



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

**FACULTAD DE QUÍMICA
POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**

“Evaluación fisicoquímica y capacidad antioxidante del aceite de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y estabilidad oxidativa de diferentes sistemas de encapsulación”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

I.Q. en A. CARLOS GONZÁLEZ MONTES

DIRIGIDA POR

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2012.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE AMARANTO
(AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS) Y ESTABILIDAD OXIDATIVA DE DIFERENTES SISTEMAS
DE ENCAPSULACIÓN”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.Q en A. Carlos González Montes

Dirigido por:

Director: Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

Co-Director: Dr. Eric A. Decker

SINODALES

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Presidente

Dr. Eric A. Decker
Secretario

Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas
Vocal

Dra. Beneranda Múrua Pagola
Suplente

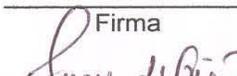
Dr. Alejandro Rocha Uribe
Suplente


Q.B. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

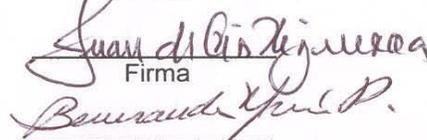


Firma

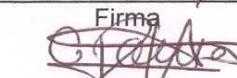
Rúbrica



Firma



Firma



Firma

Firma



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2012
México

RESUMEN

Los consumidores de alimentos buscan productos naturales que proporcionen un beneficio a la salud. Estudios epidemiológicos han demostrado la relación entre dieta y salud- por estas razones la ciencia y la industria tienen especial interés en la búsqueda y evaluación de nuevos productos naturales. En el campo de la investigación de productos naturales con beneficios a la salud se ha tenido especial interés plantas usadas por civilizaciones antiguas. Este es el caso del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) donde el aceite de amaranto ha probado tener muchos beneficios a la salud. Algunos productos, naturales o no, necesitan ser transformados de una matriz líquida a un sólido en polvo para ser adicionados a un producto alimenticio o farmacéutico. Una buena técnica para realizar esto es la microencapsulación, la cual consiste en el atrapamiento de un material en otro material que controla su liberación y brinda protección contra agentes ambientales. El método más usado es el secado por aspersion, es un proceso continuo rápido, barato y fácilmente implementado en la industria. En este estudio fueron evaluadas algunas características del aceite de amaranto obtenido de *Amarantus hypochondriacus* y la evaluación de su actividad antioxidante. El aceite fue microencapsulado usando CPS (concentrado de proteína de suero de leche) y se evaluaron las características de las microcápsulas. También fueron preparadas emulsiones con CPS a diferentes valores de pH (3 y 7) y se probaron emulsiones lavadas y no lavadas. Para ambas microcápsulas y emulsiones se evaluaron el decremento de tocoferoles, valor de peróxidos y concentración de hexanal. El mejor tratamiento para la microencapsulación del aceite fue con 30% de sólidos usando 70% de CPS y 30% de maltodextrinas. Para el aceite se obtuvo un valor de FRAP de 18058.22 μM de FeSO_4/g y una IC_{50} de 158 mg/mL para ensayo de DPPH. La estabilidad a pH 3 fue mayor que a pH 7 para emulsiones lavadas y no lavadas. En pH7 el efecto de lavar o no la emulsión es más importante mostrando más estabilidad las emulsiones no lavadas, a pH 3 este proceso no tiene efecto. Para las microcápsulas la estabilidad oxidativa fue menor que para las emulsiones mostrando un tiempo más corto de oxidación. El aceite crudo mostró una gran estabilidad, 42 días a 60 °C, mayor que otros aceites comunes como el de maíz.

(Palabras clave: Amaranto, aceite de amaranto, microencapsulación, secado por aspersion, actividad antioxidante, emulsiones aceite en agua).

SUMMARY

Food consumers look for natural products that provide benefits for their health. Epidemiological studies have shown the relationship between diet and health for these reasons, science and industry have a special interest in seeking and evaluating new natural products. In the field of natural products with health benefits research, there has been particular interest in plants used by ancient civilizations. Such is the case of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) where amaranth oil has proved to have many health benefits. Some products, natural or not, need to be transformed from liquid matrix to a solid powder in order to be added to a food or pharmaceutical product. A good technique for achieving this is microencapsulation, which consist of trapping one material in another that controls its liberation and provides protection against environmental agents. The most used method is spray drying, a continuous, fast and cheap process that can be easily implemented in industry. This study evaluates some characteristics of amaranth oil obtained from *Amaranthus hypochondriacus* and evaluation of its antioxidant activity. The oil was microencapsulated using WPC (whey protein concentrate), and the characteristics of the microcapsules were evaluated. Emulsions with WP at different pH values (3 and 7) were also prepared and washed and unwashed emulsions were tested. For both microcapsules and emulsions the decrease of tocopherols, peroxide value and hexanal concentration were evaluated. The best treatment for oil microencapsulation was with 30% solids using 70% WPC and 30% maltodextrines. A FRAP value of 18058.22 μM de FeSO_4/g was obtained for the oil and an IC_{50} of 158 mg/mL for the DPPH test. Stability at pH 3 was greater than at pH 7 for washed and unwashed emulsions. With pH 7 the effect of washing the emulsion is more important; the unwashed emulsions show greater stability; at pH 3 this process has no effect. For microcapsules, oxidation stability was less than for emulsions showing a shorter oxidation time. Bulk oil showed great stability, 42 days at 60°C, more than other common oils such as corn oil.

(Key words: Amaranth, amaranth oil, microencapsulation, spray drying, antioxidant activity, oil in water emulsions)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a Dios, por acompañarme en esta etapa de mi vida y darme la oportunidad de vivir nuevos horizontes y logros.

A mis padres, Justino y Leonor por su apoyo incondicional por estar en cada paso de esta experiencia. A mis hermanos y familia por su ejemplo y apoyo.

A mi novia Sharon por su amor y ayuda durante este proyecto.

Agradezco a mis maestros por sus enseñanzas, conocimientos, disposición y ayuda, he aprendido mucho de cada uno, motivándome a ser cada día mejor profesionalista.

A cada uno de mis sinodales por su tiempo, disposición, observaciones y apoyo en todo momento.

A la Dra. Sandra por permitirme trabajar y aprender en su laboratorio y proyecto, además de estar siempre para apoyarme y orientarme, estando siempre al pendiente de cualquier necesidad. GRACIAS.

Al Dr. Juan de Dios por permitirme trabajar en su laboratorio por un breve espacio, ayudándome a obtener excelentes resultados en breve tiempo.

A la Dra. Beneranda por su tiempo, ayuda y asesoría durante éste proyecto siempre buscando la mejora del mismo.

Al Dr. Alejandro por ofrecer su conocimiento, laboratorio e incluso casa para que pudiera aprender y adquirir la habilidad para la continuación de éste proyecto así como su disposición.

Al Dr. Eric A. Decker por aceptarme en su laboratorio y con ello permitirme realizar una de mis metas, salir de México a otro país para aprender y conocer otras culturas y lugares, así como su tiempo y ayuda durante la estancia.

A mis compañeros del laboratorio de nutracéuticos; Alex, Héctor, Marisol, Tania, Bety, Alma, Andrea, Adriana, Raquel. A mis compañeros de maestría y del PROPAC.

A mis “labmates” en Umass, Atikorn, Ketinun, Leann, Kik, Bincan, Lorena, Leqi, Yi, Jean y a mis amigos de la Universidad de Massachusetts por darme una de las mejores experiencias de mi vida.

Gracias a CINVESTAV a la Dra. Marcela, a la Universidad Autónoma de San Luis, Ceci, Vero y a la Universidad de Massachusetts por abrirme sus puertas durante el proyecto.

Finalmente a CONACYT por la beca y apoyo otorgados durante el desarrollo y elaboración de esta tesis con título “Evaluación fisicoquímica y capacidad antioxidante del aceite de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y estabilidad oxidativa de diferentes sistemas de encapsulación”

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	
SUMMARY	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
I.INTRODUCCIÓN	1
II.ANTECEDENTES	3
II.1 Alimentos funcionales	3
I.1.1 Alimentos funcionales y nutraceuticos para salud de piel y cabello	5
II.2 Lípidos	9
II.2.1 Clasificación de los lípidos	9
II.2.2 Ácidos Grasos	11
II.2.2.1 Ácidos grasos saturados	12
II.2.2.2 Ácidos grasos insaturados	13
II.2.2.2.1 Ácidos grasos omega 3	15
II.2.2.2.2 Ácidos grasos omega 6	17
II.2.2.2.3 Relación de ácidos grasos omega 6 y ácidos grasos omega 3.	17
II.2.3 Deterioro de lípidos	18
II.3 Amaranto	21
II.3.1 Aceite de amaranto	25
II.3.1.1 Ácido oléico	28
II.3.1.2 Ácido linoléico	29
II.3.1.3 Ácido linolénico	30
II.3.1.4 Ácido palmítico	31
II.3.1.5 Ácido esteárico	31
II.3.1.6 Fitoesteroles	32
II.3.1.7 Tocoferoles y Tocotrienoles	33

II.3.1.8 Escualeno	35
II.4 Microencapsulación	37
II.4.1 Secado por aspersión	38
II.5 Emulsiones	41
III. Hipótesis	43
IV. Objetivos	44
V. Objetivos específicos	44
VI. Metodología	45
VI.1 Materiales	45
VI.2 Métodos	45
VI.2.1 Extracción del aceite de amaranto	45
VI.2. 2 Caracterización del aceite de amaranto	45
VI.2.2.1 Determinación de ácidos grasos libres	45
VI.2.2.2 Valor de peróxidos	46
VI.2.2.3 Índice de Yodo	46
VI.2.2.4 Índice de saponificación	47
VI.2.2.5 Materia insaponificable.	47
VI.2.2.6 Perfil de ácidos grasos	48
VI.2.2.7 Determinación de escualeno	49
VI.2.2.8 Determinación de tocoferoles	49
VI.2.3 Microencapsulación del aceite de amaranto	49
VI.2.3.1 Eficiencia de encapsulación	50
VI.2.3.2 Análisis de tamaño de partícula	50
VI.2.3.3 Microscopía electrónica de barrido	51
VI.2.3.4 Actividad de agua	51
VI.2.4 Determinación de la actividad antioxidante	51
VI.2.4.1 DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidrazil)	51
VI.2.4.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	51
VI.2.5 Determinación de la estabilidad oxidativa	52
VI.2.5.1 Hexanal en espacio de cabeza.	52

VI.2.5.2 Determinación de valor de peróxidos.	52
VI.2.6 Elaboración de las emulsiones de aceite de amaranto	53
VI.2.7. Cinéticas de oxidación.	53
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	55
VII.1 Extracción del aceite de amaranto	55
VII.2 Caracterización del aceite de amaranto	56
VII.2.1 Parámetros de calidad	56
VII.2.2 Perfil de ácidos grasos	57
VII.2.3 Determinación de escualeno	60
VII.2.4 Determinación de tocoferoles	61
VII.3 Microencapsulación del aceite de amaranto.	63
VII.3.1 Caracterización de las microcápsulas.	63
VII.3.1.1 Eficiencia de encapsulación.	64
VII.3.1.2 Análisis de tamaño de partícula.	65
VII.3.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).	67
VII.3.1.4 Actividad de agua.	69
VII.3.1.5 DSC (Differential Scanning Calorimetry).	71
VII.4 Actividad antioxidante.	74
VII.4.1 Ensayo DPPH del aceite de amaranto	74
VII.4.2 Ensayo FRAP del aceite de amaranto	76
VII.5 Determinación de la estabilidad oxidativa	77
VII.5.1 Hexanal de las microcápsulas y aceite de amaranto.	77
VII.5.2 Hexanal en espacio de cabeza de las emulsiones	79
VII.5.3 Cinéticas de oxidación microcápsulas y aceite de amaranto	80
VII.5.4 Cinéticas de oxidación para las emulsiones	80
IX CONCLUSIONES	87
X. BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
1. Ácidos grasos saturados	13
2. Ácidos grasos insaturados	14
3. Promotores e inhibidores de la reacción de autoxidación	19
4. Mecanismos de la oxidación de lípidos	20
5. Análisis Bromatológico del grano de amaranto	23
6. Composición del aceite de varias especies de amaranto	27
7. Composición del aceite de amaranto en general	31
8. Fitoesteroles encontrados en el aceite amaranto (<i>A.cruentus</i>)	33
9. Proporciones de CPS y maltodextrinas utilizadas en la elaboración de las microcápsulas.	49
10. Proporciones de caseinato de sodio y maltodextrinas utilizado en la elaboración de las microcápsulas.	50
11. Rendimientos para aceite de amaranto reportados en la literatura	55
12. Parámetros de calidad	56
13. Porcentajes de cada uno de los ácidos grasos identificados en el aceite de amaranto.	59
14. Perfil de ácidos grasos de varias especies de amaranto	59
15. Concentraciones de escualeno reportadas en la literatura	61
16. Concentraciones de α -tocoferol reportadas para diferentes especies de amaranto.	63
17. Eficiencias de encapsulación para cada tratamiento.	65
18. Análisis de partícula de cada uno de los tratamientos	66
19. Actividades de agua determinadas	70
20. Valores obtenidos por DSC para ΔH y temperatura de degradación	73
21. IC_{50} de diversos compuestos por la técnica de DPPH	75

22. Valores de FRAP para diferentes compuestos	76
23. Tiempos de oxidación para diferentes aceites vegetales	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
1. Síntesis de las prostaglandinas	7
2. Síntesis de los leucotrienos	8
3. Clasificación de los lípidos	10
4. Estructuras de los ácidos $\Omega 3$ y $\Omega 6$	14
5. Diferencias entre Tocoferoles y Tocotrienoles	34
6. Mecanismo de atrapamiento de radicales lipídicos	35
7. Estructura del escualeno	36
8. Esquema de una microcápsula	38
9. Diagrama de un secador por aspersion	39
10. Diferentes técnicas de secado por aspersion	40
11. Perfil de ácidos grasos del aceite de amaranto	58
12. Estándar de escualeno por cromatografía de gases	60
13. Cromatogramas para la determinación de α -tocoferol	62
14. Secador por aspersion utilizado para la obtención de las microcápsulas	63
15. Suspensión caseinato de sodio	64
16. Microcápsulas de cada uno de los tratamientos	64
17. Histogramas para cada uno de los tratamientos	66
18. SEM de cada uno de los tratamientos	68
19. Microcápsulas fracturadas	69
20. Microcápsulas expuestas a una atmósfera de alta humedad	71
21. DSC para las muestras 30:80 y 20:80	72
22. DSC para las muestras 20:70 y 30:70	72
23. DSC del aceite, maltodextrinas y CPS	73
24. Gráfica de inhibición del radical DPPH	74
25. Cinética del aceite de amaranto para el ensayo de FRAP	76
26. Gráfica de valores de hexanal emulsiones y microcápsulas	78

27. Gráfica de valores de hexanal para aceite de amaranto	78
28. Reacción de oxidación lipídica	79
29. Cinética de oxidación emulsión a pH7 sin lavar	81
30. Cinética de oxidación emulsión a pH7 lavada	81
31. Cinética de oxidación emulsión a pH3 sin lavar	82
32. Cinética de oxidación emulsión a pH3 lavada	82
33. Cinética de oxidación microcápsulas	83
34. Valor de hidroxiperóxidos a través del tiempo	83
35. Diferentes sistemas de emulsiones probados	85

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente los alimentos se están considerando no solamente como fuente de nutrimentos para el mantenimiento y crecimiento corporal sino también como un importante recurso para obtener compuestos biológicamente activos y que regulan procesos fisiológicos. Aunado a esto los consumidores de alimentos buscan estos beneficios adicionales a la función fundamental del alimento de aportar valor nutricional, en lo que se conoce como alimentos funcionales. El concepto de alimentos funcionales es bien conocido en los países asiáticos desde hace varios siglos e Hipócrates hace alusión a éstos en la frase: “Deja que tu alimento sea tu medicina y deja que la medicina sea alimento”. El término de alimentos funcionales nació en Japón en 1980 como alimentos de uso específico para la salud (FOSHU), el ministerio de salud y bienestar define FOSHU como alimentos que se espera exhiban un efecto físico y a la salud cuando son consumidos como parte de una dieta ordinaria. Por esta razón se ha buscado la extracción y purificación de compuestos con actividades biológicas específicas como lo es actividad antioxidante, antihipertensiva, antitrombótica, anticancerígenas, hipocolesterolémica, entre otras.

El amaranto es un cultivo que se desarrollo en Mesoamérica desde antes de la llegada de los españoles, se mantuvo en el olvido hasta su redescubrimiento en los años 1970's. El amaranto se considera un pseudocereal y presenta propiedades nutricionales, como un contenido de proteínas cercano al idóneo, bajo índice glicémico, ausencia de gluten y actividades antioxidantes, anticancerígena e hipocolesterolémica, estas últimas atribuidas a los componentes del aceite de amaranto.

El aceite de amaranto promueve actividades biológicas interesantes gracias a sus componentes entre los que hay que destacar a los tocoferoles y tocotrienoles conocidos por su actividad antioxidante, a los fitoesteroles los cuales disminuyen el colesterol en suero y el escualeno el cual tiene actividad anticancerígena e

hipocolesterolémica; así como la actividad de varios ácidos grasos que lo componen como el ácido oléico, el cual se ha demostrado reduce el riesgo de contraer enfermedades del corazón. Además, varios de los componentes del aceite de amaranto se han utilizado para el cuidado de la salud de la piel, o como cosméticos, lo cual amplía el campo de aplicación del aceite de amaranto además de su aplicación en alimentos funcionales.

La microencapsulación es un proceso por el cual un material puede ser protegido de la oxidación o condiciones ambientales; además, se puede controlar la liberación de este material, evita que reaccione con otros componentes, prolonga la vida de anaquel, facilita su adición a una matriz alimentaria, si se trata de un compuesto activo líquido, puede ser transformado a un polvo de libre flujo fácil de manejar y puede ser liberado de manera controlada.

II. ANTECEDENTES

II.1 Alimentos Funcionales y Nutracéuticos.

Estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado claramente la relación entre la dieta y el estado de salud (Shahidi, 2004). Se ha observado un incremento en la búsqueda de productos que sirvan no solo como alimentos si no que tengan un beneficio a la salud del consumidor. Los ingredientes nutricionales y su biodisponibilidad atraen atención especial, liderando en el mercado de alimentos funcionales internacionales como productos que aportan beneficios a la salud (Sloan, 2008), Por esto la búsqueda de productos con un aporte a la salud, y la producción y purificación de extractos vegetales son un área de interés para la industria y para la investigación (Mireles, 2009), así como su uso como ingredientes en una amplia gama de productos. El reto es el desarrollo de estos productos y adoptar nuevos métodos analíticos para su aplicación en las nuevas tecnologías (Mermelstein, 2002).

El concepto de alimentos funcionales es bien conocido en los países asiáticos desde hace varios siglos y se hace alusión a éstos por Hipócrates en la frase “Deja que tu alimento sea tu medicina y deja que la medicina sea alimento”.

El término “alimentos funcionales” nació en Japón en 1980 como alimentos de uso específico para la salud (FOSHU). El ministerio de salud y bienestar define FOSHU como alimentos que se espera exhiban un efecto físico y a la salud cuando son consumidos como parte de una dieta ordinaria (Kusump, 2006), sin embargo este término ha recibido diferentes definiciones dadas por científicos, asociaciones profesionales etc. La ILSI Europe representante de la industria, la academia y el gobierno en temas de nutrición propone la siguiente definición: un alimento puede ser nombrado como funcional si demuestra afectar de manera benéfica una o más funciones blanco en el cuerpo, más allá de sus efectos nutricionales, de manera que es relevante para mejorar el estado de salud o reducir el riesgo de una enfermedad

(De Roos, 2000). La promoción a la salud por parte de estos productos se basa en la prevención de las enfermedades (Mermelstein, 2002).

Los consumidores de alimentos buscan ciertas características específicas como lo son seguridad, sabor, conveniencia, salud y valor nutricional. En el área de alimentos esos factores proveen una motivación para continuar investigando en el desarrollo de alimentos orientados a la obtención de beneficios fisiológicos y a la salud (Mermelstein, 2002).

Los alimentos funcionales los podemos definir como aquellos que tienen una apariencia similar a su contraparte tradicional y que son consumidos como parte de la dieta y que además se conocen sus beneficios a la salud independientemente de la función nutricional básica esperada del alimento convencional; los nutracéuticos son aquellos que derivan de diferentes fuentes comestibles, pero que son consumidos en forma medicinal como tabletas, pastillas o cápsulas y que han demostrado beneficios fisiológicos o un efecto de protección contra enfermedades crónicas (Mermelstein, 2002; Shahidi, 2004).

El conocimiento de los efectos de procesar los compuestos bioactivos, su absorción y metabolismo es otra área de interés para estos productos, en especial aquellos compuestos bioactivos que actúan a nivel de genes requieren especial atención (Mermelstein, 2002).

A pesar del crecimiento rápido del mercado de los alimentos, se presentan otros desafíos adicionales al diseño y desarrollo de alimentos funcionales, como la cantidad que deben contener de componentes activos para exhibir un efecto fisiológico. La identificación y eficacia de los componentes activos deben de ser validados, así como las dosis tienen que ser bien establecidas. Al tratarse de alimentos, los alimentos funcionales deben ajustarse a las regulaciones de seguridad alimentaria (Kusump, 2006).

Finalmente los alimentos funcionales y nutracéuticos ayudan a reducir la carga al sistema de salud con un mecanismo continuo de prevención. Existe un gran número de fitoquímicos y otros principios bioactivos presentes en alimentos de diversas fuentes. Los efectos sinérgicos presentados por la combinación de bioactivos presentes en el material son factores importantes a considerar en la formulación de alimentos funcionales y en la elección de una dieta saludable (Shahidi, 2004).

II.1.1 Alimentos funcionales y nutracéuticos para la salud de piel y cabello.

La piel humana está continuamente expuesta a factores internos y externos, que pueden alterar su condición y funcionamiento, como lo son la radiación ultravioleta, los radicales libres, compuestos tóxicos y alergénicos, daños mecánicos, factores endógenos como: predisposición genética, estado inmunológico, estado hormonal y estrés. La piel juega un papel importante en la regulación homeostática del cuerpo, regulando la temperatura y la salida de agua. En años recientes se ha vuelto claro que forma parte esencial del sistema inmune, como consecuencia de los factores internos y externos la piel puede sufrir inflamación, reducción en su función inmunológica, deficiencia en la función de homeostasis y otros desórdenes.

Aunado a estos desórdenes la piel se puede ver afectada en su apariencia por estos factores externos e internos, determinando la textura de su superficie, color y propiedades fisiológicas como lo son: elasticidad, dulzor, esencia y producción de sebo.

Las funciones de la piel y su apariencia son dependientes de la nutrición, esto se ve evidenciado por la aparición de lesiones en la piel a causa de deficiencias en la nutrición. Suplementos alimenticios han sido desarrollado con vitaminas, minerales, o aceites esenciales para mejorar la piel en estos estados. La ciencia nutricional se ha basado en establecer relaciones entre la dieta y la salud, así como

el rol que desempeñan ingredientes específicos, en reducir desórdenes de la piel (Bolesma, 2001).

Dentro del mercado de los alimentos funcionales una de las divisiones existentes es la de alimentos funcionales orientados a la salud de la piel y el cabello, así como a la apariencia. En el mercado de Asia y Europa se han desarrollado alimentos y bebidas que promueven la belleza interior, piel saludable y mejora en la apariencia de cabello y uñas. Ejemplos de estos alimentos en el mercado están, yogurt Essensis de Danone con el eslogan “alimentar tu piel desde el interior”, este producto contiene aceites $\Omega 6$, aceite de borraja, el cual es una buena fuente de ácido γ -linoléico, también contiene vitamina E y polifenoles de té verde. En Francia Coca-Cola y Nestlé buscaron introducir Lumaé, que es una bebida orientada a la belleza, la cual contenía vitamina C, Vitamina E, aloe vera, coenzima Q10, β -carotenos, astaxantina, colágeno y dimetilaminoetanol, que son los ingredientes de punta en cuestión de belleza. Otros productos son agua Vittel's Contre Beauté, orientada también a preservar la belleza de la piel, incluso se ha desarrollado confitería con esencia, como es el ejemplo de la compañía Kanebo en Japón que desarrolló un caramelo crujiente funcional rico en colágeno, vitamina C, ácido hialurónico al que se le mezcla linalol proveniente de aceite esencial de cítricos. Cuando la persona lo consume excreta un aroma a rosa ó a limón por 30 minutos. El dulce actúa como una alternativa de perfume (Sloan, 2008).

Dentro de los activos que se utilizan para el cuidado de la piel tenemos a la vitamina E, la cual actúa como un fotoprotector de la piel cuando se suministra como suplemento adicionado de vitamina C. El objetivo de la fotoprotección es la de prevenir foto-envejecimiento, foto-inmunodepresión y foto-carcinogénesis. Dentro de los compuestos que se utilizan para lograr un efecto fotoprotector se encuentran los carotenoides se ha demostrado que el β -caroteno tiene un efecto potencial fotoprotector en combinación con otros antioxidantes o con vitamina E, además de ser agentes quelantes muy eficientes de singuletes de oxígeno y secuestrante de radicales libres. Finalmente los ácidos polinsaturados $\Omega 3$, pueden proveer beneficios a la salud relacionados con enfermedades inflamatorias, esto se debe como

resultado de la competencia de los ácidos grasos $\Omega 3$ como sustrato de la ciclooxigenasa, Figura 1, y lipooxigenasa, Figura 2, resultando en la formación de menos prostaglandinas y leucotrienos. Esto interfiere con las cascadas inflamatorias en la piel reduciendo la síntesis de mediadores lipídicos proinflamatorios como el leucotrieno B_4 y prostaglandina PGE_2 o la reducción de citoquinas como la interleucina 1 y el factor α de necrosis tumoral.

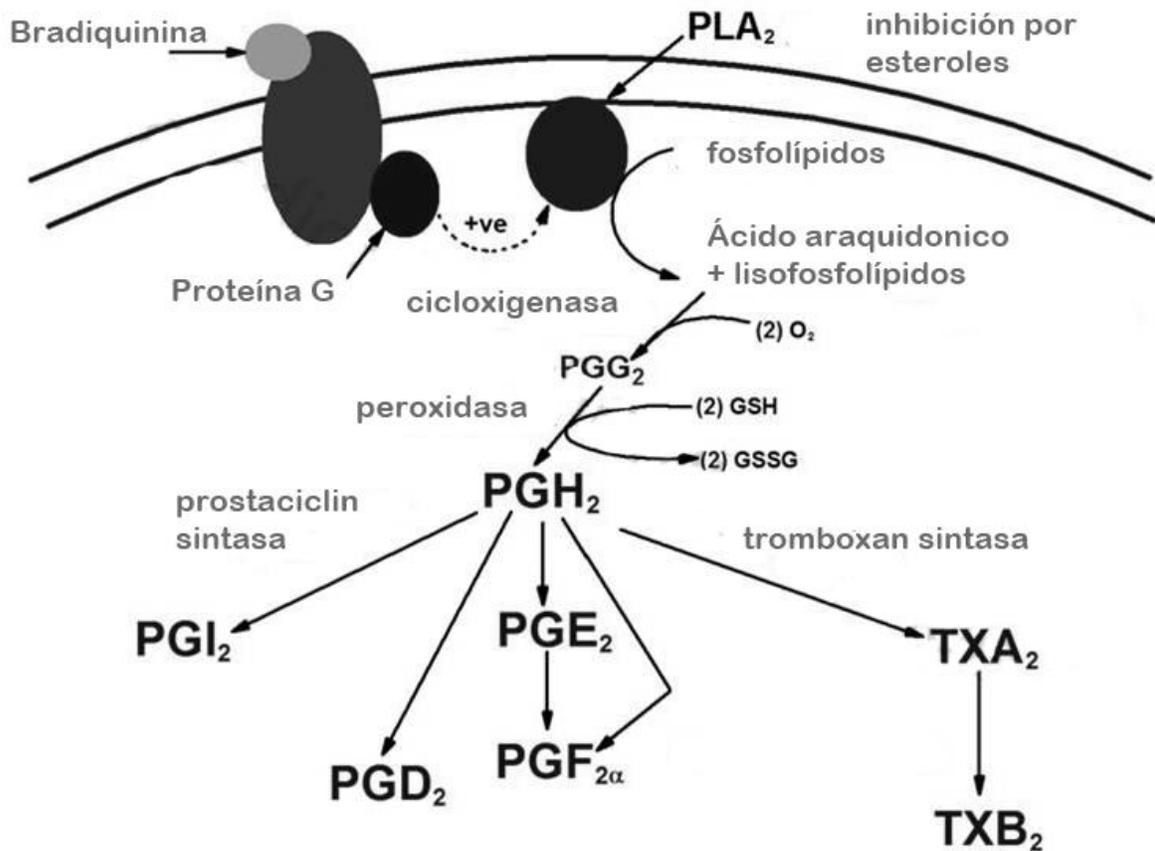


Figura1. Síntesis de las prostaglandinas.

themedicalbiochemistrypage.org/spanish/eicosanoids-sp.html

Algunos aceites de plantas contienen altas cantidades de ácido linoléico y γ -linoléico, los cuales son metabolizados en el cuerpo a ácido dihomo- γ -linoléico y subsecuentemente a ácido araquidónico. Una dieta diaria de estos ácidos induce la formación de fosfolípidos neutrófilos de la epidermis. Estos ácidos de cadena larga son metabolizados por el inhibidor de lipoxigenasa ácido 15-hidroxi-eicosatrienoico y

el mediador antiinflamatorio PGE_1 . Los metabolitos formados compiten con la síntesis de metabolitos proinflamatorios del ácido araquidónico LTB_4 y PGA_2 , lo cual explica el efecto benéfico de aceites de plantas ricas en aceites polinsaturados $\Omega 3$ en desórdenes inflamatorios.

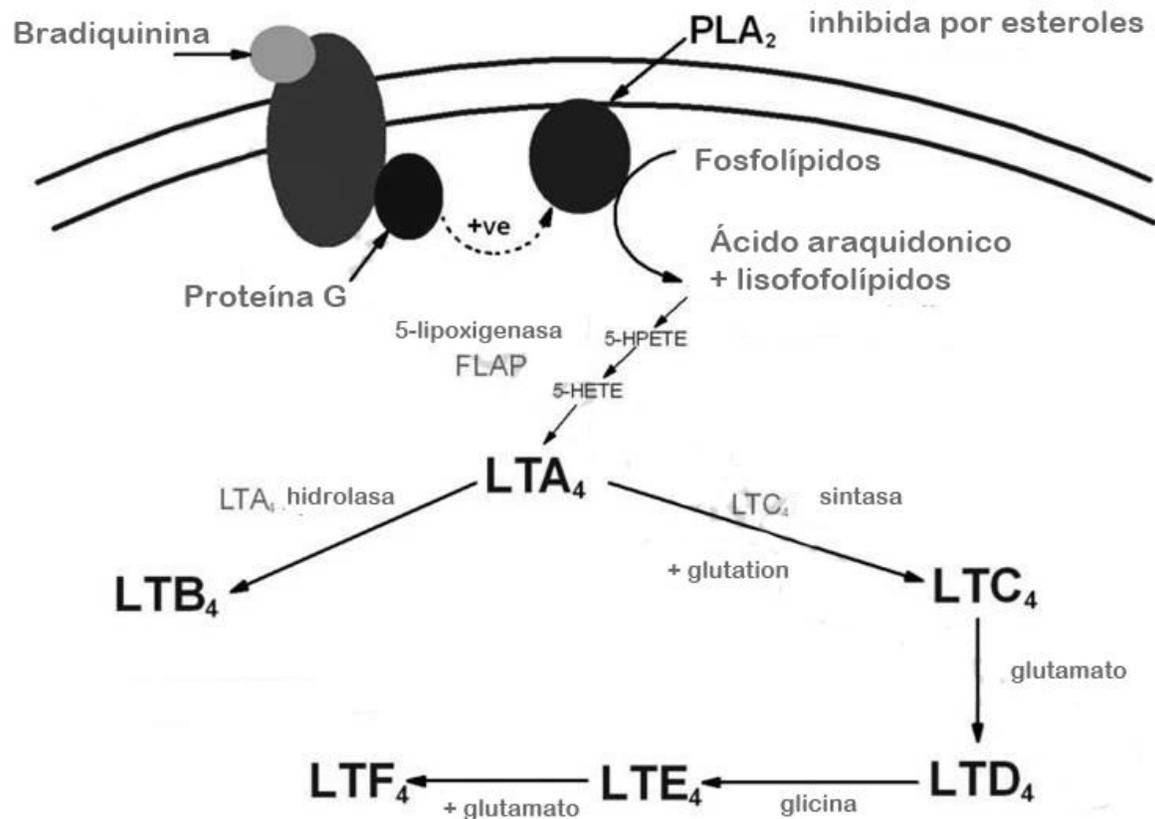


Figura 2. Síntesis de los leucotrienos.

themedicalbiochemistrypage.org/spanish/eicosanoids-sp.html

Los ácidos grasos polinsaturados $\Omega 3$ son inestables y fácilmente dañados por radicales libres, para protegerlos contra la formación excesiva de radicales libres y la peroxidación lipídica, se adicionan antioxidantes.

En adición a los efectos por la luz UV respecto a las quemaduras solares, se agrega una disminución de la respuesta inmune que además decrece con la edad y con la deficiencia en vitaminas. La vitamina E y los ácidos grasos de cadena corta

$\Omega 3$ muestran una disminución en la producción de PGA_2 como resultado en el aumento de células T, es decir un aumento en la respuesta inmune (Bolesma, 2001).

II.2 Lípidos.

La palabra lípido proviene del griego *lipos* que significa grasa y cuya definición no ha sido bien establecida: originalmente se definía como “una sustancia insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos como el cloroformo, hexano y éter de petróleo” con esta consideración existían muchos compuestos, como terpenos, vitaminas, carotenoides etc. Sin embargo algunos autores consideran como lípidos a aquellas moléculas que son derivados reales o potenciales de los ácidos grasos y sustancias relacionadas, según esta definición, los aceites y las grasas si se consideran por antonomasia como lípidos.

Los lípidos son grupos de compuestos constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque también contienen fósforo y nitrógeno. Desempeñan muchas funciones en los tejidos, además de que son la fuente energética más importante, ya que cada gramo genera 9 Kcal. Muchos cumplen con una actividad biológica, unos son parte estructural de las membranas celulares y de los sistemas de transporte de diversos nutrimentos, otros son ácido grasos indispensables, vitaminas y hormonas, algunos son pigmentos, también actúan como aislantes naturales en el hombre y en los animales ya que mantienen estable la temperatura del organismo. Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos y contribuyen a la textura y en general a las propiedades sensoriales y de nutrición. No hay distinción entre los grupos aun cuando se considera que los aceites son de origen vegetal y las grasas de origen animal, o bien que las grasas son sólidas a temperatura ambiente y los aceites se encuentran en estado líquido (Badui, 2006).

II.2.1 Clasificación de los lípidos.

El número de sustancias consideradas como lípidos es muy grande y la meta de clasificarlos resulta difícil. Existen diversos métodos para hacerlo, cada uno con sus propias ventajas y desventajas, pero todos ellos se basan en las propiedades físicas o químicas que los caracterizan (Badui, 2006).

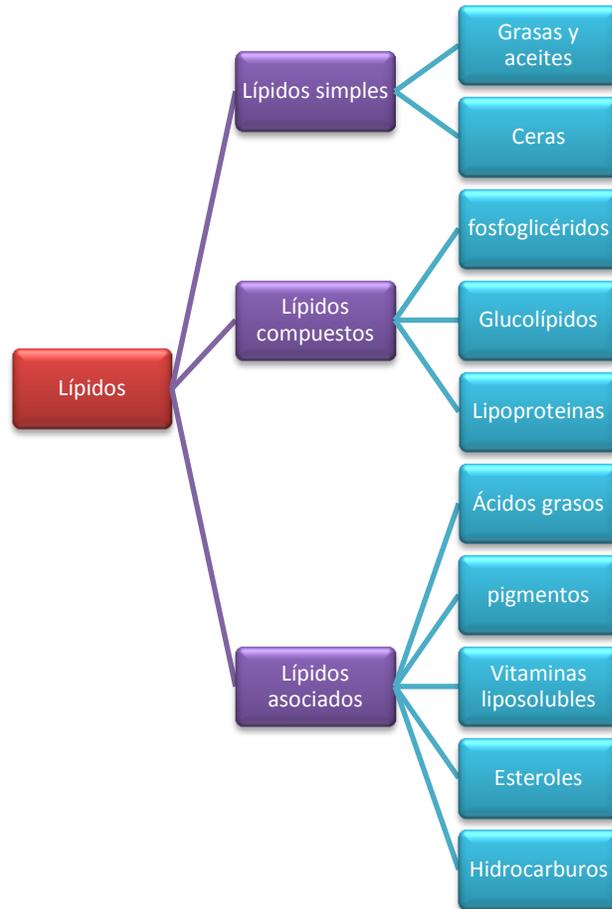


Figura 3. Clasificación de los lípidos (Badui, 2006).

Una clasificación (Figura 3) los divide en tres grandes grupos, en función de su estructura química. Los simples abarcan las grasas y los aceites, por lo tanto resultan en los más abundantes e importantes para el tecnólogo de alimentos, los lípidos compuestos están formados por una parte lipídica y otra que no lo es, unidas covalentemente. Por último los lípidos asociados o derivados son todos los que no se ubican en ninguna de las subdivisiones anteriores; en esta categoría están los ácidos grasos libres, carotenoides, vitaminas liposolubles, colesterol, etc. Otra clasificación se basa en la capacidad para producir jabones, los que lo forman se

conocen como saponificables y los que no lo pueden formar se denominan insaponificables. Por otra parte las grasas y los aceites que son los más importantes para la tecnología de alimentos se clasifican por su origen y contenido de ácidos grasos, así tenemos que se les divide en grasas animales, aceites marinos, grasa de la leche, grasas vegetales, aceites con ácido láurico, aceites con ácidos oléico y linoléico y aceites con ácido linolénico (Badui, 2006)

II.2.2 Ácidos Grasos.

Una molécula de ácido graso tiene dos regiones químicas diferenciadas. Una de ellas es una larga cadena de hidrocarburos, hidrófoba y poco reactiva químicamente. La otra es un grupo carboxilo, que se comporta como un ácido, se ioniza en solución y es muy hidrofílico y químicamente reactivo. Casi todas las moléculas de ácido grasos se unen por enlaces covalentes a otras moléculas a través del grupo carboxilo (Alberts, 2006).

Los ácidos grasos constituyen un gran porcentaje de la composición de los triacilglicéridos y en consecuencia de las grasas y los aceites. Las diferencias de estabilidad a la oxidación, de plasticidad, de estado físico, de patrón de cristalización, de índice de yodo, de temperaturas de solidificación y de fusión de las grasas y aceites se deben principalmente a la proporción y tipo de ácidos grasos que contienen.

Originalmente estos ácidos se consideraban como ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con número par de átomos de carbono que podían ser saturados ó insaturados. En la actualidad se han identificado muchos otros, como cíclicos, ramificados, hidroxilados, con número non de átomos de carbono. Se conocen más de 400 ácidos grasos que se localizan en la leche, algunos vegetales y en ciertos microorganismos. Aun cuando son muchos, éstos se encuentran en bajas concentraciones por lo que no afectan las características de los productos. El número de ácidos grasos que generalmente se localizan en alimentos es muy

limitado y solo resulta en unos cuantos, (Cuadro 1 y 2), por lo general están esterificados integrando los triacilglicéridos y cuando llegan a presentarse libres es porque se ha llevado una hidrólisis del enlace éster.

La relación de ácidos grasos en los aceites vegetales es relativamente sencilla, por ejemplo en el aceite de canola solamente aparecen siete picos en HPLC correspondientes a siete ácidos grasos, mientras que en el aceite de pescado se pueden observar 25 o más.

Diversos factores determinan la composición de las grasas y aceites, por ejemplo en el caso del huevo aumenta su cantidad en ácido linoléico a medida que la dieta de las aves es más rica en ácidos grasos insaturados, igualmente en la leche mientras la dieta de las vacas es más rica en ácidos grasos polinsaturados aumenta la proporción de ácido linoléico y linolénico. En el pescado la dieta y la temperatura del ambiente determina la composición de los ácidos grasos (Badui, 2006).

II.2.2.1 Ácidos grasos saturados.

Varían de 4 a 26 átomos de carbono y su temperatura o punto de fusión aumenta con el peso molecular o largo de la cadena; así los C4 a C8 son líquidos a 25°C, mientras que los C10 en adelante son sólidos, y su solubilidad en agua es inversamente proporcional al peso molecular. En la Cuadro 1 se muestran los ácidos grasos saturados más comunes. Su nomenclatura se basa en el empleo de los nombres comunes, tal como butírico, caproico, etc., o bien añadiendo la terminación “oico” a la raíz griega que indica el tamaño de la cadena de átomos de carbono. Su numeración generalmente comienza a partir del grupo carboxílico cuyo carbono corresponde al número uno.

Cuadro 1. Ácidos grasos saturados, los marcados con * son los más comunes en alimentos (Badui, 2006).

Nombre trivial	Nombre científico	Formula	Punto de fusión °C
Butírico	Butanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-5.9
Caproico	Hexanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	-3.4
Caprílico	Octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	16.7
Cáprico	Decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	31.6
Láurico*	Dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44.2
Mirístico*	Tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	54.4
Palmítico*	Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63.0
Estearico*	Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69.4
Araquidónico	Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76.0
Behénico	Docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	79.9
Lignocérico	Tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	84.2
Cerótico	Hexacosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	87.7

Los ácidos grasos saturados son mucho más estables que los insaturados, ante la oxidación; sin embargo, en condiciones de temperatura muy alta (más de 180°C), como llega a suceder en el freído, y en presencia de oxígeno, pueden sufrir reacciones oxidativas (Badui, 2006).

II.2.2.2 Ácidos grasos insaturados.

Debido a sus insaturaciones, estos compuestos tienen una gran reactividad química, ya que son propensos a la saturación y a las transformaciones oxidativas y de isomerización. Son muy abundantes en los aceites vegetales y marinos; su temperatura de fusión disminuye con el aumento de los dobles enlaces y siempre es menor que el de los saturados para una misma longitud de cadena, con una insaturación se les conoce como monoinsaturados, más de una insaturación poliinsaturados, en el primer caso la doble ligadura casi siempre se encuentra entre

el C9 y C10. Los nombres triviales indican el largo de la cadena, la localización de las dobles ligaduras y la terminación “enoico”, Cuadro 2.

En forma natural los ácidos grasos poliinsaturados tienen sus dobles ligaduras no conjugadas es decir que están separadas por un grupo metileno. Por razones de actividad biológica los ácidos poliinsaturados se enumeran de acuerdo con la posición del primer doble enlace con respecto al grupo metilo final así tenemos dos grandes grupos, los omega 6 ($\Omega 6$) que tienen el doble enlace en el carbono 6 como el ácido linoléico y los omega 3 ($\Omega 3$) con su primer doble enlace en el tercer carbono como el ácido linolénico, Figura 4 (Badui, 2006).

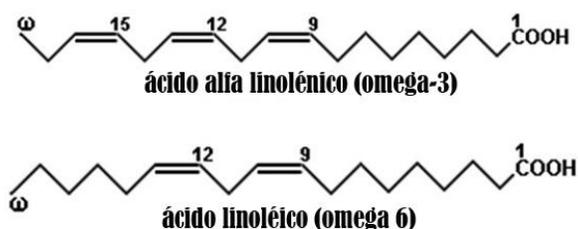


Figura 4. Estructuras de los ácidos $\Omega 3$ y $\Omega 6$.

Cuadro 2. Ácidos grasos insaturados. Los marcados con * son los ácidos grasos más comunes en alimentos (Badui, 2006).

Nombre trivial	Nombre científico	Formula	Punto de fusión (°C)
Palmitoléico	Hexadeca-9-enoico	$C_{15}H_{29}COOH$	-0.5
Oléico*	Octadeca-9-enoico	$C_{17}H_{33}COOH$	13
Linoléico*	Octadeca-9:12-dienoico	$C_{17}H_{31}COOH$	-5.0
Linolénico*	Octadeca-9:12:15-trienoico	$C_{17}H_{29}COOH$	-11.0
Araquidónico	Eicosa- 5:8:11:14:tetraenoico	$C_{19}H_{31}COOH$	-49.5
Vaccénico	<i>trans</i> -Octadeca-11-enoico	$C_{17}H_{33}COOH$	40.0
Gadoléico	Eicosa-11-enoico	$C_{19}H_{37}COOH$	23.5
Erúcico	Docosa-13-enoico	$C_{21}H_{39}COOH$	38.0

Las insaturaciones presentan dos tipos de isomerismo: a) geométrico, *cis*, *trans* y b) posicional, según sea la localización de la doble ligadura en la cadena de átomos de carbono. En estado natural, la mayoría de ellos son *cis*, mientras que los *trans*, se encuentran en grasas hidrogenadas comerciales, grasas hidrogenadas, y en algunas provenientes de rumiantes, como el sebo. Cabe indicar que las grasas *trans*, son termodinámicamente más estables y factibles que los isómeros *cis*, ya que la estructura *trans* es más rígida lo que provoca una asociación y empaquetamiento molecular compacto (cristal) semejante a un saturado. Dicho empaquetamiento hace que los isómeros *trans*, presenten temperaturas de fusión mayores que los correspondientes *cis*.

Los aceites ricos en linoléico y linolénico, como la soya, maíz y canola presentan puntos de fusión bajos, con elevados índices de yodo que indican una gran susceptibilidad a las reacciones de oxidación. Los ácidos linoléico y linolénico se consideran esenciales, por lo que se requiere un consumo continuo; se recomienda que representen del 1 al 2% de los lípidos ingeridos, forman parte constitutiva de las membranas de diferentes tejidos celulares, son precursores del ácido araquidónico necesario para darle rigidez a la mitocondria contribuyen al mantenimiento de la piel, del pelo y del sistema reproductivo, así como en la regulación de la contracción muscular y de la presión arterial, y fortalecen el crecimiento de las células sanas (Badui, 2006).

II.2.2.2.1 Ácidos grasos omega 3.

Existe un incremento en el consumo de alimentos con alto contenido de sustancias benéficas para la salud dentro de los que destacan los ácidos grasos polinsaturados omega-3 en especial el ácido α -linolénico, ácido eicosapentanoico y el ácido docosahexanoico (Mazalli y Bragagnolo, 2009).

El cuerpo humano no puede sintetizar este tipo de ácidos grasos *de novo*, aunque puede sintetizar cadenas largas de 20C- Ω 3 y de 22C- Ω 3, a partir del ácido α -linoléico C18, esta conversión tiene una eficiencia del 5% (Gerster, 1998).

Estudios *in vivo* sobre el consumo de ácidos grasos Ω 3 de fuentes tanto animales como vegetales han demostrado un amplio rango de beneficios a la salud humana, tienen influencia en el curso de diversas enfermedades, incluyendo desórdenes en la función inmune, desórdenes mentales y anomalías genéticas en el metabolismo de lípidos. Los ácidos grasos Ω 3 participan virtualmente en todas las funciones visuales en animales, además se asocian a la prevención de desórdenes neuropsiquiátricos como la depresión, demencia y notablemente sobre el Alzheimer. Se ha visto que la deficiencia de ácido α -linolénico induce marcadamente anomalías en las estructuras cerebrales, afectando la corteza frontal y la glándula pituitaria. (Eckert *et al.*, 2010).

También se ha observado que los ácidos grasos polinsaturados omega 3 actúan en los niveles de lípidos en el suero, efectos benéficos en los triglicéridos del plasma, en la actividad antitrombótica, función plaquetaria y en la presión sanguínea lo que los hace importantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Cherian *et al.*, 1996, Mazalli y Bragagnolo, 2009).

Ciertos alimentos funcionales son enriquecidos artificialmente con omega 3 como es la leche de vaca, la leche de soya, los huevos etc. (Simopoulos, 1992).

Las fuentes más ricas de Ω 3 son los peces de agua fría incluyendo el salmón, entre las alternativas vegetales se encuentran las semillas de *salvia scarlea*, Cañamo, nueces, chía, lino, y semillas de calabaza. (Nettleton, 1991).

Son susceptibles a la oxidación liberando como primeros productos hidroxiperóxidos y posteriormente aldehído, cetonas, alcoholes y ácidos carboxílicos como productos secundarios de la oxidación. Esta susceptibilidad a la oxidación es

la causa mayoritaria en el deterioro de la calidad de varios alimentos naturales y procesados. (Park *et al.*, 2004, Zhong *et al.*, 2007).

II.2.2.2.2 Ácidos grasos omega 6.

Los ácidos grasos $\Omega 6$ tienen un doble enlace en el sexto carbono desde el metilo terminal de la cadena. Los ácidos grasos $\Omega 6$ se presentan en una gran variedad de alimentos, el precursor común para estos ácidos es el ácido linoléico, el cual es requerido para la síntesis de ácido araquidónico y prostaglandinas. Los aceites vegetales y carnes son ricos en ácidos grasos $\Omega 6$, pero se presentan en bajas proporciones en pescados y mariscos. Aunque los ácidos grasos $\Omega 6$ son esenciales, cantidades excesivas pueden ser perjudiciales. La dieta de la mayoría de la gente en países desarrollados incluye un excesivo consumo de ácidos grasos omega 6, por lo cual es necesario mantener una relación entre el consumo de ácidos grasos $\Omega 3$ y ácidos grasos $\Omega 6$ (Coreen *et al.*, 2005)

Las funciones metabólicas utilizan ácidos grasos de cadena larga para la síntesis de otros ácidos grasos, por ejemplo los ácidos grasos omega 6, de 18 carbonos y un enlace simple, son elongados a cadenas de 20 carbonos y cuatro enlaces dobles (ácido araquidónico, precursor de los eicosanoides) y cadenas de 36 carbonos y seis enlaces dobles (ácido docosahexaenoico) (Valenzuela *et al.*, 2003).

II.2.2.2.3 Relación de ácidos grasos omega 6 y ácidos grasos omega 3.

Experimentos en animales y estudios clínicos indican que una relación baja entre ácidos grasos $\Omega 6/\Omega 3$ en los lípidos de la dieta es deseable para disminuir el riesgo de contraer enfermedades crónicas (Dannenberger *et al.*, 2007).

Los sistemas enzimáticos que originan los ácidos grasos $\Omega 3$ por desnaturalización y elongación, son los mismos sistemas que participan en la generación de los ácidos grasos $\Omega 6$. Consecuentemente hay una competencia en el

metabolismo de los ácidos grasos $\Omega 3$ y $\Omega 6$, un exceso de ácidos grasos $\Omega 6$ en la dieta limita la síntesis de ácidos grasos $\Omega 3$, por lo tanto el beneficio que aportan los ácidos grasos en la salud humana depende del balance en su ingestión (Mazalli y Bragagnolo, 2009).

Las dietas de los primeros humanos probablemente tuvieron una relación de 1 entre ácidos grasos $\Omega 6/ \Omega 3$, mientras que la dieta moderna occidental tiene una relación 1/15, principalmente por el consumo generalizado de aceites ricos en ácido linoléico (Coreen *et al*, 2005), para otros autores la relación es de 1:20-1:30 para la dieta occidental (Palaniswamy *et al.*, 2001).

Numerosos investigadores han descrito la importancia de los ácidos grasos $\Omega 3$ en la promoción de la salud y la prevención de enfermedades, Algunos autores sugieren una relación de consumo de estos ácidos de 1:1-2 (Palaniswamy *et al.*, 2001), ó de 1:4 (Mazalli y Bragagnolo, 2009).

II.2.3 Deterioro de los lípidos

La susceptibilidad de los lípidos a la oxidación es la principal causa de la pérdida de calidad en alimentos naturales y procesados como se menciona anteriormente, aunque en algunos alimentos una cantidad limitada de oxidación lipídica puede ser deseable para la generación de características sensoriales como sabor y olor. Por otro lado la oxidación lipídica es indeseable en la mayoría de los alimentos ya que conduce al desarrollo de sabores desagradables y de productos potencialmente tóxicos (Park *et al.*, 2004).

Los aceites sufren transformaciones químicas, conocidas comúnmente como rancidez, que producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables. Estas transformaciones se han dividido en dos grupos la lipólisis o rancidez hidrolítica y la autoxidación.

La lipólisis es una reacción catalizada por las lipasas, y en ciertas condiciones por las altas temperaturas en presencia de agua (en el freído), en las que se hidroliza en enlace éster de los triglicéridos y de los fosfolípidos y se liberan ácidos grasos. En el caso de los aceites vegetales, los ácidos grasos libres son de más de 16 carbonos, poco volátiles, sin olor y su presencia sólo se advierte por el índice de rancidez, por otra parte los de cadena corta como el butírico, caproico y caprilico son más volátiles, con olores peculiares y son responsables del deterioro percibido olfativamente (Badui, 2006).

La autoxidación es el deterioro más común de las grasas y aceites y se refiere a la oxidación de los ácidos grasos insaturados, pero también se presenta con otros compuestos de interés biológico como la vitamina A. La oxidación ocurre cuando un átomo cede un electrón a otro átomo distinto mediante el proceso de reducción, en la autoxidación se producen compuestos que aceleran a su vez la reacción y la mantienen y se sintetizan sustancia de bajo peso molecular que confieren el olor típico de grasa oxidada. La reacción depende de la distribución de los lípidos en el alimento siendo más susceptibles los que están expuestos al aire que los que se encuentran en una emulsión, en el Cuadro 3 se enlistan los inhibidores y promotores de la autoxidación. (Badui, 2006)

Cuadro 3. Promotores e inhibidores de la reacción de autoxidación (Badui, 2006)

Promotores	Inhibidores
Temperaturas altas	Refrigeración
Metales, Cu, Fe, etc.	Secuestradores
Peróxidos de grasa oxidadas	Antioxidantes
Lipoxidasa	Escaldado
Presión de oxígeno	Gas inerte o vacío
Luz UV, azul	Empaque opaco
Poliinsaturación	Hidrogenación de ácidos insaturados

La reacción requiere una energía de activación de 20-30 Kcal/mol, respecto a la reacción de Millard (20-50Kcal/mol) se ve que la autoxidación es más importante a temperaturas bajas. Las etapas de la reacción se indican en la Cuadro 4. Los hidroxiperóxidos generados en la etapa de propagación, producen nuevos radicales que alimentan la reacción, además interaccionan con otras moléculas, se polimerizan e incrementan la viscosidad, se oxidan y sintetizan sus epóxidos, su ruptura genera aldehídos, cetonas, ácidos y otros compuestos de bajo peso molecular que generan olores, se deshidratan y forman cetoglicéridos que se pueden ciclar etc. (Badui, 2006).

Cuadro 4. Mecanismos de la oxidación de lípidos (Badui, 2006)

Etapas	Reacción	Compuesto formado
Iniciación	$RH \rightarrow R^\circ + H^\circ$	Radical libre
Propagación	$R^\circ + O_2 \rightarrow ROO^\circ$	Radical hidroxiperóxido
	$ROO^\circ + RH \rightarrow R^\circ + ROOH$	Hidroxiperóxido
Terminación	$R^\circ + R^\circ \rightarrow RR$	Compuestos estables
	$R^\circ + ROO^\circ \rightarrow ROOR$	
	$ROO^\circ + ROO^\circ \rightarrow ROOR + O_2$	
	$RO^\circ + R^\circ \rightarrow ROR$	
	$2RO^\circ + 2ROO^\circ \rightarrow 2ROOR + O_2$	

La oxidación lipídica es una de las reacciones que ocurren durante el calentamiento de los alimentos a altas temperaturas en presencia de metales, fotosintetizadores y oxígeno. Por lo tanto las alteraciones pueden ocurrir en el calentamiento y almacenamiento, resultando en una pérdida considerable del valor nutricional y la producción de radicales libres que aceleran la formación de óxidos de colesterol (Mazalli y Bragagnolo, 2009).

II.3 Amarantho

Amaranthus (*Amaranthaceae*) es una planta diferente a los pastos que produce cantidades significativas de grano al que varios denominan el grano del siglo XXI. Se le considera un pseudocereal, ya que se trata de una planta dicotiledónea contrario a la mayoría de los cereales los cuales son monocotiledones, además de que su composición y función difiere a la de los cereales verdaderos. Es un cultivo robusto y que puede desarrollarse en un rango amplio de condiciones agronómicas. (Oleszek *et al.*, 1999, Pina-Rodriguez y Akoh, 2009, He *et al.*, 2002, Tikekar *et al.*, 2008, L. Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

El amaranto incluye cerca de 75 especies silvestres, que presentan su mayor diversidad en la región de América. Actualmente crece en muchos países tropicales, subtropicales y templados, se cultiva en regiones templadas de México, Centroamérica, Sudamérica, África, China India y en la parte sur de Estados Unidos (He *et al.*, 2002, Tikekar *et al.*, 2008, Pina-Rodriguez y Akoh, 2009).

El amaranto es conocido como la flor que nunca se desvanece en griego, se trata de un cultivo que se desarrolló en Mesoamérica, varias especies de amaranto fueron cultivadas por los aztecas hace 5000-6000 años y también por los incas antes de su interrupción a estas civilizaciones por los conquistadores españoles, El cultivo y la utilización del grano de amaranto fue olvidado por siglos después de su apogeo y subsecuente caída durante el periodo azteca, y fue redescubierto, promocionado con un regreso dramático antes de la mitad de la década de los 1970's y continuó creciendo fuertemente hasta el presente (Bruni *et al.*, 2001, Tikekar *et al.*, 2008, Pina-Rodriguez y Akoh, 2009, Martirosyan *et al.*, 2007).

La semilla del amaranto es pequeña y mide entre 1-1.5 mm de diámetro, tiene una forma lenticular y su peso por semilla es de 0.6-1.3 mg. El embrión tiene forma circular a diferencia de los cereales, y se encuentra rodeado de un perispermo rico en almidón estas partes junto con la cubierta forman la fracción del salvado, la cual

es rica en proteína y lípidos. Esta fracción de salvado es mayor en comparación con los cereales comunes como el maíz y el trigo (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

Dentro de las especies de amaranto en las que se han realizado estudios encontramos. *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus genus*, y de las especies silvestres *Amaranthus brownii* y *Amaranthus pumilus* (Marccone, 2000, Tikekar *et al.*, 2008, Bruni *et al.*, 2001).

La mayoría de las especies cultivadas por sus semillas son *Amaranthus hypochondriacus* en México, *Amaranthus cruentus* en Guatemala y *Amaranthus caudatus* en Perú y otros países de los Andes (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

Tanto el grano como la hoja han sido utilizados para alimentos de humanos y de animales, el valor nutricional del amaranto ha sido ampliamente estudiado. En el Cuadro 5 se muestra el análisis bromatológico del grano de amaranto. El grano tiene un alto contenido de proteína respecto a otros cereales, además de que su balance de aminoácidos es cercano al óptimo con un alto contenido de lisina y de triptófano. El contenido de proteína puede variar dependiendo de la especie, pero puede ser del 16% o más y tiene su máxima acumulación en la fase de aparición de botones. La proteína de amaranto está compuesta principalmente por globulinas y albuminas y una baja o nula concentración de prolaminas las cuales se encuentran de manera mayoritaria en los cereales comunes y que resultan tóxicas para pacientes con enfermedad celíaca, Con respecto a los cereales las globulinas y las albuminas de amaranto contienen una mayor proporción de lisina y de aminoácidos esenciales, además de una cantidad importante de ácido glutámico y prolina. Además de tener un mejor balance de aminoácidos que los cereales, la biodisponibilidad es mayor, en condiciones de proceso que no dañan la biodisponibilidad aumenta la digestibilidad. (Martirosyan *et al.*, 2007, Oleszek *et al.*, 1999, Bruni *et al.*, 2001, Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

Tiene una baja concentración de gluten por lo que productos basados en amaranto tienen un amplio valor para las personas con diabetes. El amaranto es una buena fuente de fibra dietaría comparable con el encontrado en los cereales normales. El amaranto es una buena fuente de vitamina B especialmente de riboflavina, también es importante su contenido de vitamina E, reportándose contenidos de 5.7 mg/100 g en base seca. En cuanto a su contenido de minerales es una buena fuente de calcio, magnesio y fierro, los cuales no se encuentran en alimentos libres de gluten, el calcio tiene una relevancia especial para la prevención de osteoporosis, osteopenia y en para los pacientes con enfermedad celiaca los cuales deben de cuidar su consumo de calcio por estar este ausente en la mayoría de los productos libres de gluten, de ahí la importancia que pueda tener el consumo de amaranto para esta población, al igual que para el sector de personas intolerantes a la lactosa (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

Su contenido de lípidos es del 6-9% el cual es alto respecto a otros cereales en donde es de 2 a 3 veces menor, los lípidos contenidos tienen alto grado de insaturación lo cual es deseable desde un punto de vista nutricional. Sus lípidos son estables a la oxidación actividad atribuida a su contenido de tocoferoles los cuales están presentes en una relativa alta concentración (Martirosyan *et al.*, 2007, Oleszek *et al.*, 1999, Bruni *et al.*, 200, Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

Cuadro 5. Composición del grano de amaranto (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

Compuesto	Cantidad
Proteína	16.5%
Grasa	5.7%
Almidón total	61.4%
Fibra dietaría	20.6%
Cenizas	2.8%
Ca	180.1 mg/100g (base seca)
Mg	279.2 mg/100g (base seca)
Zn	1.6 mg/100g (base seca)
Fe	9.2 mg/100g (base seca)

La mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en el amaranto son: ácido caféico, ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido ferúlico, también contiene fitoesteroles los cuales muestran actividad hipocolesterolémica, antiviral y antitumoral y en el amaranto representan el 20% de la fracción insaponificable siendo el de mayor proporción el condilasterol, además de contener escualeno en un 6%. El escualeno tiene aplicaciones en la industria cosmética como un lubricante resistente a la oxidación (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

La hoja de amaranto ha recibido menor atención que el grano, sin embargo se sabe que tiene una cantidad considerable de minerales como el calcio, fierro y fósforo, también contiene carotenoides en una concentración mayor a la mayoría de los vegetales (Martirosyan *et al.*, 2007).

En el amaranto también podemos encontrar algunos factores antinutricios como saponinas, inhibidores de tripsina y taninos. Las saponinas tienen un sabor amargo, son compuestos con actividad de superficie que reducen los niveles de vitaminas y minerales, aunque tradicionalmente se les considera como factores antinutricios recientes estudios han mostrado que las saponinas pueden tener actividad anticancerígena e hipocolesterolémica (Oleszek *et al.*, 1999, Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

La información concerniente a los atributos nutricionales y beneficios asociados con el consumo del grano de amaranto son muchos, por lo que se ha incorporado en productos de panificación, cereales para el desayuno, formulas infantiles. Algunos estudios han demostrado una variedad importante y única de aplicaciones nutraceuticas del grano de amaranto. Algunas de estas aplicaciones incluyen su incorporación en la dieta humana para obtener una respuesta baja de glucosa en sangre para diabéticos no dependientes de insulina, así como la formación de dietas con un balance de aminoácidos apropiado, y un aporte de cantidades de calcio y hierro. Otras aplicaciones nutraceuticas para el grano de amaranto es su utilización para disminuir los niveles de colesterol en la sangre en individuos susceptibles,

actividad hipocolesterémica lo que es atribuido a su alto contenido de fibra, tocotrienoles, escualeno y compuestos isoprenoides (Marcone, 2000).

II.3.1 Aceite de amaranto

El amaranto contiene típicamente entre un 6-9% de contenido de lípidos, en algunas especies como *A. spinosus* y *A. tenuifolius* se han reportado contenidos de 19.3%, sin embargo la semilla de amaranto no es considerada como un típico cultivo para la obtención de aceite. El aceite de amaranto es similar en composición al aceite de maíz, al aceite de semilla de algodón, al de germen de trigo y al aceite de sésamo (Gamel *et al.*, 2006, Lyon y Becker, 1987, Jahaniaval *et al.*, 2000, Martirosyan *et al.*, 2007).

El aceite de amaranto ha demostrado bajar los niveles de colesterol en modelos animales, efecto atribuido a su rico contenido de escualeno, tocotrienoles y compuestos isoprenoides. Esta información es sostenida en un estudio realizado en hámster los animales recibieron dietas hipocolesterémicas, con un suministro de aceite de amaranto en un 5% observándose un decremento en lipoproteínas y colesterol de baja densidad de un 15% y 22% respectivamente en comparación al grupo control (Martirosyan *et al.*, 2007, Marcone, 2000).

El contenido de lípidos libres se estima entre 5.7-7.2% y los lípidos ligados se estiman en un rango de 0.4%-0.9% para ocho variedades diferentes de amaranto. Los triacilglicéridos representan la fracción mayoritaria de los compuestos no polares de los lípidos libres, mientras que los glucolípidos y los fosfolípidos representan la fracción mayor de los lípidos ligados. Los glicolípidos representan el 6.4% de los lípidos totales, principalmente monogalactosil, digalactosil, los fosfolípidos representan el 3.6%, principalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. El aceite de amaranto contiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados aproximadamente un 77%, principalmente ácido linoléico, el cual es necesario para la nutrición humana. En el Cuadro 6 se muestra la composición de

ácidos grasos para varias especies de amaranto, en general contiene un 25% de ácido oléico, 50% de linoléico, y 1% de linolénico. En general las variedades comunes *A. cruentus*, *A. candatus*, *A. hypocondriacus*, que por lo general tienen una proporción de grasas saturadas e insaturadas que van desde 0.26 a 0.31 e incluso llegar a 0.5. El perfil de ácidos grasos en la posición 2 es muy similar a la encontrada en el aceite de algodón y al aceite de sésamo donde la fracción mayoritaria son los ácidos grasos C18:1 y C18:2 en un 36.1% y un 61.3% respectivamente. El número de carbonos es similar al encontrado al del aceite de maíz y al de algodón en un rango de C50-C54. La fracción insaponificable es del 8.8% que es una cantidad mayor a la encontrada con otros aceites vegetales, otros aceites como el de girasol, el de soya y el de oliva usualmente contienen 0.6-1.2, 0.3-1.2, y 0.4-1.1% respectivamente. Se ha reportado para el aceite de amaranto *A. cruentus* un contenido de ácido palmítico y esteárico. El escualeno presente en el amaranto se encuentra en cantidades de entre 6-11.2%, que es una cantidad considerable respecto a otros aceites vegetales. El escualeno es usualmente extraído del hígado de tiburón. En la fracción insaponificable del aceite de amaranto encontramos tocoferoles, fitoesteroles, tocotrienoles y escualeno. Se ha reportado concentraciones de 44 mg/100 g y de 834 mg/100 g de aceite para tocoferoles y esteroides respectivamente. El proceso de reventado del grano de amaranto decrece el contenido de ácidos grasos insaturados del 10%, siendo el más afectado al ácido linoléico, y el contenido de escualeno incrementa en un 15.5%, no hay mucha investigación sobre la estabilidad oxidativa del aceite de amaranto (Gamel *et al.*, 2006, Martirosyan *et al.*, 2007, Pina-Rodriguez y Akoh, 2009, Oleszek, 1999, Tikekar *et al.*, 2008).

Cuadro 6. Composición del aceite de varias especies de amaranto. (Gamel *et al.*, 2006, Lyon y Becker, 1987, Jahaniaval *et al.*, 2000, Martirosyan *et al.*, 2007, LeónCamacho, 2001, He *et al.*, 2002, Bruni *et al.*, 2001, Marcone, 2000).

Composición de ácidos grasos en %														Autor				
	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0	C24:1	relación S/U	Autor
<i>A. cruentus</i>			13.4		2.74	20.4	62.1	1.06	0.66			6.96						Lyon and Becker, 1987
<i>A. cruentus</i> (blanqueado)			13.9		2.61	19.8	62	1.09	0.61			8.01						
<i>A. cruentus</i>			14.4		4.5	32.9	40	0.5	1			4.9						Gamel et al, 2006
<i>A. cruentus</i> RRC1011	0.27		22.2	0.11	3.57	30.1	42.2	0.69	0.68	0.24							0.37	Jahanbava et al, 2000
					w-3/w-7													
<i>A. cruentus</i> L	0.7	0.2	20.4	0.4	0.1	0.7	3.9	32.1-1.2	38.2	0.7	0.8	0.3	0.3					León-Camacho, 2001
								w-5/w-3										
<i>A. hybridus</i> L	0.14	0.15	19.19	0.13	1.05	3.38	22.64	49.89	0.35-1.01	0.16	1.04	0.32	0.05	0.07	0.43			Martirosyan et al, 2007
<i>A. hybridus</i> HR027	0.3		20.6		1.8	18.7	55.9		0.5								0.29	He et al, 2002
<i>A. candidus</i>			20.5		2.2	25.5	49.8	0.6	0.5			4.8						Gamel et al, 2006
<i>A. candidus</i> (ecuador) SFE*			17.54		3.52	23.85	45.89		0.61	0.21	ND						0.52	Bruni et al, 2001
<i>A. candidus</i> (ecuador) EQ*			16.51		3.55	25.53	47.48		0.74	0.25	ND						0.29	Bruni et al, 2001
<i>A. candidus</i> (Italia) SFE*			17.49		2.71	27.48	43.66		0.38	0.11	ND						0.29	Bruni et al, 2001
<i>A. hypocondriacus</i>	0.26		23.4	0.15	3.68	31.5	39.4	0.65	0.6	0.24	0.19						0.39	Jahanbava et al, 2000
<i>A. hypocondriacus</i> HYN02	0.2		19.9		1.1	47.2	1.8	otros 1.8									0.27	He et al, 2002
<i>A. hypocondriacus</i> HYN03	0.3		19.1		1.1	53.8	1.7	otros 1.7									0.26	He et al, 2002
<i>A. hypocondriacus</i> K343				4.11	3.39	22.7	40.83	7.72									0.327	Marcone, 2000
<i>A. tricolor</i> Tr017	0.2		19.5		1	27.5	49.9	otros 1.9									0.27	He et al, 2002
<i>A. pumilus</i>				1.41	1.96	31.48	48.31	7.71									0.125	Marcone, 2000

*EQ: extracción química (solventes)

Como se observa en el Cuadro 6 los componentes y cantidades del aceite de amaranto varían dependiendo de varios factores y podemos encontrar diferencias entre variedades iguales de amaranto pero de distinta zona geográfica, entre diferentes genotipos de una misma variedad de una misma zona y entre variedades. También podemos observar que el método de extracción varia las concentraciones de cada uno de los componentes del aceite de amaranto aun viniendo de la misma planta, también el proceso al que se somete el aceite como el blanqueado afecta la composición del mismo, al igual que procesos en el grano como el reventado modifican el perfil de ácidos grasos, entre algunas variedades la composición es bastante similar. En el Cuadro 7 se muestra la nomenclatura de los ácidos grasos correspondiente al Cuadro 6 en nombre trivial. (Gamel *et al.*, 2006, Lyon y Becker, 1987, Jahaniaval *et al.*, 2000, Martirosyan *et al.*, 2007, León-Camacho, 2001, He *et al.*, 2002, Bruni *et al.*, 2001, Marcone, 2000).

II.3.1.1 Acido oléico.

Su fórmula química empírica es $C_{18}H_{34}O_2$ (ácido *cis*-9-octadecanoico, 18:1 *cis*-9 y *trans*-9). En estudios realizados sobre modelos de piel simulados se ha observado que la presencia de ácido oléico favorece la difusión del colesterol, ya que la adición de ácido oléico disminuye la densidad de la bicapa a altas temperaturas y el radio de la bicapa lipídica a bajas temperaturas permitiendo el movimiento del agua a través del sistema de mutílamelas de la piel. El decremento de la densidad incrementa la flexibilidad, lo cual es ventajoso respecto a otros estudios que utilizaban solventes para mejorar esta flexibilidad afectando las interacciones entre los grupos de las cabezas de los lípidos. Esta disminución de la densidad permite la difusión de la ceramidas, las cuales tienen funciones de receptores de señalización, de ácidos grasos a través de la membrana y del colesterol, el cual en la pared regula la fluidez de la membrana en concentraciones pequeñas. (Faller *et al.*, 2011).

El ácido oléico está presente en la leche humana es una fuente importante de energía para los infantes, además de ser un componente de los tejidos y de las

membranas, particularmente de la mielina, la cual es formada mayoritariamente en los primeros dos años de vida por lo cual es utilizado en formulas infantiles. En la dieta mediterránea se ha observado una clara reducción de las enfermedades cognitivas relacionadas con la edad y se atribuye al alto consumo de aceite de oliva, en el cual el ácido oléico es al que se le atribuye este efecto protector (Sahín *et al.*, 2006, Park *et al.*, 2006).

En las semillas oleaginosas la síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en los plásmidos, gracias a la acción de un grupo de enzimas conocidas como ácido graso sintetasas (FAS), se alarga el esqueleto de carbonos de dos en dos hasta formar palmitoil-ACP y estearoil-ACP que después será desaturado por la estearoil-ACP desaturasa (SAD) a oleoil-ACP. Estos acil-ACP deben ser hidrolizados por tioesterasas para salir al citoplasma y ser usados en la síntesis de triacilgliceroles,. En los cacahuates se ha observado que la cantidad de ácido oléico aumenta y la de linoléico disminuye con la madurez (Pleite *et al.*,2006, Andersen y Gorbet, 2002).

II.3.1.2 Ácido linoléico

El ácido linoléico (*cis*-9, *cis*-12-octadecanoico ó 18:2), es un ácido graso Ω 6, tiene dobles enlaces localizados en los carbonos 9 y 12 ambos en configuración *cis* aunque también lo podemos encontrar en configuración *trans* (Choi *et al.*, 2009, Murzin *et al.*, 2003).

Se ha encontrado en productos cárnicos y lácteos un grupo de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoléico la diferencia es la posición del doble enlace *cis*-9, *trans*-11- octadecanoico y *trans*-10,*cis*-12- octadecanoico. El ácido linoléico conjugado puede ser sintetizado a partir de aceites como el de soya, girasol y maíz utilizando luz UV. El ácido linoléico conjugado se ha encontrado que afecta la sensibilidad a la insulina, la inmunomodulación, previene el cáncer de próstata estomago, colon y de mama (Murzin *et al.*, 2004, Gammill *et al.*, 2010, Murzin *et al.*, 2003).

II.3.1.3 Ácido linolénico

Existen dos isómeros el α y el γ linolénico, el primero es un ácido $\Omega 3$ y el segundo un ácido $\Omega 6$, ambos son comunes en los aceites vegetales. El ácido α -linolénico (ácido 9, 12,15-octadecatrienoico, 18:3 n-3) es abundante en el aceite de soya, girasol y algodón. Se han demostrado propiedades antimicrobianas, junto con el ácido γ -linolénico se le atribuye la reducción de los niveles de colesterol sérico, triglicéridos, y de LDL, así como una disminución en el riesgo de desarrollar arterioesclerosis, cáncer y enfermedades alérgicas. Es esencial para el crecimiento normal, desarrollo de la retina y del cerebro, además de la promoción a la salud y la resistencia a enfermedades (Lee *et al*, 2002, Palaniswamy *et al.*, 2001, Aguedo *et al.*, 2008).

El ácido γ -linolénico (ácido cis, 6,9,12-octadecatrienoico, 18:3 n-6) es un ácido graso polinsaturado esencial $\Omega 6$ que debe ser provisto por el alimento ya que no es fácilmente sintetizado por el cuerpo. Se utiliza para el tratamiento de artritis reumatoide, neuropatía diabética, hipertensión, síndrome premenstrual, dermatitis, esclerosis múltiple, migraña, antiinflamatorio y cáncer. Es un intermediario de la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, además facilita la β -oxidación en el hígado. Cabe mencionar que la efectividad del ácido linolénico se ve afectada por altos niveles de ácido linoléico, también el ácido linoléico en el cuerpo es primeramente convertido a ácido linolénico por la acción de la $\Delta 6$ -desaturasa, para después ser convertido a ácido dihomo- γ -linolénico y ácido araquidónico (Senanayake y Shahidi, 1999, Goffman y Galletti, 2001, Yaniv *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2004

II.3.1.4 Ácido Palmítico.

El ácido palmítico (16:0), es un componente importante en la leche materna, por lo cual se ha utilizado para la preparación de fórmulas infantiles, incluso se ha utilizado aceite de amaranto para enriquecer formulas lácteas. Grandes cantidades pueden resultar en enfermedades coronarias, pero para los niños tiene importancia

nutricional, ya que mejora la absorción de calcio. El ácido palmítico también ha mostrado tener una alta capacidad antioxidante, durante la maduración. Por ejemplo en aceite de oliva, al avanzar el grado de maduración de la oliva disminuye la cantidad de ácidos grasos saturados, disminuyendo la cantidad de ácido palmítico y aumentando la de ácido linoléico, también variando la relación de ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos polinsaturados. Otro parámetro importante es el grado o la relación entre ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados. (Pina-Rodriguez y Akoh, 2009, Henry *et al.*, 2002, Beltrán *et al.*, 2004).

II.3.1.5 Ácido Esteárico.

Se utiliza principalmente en la industria como ingrediente para plásticos, dulces, suplementos dietarios, cosméticos y crayones, también se utiliza como suavizante de plásticos. Se han hecho estudios para ver si la presencia de ácido esteárico (18:0) afecta el colesterol total en la sangre y se ha observado que no tiene efecto sobre estos niveles. En el Cuadro 7 se muestra en general la composición del aceite de amaranto. (Wootthikanokkhan y Tunjongnawin, 2002, Yu *et al.*, 1995).

Cuadro 7. Composición del aceite de amaranto en general (*A. hybridus*). (Martirosyan *et al.*, 2007)

Componente	Cantidad por cada 100 g de aceite)
Triglicéridos (g)	78
Escualeno (g)	5.9
Fosfolípidos (g)	8
Fitoesteroides (g)	2
Tocoferoles totales (mg)	300
Carotenoides (mg)	0.5
Valor energético Kcal/k	711/87

II.3.1.6 Fitoesteroles.

Los fitoesteroles son de los compuestos más importantes de la fracción insaponificable de los aceites vegetales, su composición es característica de cada una de las especies botánicas de donde se obtiene el aceite, así que su análisis se utiliza como control de identidad. De los fitoesteroles el β -sitosterol es el más representativo y de mayor distribución, otros ejemplos de esteroides son campesterol, estigmasterol, brasicasterol. Los fitoesteroles pueden sufrir transformaciones durante el proceso de refinamiento, produciendo la formación de isómeros, de óxidos y de productos de deshidratación, estos productos se analizan para determinar la calidad del aceite y de sus productos. La estructura molecular de los fitoesteroles está relacionada con la estructura del colesterol por lo que se oxidan de manera similar. (Bortolomeazzni *et al.*, 1999).

En los últimos años los fitoesteroles han cobrado importancia ya que se ha probado que pueden reducir los niveles de colesterol-LDL y del colesterol total en el suero. Los fitoesteroles pueden reducir la absorción intestinal del colesterol dietario y el colesterol biliar, esto es porque los fitoesteroles inhiben por competencia la absorción intestinal del colesterol. Los fitoesteroles no son sintetizados por los animales, pero se pueden obtener de la dieta especialmente de aceites, cereales y productos de panificación, se estima que la ingesta recomendada está en el rango de 250 a 500 mg/día. Para obtener una reducción del colesterol presente en el suero de un 10-15% la ingesta debe de ser de 2 a 3 g de fitoesteroles por día, el grado de absorción de los fitoesteroles es de menos del 5% de los niveles dietarios, la mayoría se absorbe en el colon. En el Cuadro 8 se muestran los fitoesteroles encontrados para *A. cruentus*. (Conchillo *et al.*, 2005, Pina-Rodríguez y Akoh, 2009, Jiménez-Escrig *et al.*, 2006 y Bortolomeazzni *et al.*, 2003).

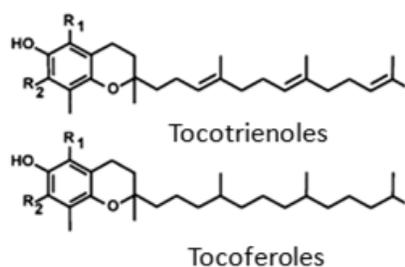
Cuadro 8. Fitoesteroles encontrados en el aceite amaranto (*A.cruentus*) (Leon-Camacho, 2001).

Compuesto	Concentración
24-metilen-colesterol	0.3
Campesterol	1.6
Estigmasterol	0.9
Δ^7 -Campesterol	24.8
Clerosterol	42.0
β -sitoesterol	1.3
Δ^5 -avenasterol	2.0
Δ^7 -estigmasterol	15.2
Δ^5 -avenasterol	11.9

II.3.1.7 Tocoferoles y Tocotrienoles.

Los tocoferoles y los tocotrienoles pertenecen a la familia de compuestos de la vitamina E. La vitamina E natural comprende cuatro diferentes formas α , β , γ y δ , los cuales difieren en el número y localización de grupos CH_3 así como en la biodisponibilidad. Los tocotrienoles tienen un isoprenoide insaturado en la cadena lateral, estos comprenden otros cuatro compuestos (Figura 5). Todos estos tocoferoles están presentes en los materiales biológicos, el α -tocoferol y su derivado acetilado tienen la reputación de tener una alta actividad biológica, así como de tener una alta capacidad antioxidante *in vivo*, protegiendo a las células de los radicales libres y previniendo la peroxidación de las grasas del cuerpo. Los tocoferoles son compuestos activos utilizados en cosméticos, productos para el cabello, productos para el cuidado de la piel, como agentes humectantes y son adecuados para la protección solar, esto por su capacidad de quelar el singulete de oxígeno producido por la radiación solar, esta actividad es potencializada por un efecto sinérgico con la vitamina C y los carotenoides. Estudios epidemiológicos han demostrado los beneficios contra la arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, Alzheimer, Parkinson y contra el proceso de envejecimiento, incluso para

el combate a la gingivitis. Estas moléculas también previenen la propagación de la peroxidación lipídica atrapando los radicales lipídicos (peroxilos), ver Figura 6. Como se mencionó en combinación con vitamina C y vitamina A (carotenoides) se potencializa su actividad de atrapar radicales, también se ha observado la disminución del progreso de lesiones pre-cáncer en células cancerígenas (Andre *et al.*, 2007, Szwajczak *et al.*, 2009, Lineau *et al.*, 2002, Strohschein *et al.*, 1998, Schauff *et al.*, 2007).



	R1	R2
α	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
δ	H	H

Figura 5. Estructura de los tocoferoles y de los tocotrienoles (Sookwong *et al.*, 2007).

Varios isómeros de los tocoferoles se utilizan como estabilizadores de aceites esenciales en materiales encapsulados y bebidas. El α-tocoferol se utiliza generalmente para la suplementación de vitamina E en productos alimentarios y como antioxidante y los otros isómeros β, γ y δ se utilizan exclusivamente como antioxidantes. El δ-tocoferol es considerado por su alta capacidad antioxidante en el aceite a granel, se sabe que puede tener actividad pro-oxidante a muy altas concentraciones, también es utilizado para la protección de sabores. El γ-tocoferol es la mayor forma de tocoferol en muchas plantas pero recibe menos atención que el α-tocoferol porque se encuentra en sangre y tejidos en concentraciones mucho menores que el α-tocoferol. Cabe mencionar que los homólogos de tocoferoles se

oxidan fácilmente en la presencia de aire (Leclercq *et al.*, 2007, Krucker, 2004, Mitarai *et al.*, 2008).

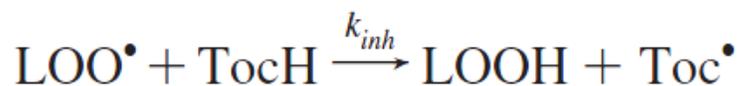


Figura 6. Mecanismo de atrapamiento de radicales lipídicos por los tocoferoles (Mitarai *et al.*, 2008).

La vitamina E es sólo sintetizada en plantas, y es un micronutriente esencial y un fitoquímico. Para su función como micronutriente se recomienda consumir de 10-13.4 UI y se ha encontrado que un consumo de 100-1000 UI reduce el riesgo de enfermedades del corazón y algunos tipos de cáncer, mejora la función inmune. (Gómez-Coronado y Barbas, 2003).

Los efectos de los tocotrienoles son el disminuir los niveles de colesterol y efectos antitrombóticos, también se ha encontrado actividad anticancerígena y es útil para la prevención de desórdenes angiogénicos, como diabetes, rinopatías, artritis reumatoide, cáncer y para prevenir enfermedades cardiovasculares (Sookwong *et al.*, 2007).

II.3.1.8 Escualeno.

El escualeno (C₃₀H₅₀, 6,10, 15,19, 23-hexametil-2,6, 10,14,18, 22 tetracosahexeno) es un importante miembro de los polienos isoprenoides, es un lípido insaponificable y juega un rol dominante en la biosíntesis de esteroides y esteroides en plantas y en animales, Es un intermediario en la síntesis de colesterol y lo podemos encontrar debajo de la piel y en el tejido adiposo. La estructura del escualeno se muestra en la Figura 7, tiene seis unidades prenílicas, los seis dobles enlaces se encuentran aislados unos de otros, a temperatura ambiente es un líquido viscoso transparente con un sabor y aroma suave, es un compuesto no volátil con un alto punto de ebullición 284° C. Los dobles enlaces le confieren cierta reactividad

al escualeno, pero en general es estable a la peroxidación y otras reacciones, es razonablemente estable a procesos de freído, rostizado y reventado. (Mantzouridou *et al.*, 2009, He y Corke, 2003, Tikekar *et al.*, 2008).

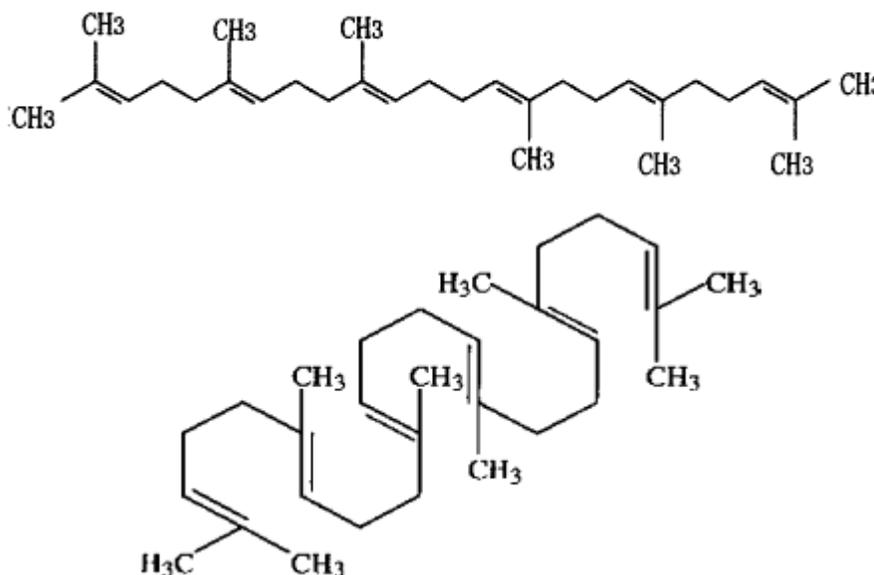


Figura 7. Estructura del escualeno (Tikekar *et al.*, 2008, Ko *et al.*, 2002)

La principal fuente de escualeno es el hígado de tiburón y de ballena por lo que el amaranto se recomienda como fuente alterna de escualeno para proteger a estos animales marinos. Se ha reportado que el grano de amaranto contiene niveles cercanos al 8%, lo cual es superior a otros aceites vegetales, como el aceite de oliva, el aceite el germen de trigo y el aceite de salvado de arroz que tienen un contenido de 0.1-0.7% de escualeno. El escualeno es importante como ingrediente de cosméticos y como un buen lubricante para instrumentos de precisión como discos de computadora por ser termoestable. De los efectos benéficos a la salud que se han reportado esta la reducción en el riesgo de varios tipos de cáncer, en especial de colon y la reducción de los niveles de colesterol en el suero en sinéresis con el consumo de tocotrienoles. El escualeno después de ser ingerido es transportado y almacenado en el tejido de la piel y juega un papel importante en la liberación de estrés oxidativo por ejemplo por exposición a los rayos del sol. Su actividad hipocolesterolémica se debe a que inhibe la HMG-CoA reductasa una

enzima necesaria para la síntesis de colesterol, su actividad anticancerígena se atribuye a que disminuye la concentración de intermediarios de farnesil fosfato como resultado de la inhibición de HMG-CoA. El farnesil fosfato es un compuesto captable por la oncoproteína Ras-P21 la cual es farnesilable, este proceso de farnesilación de proteínas incrementa la actividad carcinogénica, al incrementar el consumo de escualeno disminuye la concentración de estas oncoproteínas. Aunado a esto el escualeno remueve sustancias xenobióticas las cuales son generalmente liposolubles. El escualeno tiene la capacidad de quelar el singulete de oxígeno que se genera por exposición a la luz, explicando por qué lo podemos encontrar debajo de la piel. Es utilizado en cosméticos como acarreador de compuestos liposolubles, para que puedan entrar en la piel fácilmente. En general se usa para cosméticos y farmacia como solvente, humectante y lubricante (Catchpole *et al.*, 1997, He *et al.*, 2003, Ko *et al.*, 2002, He *et al.*, 2002, He y Corke, 2003, Tikekar *et al.*, 2008, Marcone, 2000).

II.4 Microencapsulación.

La microencapsulación es un proceso por el cual un material o una mezcla de materiales son cubiertos o atrapados con otro material o sistema, proveyendo protección y/o controlando la liberación del ingrediente atrapado (Figura 8). Se ha utilizado principalmente en la industria farmacéutica, arte gráfico, industria agroquímica, cosméticos, adhesivos e industria de recubrimientos. En el procesamiento de alimentos la microencapsulación se utiliza para la protección de ingredientes contra el deterioro o pérdidas por volatilización o una prematura interacción con otros ingredientes. También tiene la capacidad de convertir un material líquido en un sólido fácilmente manejable, aumenta la vida de anaquel protegiendo contra la oxidación y condiciones ambientales, por ejemplo a los aceites. Dependiendo de los materiales utilizados para encapsular, la liberación del material encapsulado puede darse durante el proceso, almacenamiento o consumo. Existen varios procesos o técnicas de microencapsulación dependiendo del propósito entre otros se encuentran separación de fases, evaporación de solventes,

co-cristalización, coacervación, polimerización interfacial, secado por aspersión, nanoencapsulación, etc. (Rodríguez-Huezo *et al.*, 2004, Shu *et al.*, 2006, Soottitantawat *et al.*, 2002, Ahn *et al.*, 2008, Senatore *et al.*, 2010).

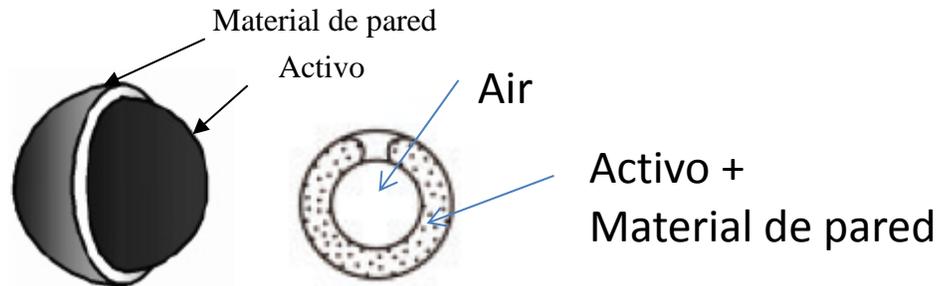


Figura 8. Material encapsulado en un material de cubierta; cuando el material a encapsular se encuentra inmerso en el material de pared hablamos de una matriz y no de una microcápsula verdadera. (Dowding *et al.*, 2004, Büchi, 2002)

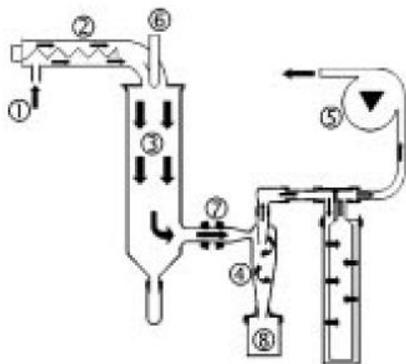
La optimización de los procesos de microencapsulación son un factor clave, métodos adecuados, factibles y sensitivos deben ser establecidos para la medición de rendimiento de microencapsulación y la eficiencia de microencapsulación (Chang *et al.*, 2005).

Los materiales de pared para microencapsulación los podemos clasificar en a) gomas: goma arábica, goma de frijol locus, agar agar), b) lípidos: ceras, grasa de palma, c) proteínas: gelatina, proteínas de leche, proteínas de soya, d) polisacáridos: almidón, xantano, pululano, goma guar, alginato y mono, di y oligosacaridos; almidones hidrolizados, lactosa, así como celulosa y sus derivados metilcelulosa carboximetilcelulosa (Dursch *et al.*, 2007).

II.4.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión es el método más utilizado de microencapsulación en la industria ya que se trata de un proceso continuo y fácil de industrializar, se trata de un método en el cual se presenta la remoción de agua, de acuerdo al concepto de difusión selectiva, el coeficiente de difusión del material encapsulado decrece

mucho en comparación con el coeficiente de difusión del agua. En general la técnica consiste en preparar la dispersión del líquido que va a ser encapsulado en una solución acuosa del polímero que formara la pared, la emulsión es atomizada en finas gotas en una cámara en donde se encuentra un flujo de aire caliente, el agua de la emulsión de las gotas rápidamente se evapora formando partículas secas, las cuales son separadas en un ciclón y colectadas en un vaso. En la Figura 9 se muestra el diagrama general de un secador por aspersion (Shu *et al.*, 2006, Sootittwntwwat *et al.*, 2003, Senatore *et al.*, 2010).



1. Entrada de aire
2. Calentador
3. Estabilizador de flujo dentro de la cámara de secado
4. Ciclón, el producto es separado del flujo de aire
5. Aspirador
6. Sensor de Temperatura de entrada
7. Sensor de Temperatura de salida
8. Contenedor de producto terminado

Figura 9. Diagrama de un secador por aspersion. (Büchi, 2002)

Originalmente el proceso de secado por aspersion se utiliza para la deshidratación, especialmente para alimentos sensibles al calor y fármacos, ahora esta técnica es utilizada como método de atrapamiento de materiales activos en una matriz, además el secado por aspersion es un método rápido, de bajo costo, y en general amigable con el ambiente. Un problema que puede tener esta técnica es la limitante en materiales de encapsulación por lo que se hace énfasis en el desarrollo de polímeros alternativos de bajo costo y que sean naturales (Senatore *et al.*, 2010, Dursch *et al.*, 2007).

La manera en la cual el material atomizado contacta con el aire caliente es un factor importante en el diseño del secado por aspersion, confiriendo propiedades especiales al producto influyendo el comportamiento de las gotas durante el

secado, cuando se realiza la atomización en la misma dirección al flujo de aire caliente a través del aparato. Las gotas se ponen en contacto con el aire caliente cuando tienen mucha humedad. El producto es tratado con mucho cuidado por la vaporización rápida. Cuando el material se atomiza a contra corriente, el flujo de aire fluye hacia arriba y el producto cae a través del aire caliente a la bandeja de recolección. La humedad relativa es eliminada y el producto se calienta mucho, por lo que este método es para productos térmicamente estables. En el método combinado el producto es atomizado hacia arriba y sólo permanece en la zona caliente por un corto tiempo para eliminar la humedad residual, la gravedad empuja el producto a la zona de enfriamiento, en este método el producto debe ser tratado con cuidado. Finalmente en el secado en un disco rotatorio, el material se atomiza en un disco que gira rápidamente convirtiendo a la emulsión en una fina niebla. El aire de secado fluye en la misma dirección, el producto debe ser tratado con cuidado justo como en el método de co-corriente. En la Figura 10 se muestran los diagramas de cada una de estas técnicas (Büchi, 2002).

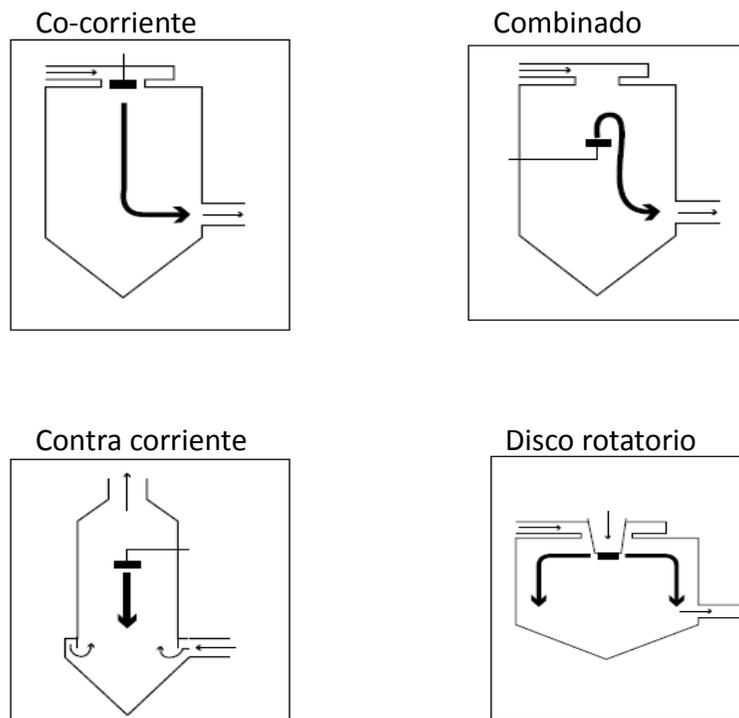


Figura 10. Diferentes técnicas de secado por aspersion (Büchi, 2002).

II.5 Emulsiones

Los lípidos en muchos alimentos se encuentran contenidos en pequeñas gotas de aceite dispersas en una fase acuosa y podemos tenerlas de manera natural o formarlas, como ejemplos tenemos la leche, la mayonesa, sopas, salsas, bebidas. Estos lípidos son susceptibles a la oxidación y formación de compuestos tóxicos y sabores desagradables. Muchos factores determinan la oxidación de estos lípidos como el pH y las propiedades interfaciales de membrana. Uno de los mecanismos más comunes de la oxidación lipídica en emulsiones es la interacción entre los hidroxiperóxidos localizados en la superficie de la gota y los metales en la fase acuosa produciendo radicales peroxil y alcoxil que son altamente reactivos (Okuda *et al.*, 2005).

Las emulsiones son termodinámicamente inestables, por ser poco favorable el contacto entre la fase acuosa y la fase lipídica, por lo que tienden a romperse a lo largo del tiempo. Convencionalmente las emulsiones aceite en agua (O/W) son creadas homogenizando la parte lipídica en una fase acuosa en la presencia de uno o más emulsificantes, ya que estos estabilizan a corto o largo plazo la estabilidad cinética de las emulsiones en sistemas alimentarios. Los emulsificantes son ingredientes surfactantes, o con actividad en la superficie que absorben las interfaces y facilitan la producción de pequeñas gotas reduciendo la tensión superficial durante la homogenización. Los emulsificantes también mejoran la estabilidad de la emulsión de la agregación de gotas por la generación de fuerzas repulsivas entre las gotas y/o por la formación de membranas interfaciales resistentes a la ruptura alrededor de las gotas. Los emulsificantes pueden ser naturales o sintéticos existiendo una gran variedad como fosfolípidos, proteínas y polisacáridos, cada uno con diferente capacidad de estabilizar y formar emulsiones. (Surth *et al.*, 2005).

Las propiedades emulsificantes de las proteínas de suero de leche han sido estudiadas por muchos años. La forma en que las proteínas de suero de leche se

polimerizan en emulsiones estabilizadas por éstas, las interacciones entre las proteínas de suero de leche, usadas como surfactantes, en la superficie de la gota de la emulsión, la influencia del pH, CaCl_2 , sacarosa, tratamiento térmico y la estabilidad de la emulsión a diferentes concentraciones se han reportado por diversos autores. Se ha encontrado que las proteínas de suero de leche inhiben la oxidación en emulsiones O/W cuando éstas se encuentran tanto en la superficie de la gota como en la fase acuosa. Los mecanismos antioxidantes de la proteínas de suero de leche han sido atribuidas a su habilidad de formar cargas catiónicas en la superficie de las gotas de la emulsión las cuales repelen los metales de transición; forman capas gruesas viscoelásticas en la interfase de la emulsión, lo cual físicamente minimiza las interacciones entre los metales de transición y los hidroxiperóxidos, tienen propiedades de quelar metales prooxidativos e inactivan radicales libres a través de los grupos sulfihidrilos y otros aminoácidos (Hu *et al.*, 2003).

III. HIPÓTESIS

La microencapsulación y las emulsiones son técnicas que permitirán proteger los componentes fisiológicamente activos y la actividad antioxidante del aceite de amaranto durante un periodo grande de tiempo, además de favorecer su incorporación como ingrediente en alimentos funcionales.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo General

Incorporar el aceite de amaranto en microesferas y emulsiones para evaluar su estabilidad oxidativa y su inclusión en alimentos.

IV.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el aceite de amaranto (*A. hypochondriacus*)
- Determinar la actividad antioxidante in vitro del aceite de amaranto
- Microencapsular el aceite de amaranto por secado por aspersión.
- Caracterizar las microcápsulas obtenidas por la técnica de secado por aspersión.
- Determinar la estabilidad oxidativa de las microcápsulas.
- Elaborar emulsiones incorporando el aceite de amaranto
- Evaluar la estabilidad oxidativa de las emulsiones

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Materiales

El grano de *A. hypochondriacus* variedad Revancha fue proporcionado por el INIFAP unidad Querétaro.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Extracción del aceite de amaranto

El grano de amaranto se molió con un molino de café comercial y se pasó por una malla no. 40. La harina se secó en estufa de vacío a 50 °C por 40 minutos para eliminar la mayor parte de agua. Posteriormente, la harina se colocó en un recipiente y se adicionó hexano grado reactivo en proporción 4:1, se dejó en maceración por una noche, al día siguiente se retiró el volumen de hexano y se filtró, a esta fracción se le denomina micela. Se restituyó el volumen retirado en el recipiente y se agitó por dos horas, posteriormente se filtró el hexano y se repitió el procedimiento cuatro veces. Los extractos hexánicos se unieron y se rotaevaporó para obtener el aceite, el cual se centrifugó a 3000 rpm por 2 min y se depositó en un frasco ámbar con atmósfera de nitrógeno y se guardó en refrigeración para su posterior uso (Rocha, 2010).

VI.2.2 Caracterización del aceite de amaranto.

VI.2.2.1 Determinación de ácidos grasos libres.

Se colocaron 5g de aceite en 25 mL de alcohol neutralizado y 1 gota de fenoptaleína. Se realizó la titulación con NaOH 0.01 N y se calculó el porcentaje de ácidos grasos libres expresados como ácido oléico (AOCS,1997).

$$\%AGL = \frac{mL \text{ de NaOH} * N * 28.2}{g \text{ de muestra}}$$

Donde:

N= Es la normalidad de la solución de NaOH

VI.2.2.2 Valor de Peróxidos.

Se mezclaron 5g de aceite con 30 mL de una solución de cloroformo: ácido acético (2:3) y 0.5 mL de una solución saturada de KI, se agitó por dos minutos se detuvo la reacción con 30 mL de H₂O destilada y se agitó.

Finalmente se tituló con tiosulfato de sodio 0.1 N en presencia de almidón con agitación constante hasta que el color café desapareció, el valor de peróxidos se calculó con la siguiente ecuación (AOCS, 1997).

$$VP = \frac{(M - B) * N * 1000}{g \text{ de muestra}}$$

Donde:

M= mL de tiosulfato gastados en la muestra.

B= mL de tiosulfato gastados en el blanco.

VI.2.2.3 Índice de Yodo.

Se pesaron 0.1 g de aceite en un matraz de 500 mL, se añadió 15 mL de solución de ciclohexano: ácido acético (1:1) y 25 mL de solución de Wijs (monocloruro de yodo). La mezcla se guardó bajo condiciones de obscuridad por 1 hora. Después se añadieron 20 mL de solución de KI al 10% y 150 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente.

Finalmente se tituló con tiosulfato de sodio 0.1 N hasta que el color amarillo casi desapareció, se añadieron unas gotas de solución de almidón y se continuó titulando hasta que el color oscuro desapareció. Se utilizó la siguiente ecuación (AOCS, 1997).

$$IY = \frac{(B - M) * N * 12.69}{g \text{ de muestra}}$$

Donde:

B= mL de tiosulfato gastados en el blanco.

M= mL de tiosulfato gastados en la muestra.

VI.2.2.4 Índice de saponificación.

Se colocaron 5 gramos de muestra y 50 mL de solución alcohólica de KOH al 4% p/v, se colocó en ebullición suave con agitación y refrigerante de reflujo por 30 minutos. Finalmente se tituló con HCl 0.5 N en presencia de fenoftaleína (AOCS, 1997).

$$IS = \frac{(B - M) * N * 56.1}{g \text{ de muestra}}$$

Donde:

B= mL de HCl gastados en el blanco

M= mL de HCl gastados en la muestra

N= Normalidad de la solución de HCl

VI.2.2.5 Materia insaponificable.

Se colocó a peso constante un matraz a 20°C. En otro matraz se colocaron 5g de muestra, se adicionaron 30 mL de etanol al 95% y 3 mL de una solución de KOH al 50% (p/v). Se puso a reflujo por 20 minutos.

Posteriormente se dejó enfriar a 30°C y se adicionaron 50 mL de éter etílico, se mezcló y transfirió a un embudo de separación. Se enjuagó el matraz con dos porciones de 50 mL de éter, las cuales fueron adicionadas y mezcladas con el contenido del embudo.

Posteriormente se lavó el matraz de saponificación con dos porciones de 50 mL de KOH 0.2N, las cuales fueron adicionadas al embudo de separación; la fase inferior fue recolectada lavándose con destilada hasta su neutralización. La fracción etérea en un matraz tarado y se rotaevaporó. Finalmente se completo el secado en una estufa a 75°C y se enfrió en un desecador. Para calcular la materia insaponificable se utilizó la siguiente formula (AOCS, 1997).

$$\%MI = \frac{\text{masa del residuo}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

VI.2.2.6 Perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases capilar con un detector de ionización de flama y una columna DB-225 30 m-025 mm y 0.25 µm de grosor. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Cp-3800 CG. La temperatura se programó a temperatura constante de 230°C y la temperatura del inyector fue de 250°C, el contenido de cada uno de los ácidos grasos se verificó por comparación con el tiempo de retención de los estándares. Para la determinación de los ácidos contenidos en la muestra se corrió un estándar de ácidos grasos Supelco 37 Component FAME Mix y para el escualeno se utilizó un estándar de la marca Sigma. (Ahn *et al.*, 2008).

VI.2.2.7 Determinación de escualeno.

Se determinó por cromatografía de gases capilar con un detector de ionización de flama y una columna DB-225 30 m-025 mm y 0.25 μm de grosor. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Cp-3800 CG. La temperatura se mantuvo constante a 230°C y la temperatura del inyector fue de 250°C. (Ahn *et al.*, 2008).

VI.2.2.8 Determinación de tocoferoles.

La determinación de tocoferoles se realizó mediante HPLC, se utilizó un equipo HPLC de la marca Shimadzu SCL-10 Avp con una columna de fase normal Agilent ZORABAX SIL 4.6 mm ID x 250 mm (5 μm) y un detector de fluorescencia Walters 474 Scanning Fluorecence Detector a 290/330 nm, en fase móvil Hexano: isopropanol 99:1 (Psomiadou *et al.*, 2000).

VI.2.3 Microencapsulación del aceite de amaranto.

Para el proceso de microencapsulación se utilizaron como materiales de pared concentrado de proteína de suero de leche (CPS) y caseinato de sodio, mezclados con maltodextrinas. Las proporciones que se utilizaron para realizar las microcápsulas se muestran en los Cuadros 9 y 10.

Cuadro 9. Proporciones de CPS y maltodextrinas utilizadas en la elaboración de las microcápsulas.

% sólidos	WPI	Maltodextrinas
20	80%-90%	20%-10%
30	80%-90%	20%-10%

Cuadro 10. Proporciones de Caseinato de sodio y maltodextrinas utilizado en la elaboración de las microcápsulas.

% sólidos	Caseinato de Na	Maltodextrinas
20	25%	75%

Se agregaron el CPS y las maltodextrinas a agua destilada y se homogenizó en el Ultra Turrax a 24,000 rpm durante 3 minutos, posteriormente se adicionó el aceite de amaranto y se homogenizó durante 5 minutos a 24,000 rpm. Para el caseinato de sodio se realizó el mismo procedimiento.

Las suspensiones se hicieron pasar por un secador por aspersion de la marca LabPlant SD-Basic, con una temperatura de aire entrada de 180°C y una temperatura de salida de 96°C a un flujo de 4 mL/min con 100% de aspiración, se utilizó un 20% de aceite (Drusch *et al.*, 2007, Ahn *et al.*, 2008, Alencar *et al.*, 2009).

VI.2.3.1 Eficiencia de encapsulación.

El aceite superficial de las microcápsulas se determinó por el método soxhlet. Para la determinación del aceite total se disolvieron las microcápsulas en agua destilada y después se realizó una extracción con hexano utilizando un embudo de separación. El solvente fue recolectado en un matraz a peso constante y se llevo a rotaevaporación y después a 70°C en una estufa de vacío. El aceite total se calculo a partir de la diferencia de peso del matraz. (Ahn *et al.*, 2008).

La eficiencia de encapsulación se determinó con la siguiente formula.

$$MEE = \frac{(aceite\ total - aceite\ superficial) * 100}{aceite\ total}$$

VI.2.3.2 Análisis de tamaño de partícula.

El análisis de tamaño de partícula se realizó utilizando las micrografías obtenidas por SEM utilizando el software ImageJ. (Ahn *et al.*, 2008).

VI.2.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las microcápsulas se adjuntaron a los pines del SEM utilizando un adhesivo de dos caras para el examen de la estructura exterior. Posteriormente una parte de las microcápsulas se fracturó haciendo pasar perpendicularmente una navaja de afeitar para el examen de la estructura interna. En ambos casos las microcápsulas se observaron al alto vacío con microscopio de electrones Jeol JMS-35^a 20 kV de energía, a una presión de 9.9 mTorr de presión, utilizando un detector GSE (Rodríguez-Huezo *et al.*, 1999).

VI.2.3.4 Actividad de agua.

La actividad de agua de las microcápsulas se determinó utilizando un Aqua Lab 3TE. (Rodríguez-Huezo *et al.*, 1999).

VI.2.4 Determinación de la actividad antioxidante.

VI.2.4.1 DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidrazil).

Se disolvieron las partículas en una mezcla de agua, etanol, hexano y etil acetato, se utilizó como estándar Trolox. La solución madre de Trolox (0.6 mM) fue preparada en agua/metanol (1:2 v/v), alícuotas desde 10 a 750 μ L se adicionaron a 1.5 mL de una solución de 75mg/mL de DPPH preparada en metanol y completando a un volumen de 2.25 mL. Se registró la absorbancia a 527 nm 30 min después de la adición de cada una de las muestras (Alencar *et al.*, 2009).

VI.2.4.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Se preparó la solución FRAP de la siguiente manera, se mezclaron 10 mL de solución amortiguadora de acetatos 300 mM, 1 mL de TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina), 10 mM en HCl 20 mM, y 1 mL de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, todo a 37°C. La curva de calibración se realizó con soluciones de FeSO_4 en un intervalo de concentración de 144-1050 $\mu\text{M/L}$. Las muestras (150 μL) se hicieron reaccionar con 175 μL de la solución FRAP por 60 min en obscuridad. Las lecturas del producto coloreado se realizaron a 593 nm (Thaipong *et al.*, 2006 y Benzle y Strain, 1996).

VI.2.5 Determinación de la estabilidad oxidativa.

VI.2.5.1 Hexanal en espacio de cabeza.

Para este ensayo se colocaron 0.15 g de microcápsulas ó 1 mL de emulsión en un vial especial para cromatografía de gases. Las muestras se incubaron a 45°C y se monitorearon por 22 días tomando muestras cada 2 días. Se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Shimadzu modelo GC-2014 con las condiciones siguientes: tiempo de corrida 10 minutos, temperatura del inyector 250°C, la temperatura del detector 250°C, la temperatura de la columna 65°C, Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 55°C (Panya *et al.*, 2012).

VI.2.5.2 Determinación de valor de peróxidos.

Para la determinación de peróxidos las microcápsulas (0.15 g) s se disolvieron en solución amortiguadora de acetato de sodio: imidazol, pH 7. 0.3 mL de la solución de microcápsulas o de la emulsión se agregaron a 1.5 mL de una mezcla isooctano/2-propanol (3:1 v/v), se agitó en un vortex de la marca Fisher, modelo Genie 2 tres veces por 10 segundos, después las muestras se centrifugaron a 1000 G por 10 min, se tomaron 0.2 mL de la capa superior (isooctano), y se adicionaron 2.8 mL de una mezcla metanol/butanol (2:1 v/v). Se adicionó 30 μL de una solución preparada a partir de tiocianato de amonio 3.94 M mezclado con una solución

preparada con cantidades iguales de BaCl_2 0.132 M y FeSO_4 0.144 M. Se dejó reaccionar por 20 min y se registró la absorbancia a 510 nm (Panya *et al.*, 2012).

VI.2.6 Elaboración de las emulsiones de aceite de amaranto

Se prepararon emulsiones al 1% w/w de aceite de amaranto, 0.1% de CPS en solución amortiguadora de acetato de sodio:imidazol a pH 7 y pH 3 dependiendo del tratamiento a realizar. Se suspendió primeramente el CPS en la solución amortiguadora hasta disolverse, posteriormente se adicionó el aceite de amaranto y se homogenizó durante 4 minutos con un homogeneizador (modelo 133/1281-0, Biospec Products Inc., Bartlesville, OK), para después ser llevado al microfluidizador (Microfluidics, Newton, MA) haciéndose cinco pases de recirculación a 50 PSI de presión. Una vez formada la emulsión se separó en dos secciones, una para utilizarse sin lavado y la otra para lavar. La emulsión a lavar se centrifugó por 1 hora a 17000 rpm (38518 G) a 4°C en una ultracentrífuga WX-Ultra 80 de la marca Thermo scientific. Una vez terminado este procedimiento se retiró la parte acuosa y se resuspendió la fase cremosa en solución amortiguadora, este paso se repitió por 3 veces, al final la concentración de aceite de amaranto al 1% original. Tanto la emulsión sin lavar como la emulsión lavada se colocaron en viales y se almacenaron a 45°C.

VI.2.7. Cinéticas de oxidación.

Para determinar las cinéticas de oxidación se compararon los valores de hexanal en espacio de cabeza y la formación de peróxidos contra la concentración de tocoferoles en el aceite a lo largo del tiempo de acuerdo a la metodología descrita en el punto VI.2.5.1 para hexanal en espacio de cabeza y VI.2.5.2 para valor de peróxidos. Para la determinación de tocoferoles se utilizó un HPLC de la marca Shimadzu SCL-10 Avp acoplado a una columna de fase normal Agilent ZORABAX SIL 4.6 mm ID x 250 mm (5 μ m) y un detector de fluorescencia Walters 474 Scanning Fluorecence Detector a 290/330 nm, como fase móvil se usó

Hexano:isopropanol 99:1. Se comparó contra estándares de α , β , γ , δ tocoferol de la marca sigma.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

VII.1 Extracción del aceite de amaranto

Para la obtención de la muestra se utilizó un molino de café para evitar altas temperaturas en la molienda, además se realizó un tamizado con malla del número 40 para obtener un tamaño menor y homogéneo de partícula. Lyon y Becker (1987) probaron diferentes medidas de malla para mejorar el rendimiento de extracción de aceite de amaranto, demostrando que utilizando el grano entero o después de la molienda no se logró una extracción eficiente. El uso de una malla 40 mejoró el rendimiento de extracción de 0.22% a 6.81%. En el cuadro 11 se muestran diferentes rendimientos de aceite de amaranto obtenidos por otros autores, utilizando diferentes métodos de extracción.

Cuadro 11. Rendimientos para aceite de amaranto reportados en la literatura.

*Ec Ecuador, *It Italia, *FSC Fluidos supercríticos, *200 y 400 atm.

Variedad	Rendimiento	Método de extracción	Autor
<i>A.caudatus (Ec*)</i>	3.74%	FSC 200*	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (Ec*)</i>	8.25%	FSC 400*	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (Ec*)</i>	8.77%	Hexano	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (Ec*)</i>	8.15%	Metanol	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (It*)</i>	4.17%	FSC 200*	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (It*)</i>	9.92%	FSC 400*	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (It*)</i>	9.22%	Hexano	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.caudatus (It*)</i>	6.09%	Metanol	Bruni <i>et al.</i> 2001
<i>A.cruentus</i>	8.5%	Hexano	Gamel <i>et al.</i> 2007
<i>A.cruentus</i>	6.35%	Hexano	Becker 1987

El rendimiento obtenido de la extracción del aceite de amaranto en este trabajo fue de 4.54 %. Algunos rendimientos reportados en el Cuadro 11 son mayores a los obtenidos en este trabajo, probablemente debido a diferencias en la especie de amaranto, técnicas de extracción y tamaño de partícula de la molienda. Los esferosomas son las partes de las semillas donde se encuentra embebido el aceite en pequeñas gotas rodeadas de fosfolípidos y oleosina. El almidón se encuentra en estructuras diferentes llamadas amiloplastos. Una manera de mejorar el rendimiento es seleccionar esta parte de la molienda descartando una parte importante del almidón que en combinación con un tamaño de partícula menor hace que la extracción sea más eficiente (Rocha 2010, C.K. Lyon and R. Becker, 1987).

VII.2 Caracterización del aceite de amaranto.

VII.2.1 Parámetros de calidad

El Cuadro 12 presenta los valores de las determinaciones utilizadas para su caracterización.

Cuadro 12. Parámetros de calidad.

MUESTRA	Valor	Desviación estándar
Ácidos grasos libres	12.5%	0.0017
Valor de peróxidos	2.01555	0.0437
Índice de yodo	114.34	1.9374
Índice de saponificación	164.22	0.1979
Materia insaponificable	8.935	0.3464
Densidad	0.8476 g/mL	0.00212

Para la caracterización del aceite de amaranto, se utilizaron los principales parámetros para determinar la calidad del aceite. Para los ácidos grasos libres se obtuvo un valor superior al esperado ya que la norma mexicana marca que para aceites vegetales comestibles el valor máximo de acidez debe ser 0.05% (NMX F223-1985). Este alto grado de acidez se pudo haber suscitado por dos factores: el primero es que no se le dio un tratamiento térmico a las semillas previo a la

extracción del aceite por lo que no hubo inactivación de las enzimas lipasas responsables de la degradación de los triglicéridos liberando ácidos grasos libres, el otro factor de influencia fue el contenido de humedad de la semilla, en un primer momento se extrajo el aceite sin un secado de la harina, por lo que el alto porcentaje de humedad pudo favorecer la hidrólisis de los triglicéridos.

La determinación de valor de peróxidos nos indica el grado de oxidación del aceite. El valor de peróxidos obtenido se encuentra dentro del rango permitido que es de un valor de 2.0. El índice de yodo nos indica el grado de insaturación de una grasa o un aceite. Los valores permitidos por la norma NMX-f-152-scfi-2005 se encuentran entre 107-135 quedando el valor obtenido dentro del rango. Este valor es constante para cada grasa o aceite, por lo que un aceite o grasa menos insaturada tiene índices de yodo bajos y es sólido a temperatura ambiente e inversamente los mas insaturados tienen índices de yodo más altos y son líquidos, como ejemplos tenemos la mantequilla cuyos valores están entre 30-70 y el aceite de linaza que está entre 125-200 (AOAC, 2001, NMX-F-152-SCFI-2005).

El valor de índice de saponificación debe de estar entre 187-195 y sirve para la detección de ácidos grasos, el valor para aceite de amaranto 164.22 se encuentra por debajo del que indica la norma NMX-F-152-SCFI-2005 para aceite de maíz en la literatura se ha reportado que el aceite de amaranto y el aceite de maíz tienen una composición similar en ácidos grasos, por lo que se decidió comparar contra este aceite aunque dado que el índice de saponificación es específico para cada aceite, los valores obtenidos son diferentes a los reportados por esta norma. (Jahaniaval *et al.*, 2000).

VII.2.2 Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos para el aceite de amaranto se realizó por duplicado. El cromatograma se muestra en la Figura 11 y los porcentajes de cada uno de los ácidos grasos en el aceite de amaranto se muestran en el Cuadro 13.

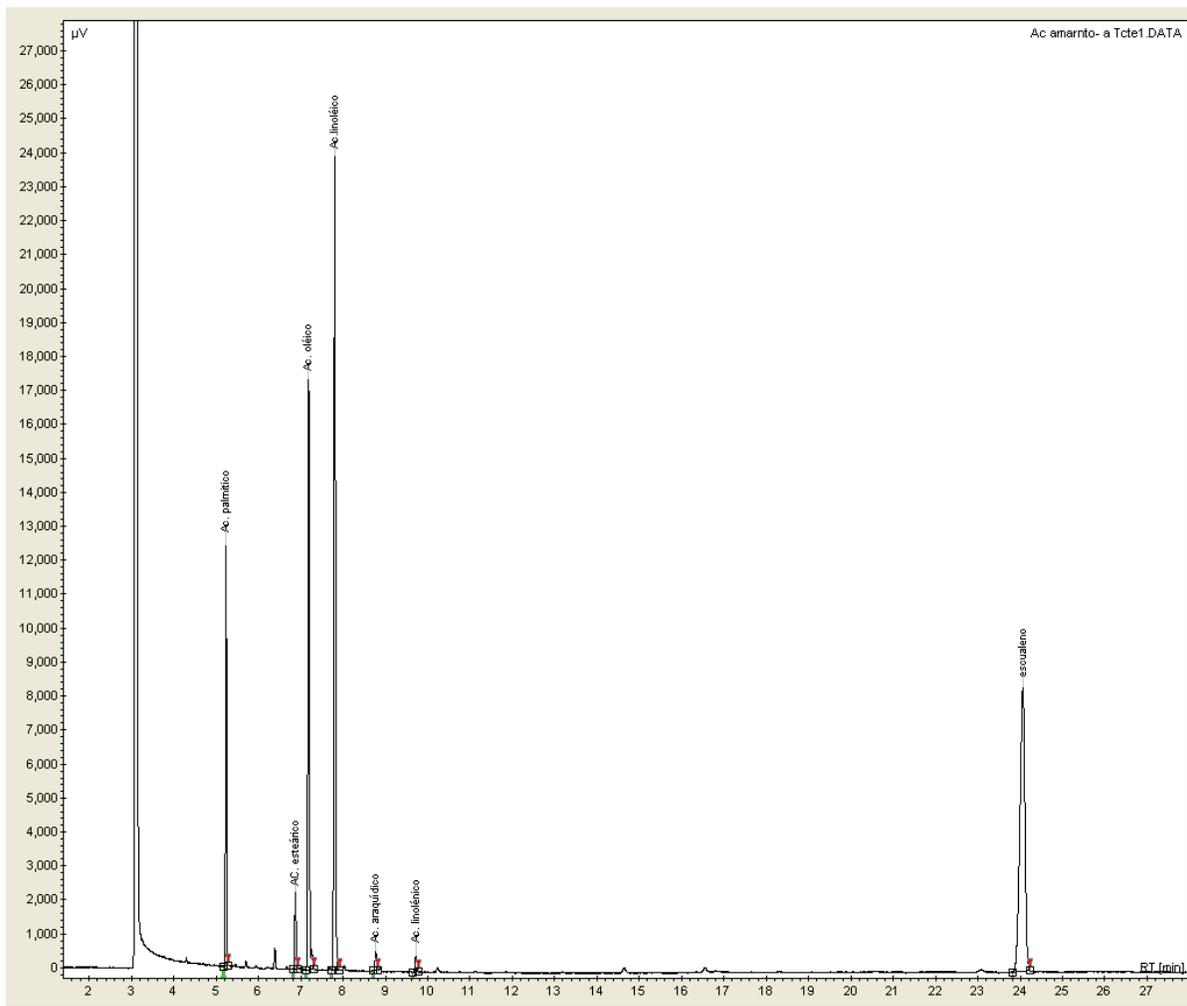


Figura 11. Perfil de ácidos grasos del aceite de amaranto.

Cuadro 13. Porcentajes de cada uno de los ácidos grasos identificados en el aceite de amaranto.

Ácido Graso	Porcentaje (%)
Ac. Palmítico	17.57
Ac. Estearico	3.54
Ac. Oléico	31.16
Ac. Linoléico	45.05
Ac. Araquídico	1.07
Ac. Linolénico	1.58

El perfil obtenido coincide con lo esperado y reportado por otros autores. Los perfiles de ácidos grasos reportados en la literatura se muestran en el Cuadro 14. Se puede observar que para *A. caudatus* y *A. cruentus* los ácidos grasos mayoritarios son el ácido oléico y ácido linoléico, mostrando una mayor concentración para el ácido oléico (Gamel *et al.*, 2006).

Cuadro 14. Perfil de ácidos grasos de varias especies de amaranto

Amaranto	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	Autor
<i>A. caudatus</i>	20.5	2.2	25.5	49.8	0.6	0.5	Gamel <i>et al.</i> , 2006
<i>A. cruentus</i>	19.4	4.5	32.9	40.0	0.5	1.0	Gamel <i>et al.</i> , 2006
<i>A. cruentus</i>	13.4	2.74	20.4	62.1	1.06	0.66	R. Becker 1987
<i>A. caudatus</i>	17.94	3.52	23.85	45.89	-----	0.61	Bruni <i>et al.</i> , 2001
<i>A. hypochondriacus</i>	23.8	3.11	23.0	47.9	0.88	0.56	Jahaniaval <i>et al.</i> , 2000
<i>A. hypochondriacus</i>	17.57	3.54	31.16	45.05	1.58	1.07	Este trabajo

Lyon y Becker 1987 reportaron la misma tendencia en la concentración de ácidos grasos que las obtenidas en este trabajo. Para *A. caudatus* se observa que hay una pequeña diferencia en los valores reportados por Gamel *et al.*, 2006 y Bruni *et al.*, 2001, probablemente debido a que, como ya se había mencionado, el perfil de ácidos grasos varía de acuerdo a factores ambientales, lugar geográfico, especie e incluso cultivar. Respecto a la muestra en estudio podemos observar gran concordancia entre los datos reportados teniendo una diferencia importante en

ácido linolénico en donde se reporta una menor cantidad a la que observamos en nuestra muestra (Bruni *et al.*, 2001).

VII.2.3 Determinación de escualeno

La Figura 12 presenta el cromatograma donde se puede observar la señal del estándar de escualeno con un tiempo de retención de 24 minutos. El porcentaje obtenido de este compuesto fue de 1.43%.

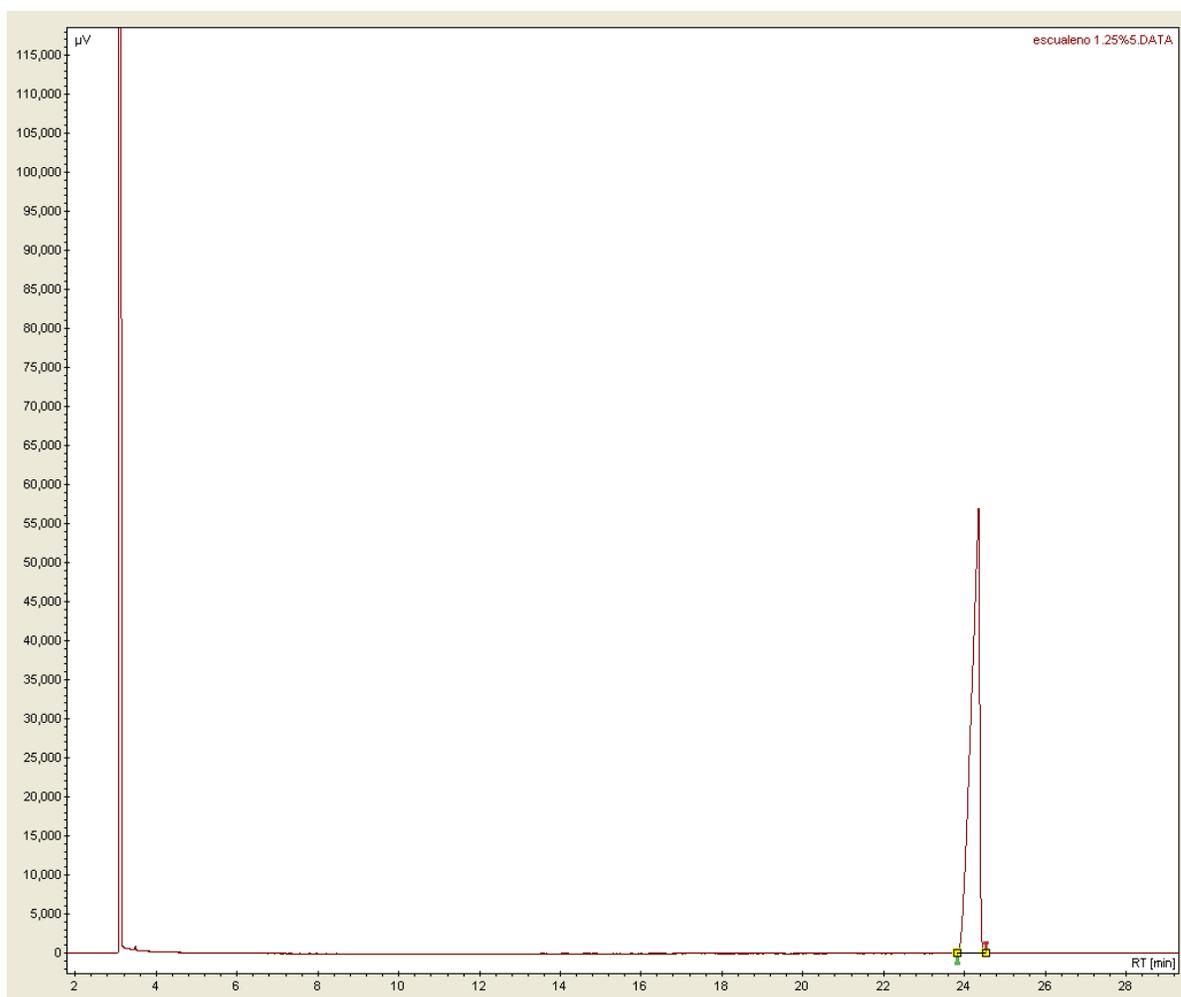


Figura 12. Estándar de escualeno por cromatografía de gases.

Las concentraciones de escualeno reportadas en la literatura se encuentran alrededor de 7-8%, pero este valor también depende de la especie de amaranto.

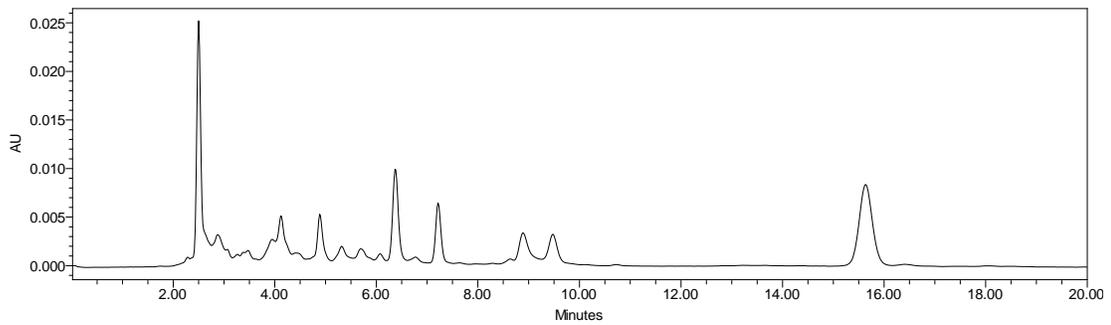
En el Cuadro 15 se muestran las concentraciones de escualeno para diferentes especies de amaranto.

Cuadro 15. Concentraciones de escualeno reportadas en la literatura. *variedades genéticas de *A.hypochondricus* y *A.cruentus*.

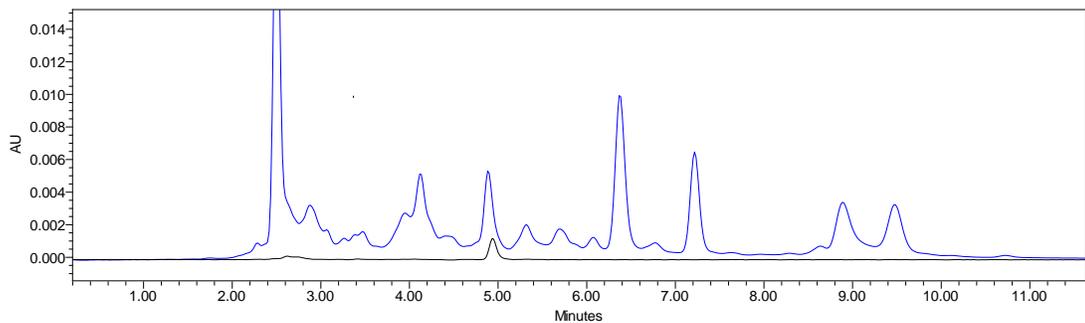
Especie	Concentració	Autor
<i>A.hypochondriacus</i>	3.6%	He <i>et al</i> , 2002
<i>A.tricolor</i>	6.1%	He <i>et al</i> , 2002
<i>A. hypochondriacus</i>	6.2%	He and Corke, 2003
<i>A.cruentus</i>	6.1%	He <i>et al.</i> 2003
<i>A.hypochondricus</i> HyNO₃*	3.62%	He <i>et al.</i> 2002
<i>A.cruentus</i> Cr024*	4.70%	He <i>et al.</i> 2002

VII.2.4 Determinación de tocoferoles

La determinación de tocoferoles se realizó en HPLC con una columna fase normal. En la Figura 13 se muestra el cromatograma completo del aceite de amaranto y se demarca el pico para tocoferoles y en la misma figura se observa el estándar de α -tocoferol junto con la muestra donde se puede ver la concordancia de los picos.



(a)



(b)

Figura 13. (a) Cromatograma completo de la muestra de aceite, (b) en azul se muestra el cromatograma de la muestra de aceite de amaranto y en negro el estándar.

Para la cuantificación de α -tocoferol se realizó una curva con el estándar y después se calculó la concentración de acuerdo al área bajo la curva de cada una de las concentraciones del estándar. La concentración de α -tocoferol para el aceite de amaranto es de 227 ppm.

El compuesto con mayor actividad dentro del aceite de amaranto es la vitamina E, compuesta de varios homólogos dentro de las que encontramos α -tocoferol, β -tocoferol, δ -tocoferol y γ -tocoferol. Para efectos de éste trabajo solo se identificó α -tocoferol el cual es el que tiene mayor actividad en el ser humano. En el Cuadro 16 se muestran las concentraciones de α -tocoferol reportadas para aceite de amaranto (León-Camacho, 2001).

Cuadro 16. Concentraciones de α -tocoferol reportadas para diferentes especies de amaranto. A) *A. caudatus* de Ecuador b) *A. caudatus* de Italia.

Especie	Concentración	Autor
<i>A. cruentus. L</i>	248 ppm	León-Camacho, 2001
<i>A. caudatus</i> ^a	192 ppm	Bruni <i>et al</i> , 2001
<i>A. caudatus</i> ^b	168 ppm	Bruni <i>et al</i> , 2001

Como se puede observar en el Cuadro 16 las concentraciones para α -tocoferol reportadas coinciden con las encontradas para la muestra bajo estudio en el presente trabajo. El α -tocoferol desempeña un papel importante en la prevención de enfermedades en la piel así como efectos antitumorales (Klaus *et al.*, 2007).

VII.3 Microencapsulación del aceite de amaranto.

Se realizaron los tratamientos para microencapsular según lo establecido en el diseño del Cuadro 9 y Cuadro 10. Durante el secado las muestras realizadas con CPS no mostraron dificultad para ser dispersadas ni para pasar a través del secador por aspersión. Mientras que la muestra con caseinato de sodio mostró buena dispersabilidad pero al pasar por el sacador se formo una capa que obstruyo la aguja del aspersor lo cual imposibilitó el flujo y por tanto se decidió eliminar este tratamiento.



Figura 14. Secador por aspersión utilizado para la obtención de las microcápsulas.

En la Figura 14 se muestra el secador por aspersión y en la Figura 15 se muestra la apariencia de la suspensión después de ser homogenizada. En la Figura 16 se muestran las capsulas de cada uno de los tratamientos.

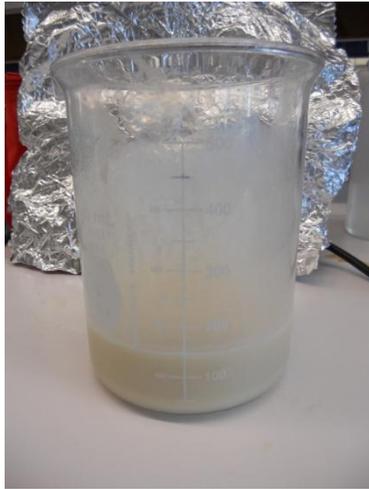


Figura 15. Suspensión caseinato de sodio.



Figura 16. Microcápsulas de cada uno de los tratamientos (1) 20:30, (2) 30:70, (3) 20:80, (4) 30:80

Las microcápsulas obtenidas mostraron similitud entre sí, todas ellas mostraron un color blanco y una apariencia granulosa, demostraron gran solubilidad en agua. La emulsión para caseinato de sodio mostró buena dispersión pero al entrar en el secado formo una capa fina de proteína que impedía el paso hacia el aspersor. La caseína tiene la propiedad de formar películas. Aunque se utilizó una proporción de proteína menor que en los tratamientos con CPS, es probable que el porcentaje utilizado de caseinato de sodio, aunado a la presión y temperatura hayan promovido la formación de la película. (Elzoghby *et al.*, 2011).

VII.3.1 Caracterización de las microcápsulas.

VII.3.1.1 Eficiencia de encapsulación.

Los resultados de eficiencia de encapsulación se muestran en el Cuadro 17 para cada uno de los tratamientos.

Cuadro 17. Eficiencias de encapsulación para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	% Eficiencia de encapsulación	% Rendimiento de encapsulación
30% de sólidos - 70% CPS	82.33%	45.62%
30% de sólidos - 80% CPS	55.65%	52.60%
20% de sólidos - 80% CPS	44.25%	60.82%
20% de sólidos - 70% CPS	12.45%	65.15%

La proporción de maltodextrinas respecto a CPS es la misma entre el tratamiento 30% de sólidos con 80% CPS y 20% maltodextrinas y el tratamiento 20% de sólidos con 80% de CPS y 20% de maltodextrinas teniendo una relación 4:1, así como la proporción de maltodextrinas respecto a CPS es la misma entre el tratamiento 30% de sólidos con 70% CPS y 30% maltodextrinas y el tratamiento 20% de sólidos con 70% de CPS y 30% de maltodextrinas teniendo una relación aproximada de 2:1.

Bajo este contexto podemos observar que cuando se aumenta la cantidad de sólidos y la cantidad de CPS la eficiencia de encapsulación aumenta aunque las proporciones que se utilicen en la emulsión sean las mismas. Este efecto es marcado en los tratamientos correspondientes a 30:70 y 20:70 en donde la proporción es la misma pero con menor cantidad de sólidos al final se obtuvo una mayor eficiencia el tratamiento con mayor cantidad de sólidos, lo cual es coherente tomando en cuenta que entre mayor es la cantidad de sólidos mayor es la cantidad de CPS para retener el aceite.

VII.3.1.2 Análisis de tamaño de partícula.

Para el análisis de tamaño de partícula se utilizó el software ImageJ y los resultados se muestran en la Figura 17 así como en el Cuadro 18. Podemos observar una distribución regular en donde la moda y la media coinciden de buena manera, lo cual se observa en la grafica de caja y brazos para cada uno de los

histogramas, a excepción del tratamiento 20:70, así como una distribución regular. Además en el Cuadro 18 se muestran los rangos de tamaño de las microcápsulas y el tamaño promedio para cada uno de los tratamientos.

Cuadro 18. Análisis de partícula de cada uno de los tratamientos * Valores en μm

Muestra	30:80	20:80	30:70	20:70
Promedio*	9.75	8.34	15.11	11.98
Rango*	3.33-18.00	4.76-16.66	5.55-31.11	4.0-22.97
D. Estándar	3.97	3.012	6.59	5.24

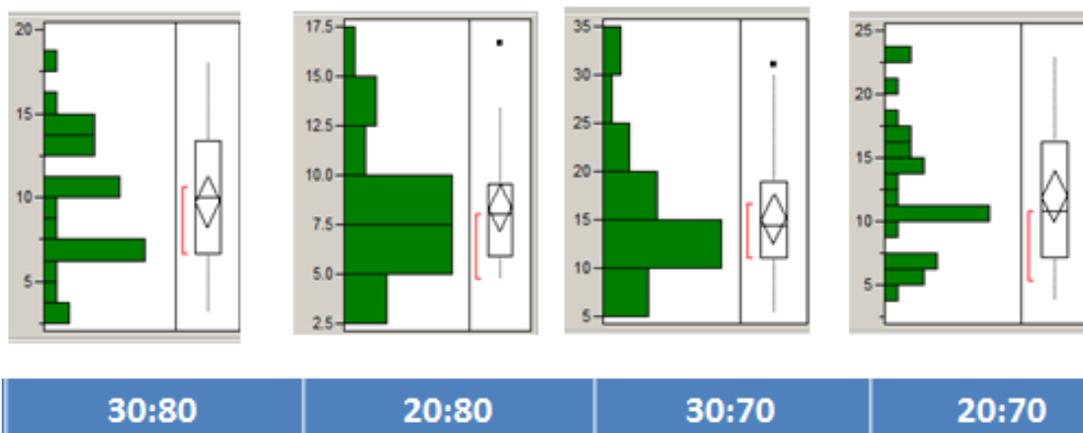


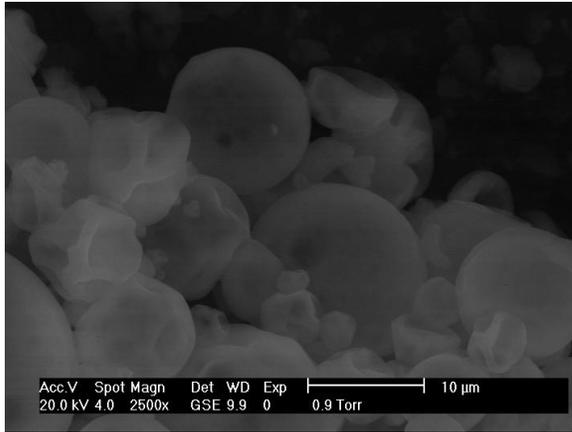
Figura 17. Histogramas para cada uno de los tratamientos con la distribución del tamaño de partícula, 30:80 (30% sólidos 80% de CPS), 20:80 (20% de sólidos 80% de proteína), 30:70 (30% sólidos, 70% de proteína), 20:70 (20% sólidos 70% proteína).

En los valores de tamaño de partícula se observa que el porcentaje de CPS dentro del porcentaje del total de sólidos es el determinante para obtener un menor o mayor tamaño de partícula como se observa en el Cuadro 18. Se observa que

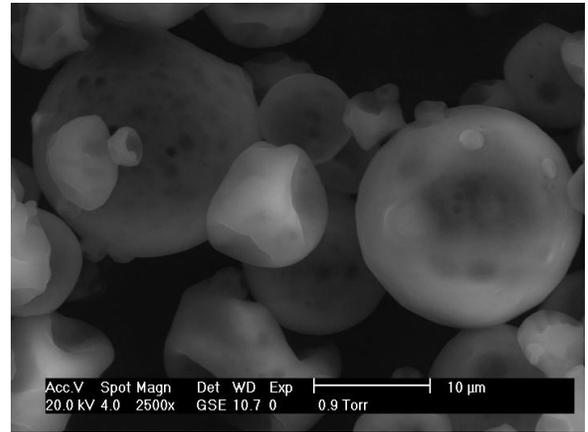
entre una mayor proporción de CPS se obtienen tamaños de microcápsulas menores, para el porcentaje de sólidos se observa que a mayor cantidad de sólidos para el mismo porcentaje de CPS el tamaño de partícula aumenta. Relacionando estos resultados con los obtenidos en la eficiencia de encapsulación se podría proponer que a porcentajes altos en el contenido de sólidos totales se obtiene mejor eficiencia de encapsulación y tamaños más grandes de microcápsulas, habiendo mas concentración de sólidos existe mayor oportunidad de retener el aceite en el interior de la microcápsula.

VII.3.1.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

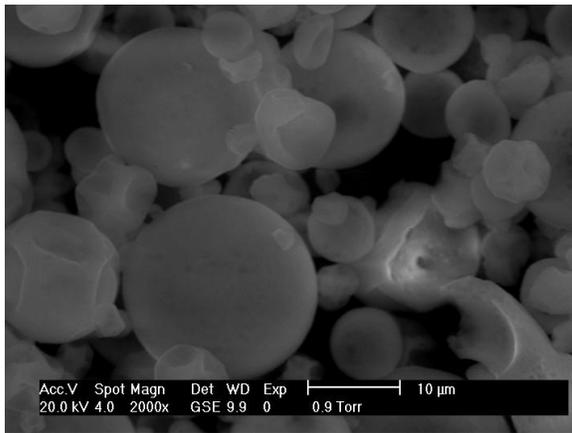
Para cada tratamiento se realizaron observaciones de la morfología interna y externa de las microcápsulas, (Figura 18), para lo cual éstas fueron fracturadas en un mortero de ágata. En las micrografías presentadas se puede apreciar la estructura externa de las microcápsulas y la distribución del aceite embebido en la matriz (Figura 19). Se observaron partículas bien definidas que presentaron forma esférica.



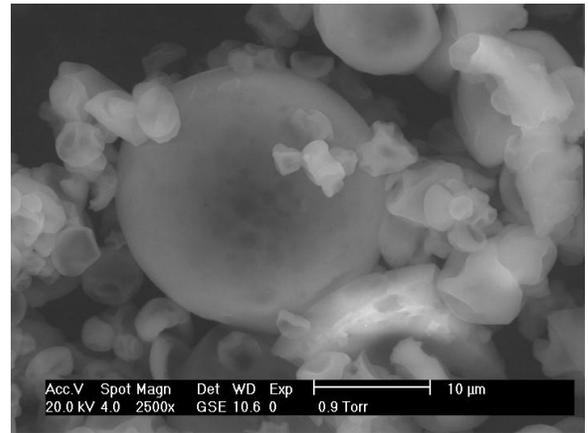
(1)



(2)



(3)



(4)

Figura 18. Microcápsulas obtenidas para cada uno de los tratamientos, (1) tratamiento 20:80, (2) 30:80, (3) 30:70, (4) 20:70.

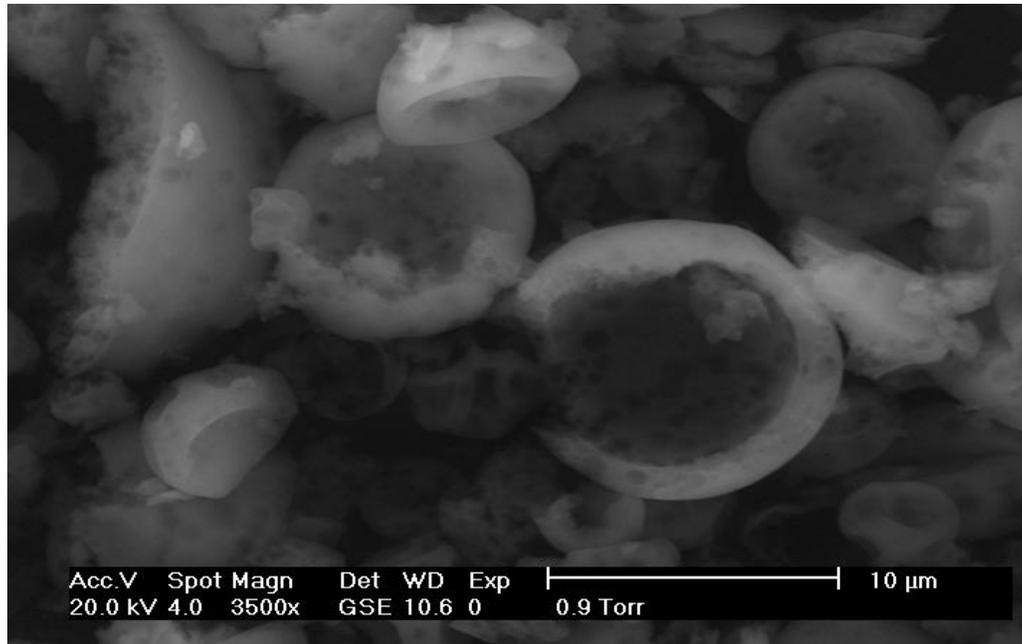


Figura 19. Microcápsulas fracturadas; se puede observar la constitución de la matriz así como las gotas de aceite al interior de la macropartícula.

En la microscopia para el tratamiento 20:70 se observa que existe una cantidad grande de partículas pequeñas respecto a los demás tratamientos además de que las estructuras muestran partículas colapsadas lo cual indica una formación rápida en el secador. Para el tratamiento 30:80 se observan tamaños de partícula más grandes y pocas partículas pequeñas, para el tratamiento 30:70 se observan dos grupos muy homogéneos y para 20:80 tamaños de partículas grandes con partículas pequeñas pochadas. La parte que nos brinda mas información aquí es al fracturar las partículas, se observa la formación de una matriz en donde el centro es aire y el aceite se encuentra embebido en la capa que rodea el centro de aire como se explicó en la introducción no se trata de una encapsulación verdadera, ya que de ser así el aceite debería encontrarse en el centro de la microcápsula y no en la pared.

VII.3.1.4 Actividad de agua.

La actividad de agua se determinó para cada uno de los tratamientos, así como el porcentaje de humedad los cuales se muestran en el Cuadro 19. Se observa que las actividades y porcentajes de humedad tienen valores muy bajos para las microcápsulas en todos los tratamientos.

Cuadro 19. *Actividades de agua determinadas a 20°C y porcentajes de humedad para cada uno de los tratamientos

Muestra	Aw*	% de humedad
20:80	0.094	2.92
30:80	0.091	0.125
20:70	0.153	1.11
30:70	0.093	2.54

La Aw que presentaron las cápsulas fue similar entre tratamientos, los valores obtenidos fueron bajos por lo que se infiere las capsulas tienden a ser higroscópicas lo cual se pudo observar por SEM (Figura 20). El tratamiento con mayor Aw fue 20:70 que también obtuvo los valores más bajos de eficiencia de encapsulación. Los valores obtenidos son similares a los obtenidos para microcápsulas de goma arábica en la microencapsulación de jugo de betabel (Beristain *et al.*, 2010).

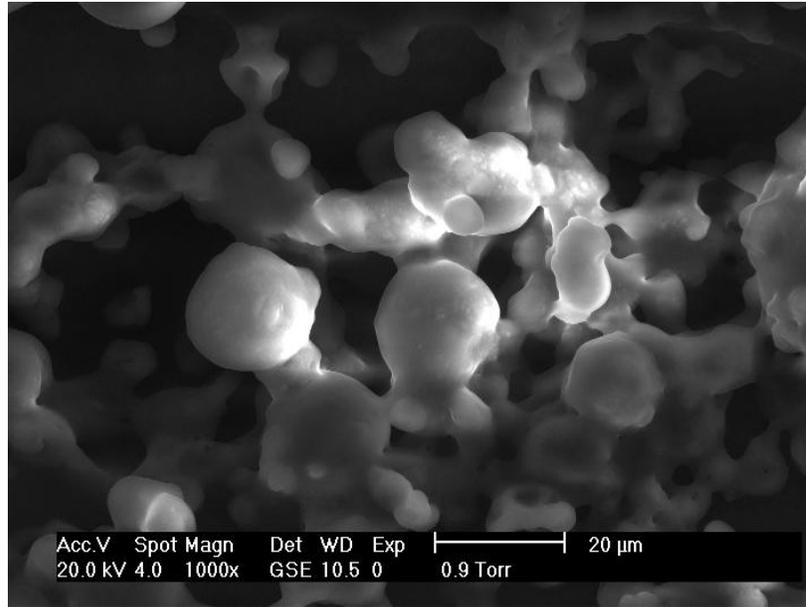


Figura 20. Microcápsulas expuestas a una atmosfera de alta humedad.

VII.3.1.5 DSC (Differential Scanning Calorimetry)

El estudio de DSC se realizó para cada tratamiento (Figura 21 y 22) y para los materiales de pared y el aceite (Figura 23). También se realizaron estudios de DSC para los materiales de pared hidratados con el fin de observar procesos de descomposición y resistencia a temperaturas de 30°C a 250°C en ausencia de agua.

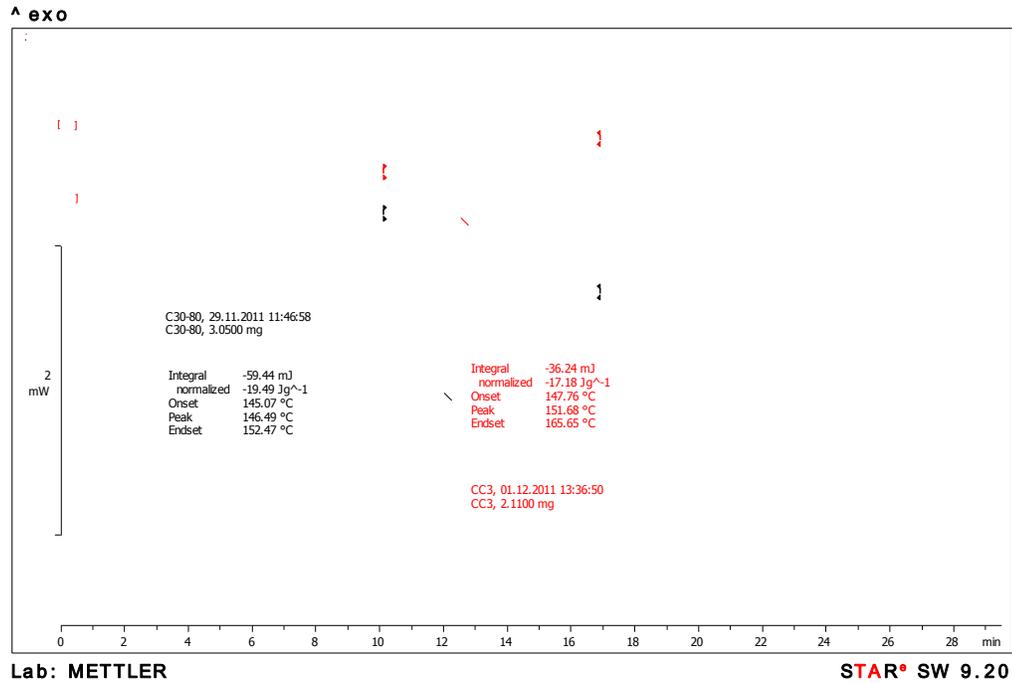


Figura 21. DSC para las muestras 30:80 línea negra y 20:80 línea roja.

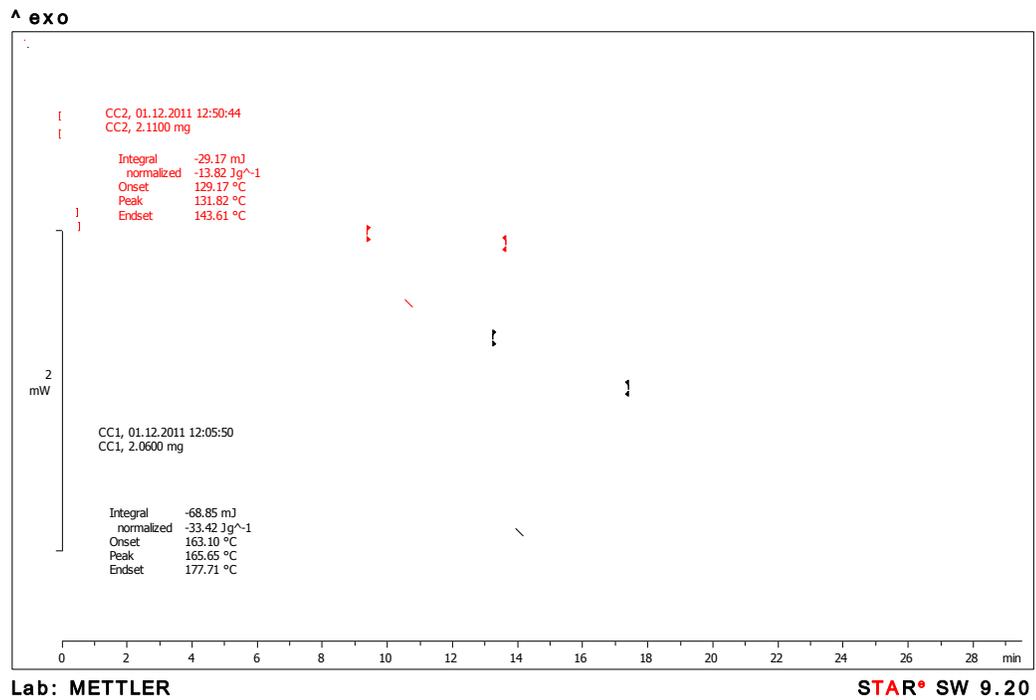


Figura 22. DSC para las muestras 20:70 línea negra y 30:70 línea roja.

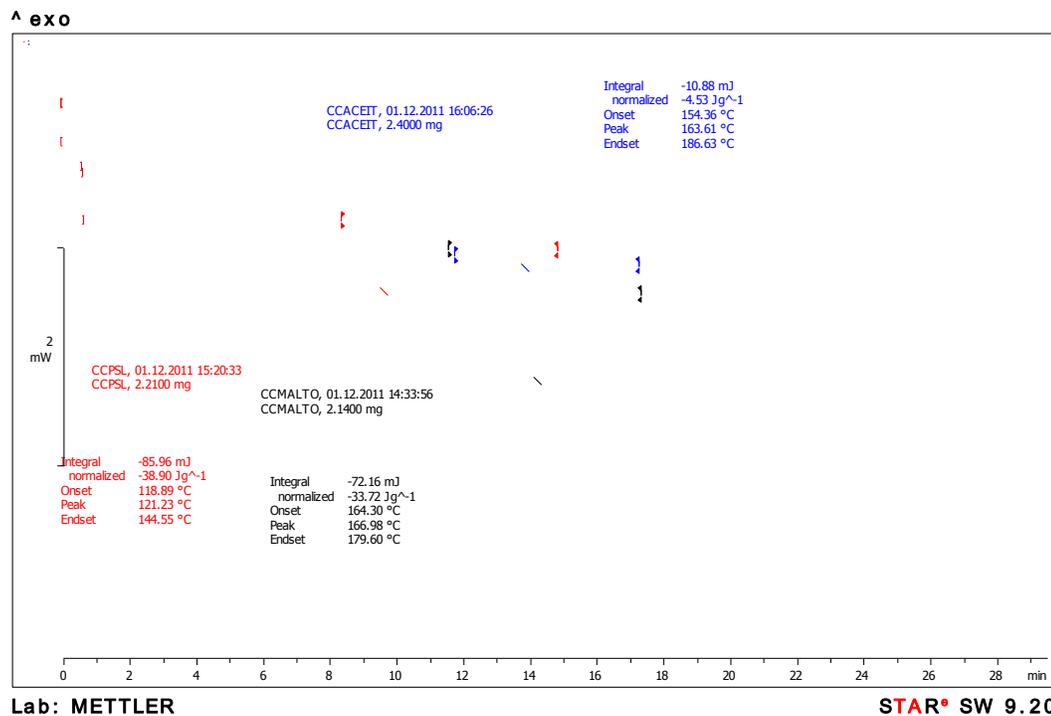


Figura 23. DSC del aceite sin microencapsular línea azul, Maltodextrinas línea negra y CPS línea roja.

Los valores para las entalpias ΔH de cambio de fase así como las temperaturas de cambio de fase se obtuvieron del gráfico utilizando el área bajo la curva y el pico de cada una de las curvas, estos valores se muestran en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Valores obtenidos por DSC para ΔH y temperatura de degradación.

Material	Temperatura (C°)	c (J/g)
30:80	145.07	-19.49
20:80	147.76	-17.18
30:70	129.17	-13.82
20:70	163.10	-33.42
Maltodextrinas	154.36	-33.72
CPS	118.89	-38.90
Aceite	163.61	-4.53

El tratamiento que se seleccionó es el que se descompone con menor energía además de mostrar menor resistencia a la temperatura en ausencia de agua por lo que es más fácil de desintegrar que los demás tratamientos. También se observa que a mayor tamaño de partícula se requiere un menor que para partículas de menor tamaño. A menor ΔH menor aporte calórico.

También se analizó cada uno de los materiales individualmente para observar la probable orden y temperaturas de desintegración de cada componente de la macropartícula. Se observó que todos los materiales cambian de estado en el mismo rango de temperatura lo que nos indica que la microcápsula pierde su integridad a la misma temperatura que todos sus componentes.

VII.4 Actividad antioxidante.

VII.4.1 Ensayo DPPH del aceite de amaranto.

Para el aceite se realizó la determinación de la IC_{50} utilizando un rango de concentraciones de 4.2 mg/mL – 635 mg/mL. Se obtuvo la gráfica de % de inhibición vs Log concentración para después determinar el valor de IC_{50} (Figura 24). La IC_{50} que se determinó fue de 158 mg/mL.

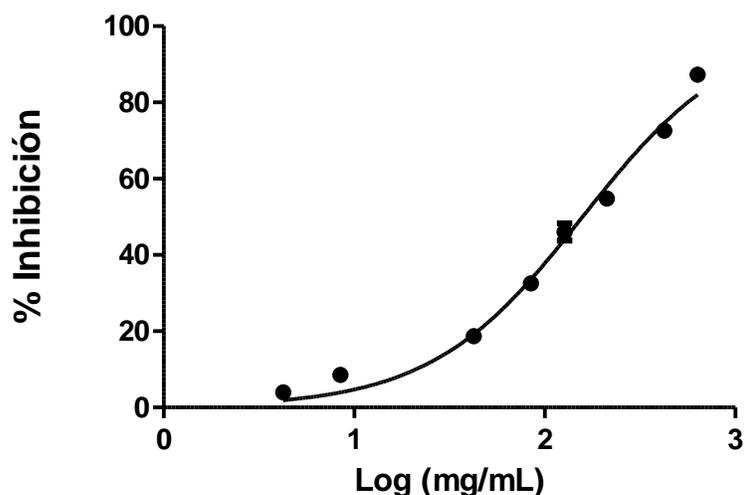


Figura 24. Grafica para el log de la concentración de aceite contra el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

En el Cuadro 21 se muestran los valores de IC₅₀ para el ensayo de DPPH de diversas muestras.

Cuadro 21. IC₅₀ de diversos compuestos determinada por la técnica de DPPH.

Muestra	IC ₅₀ (mg/mL)	Autor
α-tocoferol	0.02419	Othani and Siramon, 2007
Carvacrol	0.65	Othani and Siramon, 2007
Timol	0.70	Othani and Siramon, 2007
BHT	0.0866	Sharma and Bhat, 2009
BHA	0.3066	Harput <i>et al</i> , 2011
Ácido Ascórbico	0.1110	Ricci <i>et al</i> , 2005
Quercetina	0.6588	Harput <i>et al</i> , 2010
Sesamol	0.02323	Mishra <i>et al</i> , 2012

El valor de IC₅₀ del aceite de amaranto es mayor en comparación con los compuestos presentados en el Cuadro 22. Es decir que su actividad antiradical es menor, ya que para observar el 50% de la inhibición se requiere de una mayor concentración de muestra. Cabe resaltar que la actividad antiradical varia con el solvente utilizado del medio de reacción para la técnica de DPPH. Para el aceite de amaranto donde la actividad antioxidante está determinada por los tocoferoles, presenta una mayor actividad en hexano que en otros solventes como metanol, que es el solvente utilizado para los componentes del Cuadro 22 (Dawidowicz *et al*, 2012)

VII.4.2 Ensayo FRAP del aceite de amaranto.

Utilizando la concentración de la IC₅₀ determinada para el ensayo de DPPH se realizó el ensayo de FRAP. Se determinaron la cinética y el valor de FRAP en micromoles de FeSO₄. La cinética obtenida para el aceite se muestra en la Figura 25. El valor obtenido para el aceite de amaranto fue de 2853.20 μM de FeSO₄

(2.8532 μmol) a los 60 minutos equivalente a 18058.22 μM de FeSO_4 / g de muestra o 18.05 $\mu\text{mol/g}$ de muestra.

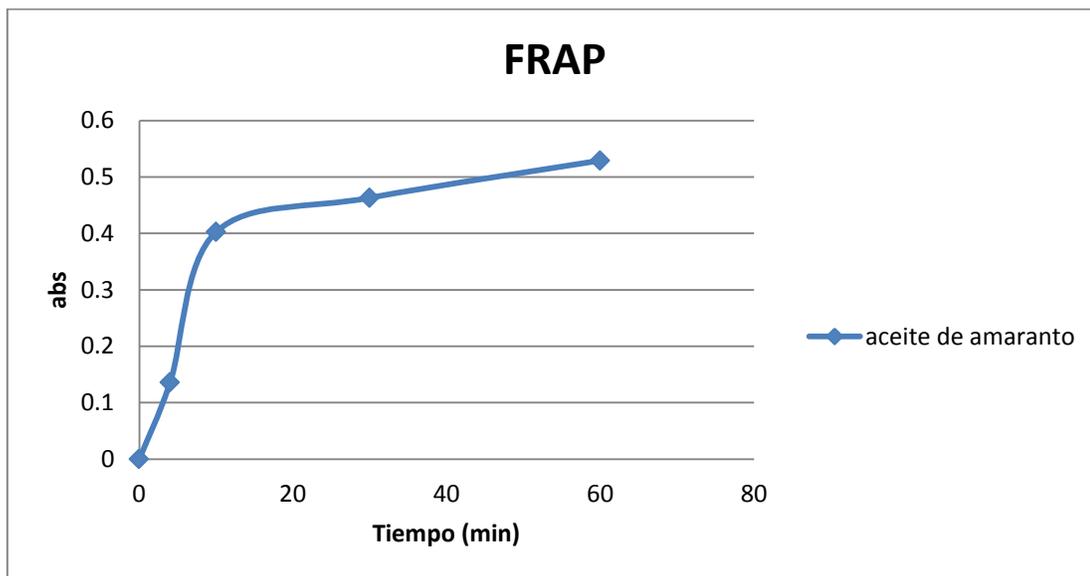


Figura 25. Cinética del aceite de amaranto para el ensayo de FRAP.

En el Cuadro 22 valores de FRAP para diferentes compuestos.

Cuadro 22. Valores de FRAP para diferentes compuestos, a) $\mu\text{mol equiv of Fe (II)/L}$, b) mmol/L .

Muestra	Valor de FRAP	Autor
Quercetina	1926 ± 43^a	Pulido <i>et al</i> , 2000
Ácido Tánico	1625 ± 36^a	Pulido <i>et al</i> , 2000
Ácido Caféico	1430 ± 62^a	Pulido <i>et al</i> , 2000
Resveratrol	343 ± 10^a	Pulido <i>et al</i> , 2000
Catequina	642 ± 29^a	Pulido <i>et al</i> , 2000
Ácido ascórbico	647 ± 53^a	Pulido <i>et al</i> , 2000
BHT	0.07 ± 0.02^b	Luximon-Ramma <i>et al</i> , 2002
BHA	5.8 ± 0.24^b	Luximon-Ramma <i>et al</i> , 2002

Para este ensayo se deben de considerar el solvente utilizado, así como el tiempo en el que se toma el valor de FRAP para hacer una comparación válida con los resultados de otros autores. Para los ejemplos reportados por Pulido *et al.*, (2000) el tiempo al que se realizó la medición fue a los 4 minutos mientras que para nuestra muestra se observó que la cinética se mantenía estable hasta los 60 min.

Para una muestra de aceite de maíz comercial refinado adicionado con BHT 0.001% se obtuvo un valor de FRAP de 1577.22 μM de FeSO_4 para el mismo sistema que el utilizado para aceite de amaranto en donde podemos observar que el aceite de amaranto tiene un valor FRAP mayor lo que se traduce en mayor poder reductor de fierro. Es decir un mayor poder reductor.

VII.5 Determinación de la estabilidad oxidativa.

VII.5.1 Hexanal en espacio de cabeza de las microcápsulas y aceite de amaranto.

El estudio de hexanal en espacio de cabeza se llevó a cabo para las microcápsulas y emulsiones así como para el aceite de amaranto de los resultados obtenidos se hicieron las siguientes graficas mostradas en las Figuras 26 y 27.

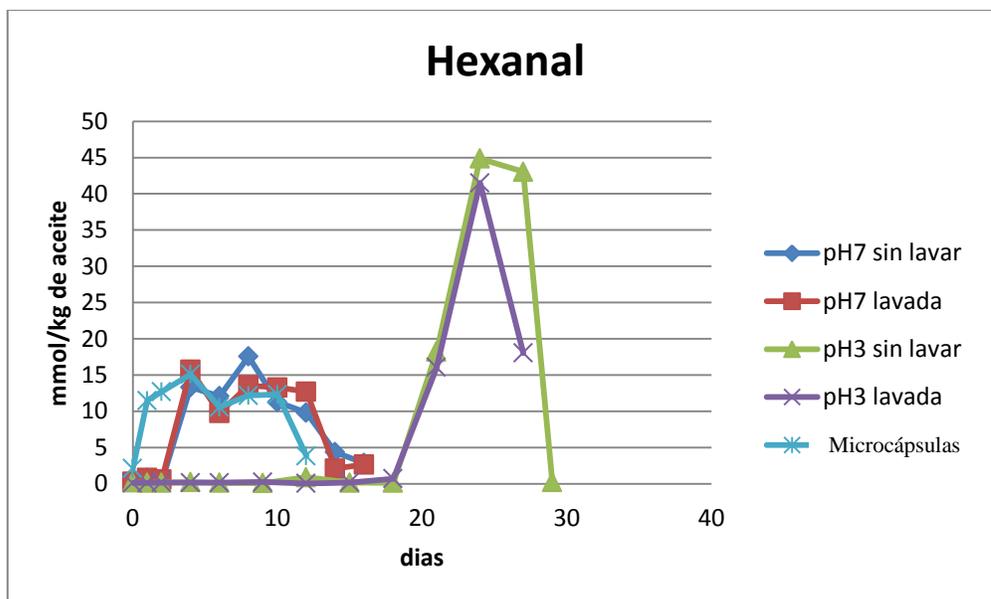


Figura 26. Gráfica de valores de hexanal para las diferentes emulsiones y para las microcápsulas de aceite de amaranto.

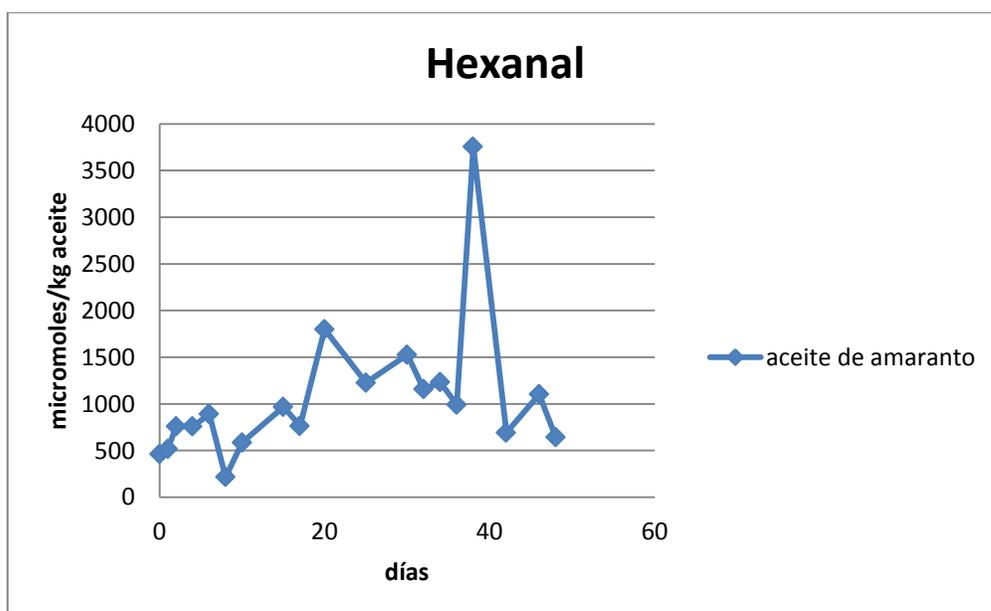


Figura 27. Gráfica de hexanal para el aceite de amaranto.

En el caso de las microcápsulas como se observa en la Figura 25, la reacción de oxidación comienza desde el primer momento en que se empieza el experimento por lo que a la par que aumentaba el valor de hidroxiperóxidos lo hizo el valor de hexanal.

En el caso del aceite de amaranto, Figura 26 se muestra que el hexanal como producto final de la oxidación tiene su valor máximo en el día 38, superando por mucho las expectativas en cuanto al tiempo que se requiere para la oxidación de un aceite comparando con valores para aceite de maíz, similar en composición, por ejemplo tenemos que para "sripped oil" de maíz a 60°C que es la temperatura de éste estudio la oxidación se da en 2 días, con adición de δ -tocoferol 250 ppm la oxidación se da en 5 días. Para las emulsiones se utilizó una temperatura de 55°C y para las microcápsulas de 45°C (Huang *et al*, 1995).

VII.5.2 Hexanal en espacio de cabeza de las emulsiones

Para las emulsiones observamos que la aparición de hexanal se da después de que el valor de hidroxiperóxidos aumenta a su punto máximo, esto se debe a que la reacción de oxidación como se muestra en la Figura 28, muestra la aparición primeramente de los hidroxiperóxidos y finalmente la de productos finales como aldehídos y cetonas entre estos productos finales uno de los de mayor importancia es el hexanal.

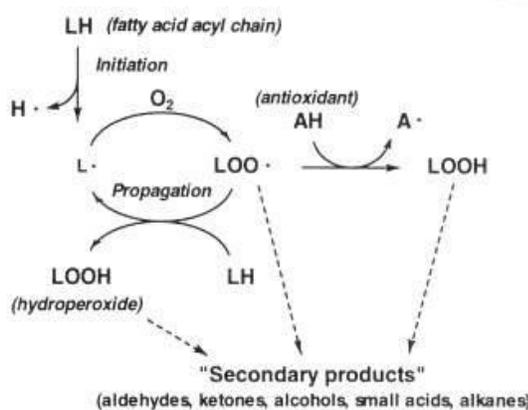


Figura 28. Reacción de oxidación lipídica

Este comportamiento fue el mismo para cada una de las emulsiones para los diferentes valores de pH a los que se determinaron las reacciones de oxidación.

VII.5.3 Cinéticas de oxidación para las microcápsulas y aceite de amaranto.

Para la determinación de peróxidos se obtuvo la gráfica mostrada en la Figura 33 para las microcápsulas en las cuales se muestra el avance de la oxidación respecto a la caída en la concentración de cada uno de los tocoferoles presentes en el aceite y para el aceite se muestra el avance en el valor de peróxidos, Figura 34.

En el caso de las microcápsulas se piensa que el aceite migro a la superficie de la microcápsula, al tratarse de un sistema con una gran área superficial en contacto con el aire aunado a esta migración se obtuvo una pobre protección contra la oxidación, esta hipótesis se puede sustentar al observar las micrografías previamente obtenidas en donde se observa que varias de las microcápsulas presentan paredes muy delgadas, al estar embebido el aceite en la matriz de encapsulación y siendo ésta tan delgada la migración pudo haberse suscitado. Se propone una mayor concentración de proteína o buscar un mejor agente entrecruzante, diferente a las maltodextrinas.

Para el aceite de amaranto la oxidación se presentó a los 42 días como se mencionó anteriormente la estabilidad del aceite es muy superior a la que se esperaba, comparando con otros aceites como se muestra en el Cuadro 23, donde se observa que el aceite es altamente estable.

Para las cinéticas tanto del aceite como de las emulsiones y las microcápsulas se observó el mismo comportamiento en la disminución en la concentración de tocoferoles; la primera forma en desaparecer es el α -tocoferol, siendo el primero en oxidarse, después β -tocoferol y finalmente δ -tocoferol.

VII.5.4 Cinéticas de oxidación para las emulsiones.

Para la determinación de peróxidos en las emulsiones se obtuvieron las siguientes gráficas, Figura 29 para las emulsiones a pH 7 sin lavar, Figura 30 para

las emulsiones a pH 7 lavadas, la Figura 31 para las emulsiones a pH 3 sin lavar, Figura 32 para emulsiones a pH 3 lavadas.

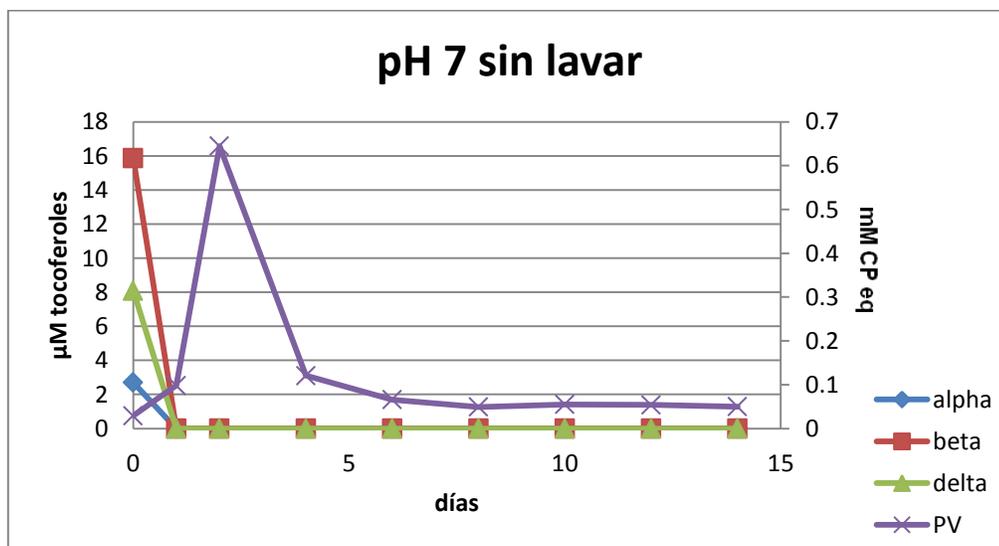


Figura 29. Emulsión a pH7 sin lavar, valor de peróxidos eje derecho y valor de la concentración de cada uno de los tocoferoles eje izquierdo.

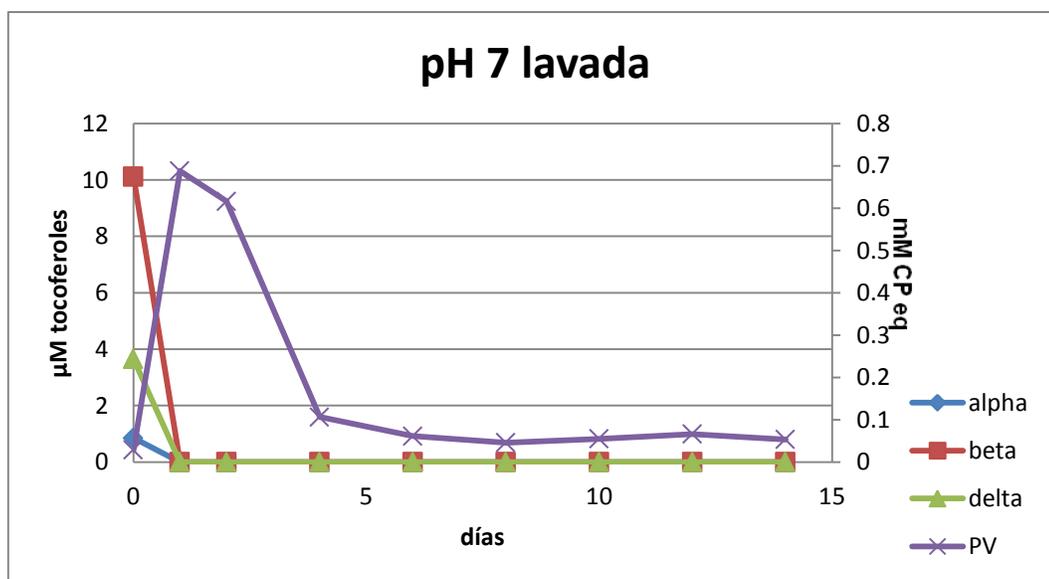


Figura 30. Emulsión a pH7 lavada, valor de peróxidos eje derecho y valor de la concentración de cada uno de los tocoferoles eje izquierdo.

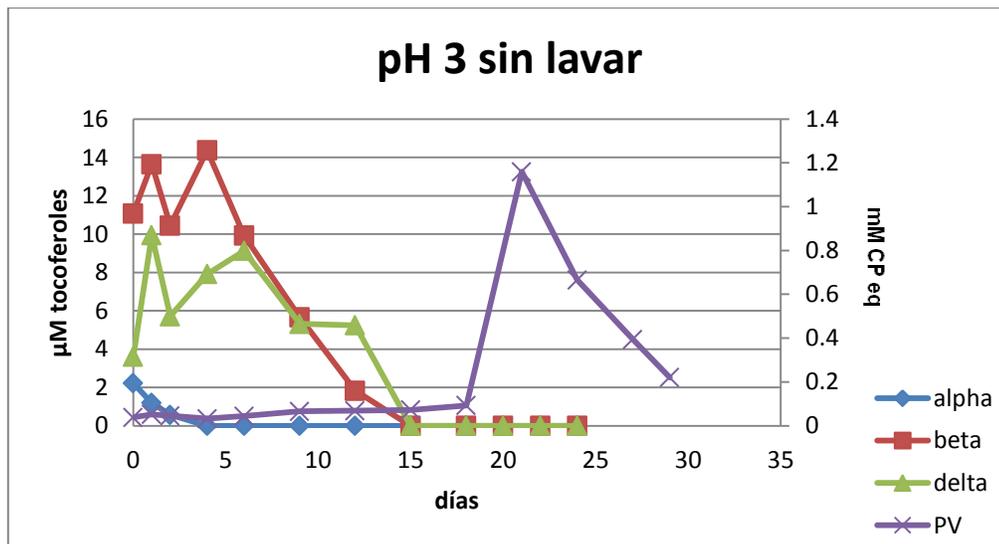


Figura 31. Emulsión a pH3 sin lavar, valor de peróxidos eje derecho y valor de la concentración de cada uno de los tocoferoles eje izquierdo.

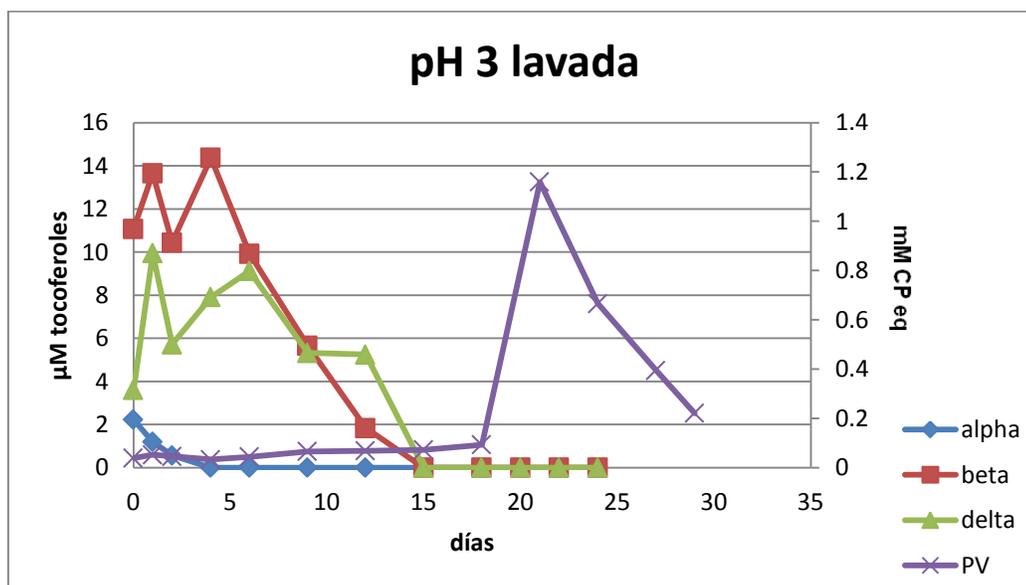


Figura 32. Emulsión a pH3 lavada, valor de peróxidos eje derecho y valor de la concentración de cada uno de los tocoferoles eje izquierdo.

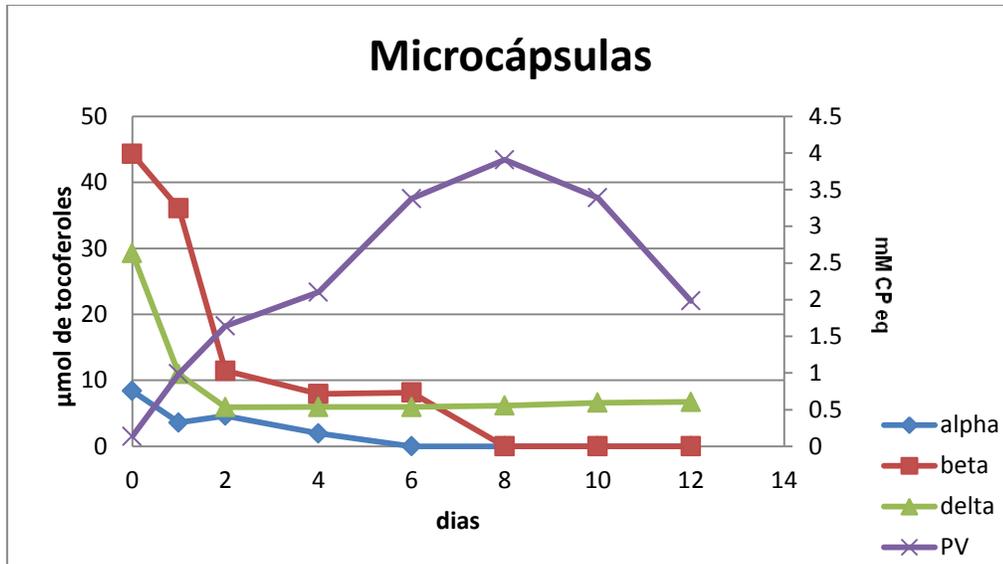


Figura 33. Microcápsulas, valor de peróxidos eje derecho y valor de la concentración de cada uno de los tocoferoles eje izquierdo.

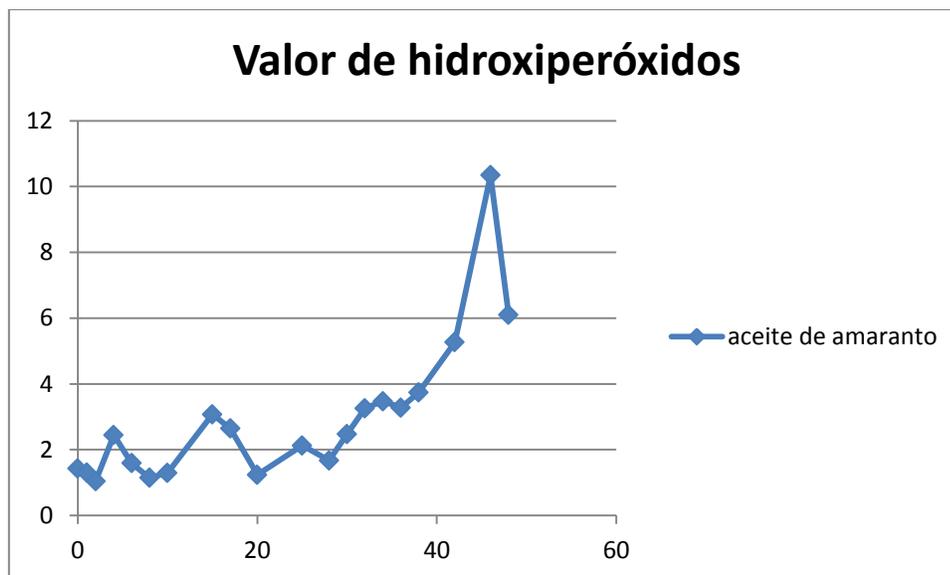


Figura 34. Valor de hidroxiperóxidos a través del tiempo.

Para las cinéticas de oxidación obtenidas se observó que para las emulsiones a pH7 sin lavar, donde la superficie de las partículas en la emulsión presentan carga negativa, por estar arriba del punto isoeléctrico de la proteína, PI aproximadamente 4.2, existe una fase Lag antes de que empiece a aumentar el valor de

hidroxiperóxidos la cual se atribuye al efecto antioxidante de la proteína en la fase acuosa, ya que esta puede interaccionar con los iones Fe^{2+} que son los que catalizan la reacción de oxidación, esta actividad antioxidante se encuentra reportada. Esta hipótesis se sustenta al realizar la emulsión al mismo pH7 pero lavando la emulsión, es decir retirando de la fase acuosa la proteína que no se encuentra formando parte de la emulsión, se comprobó que se estaba retirando la proteína ya que en el agua de lavado se determinó concentración de proteína por el método de Biuret. Cuando se realizó la cinética de oxidación para esta emulsión se observó que la fase Lag desaparece comenzando de inmediato la oxidación, para estudios a temperatura menor se observa de manera más clara como las fases de iniciación para emulsiones sin lavar son más lentas que para las emulsiones lavadas. (Hu *et al*, 2003).

En el caso de las emulsiones a pH 3, para la emulsión lavada y para la emulsión sin lavar los tiempos de oxidación son los mismos, esto se debe a que la proteína se encuentra cargada positivamente tanto en la superficie de la micela que forma la emulsión así como la proteína en la fase acuosa repeliendo a los iones Fe^{2+} de la superficie de la emulsión o de la superficie de la proteína en la fase acuosa por lo que la proteína en la fase acuosa no ejerce actividad antioxidante, además esta propiedad de repulsión electrostática disminuye las interacciones entre la micela y los iones Fe^{2+} de tal forma que la reacción de oxidación es más lenta lo cual se puede observar claramente al ver los tiempos de oxidación para las emulsiones de pH 7 comparando con las emulsiones a pH 3, estos sistemas se ilustran en la Figura 35.

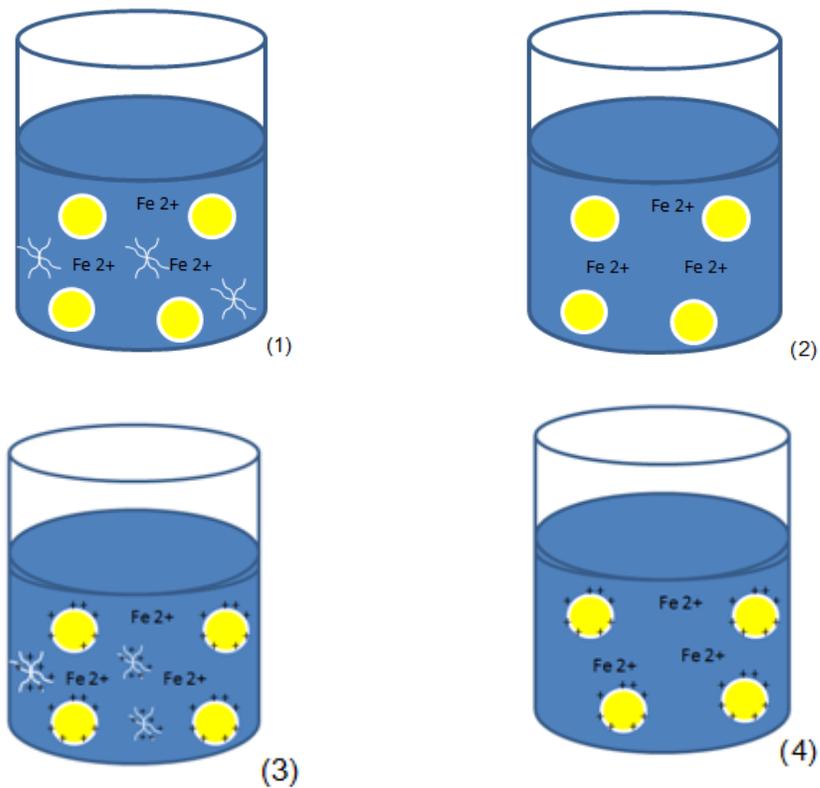


Figura 35. 1. Emulsión a pH 7 sin lavar, en donde se observa la proteína en fase acuosa, 2. Emulsión a pH 7 lavada, no hay proteína en la fase acuosa, 3. Emulsión a pH 3 se observa la superficie de la micela y de la proteína cargada positivamente. 4. Emulsión a pH 3 lavada, se observa la proteína en la superficie de la micela cargada positivamente.

La forma biológicamente activa de la vitamina E es el α -tocoferol, pero podemos observar que como antioxidantes para el aceite β -tocoferol y δ -tocoferol tienen un mayor efecto antioxidante. En las gráficas podemos observar que una vez la concentración de tocoferoles cae, el valor de hidroxiperóxidos aumenta, demostrando el poder antioxidante de estos compuestos, además la gran estabilidad del aceite a la oxidación también se le atribuyó a la posible presencia de compuestos fenólicos, esto se puede observar ya que en las gráficas de pH 3 una vez consumidos los tocoferoles existe un lapso de tiempo antes de que se presente la oxidación sugiriendo la presencia de otro compuesto antioxidante, esto también

se puede observar a menor temperatura en pH 7, se realizó dicho análisis pero quedó inconcluso sólo dando evidencia de que este hecho puede ser posible.

Cuadro 23. Tiempos de oxidación para diferentes aceites vegetales.

Aceite	Tiempo de Oxidación	Técnica	Autor
Amaranto	42 días	Hidroxiperóxidos	Presente trabajo
Amaranto	28.05 horas	OSI	Presente trabajo
Maíz (stripped oil)	2 días	Hidroxiperóxidos	Huang <i>et al.</i> , 1995
Soya	4.2 horas	OSI	Daniels <i>et al.</i> , 2006
Maíz	4 días	Hidroxiperóxidos	Frankel <i>et al.</i> , 1996
Soya	3 días	Hidroxiperóxidos	Maisthisakul <i>et al.</i> , 2006

IX. CONCLUSIONES

- La calidad del aceite se encontró en el rango establecido para aceites vegetales para consumo humano en las normas oficiales mexicanas.
- El aceite crudo mostró buena actividad antioxidante en los ensayos de DPPH y FRAP.
- En los tratamientos con CPS se obtuvieron las microcápsulas, no siendo así para el tratamiento con caseinato de sodio.
- Los tratamientos para la obtención de microcápsulas mostraron la forma de matriz, en donde el aceite se encontró embebido en la parte que forma la pared de la microcápsula.
- El proceso de microencapsulación con mejores resultados fue el tratamiento 30% de sólidos con el 70% de CPS y 30% de maltodextrinas.
- El tratamiento con 30% de sólidos con el 70% de CPS y 30% de maltodextrinas, por DSC mostró, que su entalpía de formación fue menor que la de los otros tratamientos, siendo esta otra ventaja para su elección.
- Los tratamientos a pH bajos modifican la carga de la emulsión, repeliendo los iones hierro retardando el proceso de oxidación.
- Los tratamientos a pH neutro muestran una fase Lag mayor en el caso de la emulsión sin lavar, que la emulsión lavada demostrando que la proteína presente en la fase acuosa posee actividad antioxidante que retarda el proceso de oxidación.
- Las microcápsulas muestran una pobre protección contra la oxidación, atribuyéndose a la migración de aceite a la superficie de la microcápsula y a la gran área superficial de contacto con el aire.
- El aceite crudo mostró una elevada estabilidad oxidativa superior incluso a la de otros aceites similares en composición como el de maíz.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aguedo, M., Hanon, E., Danthine, S., Paquit, M., Longay, G., Thomas, A., Vandebol, M., Thonart, P., Wathélet, J., Blecker, C. 2008. Enrichment of Anhydrous Milk Fat in Polyunsaturated Fatty Acid Residues from Linseed and Rapeseed Oils through Enzymatic Interesterification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 56, 1757–1765

Ahn, J., Kim, Y., Lee, Y., Seo, E., Lee, K., Kim, H. 2008. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry* 107, 98–105.

Alberts, B. 2006 Introducción a la biología celular. 2° edición. Editorial Médica Panamericana. Vol. 55: 119-128.

Alencar, J., Gosset, G., Robin, M., Pique, V., Culcasi, M., Clement, J., Maercier, A., Pietri, S. 2009. Improving the Stability and Antioxidant Properties of Sesame Oil: Water-Soluble Spray-Dried Emulsions from New Transesterified Phenolic Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 57, 7311–7323.

Alvares- Jubete, L., Arendt E.K., Gallagher E. 2010. Nutritive value of pseudocereals and their increasing uses as functional gluten free ingredients. *Food Science & Technology* Vol. 21106-113

Andersen, P., Gobert, D. 2002. Influence of Year and Planting Date on Fatty Acid Chemistry of High Oleic Acid and Normal Peanut Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 50, 1298-1305.

Andre, C., Oufir, M., Guignard, C., Hoffmann, L., Housman, J., Evers, D., Larondelle, Y. 2007, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 55, 10839–10849.

Badui, S. 2006. Química de los alimentos. 4° edición. Editorial Pearson. 245-252, 282-296.

Beltrán, G., del Rio, C., Sanchez, S., Martínéz, L. 2004. Influence of Harvest Date and Crop Yield on the Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oils from Cv. Picual. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 52, 3434-3440

Benzle, I., Strain, J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Chemistry*. Vol: 239, 70-78.

Bolesma, E., Hendriks, H., Roza, L. 2001. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Journal of clinical nutrition* Vol. 73: 853-864.

Bortolomeazzni, R., Cordaro, F., Pizzale, L., Conte, L. 2003. Presence of Phytosterol Oxides in Crude Vegetable Oils and Their Fate during Refining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 51, 2394-2401

Bortolomeazzni, R., Zan, M., Pizzale, L., Conte, L. 1999. Mass Spectrometry Characterization of the 5 α -, 7 α -, and 7 β -Hydroxy Derivatives of β -Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol, and Brassicasterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol: 47, 3069-3074.

Bruni, R., Medici, A., Guerrini, A., Scalia, S., Poli, F., Muzzoli, M., Sacchetti, G. 2001. Wild *Amaranthus caudatus* Seed Oil, a Nutraceutical Resource from Ecuadorian Flora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 49, 5455-5460

Büchi, 2002. Training papers spray drying. Labortechnik AG. English version.

Catchpole, O., Kamp C. 1997. Phase Equilibrium for the Extraction of Squalene from Shark Liver Oil Using Supercritical Carbon Dioxide. *Industrial Engineering Chemistry*. Vol: 36, 3762-3768.

Chang, P., Lee, J., Lee, J. 2005. Development of a New Colorimetric Method Determining the Yield of Microencapsulation of α -Tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 53, 7385-7389.

Cherian, G., Ahn, D., Sim, J. 1996. Blood and Aorta Lipid Status and Platelet Function in Swine Modified by Dietary r-Linolenic Acid-Rich Flax Seed. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 44, No. 8: 2330-2335.

Choi, N., Park, H., Hwang J., Kwon, K., Chang, J., Hwang, I., Kim, Y. 2009. Characterizations of Environmental Factors in Conjugated Linoleic Acid Production by Mixed Rumen Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 57, 9263–9267.

Conchillo, A., Cercaci, L., Ansorena, D., Rodriguez, T., Lercker, G., Astiasaran, I. 2005. Levels of Phytosterol Oxides in Enriched and Nonenriched Spreads: Application of a Thin-Layer Chromatography-Gas Chromatography Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 53, 7844-7850

Coreen, M., Hites, R., Steven, J., Foran, J., Knuth, B., Carpenter, D. 2005. Lipid Composition and Contaminants in Farmed and Wild Salmon Environment Science and Technology. Vol. 39: 8622-8629

Daniels, R., Kim Jung, H., Min, D. 2006. Hydrogenation and interesterification effects on the oxidative stability and melting point of soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54: 6011-6015.

Dawidowicz, A., Wianowska, D., Olszowy, M. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity) *Food Chemistry* Vol. 131: 1037–1043.

Dannenberger, D., Nuernberg, G., Scollan, N., Ender, K., Nuernberg, K. 2007. Diet alters the Fatty Acid Composition of Individual Phospholipid Classes in Beef Muscle *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55: 452-460.

De Roos, N. M. 2000. University Medical Centre Utrecht, The Netherlands: 1-9.

Dowding, P., Atkin, R., Vincent, B., Bouillot, P. 2004. Oil Core-Polymer Shell Microcapsules Prepared by Internal Phase Separation from Emulsion Droplets. I. Characterization and Release Rates for Microcapsules with Polystyrene Shells. *Langmuir*, Vol. 20, 11374-11379.

Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Hansberg-Schimidt, B., Schwartz, K. 2007. Impact of Physicochemical Characteristics on the Oxidative Stability of Fish Oil Microencapsulated by Spray-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 55, 11044–11051.

Eckert, G.P., Franke, C., Nöldner, M., Rau, O., Wurglics, M., Schubert, M., Müller, W. 2010. Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. *Pharmacological Research*. Vol 61: 234-241.

Faller, R., Hoopes, M., Noro, G., Longo, M. 2011. Bilayer Structure and Lipid Dynamics in a Model Stratum Corneum with Oleic Acid. *Journal of Physical Chemistry*. XX: xx-xx.

- Frankel, E., Huang S., Aeschbach, R., Prior, E. 1996.** Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil or in water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 44, 131–135.
- Gamel, T.H., Mesallam, A., Damir, A., Shekib, L., Linssen J. 2007.** Characterization of amaranth seed oils. *Journal of Food Lipids* Vol. 14 323–334.
- Gammill, W., Proctor, A., Jain, V.** Comparative Study of High-Linoleic Acid Vegetable Oils for the Production of Conjugated Linoleic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 58, 2952–2957.
- Gerster, H. 1998.** "Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *International Journal Vitamin Nutrition Research*. 68 (3): 159–173.
- Goffman, F., Galletti S. 2001.** Gamma-Linolenic Acid and Tocopherol Contents in the Seed Oil of 47 Accessions from Several *Ribes* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol:49, 349-354.
- Gómez-Coronado, D., Barbas, C. 2003.** Optimized and Validated HPLC Method for α - and γ -Tocopherol Measurement in *Laurus nobilis* Leaves. New Data on Tocopherol Content. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*. Vol:51, 5196-5201.
- Harput, U., Genç, V., Khan, N., Saracoglu, I. 2010.** Radical Scavenging Effects of Different *Veronica* Species. *Records of natural products* Vol. 5:2 (2011) 100-107.
- Horwitz, W. 2005** Official methods of analysis of AOAC. 18^o edición. Editorial AOAC Intl. 357, 413, 786.
- He, H., Corke, H. 2003.** Oil and Squalene in *Amaranthus* Grain and Leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 51, 7913-7920.
- He, H., Corcke, H., Cai, J. 2003.** Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil and Squalene from *Amaranthus* Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 51, 7921-7925.
- He, H., Cal, Y., Sun, M., Corke, H. 2002.** Extraction and Purification of Squalene from *Amaranthus* Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol:50, 368-372.
- Henry, G., Momin, R., Muraleedharan, N., Dewitt D. 2002.** Antioxidant and Cyclooxygenase Activities of Fatty Acids Found in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol:50, 2231-2234.
- Hu, M., McClements, J., Decker, E. 2003.** Impact of Whey Protein Emulsifiers on the Oxidative Stability of Salmon Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol: 51, 1435–1439.
- Huang, S., Frankel, E., German, B. 1995.** Effects of individual tocopherols and tocopherol mixture on the oxidative stability of orn oil triglycerides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol: 43, 2345–2350.
- Jahaniaval, F., Kakuda, Y., Marcone, M. F. 2000.** Fatty Acid and Triacylglycerol Compositions of Seed Oils of Five *Amaranthus* Accessions and Their Comparison to Other Oils. *JAOCS*, Vol. 77, no. 8 847-852.

- Jiménez-Escrig**, A., Santos-Hidalgo, A., Saura-Calixto, F. **2006**. Common Sources and Estimated Intake of Plant Sterols in the Spanish Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol:54, 3462-3471.
- Klaus**, A., Meyer, C., Grynbaum, D., Friebolin, V., Schauff, S. **2007**. Monitoring the interactions of tocopherol homologues with reversed-phase stationary HPLC Phases by ¹H Suspended-starte saturation transfer difference High-resolution/magic angle spinning NMR spectroscopy. *Journal of analytical chemistry*. Vol 79, 8323-8326.
- Klinkesorn**, U., Sophandora , P., Chinachoti, P., McClements, J., Decker, E. **2005**. Stability of Spray-Dried Tuna Oil Emulsions Encapsulated with Two-Layered Interfacial Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol: 53, 8365-8371
- Ko**, T., Weng, Y., Chiou, R. **2002**. Squalene Content and Antioxidant Activity of *Terminalia catappa* Leaves and Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 50. 5443-5348.
- Kusump**, S. **2006**. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides released from the hydrolysate of casein and the milk fermented by *Lactobacillus casei* ADA03. Tesis Doctoral. Department of agricultural, food and nutritional science. University of Alberta. Edmonton Canadá: 2-7.
- Kriengsak**, T., Coomprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. **2006**. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis* Vol: 19, 669.675.
- Krucker**, M., Lineau, A., Putzbach, K., Grybaum, M., Schuler, P., Albert, K. **2004**. Hyphenation of Capillary HPLC to Microcoil 1H NMR Spectroscopy for the Determination of Tocopherol Homologues. *Journal of Analytical Chemistry*. Vol: 76. 2623-2628.
- Leclercq**, S., Reineccius, G., Milo, C. **2007**. Effect of Type of Oil and Addition of δ -Tocopherol on Model Flavor Compound Stability during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 55, 9189–9194.
- Lee**, Y., Kim, Y., Shin, D. **2002**. Antimicrobial Synergistic Effect of Linolenic Acid and Monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 50, 2193-2199.
- León-Camacho**, M., García-González, D. **2001**. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. *Eur Food Res Technol* Vol. 213:349–355.
- Lineau**, A., Glaser, T., Krucker, M., Zeeb, D., Fritz, L., Curro, F., Aalbert, K. **2002**. Qualitative and Quantitative Analysis of Tocopherols in Toothpastes and Gingival Tissue Employing HPLC NMR and HPLC MS Coupling. *Journal of analytical Chemistry*. Vol:74, 5192-5196.
- Liu**, J., DeMichele, S., Palombo, J., Chuang, L., Hastlow, C., Huang, Y. **2004**. High Gamma-Linolenic Canola Oil versus Borage Oil on Growth, Hematology, Serum Biochemistry, and N-6 Fatty Acid Metabolism in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 52, 3960-3966.
- Luximon-Ramma**, A, Bahorun, T., Soobrattee, M., Aruoma, O. **2002**. Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of *Cassia fistula* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 50, 5042-5047

- Lyon, C.K, Becker, R. 1987.** Extraction and Refining of Oil from Amaranth Seed. *JAOCS*, Vol, 64, no. 2 233-236.
- Maisthisakul, P., Pongsawatmant R., Gordon, M. 2006.** Antioxidant Properties of Teaw (*Cratoxylum formosum Dyer*) Extract in soybean oil and emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 54, 2719-2725.
- Mantzouridou, F., Nazari, E., Tsimidou, M. 2009.** Squalene versus Ergosterol Formation Using *Saccharomyces cerevisiae*: Combined Effect of Oxygen Supply, Inoculum Size, and Fermentation Time on Yield and Selectivity of the Bioprocess. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 57, 6189–6198
- Marcone, M. 2000.** First Report of the Characterization of the Threatened Plant Species *Amaranthus pumilus* (Seabeach Amaranth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 48, 378-382.
- Martirosyan, D., Mirsoshnichenko, L., Kulanova, S., Pogojeva, A., Zodelov, V. 2007.** Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Biomed Central*. Vol: 6 2-12.
- Mazalli, M., Bragagnolo, N. 2009.** Increase of Cholesterol oxidation and Decrease of PUFA as a Result of Thermal Processing and Storage in Eggs Enriched with n-3 Fatty Acids *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., Vol. 57, No. 11: 5028-5034.
- Mermelstein, N. 2002** A look into the future of food science and technology. *Journal of food technology*. Vol 56: 46-55.
- Mireles A. 2009.** Bioactive compounds for food products: theory and applications. 1° ed., Taylor and Francis Group LLC. Capítulo 1. M. Angela, A. Meireles. Extraction and purification of bioactive compounds: 1-9.
- Mitarai, A., Ouchi, A., Tokonaga, A., Mukai, K., Abe, K. 2008.** Kinetic Studies of the Free Radical-Scavenging Actions of Tocopherol Metabolites (α -, γ -, and δ -Carboxyethyl-6-hydroxychroman) and Trolox in Ethanol and Micellar Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol:56, 84–91.
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. 2012.** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH_ assay:A critical review and results. *Food Chemistry* Vol.130:1036–1043.
- Murzin, A., Arvela, P., Kumar, N., Holmbon,B., Salmi, T. 2003.** Heterogeneously Catalytic Isomerization of Linoleic Acid over Supported Ruthenium Catalysts for Production of Anticarcinogenic Food Constituents. *Journal of Industrial. Engineering Chemistry*. Vol. 42, 718-727.
- Murzin, Y., Berneas. A., Kumar, N., Arvela, P., Holmbom, B., Salmi, T. 2004.** Heterogeneous Catalytic Production of Conjugated Linoleic Acid. *Organic Process Research & Development* Vol. 8, 341-352
- Nettleton, JA. 1991.** Omega -3 Fatty acids: Comparison of plant and seafood sources in human nutrition, *Journal of the American Dietetic Association*.Vol. 91, no. 3, pp. 331-337.
- Okuda, S., McClements, J., Decker, E. 2005.** Impact of Lipid Physical State on the Oxidation of Methyl Linolenate in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 53, 9624–9628.

Oleszek, W., Junkuszew, M., Stochmal, A. 1999. Determination and Toxicity of Saponins from *Amaranthus cruentus* Seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol: 47, 3685-3687.

Palaniswamy, U., McAvoy, R., Bible, B. 2001. Stage of Harvest and Polyunsaturated Essential Fatty Acid Concentrations in Purslane (*Portulaca oleraceae*) Leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49: 3490-3493.

Panya, A., Laguerre M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., McClements, J., Decker, E. An Investigation of the Versatile Antioxidant Mechanisms of Action of Rosmarinate Alkyl Esters in Oil-in-Water Emulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol: 60 2692-2700.

Panya, A., Laguerre M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, J., Decker, E. 2010. Effects of Chitosan and Rosmarinate Esters on the Physical and Oxidative Stability of Liposomes. Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol: 58, 5679–5684.

Park, Y., Keller, D., McClements, J., Decker, E. 2004. Incorporation and Stabilization of Omega-3 Fatty Acids in Surimi Made from Cod, *Gadus morhua*. Journal of Agricultural Food Chemistry. Vol 52: 597-601.

Park, Y., Jang, H., Lee, K., Hanhn, T., Paik, Y. 2006. Prolyl Endopeptidase Inhibitory Activity of Unsaturated Fatty Acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol. 54, 1238-1242.

Pina-Rodriguez, M., Akoh, C., 2009. Synthesis and Characterization of a Structured Lipid from Amaranth Oil as a Partial Fat Substitute in Milk-Based Infant Formula. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol: 57, 6748–6756.

Pleite, R., Martinez-Force, E., Graces, R. 2006. Increase of the Stearic Acid Content in High-Oleic Sunflower (*Helianthus annuus*) Seeds. Journal of Agricultural and Food Chem. Vol 54, 9383-938

Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D. 2000, α -Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol: 48, 1770-1775

Pulido, R., Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol:48, 3396-3402

Rodriguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado Barragan, L. A., Beristain, C.I., Carter, V. 2004. Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids. Journal of Food Science. Vol: 69, 352-359.

Senanayake N., Shahidi, F. 1999. Enzyme-Assisted Acidolysis of Borage (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.) Oils: Incorporation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol: 47, 3105-3112.

Senatore, D., Laven, J., Benthem, R., La Camera, D., With, G. 2010. Microencapsulation of Epoxidized Linseed Oil Liquid Cross-Linker in Poly(*N*-vinylpyrrolidone): Optimization by a Design-of-Experiments Approach. Journal of industrial, Engineering Chemistry Research. Vol: 49, 3642- 3653.

Shain, N., Akoh, C., Karaal, A. 2006. Human Milk Fat Substitutes Containing Omega-3 Fatty Acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54, 3717-3722.

- Shahidi, F. 2004.** Functional Foods: Their role in health promotion and disease prevention. *Journal of food science*. Vol. 69: 5.
- Sharma, O., Bhat, T. 2009.** DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry* Vol. 113: 1202–1205.
- Shaw, L., McClements, J., Decker, E. 2007.** Spray-Dried Multilayered Emulsions as a Delivery Method for n-3 Fatty acids into Food Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 55, 3112-3119.
- Shen, Z., Agustin, M., Sanguansri, L., Cheng, L. 2010.** Oxidative Stability of Microencapsulated Fish Oil Powders Stabilized by Blends of Chitosan, Modified Starch, and Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol: 58, 4487–4493.
- Schauff, S., Friebolin, V., Grynbaum, M., Meyer, C., Albert, K. 2007.** Monitoring the Interactions of Tocopherol Homologues with Reversed-Phase Stationary HPLC Phases by ¹H Suspended-State Saturation Transfer Difference High Resolution/Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy. *Journal of analytical Chemistry*. Vol: 79, 8323-8326.
- Shu, B., Zhao, Y., Lui, X. 2006.** Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering* Vol: 76, 664–669.
- Simopoulos, A., P, Salem. 1992.** Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding, *N. Am-J-Clin-Nutr.* Feb; 55(2): 411-4
- Siramon, P., Ohtani, Y. 2007.** Antioxidative and antiradical activities of Eucalyptus camaldulensis leaf oils from Thailand, *Journal of wood science*. Vol. 53:498–504
- Sloan, E. A. 2008.** Great ideas from around the world. *Food Technology*. Vol. 10.7: 21-33.
- Sookwong, P., Nakagawa, K., Murata, K., Kojima, Y., Miyazawa, T. 2007.** Quantitation of Tocotrienol and Tocopherol in Various Rice Brans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 55, 461-466.
- Soottitantawat, A., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P.,** Microencapsulation by Spray Drying: Influence of Emulsion Size on the Retention of Volatile Compounds. *Journal of Food Science*. Vol. 69, 2256-2262.
- Strohschein, S., Purch, M., Lubda, D., Albert, K. 1998.** Shape Selectivity of C₃₀ Phases for RP-HPLC Separation of Tocopherol Isomers and Correlation with MAS NMR Data from Suspended Stationary Phases. *Analytical Chemistry*. Vol: 70, 13-18.
- Surh, J., Suk Gu, Y., Decker, E., McClements, J. 2005.** Influence of Environmental Stresses on Stability of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by SDS–Fish Gelatin Membranes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol: 53, 4236–4244.
- Szwajczak, E., Stagracynski, R., Herba, H. 2009.** Shear Viscosity of Mixtures of r-Tocopherol with Nonpolar Solvents. Vol: 54, 400-404.
- Tikekar, R., Ludescher, R., Karwe, M., 2008.** Processing Stability of Squalene in Amaranth and Antioxidant Potential of Amaranth Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 56, 10675–10678.
- Valenzuela, B., Nieto, A., Nieto, S. 2003.** Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista Chilena de Pediatría* Vol.74 No.2: 149-157.

- Watanabe**, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S., Matsuno, R. **2002**. Suppressive Effect of Saturated Acyl L-Ascorbate on the Oxidation of Linoleic Acid Encapsulated with Maltodextrin or Gum Arabic by Spray-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol: 50, 3984-3987.
- Wootthikanokkhan**, J., Tunjongnawin, P. **2003**. Investigation of the effect of mixing schemes on cross-link distribution and tensile properties of natural–acrylic rubber blends. *Polymer Testing*. Vol 3. 305-312..
- Xing**, Q., Cao, Y., Su, B., Yang, Y. **2009**. *Industrial Engineering Chemistry*. Vol: 48, 6417–6422.
- Yaniv** Z., Schafferman, D., Madar, Z. **1999**. Cholesterol and Triglyceride Reduction in Rats Fed *Matthiola incana* Seed Oil Rich in (*n*-3) Fatty Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol:47, 637-642.
- Yu**, S., Derr, J., Etherton, T., Ehterton, K. **1995**. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol: 61, 1129-1139.
- Zhong**, Y., Lall, S., Shahidi, F., **2007**. Effects of Oxidized Dietary Oil and Vitamin E Supplementation on Lipid Profile and Oxidation of Muscle and Liver of Juvenile Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55, No. 15: 6379-6386.