra de Sinaloa y un promedio de 88.5% del aceite de la muestra de Jalisco.
- Se confirmó que la materia saponificable esta compuesta principalmente por ácidos grasos insaturados y que de estos el ácido graso predominante es el ácido

α -linolénico (C18:3 con insaturaciones en 9,12 y 16 ω 3), de aquí que el aceite de chía posea un atractivo significativo por su aporte de este ácido graso esencial.

- No se detectó la presencia del ácido γ Linolénico (C18:3 con insaturaciones en 6,9 y 12 ω 6)
- Se encontró que la materia insaponificable del aceite de chia representa un porcentaje del 8.4% del aceite de la semilla de Sinaloa y 9.4% del aceite de la semilla de Jalisco.
- Se determinó que por el método de purificación en columna se realiza la separación del escualeno de los fitoesteroles sin embargo hay una pérdida del 21% de los compuestos de interés contenidos en la fracción insaponificable, por lo que no es recomendable este método de purificación.
- Se encontró que la fracción insaponificable está conformada principalmente por fitoesteroles y que el escualeno se encuentra en concentraciones bajas o poco significativas en el aceite de semilla de chía.
- Se concluyó que la cuantificación de escualeno es más sensible por cromatografía de gases que por cromatografía de líquidos.
- Los fitoesteroles identificados fueron: estigmasterol, estigmastanol y β -sitosterol, siendo este último el predominante.
- Se determinó que en promedio la concentración de β -sitosterol está entre 459 y 796 mg por cada 100g de grasa, el estigmasterol entre 137 y 183 mg por cada 100g de grasa y el estigmastanol entre 217 y 277 mg por cada 100g de grasa. La muestra de Jalisco tiene una concentración de fitoesteroles ligeramente mayor sin embargo, estadísticamente no hay diferencia significativa entre las concentraciones de fitoesteroles de ambas muestras.
- Se encontró que la cantidad de fitoesteroles, incluidos en el aceite de la semilla de chía, resulta ser significativamente atractiva en comparación con otras fuentes actualmente explotadas.

Bibliografía

Abidi, S.L., (2001), *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils.*, Journal of Chromatography A., 935:173-201.

American Dietetic Association, (ADA). (2004). *Position Of The American Dietetic Association: Functional Foods.*, Journal of the American Dietetic Association., 104,5:814-826

Association of Official Agricultural Chemists, AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis*, Washington D.C. 16th ed., Sección 920.160

Ayerza, R. (1995), *Oil content and fatty acid composition of chia (Salvia hispanica L.) from five Northwestern locations in Argentina.*, Journal of American Oil Chemical Society, 22:1079-1081.

Ayerza, R. y Mealla, A.M., (1993). *El cultivo de la chía en México.*, Agropecuaria El Valle S.A., Buenos aires.

Awad, A.B. y Fink, C.S., (2000). *Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action.*, Journal of Nutrition., 130:2127-2130.

Bello, A.C. (1992), *Rapid isolation of the sterol fraction in edible oils using a silica cartridge*, Journal of Association of Official Agricultural Chemists (AOAC)., 75: 1120-1123.

Bruni, R., Medeci, A., Guerrini, A., Scalia, S., Poli, F., Muzzoli, M. y Sacchetti, G., (2001). *Wild Amaranthus caudatus seed oil, a Nutraceutical resource from Ecuadorian Flora.*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49:5455-5460.

Bushway, A.A., Belyea, P.R. y Bushway, R.J., (1981). *Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein.*, Journal of Food Science., 46:1349-1350 y 1356.

Chow, C.K., (1992), *Fatty acids in foods and their health implications.*, Marcel Dekker, Inc., U.S.A., 429-435.

- Christie, W.W., (1989). *Gas Chromatography and Lipids, a practical guide.*, The oily press.
- Cortarini, G., (2002)., *Quantitative analysis of sterols in dairy products: experiences and remarks.*, International Dairy Journal, 12:573-578.
- Fenton, M., (1992)., *Chromatographic separation of cholesterol in foods.*, Journal of Chromatography., 624:369-388.
- Fernández-Martín, R., (2000)., *ent-Kaurene and squalene synthesis in Fusarium fujikuroi cell-free extracts.* Phytochemistry., 54:723-728.
- Firestone, D. (1990)., *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, 4° ed., Americal Oil Chemist Society., 3-75.
- Flores, C., (1938). *Estudio analítico de la Salvia hispanica (chía).*, Tesis Licenciatura., F.Q.-UNAM., México, D.F., 11-17, 31-34.
- Gaona, E.B., (2002). *Obtención de una fracción rica en ácido linoleico a partir de aceite de girasol.*, Tesis Licenciatura., FQ-UNAM., México, D.F., 10-17,27-37, 69.
- Guil-Guerrero, J.L., García Maroto, F., Campra-Madrid, P. y Gómez-Mercado, F., (2000). *Occurrence and characterization of oils rich in γ -linolenic acid part II: fatty acids and squalene from Macaronesian echium leaves.*, Phytochemistry., 54:525-529.
- Gustone, F.D., (1996). *Fatty acid and lipid chemistry.*, Blackie Academic & Professional., 61-86, 100-128 y 222-228.
- He, H.P., Cai, Y., Sun, M. y Corke, H., (2002). *Extraction and purification of squalene from amaranthus grain.*, Journal of Agricultural and .Food Chemistry., 50:368-372.

Lu., H.T., Jiang Y., Chen, F., (2003). *Preparative separation and purification of squalene from the microalga Thraustochytrium ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography.*, Journal of Chromatography A., 994:37-43

Hicks, K. y Moreau, R., (2001). *Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol buster.*, Food Technology., 55:63-67, no. 1.

Kovacs, M.I.P., (1990), *Determination of cholesterol in pasta products using gas-liquid chromatography.*, Journal of Cereal Science, 11:291-297.

Lin, K.Y., Daniel, J.R. y Whistler, R.L., (1994). *Structure of chia seed polysaccharide exudate.*, Carbohydrate Polymers., 23:13-18.

Moghadasian, M.H., (2000). *Pharmacological properties of plant sterols In vivo an in vitro observations.*, Life Science, 67:605-615.

Moreau, R.A., Whitaker, B.D. y Hicks, K., (2002). *Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods; structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses.*, Progress in Lipid Research., 41: 457-499.

Moreda, W., Pérez-Camino, M.C. y Cert, A., (2001). *Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable Oils.*, J. Chromatography A., 936:159-171.

Normén, L., Bryngelsson, S., Jonhsson, M., Evheden, P., Ellegård, L., Brants, H., Andersson, H. y Dutta, P., (2002). *The phytosterol content of some cereal foods commonly consumed in sweden and in the netherlands.*, Journal of Food Composition and Analysis, 15:693-704.

Nguyen, T.T., (1999). *The cholesterol-lowering action of plant stanol esters.*, American Society for Nutritional Sciences, 129 : 2109-2111.

Phillips, K.M., Ruggio D.M., Toivo, J.I., Swank., M.A. y Simpkins, A.H., (2002). *Free and esterified sterol composition of edible oils and fats.*, Journal of Food Composition and Analysis, 15:123-142.

Piironen V., Toivo J. y Lampi. A.M., (2000). *Natural Sources Of Dietary Plant Sterols.*, Journal of Food Composition and Analysis., 13:619-624.

Piironen V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. y Lampi, A.M., (2000), *Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition.*, Journal of Science Food Agriculture., 80:939:966.

Quitez, J., Garcia-Lorda, P. y Salas-Salvado, J., (2003). *Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions.*, Clinical Nutrition., 1-8.

Scheer, J.F., (2000). *The magic of chia, revival of an ancient wonder food.*, Frog, Ltd., 9-21.

Toivo, J., Lampi, A.M., Aalto, S. y Piironen, V., (1999). *Factors affecting sample preparation in the gas chromatographic determination of plant sterols in whole wheat flour.*, Food Chemistry, 68:239-245.

Toivo, J., Phillips, K., Lampi, A.M. y Piironen V., (2001). *Determination of sterols in foods: recovery of free, esterified, and glycosidic sterols.*, Journal of Food Composition and Analysis, 14:631-643.

Tvrzická, E., Mares, P., Písaříková, A., Novakovic, J. y Hrabák, P. (1991), *Simplified gas chromatography method for the simultaneous determination of phytosterols and cholesterol.*, Journal of Chromatography., 563:188-192.

Witt, T.J., MacDonald, R. y Ishani, A., (1999). *Beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia.*, Journal Urology International. 83:976-983.

Apéndice 1: Análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia significativa (DS) entre las muestras de Jalisco y Sinaloa.

Para el cálculo de la diferencia significativa entre las muestras de Jalisco y Sinaloa se utilizó el Análisis de varianza (ANOVA)

Tabla 10.1: Diferencia significativa del porcentaje de grasa

Grupos	Repeticiones	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar
Sinaloa	6	1.5309	26%	0.21%	4.55%
Jalisco	6	1.7830	30%	0.16%	4.05%

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F (5%)	CONCLUSION
Entre muestras	0.0053	1	0.0053	21.9812	16.26	Existe DS
Error	0.0012	5	0.0002			
Total	0.0239	11				

NOTA: Datos tratados de la Tabla 7.2 en la sección 7.1.2 pg 39

Tabla 10.2: Diferencia Significativa del porcentaje de fracción saponificable

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar
Sinaloa	6	4.9278	82%	0.76%	8.70%
Jalisco	6	5.3104	89%	0.06%	2.48%

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F (5%)	CONCLUSION
Entre muestras	0.0122	1	0.012199	1.992	16.26	No hay DS
Entre repeticiones	0.0103	5	0.002057	0.336	10.97	No hay DS
Error	0.0306	5	0.006124			
Total	0.0531	11				

NOTA: Datos tratados de la Tabla 7.5 en la sección 7.2 pg 42

Tabla 10.3: Diferencia Significativa del porcentaje de fracción insaponificable

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar
Sinaloa	6	50.50%	8.4%	0.10%	3.22%
Jalisco	6	56.46%	9.4%	0.28%	5.31%

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F (5%)	CONCLUSION
Entre muestras	0.0003	1	0.000296	0.22	16.26	NO hay DS
Entre repeticiones	0.0126	5	0.002512	1.863	10.97	NO hay DS
Error	0.0067	5	0.001349			
Total	0.0196	11				

NOTA: Datos tratados de la Tabla 7.5 en la sección 7.2 pg 42

Tabla 10.4 : Diferencia Significativa del contenido de β sitosterol

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar
Sinaloa	4	1836.29	459.0729	2121	46
Jalisco	4	3185.52	796.3804	23113	152

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F (5%)	CONCLUSION
Entre muestras	227553	1	227552.7	4.308	34.12	NO hay DS
Entre repeticiones	75702	3	22884.23	0.433	29.46	NO hay DS
Error		3	52817.42			
Total	303254	7				

NOTA: Datos tratados de la Tabla 8.6 en la sección 8.2 pg 53

Tabla 10.5 : Diferencia significativa del contenido de estigmasterol

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar
Sinaloa	4	551.477	137.8693	4002	63.2584
Jalisco	4	733.352	183.338	5448	73.8082

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F (5%)	CONCLUSION
Entre muestras	4134.8	1	4134.808	0.694	34.12	NO hay DS
Entre repeticiones	10486	3	3495.339	0.587	29.46	NO hay DS
Error	17862	3	5953.927			
Total	32483	7				

NOTA: Datos tratados de la Tabla 8.6 en la sección 8.2 pg 53

Tabla 10.6: Diferencia significativa del contenido de estigmastanol

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar
Sinaloa	4	870.616	217.6541	10503	102.4845
Jalisco	4	1108.43	277.1073	23366	152.8604

ANÁLISIS DE VARIANZA

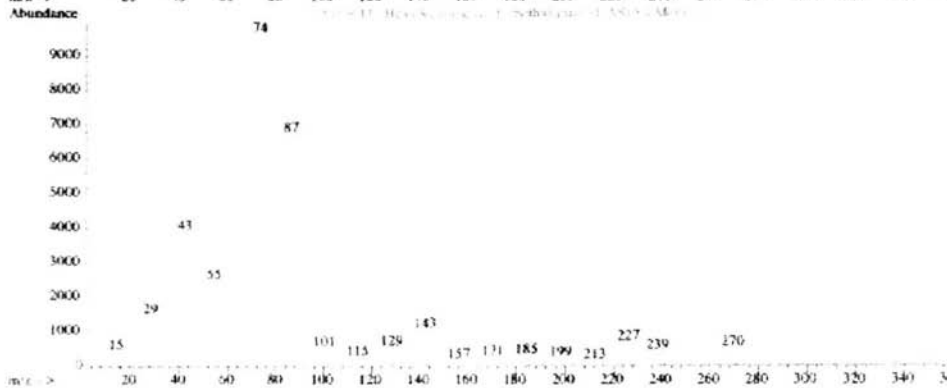
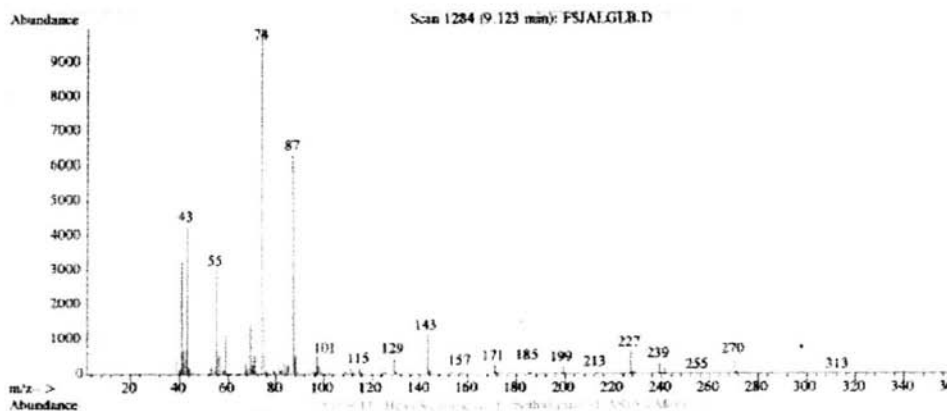
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F (5%)	CONCLUSION
Entre muestras	7069.4	1	7069.36	2.619	34.12	NO hay DS
Entre repeticiones	93510	3	31170.12	11.55	29.46	NO hay DS
Error	8097.7	3	2699.246			
Total	108677	7				

NOTA: Datos tratados de la Tabla 8.6 en la sección 8.2 pg 53

Apéndice 2: Espectros de masas de los compuestos

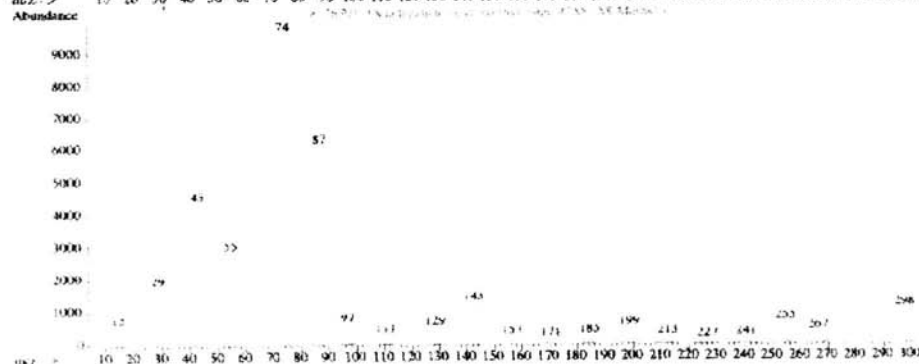
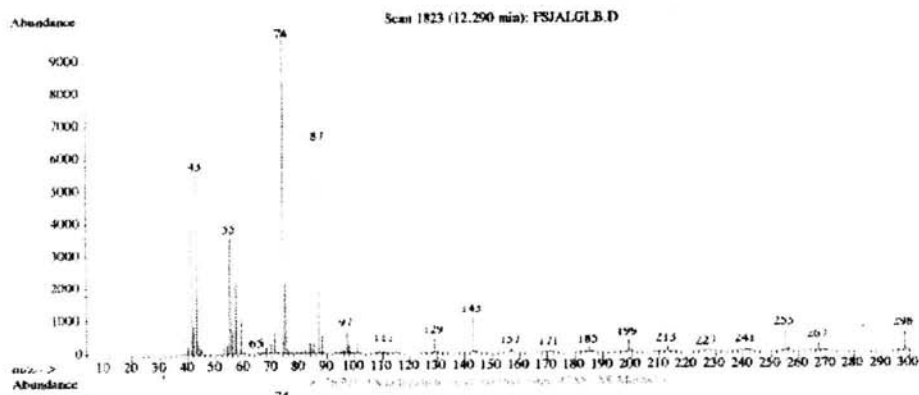
ESPECTRO :	1
COMPUESTO :	Ester metílico del ácido hexadecanoico Ácido palmítico C16:0
CALIDAD:	99%
t Retención:	9.23 min
CORRESPONDE:	Figura 8.1.:Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable.

Library Searched : C:\Database\WILBY275.L
 Quality : 99
 ID : Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl palmitate \$\$ Methyl hexadecanoate \$\$ Methyl n-hexadecanoate \$\$ Uniphat A60 \$\$ Metholene 2216 \$\$ Palmitic acid methyl ester \$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$ PALMITIC ACID-



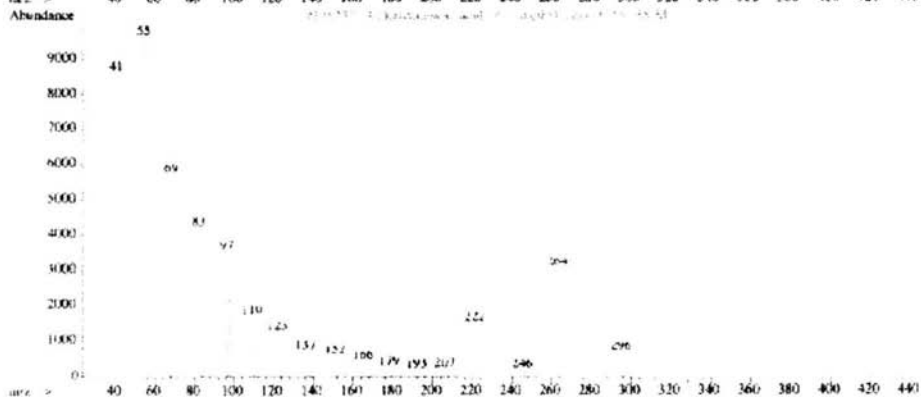
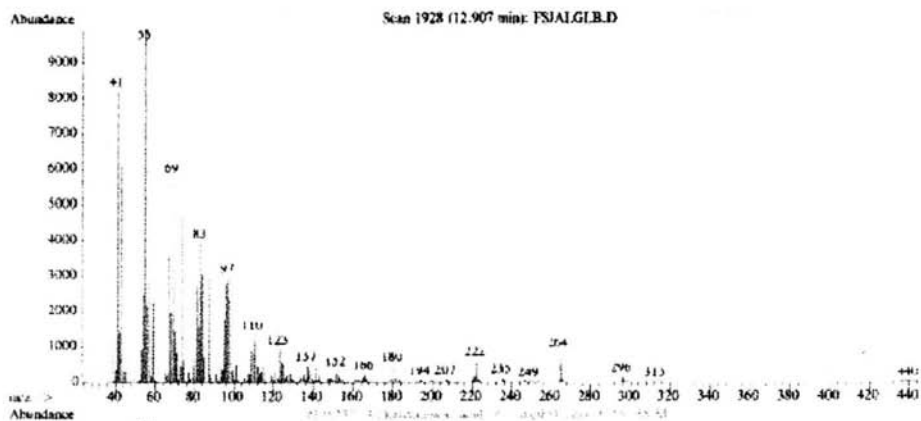
ESPECTRO :	2
COMPUESTO :	Éster metílico del ácido octadecanoico Ácido esteárico C18:0
CALIDAD:	98%
t Retención:	12.29 min
CORRESPONDE:	Figura 8.1.:Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable.

Library Searched : C:\Database\WILEY275.L
Quality : 98
ID : Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) \$\$ Methyl stearate \$\$ Methyl octadecanoate \$\$ Methyl n-octadecanoate \$
\$ Stearic acid methyl ester \$\$ Kemester 9718 \$\$ Stearic acid, methyl ester \$\$ n-Octadecanoic acid methyl ester \$\$ Methyl-octadecanoate \$\$ Methyl es



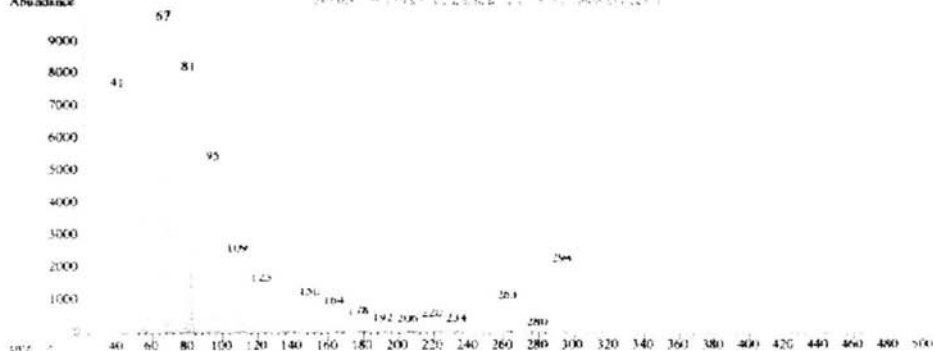
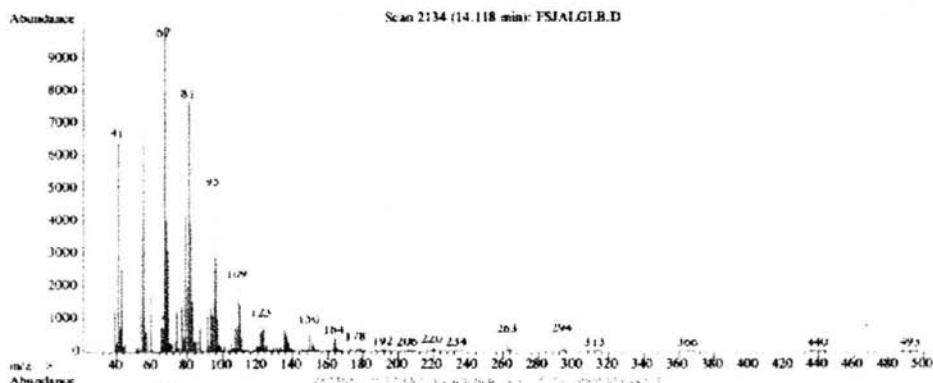
ESPECTRO :	3
COMPUESTO :	Ester metílico del ácido 9 octadecanoico Ácido oleico C18:1
CALIDAD:	99%
t Retención:	12.9 min
CORRESPONDE:	Figura 8.1.:Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable.

Library Searched : C:\Database\WILEY275.L
Quality : 99
ID : 9-Octadecenoic acid (Z) , methyl ester (CAS) \$\$ Methyl oleate \$\$ Methyl cis-9-octadecenoate \$\$ Oleic acid methyl ester \$\$ Oleic acid, methyl ester \$\$ Emery oleic acid ester 2301 \$\$ OLBIC ACID-METHYL ESTER \$\$ (Z)-9-OC TADECENOIC ACID, METHYL ESTER \$\$ (Z)-9-



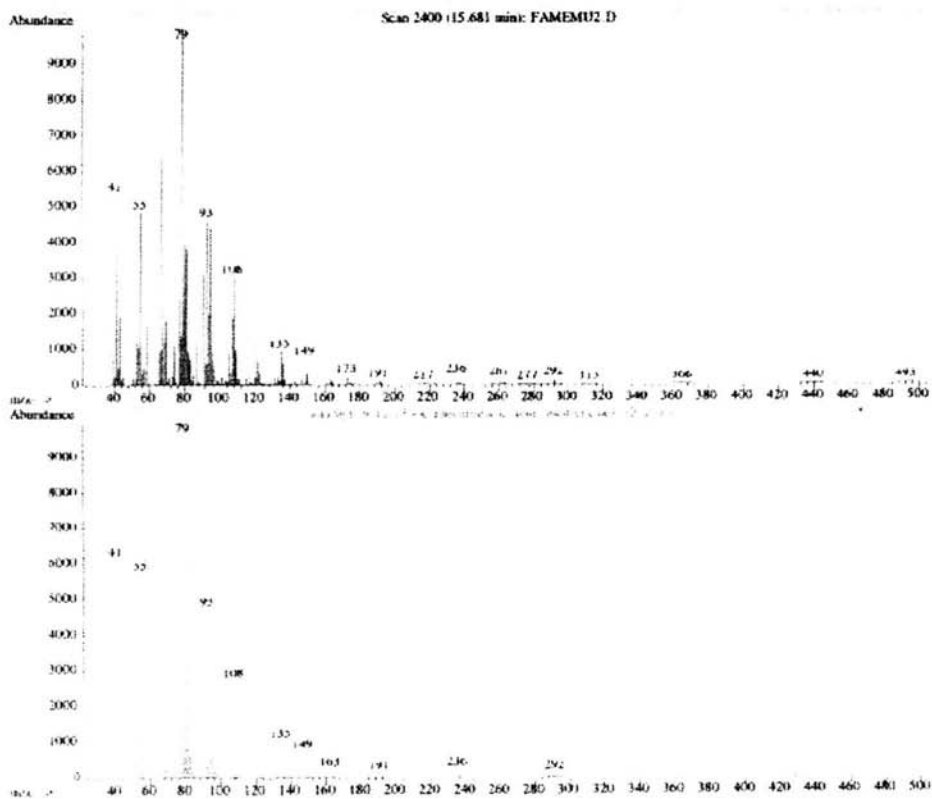
ESPECTRO :	4
COMPUESTO :	Ester metílico del ácido 9,12 octadecanoico Ácido linoleico C18:2
CALIDAD:	99%
t Retención:	14.12 min
CORRESPONDE:	Figura 8.1.:Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable.

Library Searched : C:\Database\WILEY275.L
Quality : 99
ID : 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS) \$
Methyl linoleate \$\$ METHYL CIS-9,CIS-12-OCTADECADIEN
OATE \$\$ Methyl octadecadienoate \$\$ Linoleic acid methyl
1 ester \$\$ Linoleic acid, methyl ester \$\$ Methyl cis,c
is-9,12-octadecadienoate \$\$ Methyl 9-ci



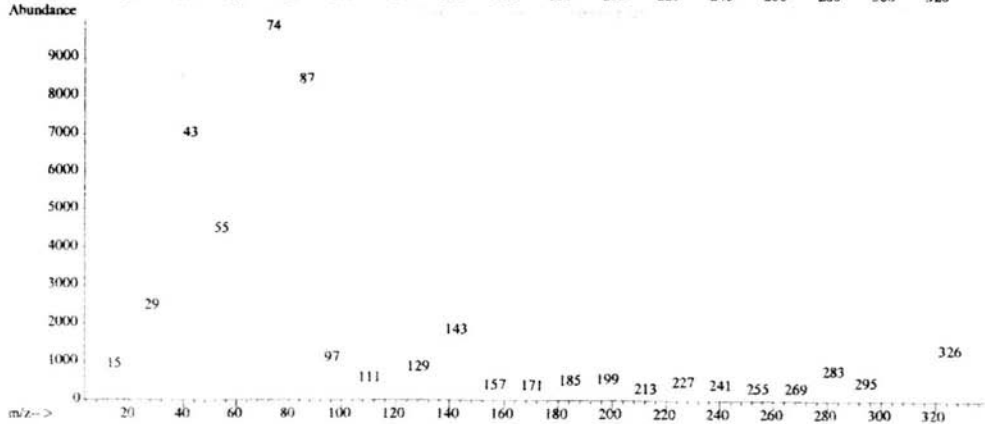
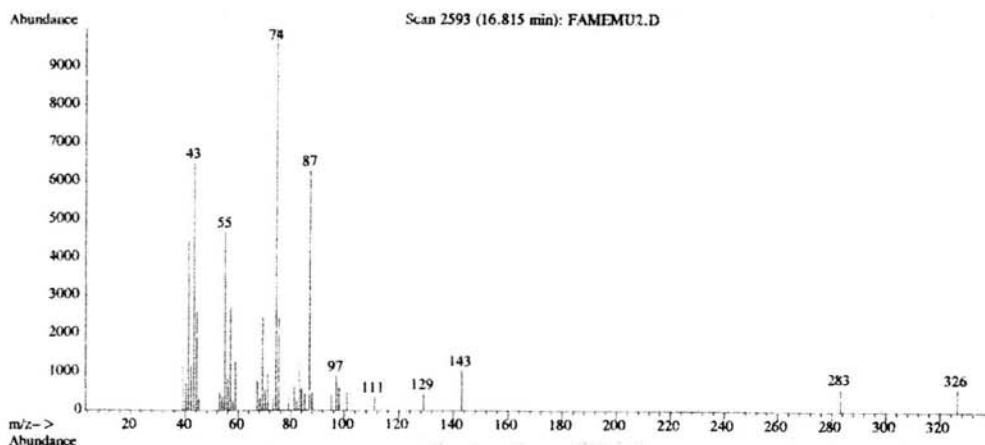
ESPECTRO :	5
COMPUESTO :	Éster metílico del ácido 9,12,15 octadecanoico Ácido α -linolénico C18:3
CALIDAD:	99%
t Retención:	15.68 min
CORRESPONDE:	Figura 8.1.:Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable.

Library Searched : C:\Database\NBS75K.L
Quality : 99
ID : 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-



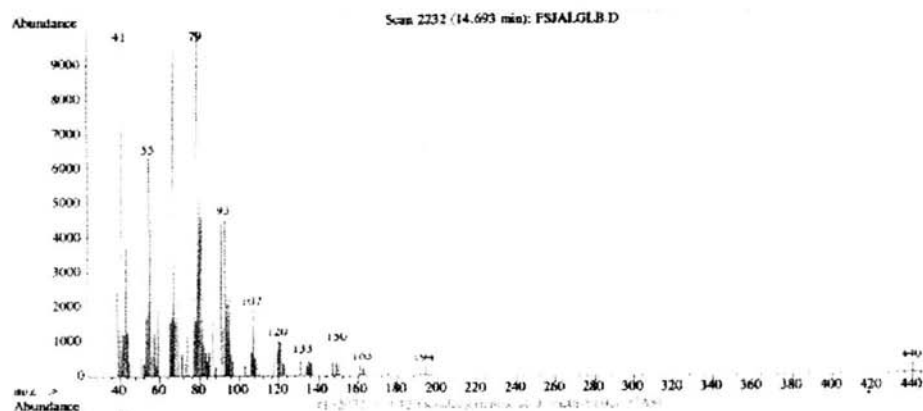
ESPECTRO :	6
COMPUESTO :	Éster metílico del ácido eicosanoico C20:0
CALIDAD:	95%
t Retención:	16.8min
CORRESPONDE:	Figura 8.1.:Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable.

Library Searched : C:\Database\NBS75K.L
Quality : 95
ID : Eicosanoic acid, methyl ester



ESPECTRO :	7
COMPUESTO :	Éster metílico del ácido 6,9,12 octadecanoico Ácido γ -linolénico C18:3
CALIDAD:	86%
t Retención:	14.69 min
CORRESPONDE:	FIGURA 8.3: Cromatograma (por CG) correspondiente a la fracción saponificable con γ -linolénico adicionado para determinar la eficiencia del método de tratamiento de la muestra.

Library Searched : C:\Database\WILBY275.L
Quality : 86
ID : 6,9,12-Octadecatrienoic acid, methyl ester (CAS) \$\$ methyl 6,9,12-octadecatrienoate



ESPECTRO :	8
COMPUESTO :	2,6,10,14,18,22 tetracosahexaeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil Escualeno
CALIDAD:	27%
t Retención:	4.22 min
CORRESPONDE:	Figura 8.4

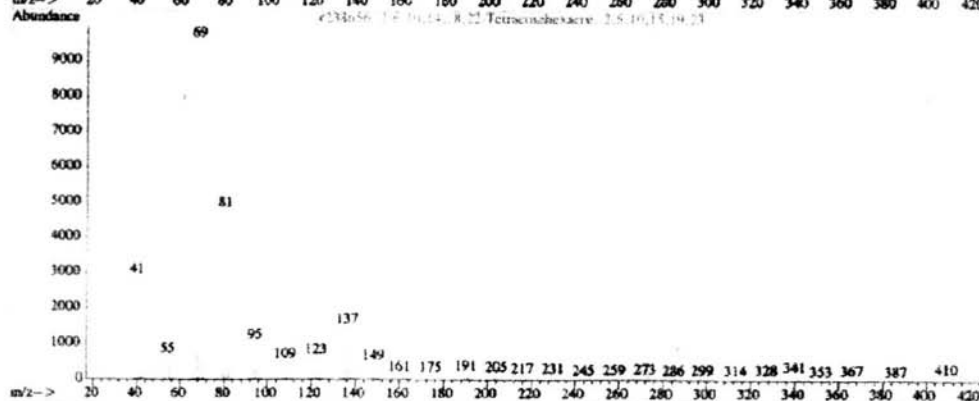
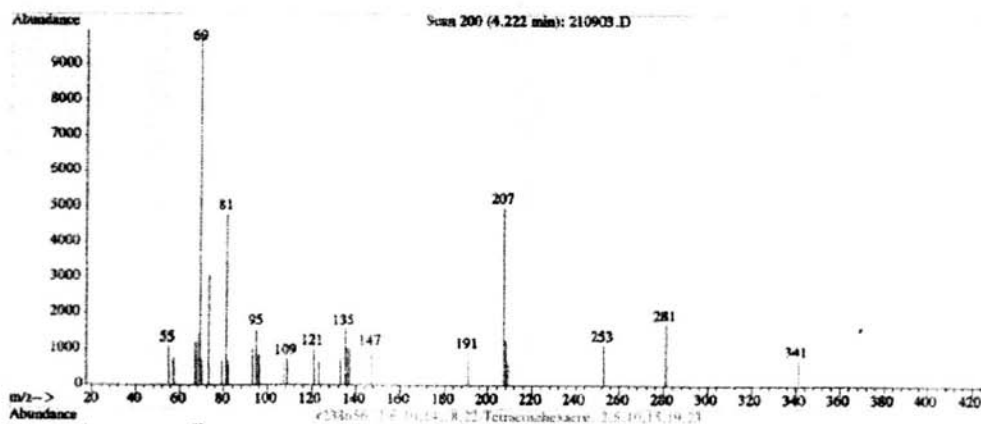
Library Searched : C:\Database\WILEY275.L

Quality

ID

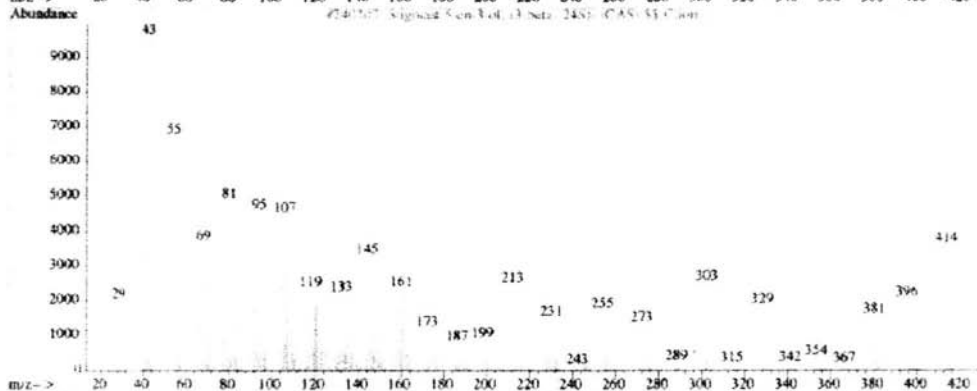
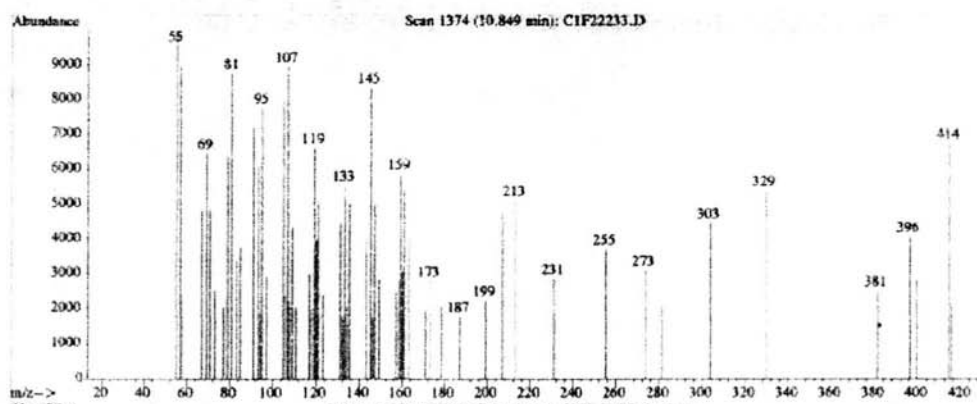
: 27

: 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl- (CAS) \$\$ Squalene \$\$ Skvalen \$\$ Supraene \$\$ Sp
inacene \$\$ 2,6,10,15,19,23-HEXAMETHYL-2,6,10,14,18,22,
-TETRACOSAHEXAENE



ESPECTRO :	9
COMPUESTO :	Stigmas-4-en-3-ol (β) Sitosterol
CALIDAD:	98%
t Retención:	10.84 min
CORRESPONDE:	Figura 8.4

Library Searched : C:\Database\WILEY275.L
Quality : 98
ID : Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) \$\$ Clionasterol
ol \$\$ 24S-STIGMAST-5-EN-3.BETA.-OL \$\$ gamma.-Sitosterol
ol \$\$ Fucosterol, .beta.-dihydro- \$\$ Stigmast-5-en-3.beta.-ol,
(24S)- \$\$ 24.beta.-Ethyl-5-cholesten-3.beta.-ol
ol \$\$.beta.-Dihydrofucosterol \$\$ 22,23



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

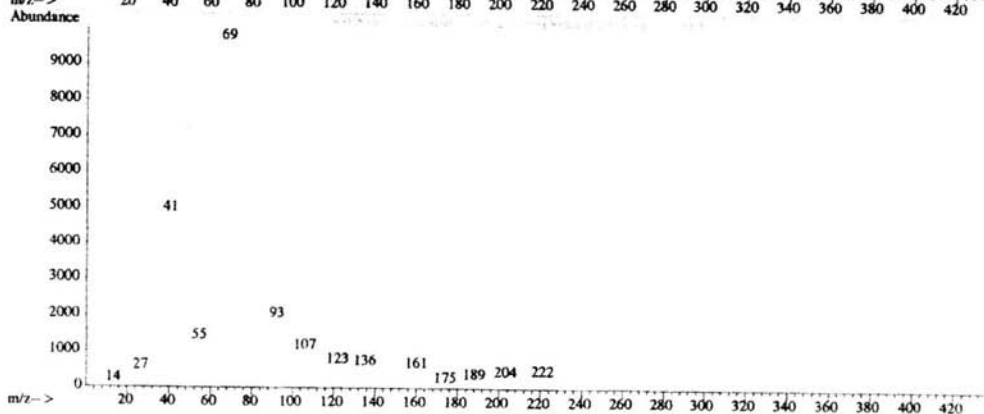
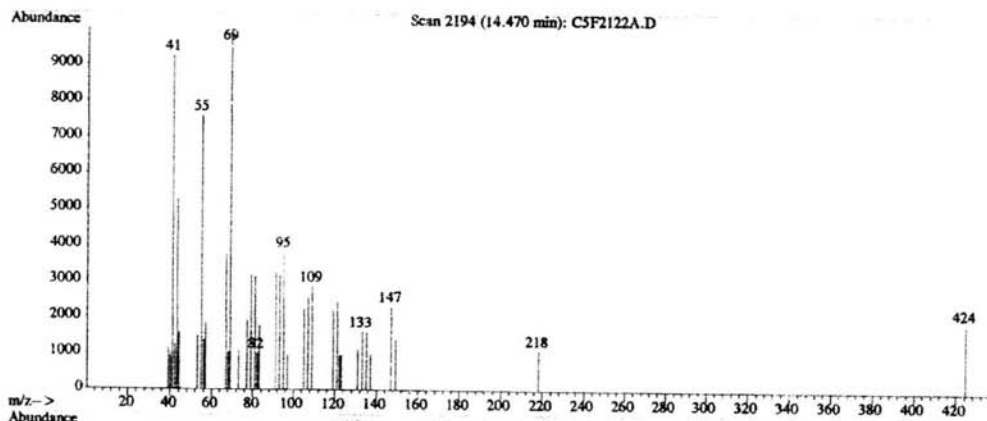
ESPECTRO :	10
COMPUESTO :	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11 trimetil farnesol cis Farnesol
CALIDAD:	38
t Retención:	14.5 min
CORRESPONDE:	Figura 8.4

Library Searched : C:\Database\WILEY275.L

Quality : 38

ID :

cis-Farnesol \$\$ 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimet
hyl-, (Z,E)- (CAS) \$\$ (Z,E)-Farnesol \$\$ (2Z,6E)-Farnes
ol \$\$ cis,trans-Farnesol \$\$ 2-cis,6-trans-Farnesol \$\$
CIS-TRANS-FARNESOL



Apéndice 3: Curvas patrón

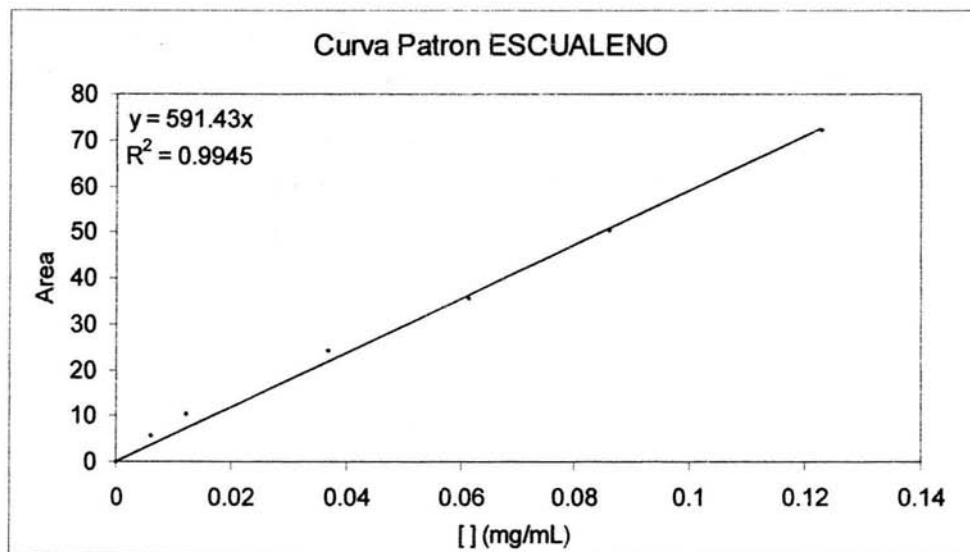


Figura 11.1 : Curva patrón de escualeno

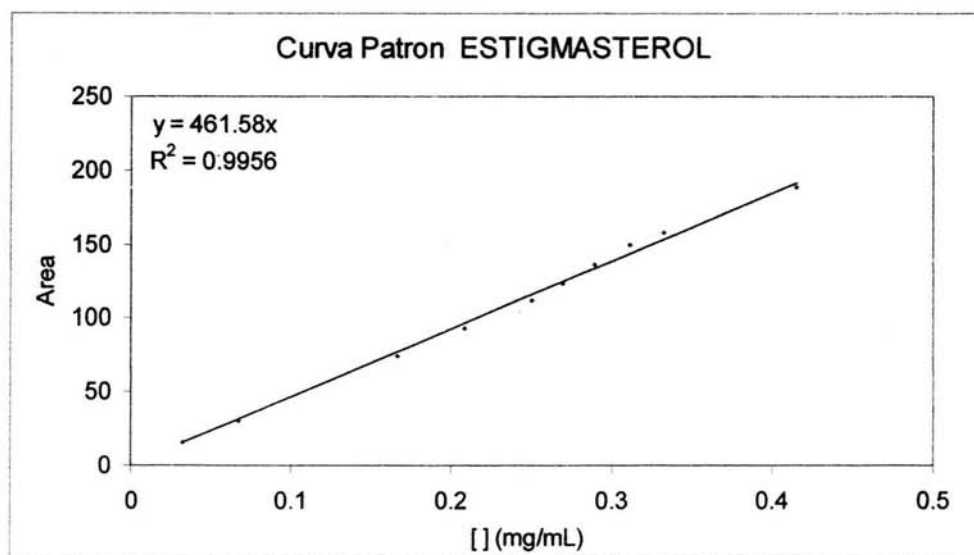


Figura 11.2 : Curva patrón de estigmasterol

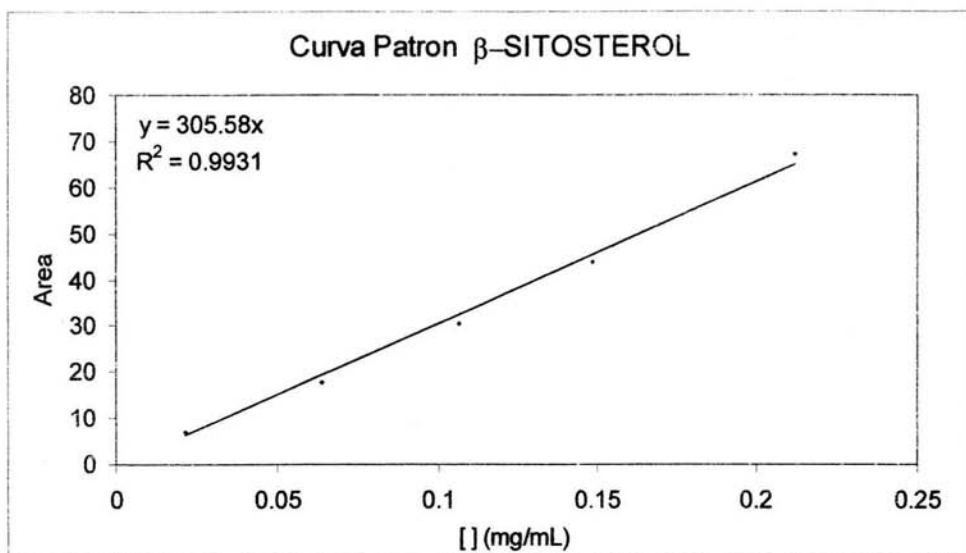


Figura 11.3 : Curva patrón de β sitosterol

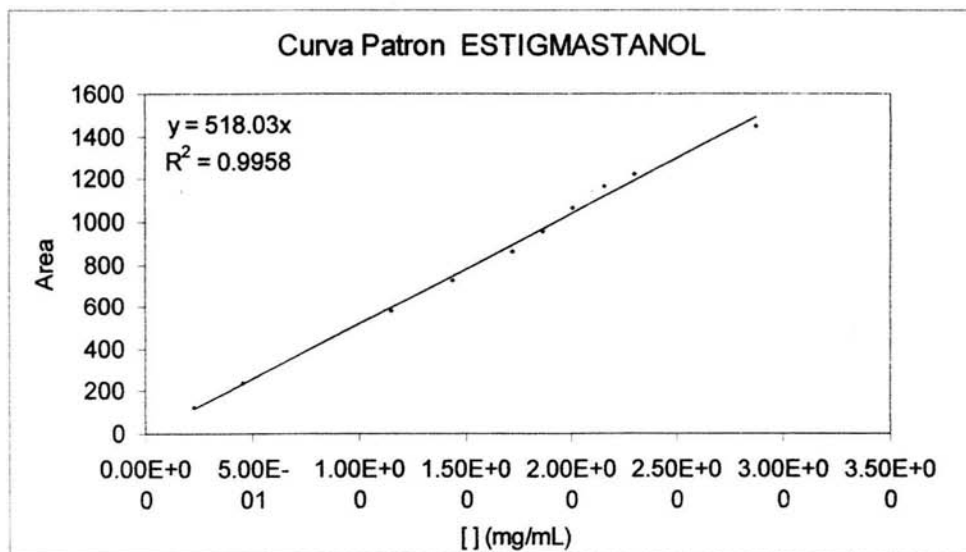


Figura 11.4 : Curva patrón de estigmasterol

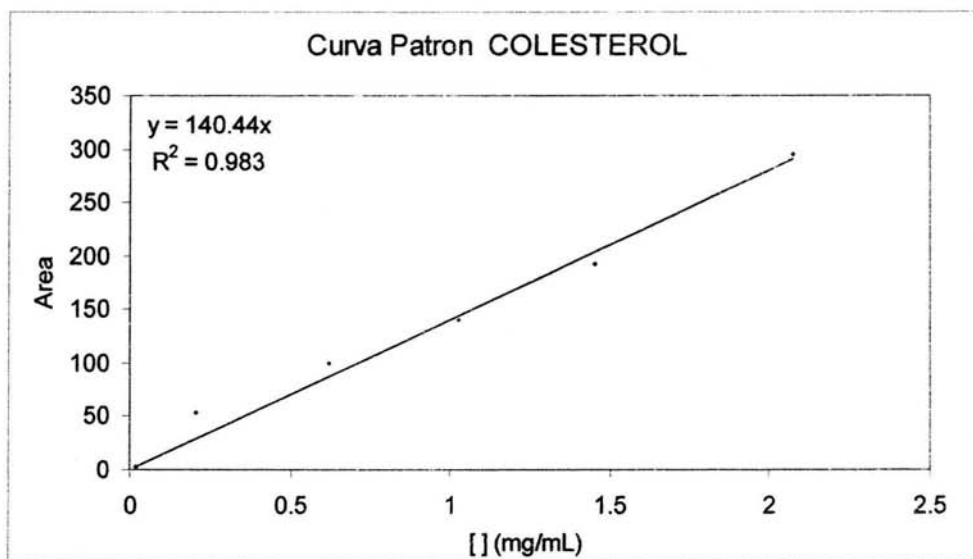


Figura 11.5 : Curva patrón de colesterol

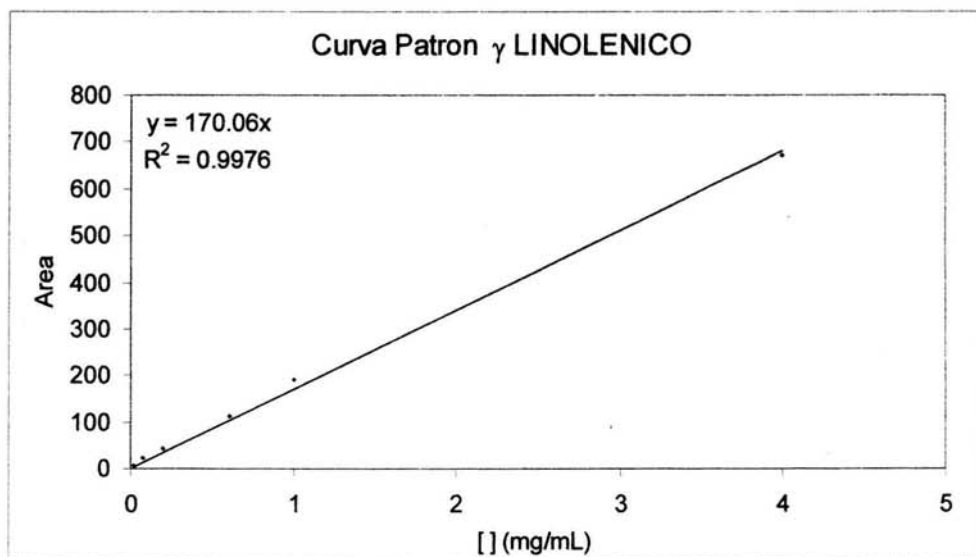


Figura 11.6 : Curva patrón de γ -linolénico