



47  
24  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

METODOS DE EXTRACCION DE ACIDO LINOLEICO  
A PARTIR DE ACEITE DE GIRASOL Y APLICACIONES  
COMO COMPLEMENTO DIETETICO



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

Trabajo Monográfico de Actualización  
Mancomunado

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N

FIDENCIO GARCIA HIDALGO

EMILIANO LOPEZ MARTINEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

I. INTRODUCCION	I
II. GENERALIDADES	4
2.1 DEFINICION DE GRASAS Y ACEITES	4
2.1.1. Glicéridos	4
2.1.2. ácidos grasos	6
2.1.3. Componentes no glicéridos de grasas y aceites	7
2.1.3.1. Fosfátidos	7
2.1.3.2. esteroides	7
2.1.3.3. Alcoholes grasos	8
2.1.3.4. Componentes que afectan la apariencia de grasas y aceites	8
2.1.3.5. tocoferoles	9
2.1.3.6. Componentes de significancia nutricional	9
2.1.3.7. Contenido mineral	9
2.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE GRASAS Y ACEITES	10
2.2.1. Puntos de fusión	10
2.2.2. Solubilidad	11
2.2.3. Viscosidad	12
2.2.4. Hidrólisis	12
2.2.5. Esterificación	12

2.2.6 Saponificación con álcalis	13
2.2.7 Reacción con urea	13
2.3 PRINCIPALES FUENTES DE OBTENCIÓN DE ACIDO LINOLEICO	13
2.4 ACIDO LINOLEICO	18
2.5 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LOS ESTERES DEL ACIDO LINOLEICO	19
III METODOS DE EXTRACCION	21
3.1 PRESION MECANICA	27
3.2 PROCESO DE HIDROFILIZACION	29
3.3 PROCESO DE FRACCIONAMIENTO CON AYUDA DE DISOLVENTES	34
3.4 TECNICA DE FRACCIONAMIENTO CON UREA	38
3.4.1 Descripción del método	39
3.4.2 Fraccionamiento por el método de elución de los complejos de urea	40
3.4.3 Fraccionamiento por el método cumulativo	40
IV. METODOS DE VALORACION DEL ACIDO LINOLEICO	45
4.1 METODO ESPECTROFOTOMETRICO	45
4.2 USO DEL VALOR DE IODO (IV) Y VALOR DE TIOCIANOGENO (TV) EN LA DETERMINACION DE ACIDO LINOLEICO	53
4.3 METODO DE CROMATOGRAFIA DE GASES PARA LA VALORACION DEL ACIDO LINOLEICO	61

V. USOS DEL ACIDO LINOLEICO COMO COMPLEMENTO DIELETICO	76
5.1 EPA <sub>6</sub> Y DESORDENES CORONARIOS	87
5.2 EPA <sub>6</sub> Y OBESIDAD	88
5.3 EPA <sub>6</sub> Y DIABETES MELLITUS	89
5.4 EPA <sub>6</sub> DESORDENES DE PECHO Y CICLO MENSTRUAL	90
5.5 EPA <sub>6</sub> E INFLAMACION	91
5.6 EPA <sub>6</sub> Y ESCLEROSIS MULTIPLE	92
5.7 EPA <sub>6</sub> Y DESORDENES SIQUIATRICOS	94
5.8 EPA <sub>6</sub> Y ALCOHOLISMO	94
VI. CONCLUSIONES	96
VII. BIBLIOGRAFIA.	97

## CAPITULO I. INTRODUCCION

El principal problema que enfrenta el hombre en la actualidad es el de la alimentación, no solo desde el punto de vista cuantitativo; ya que nutrirse bien no necesariamente significa comer mas, si no, aportar al organismo los elementos que son indispensables para su nutrición.

El hombre requiere para una buena nutrición de una gran cantidad de compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, estos compuestos clásicamente se dividen en: Carbohidratos, proteínas, minerales, vitaminas y lípidos (grasas y aceites), etc.

Los carbohidratos son llamados así por que antiguamente se creía que la unidad fundamental de éstos compuestos era una molécula de agua unida a un átomo de carbono. En la actualidad se sabe que puede haber otros elementos unidos a la molécula de estos compuestos. La principal función de estos compuestos es que sirven como fuente de energía para los organismos vivos.

Las proteínas, cuya unidad fundamental son los aminoácidos son esenciales en la dieta del hombre por que entran en la formación de la mayor parte de los músculos y órganos internos.

Los minerales son constituyentes inorgánicos normales del organismo y sus funciones son muy variadas, como ejemplos tenemos:

Hierro, cobre, fósforo, etc.

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas que necesita el organismo en pequeñas cantidades en la alimentación y que van

a intervenir en diversas reacciones metabólicas necesarias para el funcionamiento del organismo humano.

Los lípidos o grasas y aceites también son indispensables en la dieta del hombre. Antiguamente se creía que los lípidos solo servían como una fuente de energía altamente concentrada, pero en la actualidad de acuerdo a recientes investigaciones se ha observado que en ciudades desarrolladas donde la ingestión de grasas saturadas generalmente sólidas a temperatura ambiente como manteca o sebo visibles o invisibles como la contenida en la carne es alta que hay una mayor incidencia de algunos tipos de disturbios fisiológicos como tendencias a incrementar el colesterol en sangre, favorece desórdenes del corazón, arteroesclerosis y trombosis arterial.

Esto ha llevado a incrementar el consumo de aceites vegetales poliinsaturados, lo que ha llevado a proveer una buena fuente de ácidos grasos esenciales como el Linoleico, y se ha visto que hay una tendencia a abatir el índice de enfermedades descrito anteriormente. De acuerdo a nuevos hallazgos biológicos se ha observado que el ácido Linoleico ejercerá mejor su función si este es dado en forma concentrada, ya que otros componentes presentes en el aceite pueden interferir en la función de este ácido, además de que en el procesamiento del aceite y/o calentamiento también puede provocar modificaciones de dicho ácido. El ácido Linoleico es un ácido graso esencial que no puede sintetizar el organismo, compuesto por una cadena hidrocarbonada conteniendo dos dobles ligaduras y un grupo carboxilo. Este

Ácido tiene varias funciones dentro del organismo que serán detalladas posteriormente.

Se seleccionó el aceite de girasol por que es un aceite que contiene el ácido Linoleico en un grado relativamente elevado, y además su importancia mundial ha crecido en los últimos años debido a sus ventajas económicas como son: elevado rendimiento de extracción de aceite de las semillas, sistemas de extracción cómodos y sencillos y superior calidad del aceite.

En este trabajo se describe a uno de los principales componentes del aceite de girasol; el ácido Linoleico, además hable de los métodos de obtención de dicho ácido, sus características, ventajas y desventajas, se describen detalladamente sus métodos de valoración, además contiene una sección donde se habla sobre sus funciones dentro del organismo tales como síntesis de prostaglandinas, sus efectos sobre colesterol sérico y otras.



### 2.1 Definición de grasas y aceites.

En la actualidad, la principal fuente de obtención de ácidos grasos son las grasas y aceites.

Grasas y aceites son sustancias de origen animal o vegetal que consisten predominantemente de ésteres triglicéridos de los ácidos grasos. En general el término grasa es usado en referencia a los materiales que son sólidos, o mas propiamente semisólidos a temperaturas ordinarias, mientras, que el término aceite es reservado para aquellos que son líquidos bajo las mismas condiciones. Sin embargo es obvio que no puede hacerse una distinción rígida entre los dos.

Las grasas y aceites generalmente están constituidas por las siguientes estructuras:

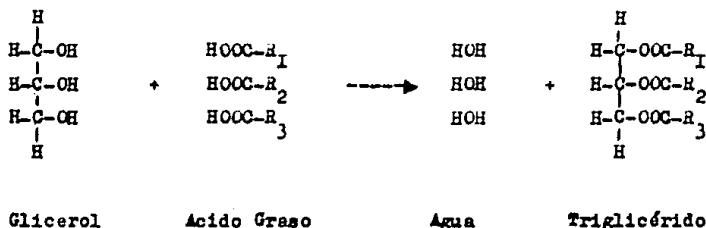
- a).- Glicéridos
- b).- Acidos grasos
- c).- Componentes no glicéridos.

#### 2.1.1. GLICERIDOS.

Estos compuestos pueden ser : 1).- Triglicéridos y 2).- mono- y diglicéridos.

Desde el punto de vista estructural puede considerarse que un tri glicérido está formado por la condensación de una molécula de

glicerol con tres moléculas de ácidos grasos para dar tres moléculas de agua y una molécula de triglicérido.



Si los tres ácidos grasos son idénticos, el producto es un triglicérido simple, si estos son diferentes es un triglicérido mezclado. Cada triglicérido mezclado conteniendo tres diferentes radicales ácidos tiene tres diferentes formas isoméricas, dependiendo de que ácido graso esté ocupando la posición beta, cada triglicérido mezclado conteniendo dos diferentes ácidos grasos similarmente tiene dos formas isoméricas.

Los mono y diglicéridos contienen solamente uno y dos radicales de ácidos grasos respectivamente, y consecuentemente tienen grupos hidroxilo libres. Estos se encuentran en cantidades apreciables solamente en grasas que han sido parcialmente hidrolizadas, pero son fácilmente preparados sintéticamente y tienen importantes usos industriales.

## 2.1.2 ACIDOS GRASOS.

El peso molecular de la porción glicerilo ( $C_3H_5$ ) de una molécula de triglicérido es 41, el peso molecular de los radicales ácidos grasos combinados ( $RCOO$ ) comprende el restante de la molécula la cual variará con diferentes aceites de alrededor de 650 a 970. Así los ácidos grasos constituyen de 94% a 96% del peso total de la molécula.

A causa de su elevado peso en las moléculas de glicérido y también por que comprenden la porción reactiva de la molécula los ácidos grasos influyen mucho el carácter de los glicéridos; ahora ya que los glicéridos constituyen la mayor parte de grasas y aceites, la química de grasas y aceites será en gran parte la química de sus ácidos grasos.

Los ácidos grasos naturales son en general compuestos monobásicos alifáticos, consistiendo casi invariablemente de un solo grupo carboxilo unido a un extremo de una cadena recta hidrocarbonada, casi todos contienen un número par de átomos de carbono. Los ácidos individuales difieren de uno a otro primariamente en el número de átomos de carbono en sus cadenas y el número y posición de las ligaduras etilénicas o dobles ligaduras entre los átomos de carbono.



Donde R es una cadena hidrocarbonada.

Aquellos ácidos grasos en los que la cadena hidrocarbonada tiene todos sus átomos de carbono unidos con no menos de dos átomos de

hidrógeno y los que por lo tanto no contienen dobles ligaduras son llamados saturados. Los ácidos grasos que contienen dobles ligaduras son llamados insaturados. El grado de insaturación de un aceite depende del número promedio de dobles ligaduras en sus ácidos grasos.

### 2.1.3 COMPONENTES NO GLICERIDOS DE GRASAS Y ACEITES.

Las grasas y aceites comerciales contienen pequeñas cantidades de varias sustancias aparte de los glicéridos, entre estos tenemos los siguientes:

#### 2.1.3.1 FOSFATIDOS.

Los fosfátidos que son asociados con grasas y aceites en muchas plantas y tejidos animales consisten de un alcohol polihídrico (usualmente, pero no siempre glicerol) el cual es esterificado con ácidos y con ácido fosfórico, el ácido fosfórico es nuevamente combinado con un compuesto básico conteniendo nitrógeno.

Los fosfátidos usualmente se encuentran en cantidades pequeñas aproximadamente de 0.3% a 2%. Estos compuestos pueden ser fácilmente removidos por agua.

#### 2.1.3.2 ESTEROLES.

Los esteroleos son componentes característicos de todas las grasas

y aceites naturales, comprendiendo en la mayoría de los casos en gran parte la materia insaponificable. Sin embargo ellos son de poca importancia para los tecnólogos de aceites, ya que la cantidad presente en las grasas es muy pequeña de 0.03% a 1.7%, además de que son químicamente inertes y no contribuyen a alguna propiedad importante del aceite.

### 2.I.3.3 ALCOHOLES GRASOS.

Los alcoholes grasos se han encontrado en pequeñas cantidades, ya sea en la forma libre ó esterificada con ácidos grasos como ceras. Sin embargo, algunos aceites vegetales contienen suficientes cantidades de cera (derivado de la capa de la semilla) que causa que estos se opaquen cuando son puestos a bajas temperaturas.

### 2.I.3.4 COMPONENTES QUE AFECTAN LA APARIENCIA DE GRASAS Y ACEITES.

El color rojo amarillento de la mayoría de grasas y aceites es debido a la presencia de varios pigmentos carotenoides. Estructuralmente los carotenoides consisten de cadenas hidrocarbonadas altamente insaturadas, ó unidades de isopreno arregladas en varias configuraciones cíclicas y acíclicas.

La hidrogenación de un aceite reducirá la insaturación de los pigmentos carotenoides lo suficiente para efectuar una reducción de color, también pueden ser destruidos por calentamiento a altas temperaturas, también son fácilmente adsorbidos por carbón activado.

### 2.1.3.5 TOCOPEROLES.

Los tocoferoles como componentes de grasas vegetales tienen una importancia dual, ya que ellos constituyen la vitamina E soluble en grasas y también por que comprenden los más importantes antioxidantes naturales contenidos en muchos aceites vegetales refinados. Estas sustancias se encuentran concentradas en la materia insaponificable después que ha sido efectuada la saponificación. Hay varios tipos de tocoferoles entre los que podemos citar alfa-tocoferol, beta-tocoferol y otros. Puede considerarse que estos compuestos son derivados del cromano.

La cantidad total presente de estos compuestos es muy baja, ya que su concentración varía de 0.003% a 0.45%

### 2.1.3.6 COMPONENTES DE SIGNIFICANCIA NUTRICIONAL.

Grasas y aceites son importantes fuentes de vitaminas liposolubles como la A, D y E, las cuales se encuentran concentradas en la materia insaponificable después de efectuar la saponificación.

### 2.1.3.7 CONTENIDO MINERAL.

Se ha establecido en grasas comerciales que han sido refinadas que contienen fósforo de la presencia residual de los fosfátidos y residuos de jabones de sodio que quedan después de la refinación alcalina.

Los análisis de aceites de metales pesados es difícil, pero se ha establecido que aceites vegetales crudos contienen aproximadamente de 0.1 a 0.3 ppm de cobre, de 0.1 a 0.7 ppm de manganeso y de 1 a 5 ppm de hierro

## 2.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE GRASAS Y ACEITES.

Como los ácidos grasos constituyen la mayor parte del peso de las grasas en las que ellos están presentes, las propiedades físicas y químicas de las grasas son determinadas en gran proporción por las propiedades de los ácidos grasos que ellas contienen.

### 2.2.1. PUNTOS DE FUSION.

Hay muchos factores que tienen influencia sobre el punto de fusión de los ácidos grasos. Probablemente los mas importantes de éstos son la longitud de cadena el grado de insaturación, la posición de la doble ligadura en la molécula y la forma geométrica del ácido.

En general es conocido que los puntos de fusión de los ácidos grasos y de los triglicéridos se incrementa progresivamente con la extensión de la cadena de carbón.

Generalmente la introducción de una doble ligadura dá por resultado un considerable decremento en el punto de fusión de un ácido graso, mientras la presencia de dobles ligaduras adicionales baja aún más los puntos de fusión.

Hay un progresivo descenso en los puntos de fusión en los ácidos cis-octadecenoicos conforme la distancia entre la doble ligadura y el grupo carboxilo se incrementa. Otro factor que también debe ser tomado en cuenta es la forma geométrica, el cambio de una forma cis a una forma trans es casi siempre acompañado por un marcado incremento en el punto de fusión.

### 2.2.2. SOLUBILIDAD.

Exceptuando los ácidos grasos de muy bajo peso molecular, la solubilidad de ácidos grasos en agua es muy pequeña, esta disminuye conforme aumenta el número de carbonos de la cadena, y, también conforme disminuye la temperatura.

La solubilidad de agua en grasa es pequeña, pero es distintivamente mas grande que la solubilidad de grasa en agua. La solubilidad de agua en ácidos grasos es pequeña a temperaturas ordinarias ( excepto en ácidos grasos de pequeño peso molecular ), pero se incrementa conforme se incrementa la temperatura. A temperaturas abajo de su punto de fusión, los ácidos grasos disuelven pequeñas cantidades de agua. El agua disuelta en los ácidos grasos sólidos causa una baja en el punto de fusión.

La solubilidad de grasas y ácidos grasos en disolventes en los que ellos son completamente miscibles en la forma líquida, baja agudamente conforme la temperatura llega bajo el punto en el cual una fase sólida empieza a separarse. Este hecho puede usarse para la separación de mezclas grasosas conteniendo componentes



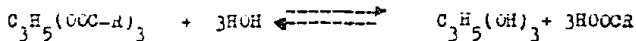
que tienen diferencias substanciales en los puntos de fusión.

### 2.2.3 DENSIDAD

La densidad es ordinariamente considerada como el peso en gramos por centímetro cúbico. Hay un progresivo descenso en la densidad conforme aumenta la longitud de cadena, y esta es disminuida conforme aumenta la temperatura.

### 2.2.4 HIDROLISIS

Bajo condiciones apropiadas, los triglicéridos de grasas y aceites pueden ser hidrolizados para dar ácidos grasos libres y glicerol, la reacción es:



La hidrólisis es catalizada por ácidos minerales, por compuestos que forman jabones de ácidos grasos y por otras sustancias incluyendo sustancias lipolíticas.

### 2.2.5 ESTERIFICACION.

Si la reacción deseada es la inversa de la indicada anteriormente puede hacerse completamente por remoción continua del agua de la zona de reacción. En esta reacción otro alcohol diferente del

glicerol toma el lugar de este.

#### 2.2.6. SAPONIFICACION CON ALCALIS.

Si la grasa es descompuesta por un álcali para dar una sal de ácido graso ó jabón de metal alcalino y glicerol, la reacción es llamada de saponificación.

#### 2.2.7. REACCION CON UREA.

Los ácidos grasos, así como otras cadenas alifáticas hidrocarbonadas son capaces de reaccionar con urea para formar complejos, los que pueden ser disociados posteriormente por disolventes.

#### 2.3. PRINCIPALES FUENTES DE OBTENCION DE ACIDO LINOLEICO.

En general hay muchas grasas y aceites que contienen ácido linoleico, pero hay algunas en que su contenido es especialmente alto, entre estas tenemos varios aceites vegetales comestibles tales como; aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de girasol y otros. En especial describiremos este último ya que, además de que es el objetivo de este trabajo, su importancia mundial ha crecido debido a las características agronómicas de la planta, a la cantidad de aceite contenido en la semilla de dicha planta (de donde se extrae el aceite), y también por que es un aceite de calidad para diversos usos, su producción mundial ha aumentado en

años recientes llegando a ocupar uno de los primeros lugares en la producción de aceites comestibles.

El girasol es originario de México y puede ser establecido su crecimiento silvestre acuí. Fue introducido en Europa en el siglo XVI y gradualmente se hicieron importantes cosechas en Europa oriental y especialmente en Rusia, en donde la molienda de la semilla de girasol para aceite abrió una importante industria en el siglo XIX.

Se pueden cultivar numerosas variedades de girasoles, estas pueden ser divididas de acuerdo a su tamaño en: variedades altas o gigantes las cuales pueden tener de 2.50 mts a 4.30 mts de altura las variedades enanas o chaparras que pueden tener de 1.20mts a 2.10 mts de altura y los variedades intermedias. Los tallos generalmente son delgados llegando a medir en las variedades altas hasta 3.5cm de diametro. El tipo de suelo que requiere es arcilloso. El clima mas apropiado para su crecimiento es templado.

El girasol recibe el nombre científico de Helianthus annuus y pertenece a la familia de las plantas compuestas. El término procede de las voces griegas Helios= sol y Anthus=flor. El nombre de girasol se debe a que en las mañanas el disco floral mira hacia el oriente, al medio dia mira hacia el zénit y continua la trayectoria aparente del sol hacia el poniente. Esta propiedad heliotrópica posiblemente se deba a la sensibilidad a la luz o al calor o a reacciones fotoquímicas en algunos tejidos de la planta

El contenido de aceite de la semilla de girasol varía sobre un considerable rango de alrededor de 22% a 36%, siendo las semillas de las variedades chaparras las preferidas para la extracción

del aceite, ya que contienen mayor porcentaje de aceite, y , además su corto tamaño y mayor uniformidad de peso hacen la operación de extracción mas práctica.

El aceite crudo de girasol tiene un rango de color que va de color amarillo claro a color ámbar oscuro y contiene algunos fosfátidos y materia mucilaginosa, su contenido de ácidos grasos libres es aproximadamente 0.5%. Tiene un olor distintivo pero no desagradable ni ofensivo.

El aceite de girasol es fácilmente refinado, y ya, en esta condición es un aceite amarillo claro el cual es apropiado para uso como aceite de cocina, y puede ser hidrogenado con baja pérdida para uso en margarinas, mantequillas y otros usos. Es un aceite altamente insaturado pero con un bajo contenido de ácido linoléico por lo que no se enrancia fácilmente lo que es una ventaja cuando es usado como alimento.

Algunas características analíticas y estándares generales recomendados por la Codex Alimentarius Commission (CAC) están dados en la tabla I.

Pocos aceites vegetales reflejan la influencia del clima, temperatura, factores genéticos y localización tan significativamente en su composición como el aceite de girasol. Promedios de ácido oleico y ácido linoleico de aceite de girasoles desarrollados en el norte comparado con aceite de girasoles desarrollados en el sur varían en ácido linoleico de 68% a 44% y ácido oleico de 19% a 47%.

La distribución Linoleico/Oleico es mas afectada en su desarrollo por las temperaturas; lo caluroso del clima da bajo contenido de ácido linoleico y alto contenido de ácido Oleico. De cualquier manera predomina el alto contenido de ácido Linoleico. Composiciones comparativas de ácidos grasos del aceite de diferentes fuentes estan mostrados en la tabla II.

El aceite de girasol US para comercio internacional es gobernado por reglas de la American Fats and Oils Association regla I4 (Tabla III) y será puro y producido solamente de semilla de girasol de un promedio de calidad bueno.

El aceite de girasol contiene altos niveles de alfa-tocoferol, que es la forma mas activa de la vitamina E.

El contenido de fosfolípidos varia de 0.5% a 1.0% y cerca de la mitad son extraídos con el aceite.

Los glicéridos de aceite de girasol consisten principalmente de triglicéridos mezclados conteniendo uno o dos radicales de ácido Linoleico. Como la proporción de ácido Linoleico varia sobre un considerable rango, la composición de glicéridos varia mucho, y en aceites con altas proporciones de ácido Linoleico considerables cantidades de trinolein (tres radicales de ácido Linoleico en el triglicérido ) pueden estar presentes.

TABLA I

Características analíticas y estándares generales recomendados por la Codex Alimentarius Commission (CAC)

Valor de Iodo	110-143
Indice de Refracción (40°C)	1.467-1.469
Valor de saponificación	188-194
Materia Insaponificable (mgKOH/g)	1.5% máximo
Gravedad específica 20/20 C	0.918-0.923
Densidad 60°C	0.897

TABLA II

Composición de ácidos grasos

ácidos grasos	norte	sur	Canada	Argentina	Rusia
Palmitico	5.28	5.1	6.3	5.7	6.0
Esteárico	4.24	3.9	4.2	3.0	5.6
Oleico	18.40	26.0	18.3	24.0	17.8
Linoleico	70.4	64.4	69.0	66.0	68.7
Linoléico		0.5	0.4	T	0.2

TABLE III

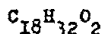
Regla 14 de la American Fats and Oils Association

Valor de saponificación	188-194
Insaponificable	1.3% maximo
Acidos grasos libres (como Oleico)	2.0% maximo
Humedad y sustancias volátiles (AOCS Método Ca 2d-25)	0.5% maximo
Impurezas insolubles (AOCS Método Ca 3-46)	0.3% maximo
Color (AOCS)	rojo 2.5 maximo
Acido Linoléico	1.0% maximo

2.4. ACIDO LINOLEICO.

Acido octadecadienoico, ácido Linólico, cis-9, cis-12 ácido octadecadienoico (ácido Linoleico)

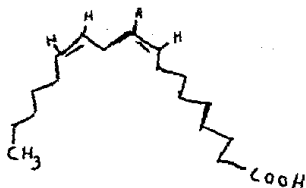
Formula condensada



Peso Molecular

280.44

Formula desarrollada



Descripción; Acido graso esencial componente de la vitamina F, mayor constituyente de muchos aceites vegetales como; aceite de semilla de algodón, de soya, de cacahuate, de girasol, etc., donde este se encuentra como un glicérido. Ingrediente característico de aceites semisecantes.

Propiedades físicas y químicas; aceite incoloro, fácilmente oxidado por aire, no puede ser destilado sin descomposición. Es recomendado su almacenamiento en forma de éster.

Fácilmente soluble en éter, soluble en alcohol absoluto, miscible en dimetil formamida y disolventes de grasas y aceites.

$d_4^{20}$  0.9038;  $d_4^{25}$  0.9007, Punto de Fusión =  $-12^{\circ}\text{C}$

Punto de ebullición a 1.4mm de Hg =  $202^{\circ}\text{C}$

Punto de ebullición a 16mm de Hg =  $230^{\circ}\text{C}$

$n_D^{20}$  1.4715       $n_D^{25}$  1.4588       $n_D^{30}$  1.4699

Valor de Iodo = 172.4,      Valor de Tiocianógeno = 96.7

## 2.5 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LOS ESTERES DEL ACIDO LINOLEICO.

Metil linoleato; éster metílico del ácido 9-12 octadecadienoico

Fórmula condensada;  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$

Peso molecular; 294.46

Aceite incoloro,  $d_4^{20}$  0.8886, Punto de fusión =  $-35^{\circ}\text{C}$

Punto de ebullición a 16mm de Hg =  $212^{\circ}\text{C}$

Punto de ebullición a 4mm de Hg =  $192^{\circ}\text{C}$



$n_D^{25} = 1.4593$ , Valor de Iodo = 172.4.

Mas estable a la oxidación por aire que el ácido linoleico. Miscible en dimetil formamida y en disolventes de grasas y aceites.

Etil linoleato; Etil éster del ácido 9,12 octadecadienoico.

Formula condensada;  $C_{20}H_{36}O_2$

Peso molecular; 308.49

$d_4^{12.5} = 0.8846$ ,  $d_4^{20} = 0.8919$

Punto de ebullición a 0.001mm de Hg = 133°C

Punto de ebullición a 2.5mm de Hg = 175°C

$n_D^{20} = 1.4673$ ,  $n_D^{25} = 1.4498$

Valor de Iodo = 162.5

Aceite incoloro, mas estable a la oxidación por el aire que el ácido linoleico.

Miscible con dimetil formamida y disolventes de grasas y aceites.

### CAPITULO III. METODOS DE EXTRACCION.

Aceites, grasas ó ácidos grasos mezclados se pueden fraccionar en sus diversos componentes para proveer nuevos materiales que sean más útiles que los primeros para propósitos específicos. Así, por ejemplo, de los ácidos grasos de sebo puede obtenerse ácido esteárico y Oleico que tienen diferentes aplicaciones industriales. En otros casos se pueden utilizar técnicas de fraccionamiento para obtener grasas con ciertas características deseadas, tal es el caso por ejemplo, de la producción del equivalente de manteca de cacao a partir de aceite de palma, y de aceites de soya y algodón hidrogenados. Por lo que podemos concluir que las técnicas de fracciónación tienen muchas aplicaciones.

En nuestro caso el objetivo es obtener un concentrado de ácido Linoleico que pueda ser introducido en alguna forma farmacéutica, y desifocada adecuadamente, ya que, como veremos posteriormente, este tiene una serie de acciones dentro del organismo, y su deficiencia puede causar algunos trastornos.

Las técnicas de fraccionamiento pueden ser aplicadas a grasas, aceites y ácidos grasos, sin embargo, es obvio que en el caso de grasas y aceites así como tal, el grado de separación de los ácidos grasos es muy limitado, ya que, los ácidos grasos se encuentran mezclados en la molécula de glicerol, formando la molécula de triglicérido, como es el caso del aceite de girasol, por ejemplo, que consiste principalmente de triglicéridos mezclados conteniendo uno o dos radicales de ácido Linoleico. Los glicéridos

tienden a tener las características promedio de los ácidos grasos, ya que tres diferentes ácidos de diversa naturaleza y propiedades pueden estar combinados en una sola molécula de glicerol. Por lo que la separación de un aceite en fracciones no lleva a una separación efectiva de los ácidos grasos. Desde este punto de vista el objeto del fraccionamiento es en general una modificación de la textura, cristalización y comportamiento de fusión.

Si el fraccionamiento es llevado a cabo en los ácidos grasos libres ó sus monoésteres, la separación obtenible es solamente limitada por la eficiencia de los métodos de fraccionamiento, y con el uso de técnicas suficientemente efectivas podría ser llevada a una separación casi cuantitativa de los ácidos ó ésteres individuales.

El primer reporte de separación de ácidos grasos que apareció en la literatura fue hecho en 1828 (13), cuando un alemán llamado Gussierow separó ácidos grasos lineales saturados de ácidos grasos lineales insaturados, preparando primero la sal de plomo de los ácidos correspondientes, disolviendo las sales mezcladas en éter etílico, y después separando los ácidos grasos menos solubles de los ácidos grasos insaturados mas solubles. Debido a que este método de separación fue muy eficiente, muchos investigadores con el tiempo han preparado varias sales de ácidos mezclados y estudiado su fraccionamiento en varios sistemas de disolventes. La separación de ácidos grasos por éste procedimiento nunca ha sido aplicado comercialmente por que no es económico el proceso, sin embargo, después del advenimiento de la cromatografía gas-líquido éste metodo fue frecuentemente usado como una herramienta

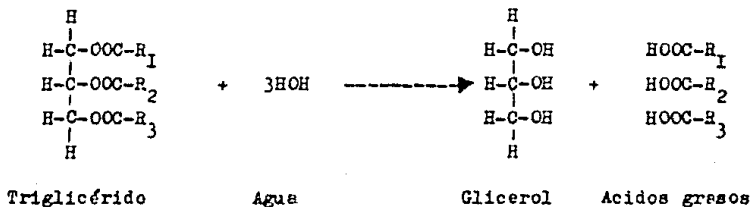
analítica. De hecho la American Oil Chemist's Society métodos oficiales describe un procedimiento de separación de sales de plomo para analizar mezclas de ácidos grasos.

Actualmente existen reportados en la literatura una gran cantidad de procesos relativos al fraccionamiento de grasas y aceites los cuales se basan en diversas propiedades específicas de los ácidos grasos, tales como puntos de fusión, puntos de ebullición, algunas reacciones químicas y otras.

Aquí describiremos algunos de los métodos que se emplean comercialmente y de otro que podría ser empleado mas específicamente para el logro del objetivo de este trabajo.

Como se mencionó anteriormente los procedimientos de fraccionamiento son mas efectivos cuando estos son llevados a cabo en los ácidos grasos libres ó sus monoésteres, por lo que describiremos algunos aspectos generales de dichos procesos.

En términos generales la liberación de los ácidos grasos puede hacerse por medio de una hidrólisis de los triglicéridos presentes en el aceite o grasa de acuerdo a la siguiente reacción.



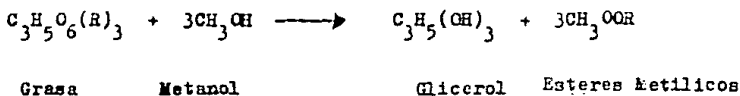
Esta reacción puede ser acelerada por la presencia de ácidos minerales y ciertos óxidos de metales, incluyendo particularmente óxidos de zinc y de magnesio, la temperatura y la presión también juegan un papel importante en esta reacción, ya que conforme estas se incrementan la velocidad de reacción también se incrementa. Como al incrementar la presión la velocidad de reacción también aumenta esta podría ser llevada a cabo en autoclave para obtener ácidos grasos libres que son fácilmente descompuestos por la temperatura (como Linoleico).

Otra forma de obtener los ácidos grasos libres es; primero saponificando la muestra con una base alcalina como hidróxido de sodio ó de potasio, después acidificando la muestra con algún ácido mineral como sulfúrico ó clorhídrico y después extraer los ácidos grasos liberados por medio de algún disolvente. Con el fin de ilustrar este caso citamos el siguiente ejemplo:

Preparar una solución NaOH/ETOH acuoso de la siguiente manera (29); Disolver 150g de NaOH y 1.56g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en 500 ml de agua destilada (el  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  se usa como agente secuestrante de iones metálicos que pudieran encontrarse, como iones de cobre ó de hierro, ya que estos aceleran la oxidación de ácidos grasos insaturados) a esta solución se le agregan 500 ml de etanol. En esta solución poner 50g de aceite y calentarlo con agitación a  $60^\circ\text{C}$  por 30 min. Después de la saponificación se le agregan 20 ml de agua y se enfría a temperatura ambiente, a esta solución se le adicionan 200 ml de hexano y se agita por 30 min, la capa superior que contiene materia insaponificable es descargada. A la

capa inferior se le agrega ácido clorhídrico concentrado, con agitación hasta tener un  $\frac{H}{P} = 1$ , de nuevo aparecen dos capas, la capa baja es descargada y la capa superior de hexano es evaporada a un pequeño volumen con agitación, al vacío y a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Por lo que respecta a la formación de monoésteres, esta reacción es llevada a cabo con alcoholes monohídricos de bajo peso molecular, tales como, metanol ó etanol, es catalizada por ácidos ó álcalis y la reacción se lleva a cabo fácilmente a bajas temperaturas. este proceso tiene sus ventajas con respecto al otro, ya que, aparte de que se lleva a cabo fácilmente y no requiere equipo especial que sea resistente a la corrosión, además los monoésteres son mas estables que los ácidos grasos libres. Cuando el alcohol que se usa es el metanol, la reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



La reacción puede ser llevada en un tanque abierto el cual puede ser construido de acero ordinario. La grasa debe estar clara, seca y substancialmente neutra. La grasa se calienta aproximadamente a  $80^{\circ}\text{C}$ , y se le adiciona alcohol metílico en el cual va disuelto de 0.1% a 0.5% de sosa ó potasa cáustica ó una cantidad equivalente de un ácido mineral fuerte. La cantidad de alcohol recomendada en caso de usar sosa ó potasa cáustica como catalizador es

de 1.6 veces la cantidad teórica requerida para llevar a cabo la reacción, pero en el caso de usar ácido mineral fuerte como catalizador se requiere de un gran exceso de metanol para que se lleve a cabo la reacción. Después de la adición del alcohol, la mezcla es agitada por unos pocos minutos, y después se deja reposar. El glicerol empieza a separar casi inmediatamente, como es virtualmente anhidro y más pesado que los otros líquidos rápidamente se asienta para formar una capa en el fondo del tanque. La capa baja de glicerol contiene no menos del 90% de glicerol originalmente presente en la grasa y la capa superior consiste de los metil-ésteres, la mayoría del alcohol que quedó sin reaccionar, el álcali, el remanente de glicerol y muy pequeñas cantidades de jabón. Estas impurezas son eliminadas de los ésteres por lavados sucesivos con pequeñas cantidades de agua caliente. Específicamente para el aceite de girasol la preparación de los monoésteres a nivel laboratorio se puede llevar a cabo de la siguiente manera (30):

Acetate de girasol (177.8g) y metanol anhidro (1 litro) fueron calentados juntos a reflujo por 5 horas junto con ácido sulfúrico concentrado (30 ml). Los productos fueron transferidos a un embudo de separación con éter de petróleo (300 ml) y lavados con agua hasta que los lavados fueron neutros (3 veces con 500 ml). Las emulsiones que se formaron durante los periodos de lavado fueron rápidamente rotas por la adición de cloruro de sodio, la capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y el disolvente eliminado bajo vacío. El producto esterificado (169.2g,

95.2%) fue obtenido como un líquido movedizo color ámbar palido. La destilación bajo presión reducida dio los ésteres metílicos puros (144g, 81% sobre las bases originales).

Independientemente de los procesos que han de ser usados para el fraccionamiento de ácidos grasos es importante definir ciertas especificaciones de calidad de la materia prima.

Es obvio que el contenido de mono, di y triglicéridos así como otras impurezas deberá ser tan bajo como sea posible. Para obtener productos de alta calidad, es así mismo necesario empezar con material crudo no dañado en los ácidos, como por ejemplo que éstos pudieran estar oxidados, polimerizados, etc. Frecuentemente se hace necesaria una destilación sobre el material crudo para obtener los ácidos grasos ó sus monoésteres lo más puro posible. Entre los principales procesos citados para la separación de los ácidos grasos están los que describiremos a continuación.

### 3.1 PRESION MECANICA.

Este proceso (13, 16) frecuentemente referido como "Panning and Pressing" es uno de los métodos más viejos y básicamente es muy simple. En este proceso los ácidos grasos saturados son separados de los insaturados por medio de los siguientes pasos: Primero se funde la mezcla de ácidos grasos (en caso de ser sólidos), después se vierten estos en cestos de aluminio poco profundos, éstos se someten a enfriamiento lento hasta que se forma un sólido. Este sólido está formado de cristales de ácidos grasos de alto punto de fusión y líquido de bajo punto de fusión que ocupa el lugar



entre los cristales. El sólido formado es separado del cesto, envuelto en tela ó paño de algodón, puestos en prensas verticales, y presionados lentamente para excluir la fracción líquida de bajo punto de fusión conocida como oleína, y que es donde van la mayoría de los ácidos grasos insaturados quedando la fracción sólida conocida como estearina y que es donde quedan la mayoría de los ácidos grasos saturados. En el caso de separación de ácidos grasos de sebo la temperatura final del sedimento presionado determina el título de la fracción de ácido oleico y el valor de iodo de la fracción de ácido esteárico.

Los sólidos remanentes en las prensas son fundidos y vendido como ácido esteárico presionado-simple ó bien son re-fundidos y de nuevo vertidos en cestos, solidificados, envueltos y presionados a baja temperatura para dar ácido esteárico presionado-doble, y el correspondiente ácido oleico, ó bien repetir el proceso y obtener ácido esteárico presionado-triple.

En la tabla IV se dan los valores de iodo de varios productos de ácido esteárico y los correspondientes títulos de los productos de ácido oleico cuando se aplica este método para la separación de ácidos grasos de sebo.

Este proceso ha sido practicado por muchos años especialmente sobre ácidos grasos de sebo, con resultados medianamente buenos.

La estructura óptima de cristales es obtenida cuando los ácidos saturados de la mezcla de ácidos grasos tiene una composición aproximada del 55% de ácido palmítico y 45% de ácido esteárico. La mayoría de las mezclas de origen vegetal no tienen la proporción citada anteriormente de ácido palmítico a ácido esteá-

rico y por lo tanto, no son apropiados para ser separados por presión mecánica.

Este procedimiento es actualmente usado en viejas instalaciones con capacidades bajas. La principal desventaja son los altos costos de labor, así como, es difícil mecanizar y automatizar el proceso.

TABLA IV

Separación de ácidos grasos de sebo por el proceso Panning and Pressing

Tipo de producto	V.I. de la fracción sólida	Título de la fracción líquida
Presionado simple	8-12	6-10°C
Presionado doble	5-8	2-5°C
Presionado triple	1-3	2-5°C

### 3.2 PROCESO DE HIDROFILIZACION

Este proceso (II, I3, I6) conocido a veces como el proceso Henkel, el proceso Lanza ó el proceso Lipofrac. El principio básico de este proceso es simple y puede ser ilustrado por una prueba de laboratorio. Una mezcla parcialmente cristalizada de ácidos grasos o sus monoésteres es mezclada con una solución de agua/agente humectante. Después del mezclado la suspensión es centrifugada y ocurre una separación de fases. La fracción ligera, es decir, los ácidos grasos insaturados (la fracción oleína) pasan a la superficie del tubo de centrifuga. La fracción intermedia es una

suspensión de cristales de grasa en la solución de agua, y la porción del fondo es mas o menos una solución libre de grasa. Lo que ha pasado es que los cristales de ácidos grasos (los ácidos grasos saturados) son humedecidos por la solución de agua y son transferidos del aceite líquido a la solución de agua, y cuando ésto ha ocurrido las gotas de aceite líquido coalescen y la fase ligera de aceite puede ser separada de la suspensión pesada de cristales en solución de agua por medio de fuerza centrífuga.

La prueba de laboratorio anteriormente descrita puede ser útilmente aplicada a un proceso industrial continuo. Como es mostrado en la figura (I). La estructura de cristal de los ácidos grasos es comparativamente simple comparada con la estructura de triglicéridos y es posible enfriar y cristalizar ácidos grasos rápidamente para la separación en los procesos de hidrofiliación. Los ácidos grasos fundidos son bombeados a través de una superficie cambiadora de calor, donde los ácidos grasos son enfriados y parcialmente cristalizados a una temperatura deseada por medio de un líquido frío apropiado como por ejemplo agua. El límite de la temperatura inferior es la temperatura de congelamiento de la solución agua/agente humectante aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$ . Los ácidos grasos cristalizados son después mezclados con la solución agua/agente humectante, el cual es preferiblemente decilsulfato de sodio y un electrolito como sulfato de sodio ó de magnesio. La mezcla se pone en un mezclador de pequeño volumen y alto rompimiento para dar un intenso mezclado y desintegración de grupos de cristales. Después esta pasa a un mezclador de gran volumen

y baja capacidad de rompimiento donde ocurre una fase de reversión y coalescencia la composición y la cantidad de la solución acuosa humectante son parámetros importantes para un fraccionamiento óptimo.

La dispersión formada en los mezcladores es separada en el primer separador centrífugo, la fase ligera consiste de los ácidos grasos insaturados (oleína), y la fase pesada es la suspensión estearina/agente humectante. En este punto la oleína es tomada para almacenamiento ó tratamientos adicionales.

Después de abandonar el separador, la suspensión restante es bombeada a través de un cambiador de calor regenerativo donde es precalentada por solución de detergente caliente, después es adicionalmente calentada a aproximadamente  $90^{\circ}\text{C}$  por vapor. Los cristales de estearina son así fundidos y la emulsión formada es separada en una segunda centrífuga. La solución acuosa es recirculada al proceso.

Por este proceso es posible fraccionar todas las clases de ácidos grasos. La temperatura de enfriamiento en la primera separación tiene mucha influencia sobre la separación de los ácidos grasos. Así por ejemplo, cuando esta temperatura es elevada, es decir, aproximadamente  $20-25^{\circ}\text{C}$  se obtiene una fracción de estearina mas pura, pero la fracción oleína sale con muchos ácidos grasos saturados en solución. A temperaturas bajas aproximadamente de  $2-3^{\circ}\text{C}$ , la fase oleína sale mas pura, pero la fase estearina queda mas contaminada con ácidos grasos insaturados. Es posible obtener mejores separaciones, sobre todo de ácidos saturados e insaturados

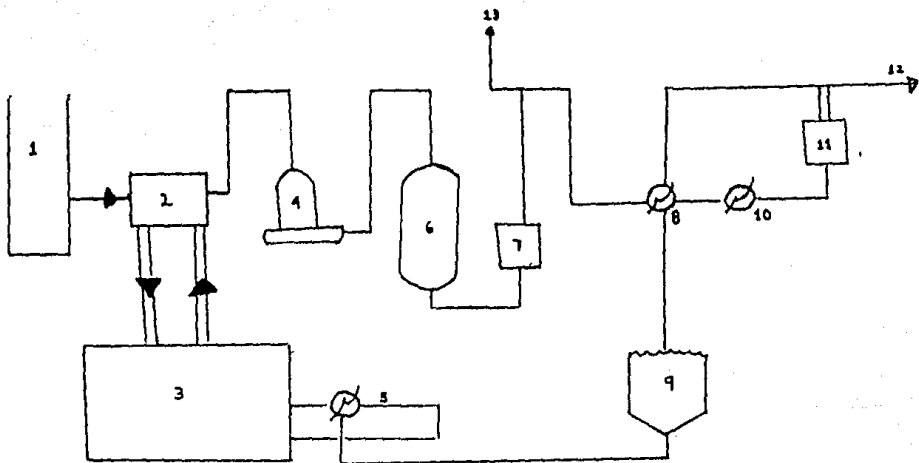


FIGURA No. 1  
 FRACCIONACION DE ACIDOS GRASOS  
 ( PROCESO DE HIDROFILIZACION ).

- 1).- Tanque de alimentación
- 2).-Cristalizador
- 3).- Unidad de refrigeración
- 4).- Mezclador I
- 5).- Cambiador de calor I
- 6).- Mezclador II
- 7).- Separador I
- 8).-Cambiador de calor II
- 9).- Solución detergente
- 10).-Cambiador de calor III
- 11).- Separador II
- 12).- fracción de estearina
- 13).- fracción de oleína

haciendo un fraccionamiento en dos periodos, por ejemplo, haciendo el primer fraccionamiento a 20-25<sup>o</sup>C, y después un segundo fraccionamiento de la fase oleina a 2-3<sup>o</sup>C.

Cantidades típicas de consumo de substancias por toneladas de ácidos grasos ha ser fraccionados están dados en la tabla (V)

TABLA V

Consumo de substancias por tonelada de ácido graso	
Vapor (120 <sup>o</sup> C)	170 Kg
Agua para el proceso	0.2 m <sup>3</sup>
Agua fría (recirculación)	1 m <sup>3</sup>
Decilsulfato de sodio	2-5 Kg
Sulfato de sodio	1-2 Kg

### 3.3. PROCESO DE FRACCIONAMIENTO CON AYUDA DE DISOLVENTES

Este sistema se basa en las siguientes operaciones:

- a).- Disolución del producto a fraccionar en un disolvente en adecuada relación de volúmenes.
- b).- Enfriamiento de la solución, en determinadas condiciones tiempo-temperatura, con el fin de cristalizar los ácidos grasos saturados.
- c).- Separación de los cristales en filtros adecuados.
- d).- Recuperación por destilación del disolvente, tanto de la fase sólida cristalizada, como de la fase líquida.

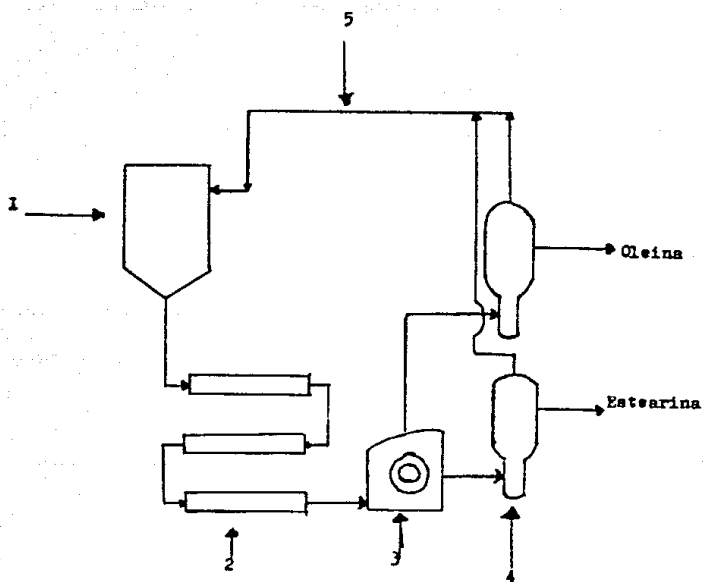
En la figura (2) vemos el esquema de un proceso que utiliza las operaciones de fraccionamiento anteriormente descritas el cual es conocido como el proceso "Emersol".

En el proceso "Emersol", los ácidos grasos son disueltos en metanol, continuamente bombeados a un cristizador multitubular enfriado a  $-10^{\circ}\text{C}$  por medio de líquido refrigerante, equipado con una serie de cuchillos giratorios para evitar que se depositen sobre las paredes del cristizador los ácidos grasos cristalizados y después filtrados en un filtro rotatorio continuo para separar la fracción sólida cristalina de alto punto de fusión de la fracción líquida de bajo punto de fusión, el sólido del filtro es fundido y destilado para remover el metanol y recobrar el ácido graso de alto punto de fusión, así mismo, el metanol es destilado de la fracción líquida para recobrar el ácido graso de bajo punto de fusión (insaturados).

Entre los factores que más influyen en este proceso de fraccionamiento están:

- a).- Composición de la materia grasa original.
- b).- Disolvente, generalmente se seleccionan disolventes polares, ya que estos presentan ciertas ventajas como: Producción de cristales tipo-aguja con buenas características de lavado y filtrado, no requiere de temperaturas muy bajas de cristalización y su miscibilidad con agua por lo cual la reducción de solubilidad de ácidos grasos se puede obtener fácilmente
- c).- Temperatura de cristalización, esta depende principalmente del disolvente empleado.
- d).- Relación de la proporción disolvente/ácido graso. En el proceso Emersol se emplea metanol al 90% como disolvente, una





FRACCIÓNACION DE ACIDOS GRASOS

( Proceso con ayuda de disolventes )

FIGURA 2

- 1).- Tanque de alimentación
- 2).- Cristalizadores
- 3).- filtro
- 4).- Columnas de separación
- 5).- Recirculación de metanol

temperatura de cristalización de  $-10^{\circ}\text{C}$  y una proporción de disolvente/ácido graso de 4.

Si se quiere obtener un producto con alto porcentaje de ácidos insaturados, es necesario someter a la fase líquida obtenida a una segunda etapa de fraccionamiento similar a la primera donde se modifica la relación de disolvente/ácido graso, y la temperatura de cristalización.

### 3.4 TÉCNICA DE FRACCIONAMIENTO CON UREA.

La formación de complejos de urea con compuestos orgánicos de cadena recta fué descubierta por Bengen en 1940.

La estabilidad de estos complejos varía de acuerdo al tipo de compuesto complejado. Este fenómeno hace posible llevar a cabo separaciones de ciertos compuestos orgánicos variando la temperatura, concentración de urea y concentración del disolvente.

Las investigaciones han mostrado que es posible separar mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos ó ácidos grasos debido a su grado de insaturación, estos estudios han mostrado que las estabildades de complejos de urea decrecen conforme el grado de insaturación se incrementa.

Estas investigaciones se llevarón a cabo de diferentes formas, como las siguientes:

En un método se incrementa la adición de urea al sistema ácido graso/disolvente para obtener paulatínamente incrementos de los complejos más inestables de urea, es decir, primero reaccionan

los más estables y después los más inestables. En otro método los ácidos grasos son completamente convertidos en complejos de urea y eluidos con diferentes cantidades de disolventes, por este método los complejos más inestables son eluidos primero, mientras que, incrementos adicionales de disolventes permiten eluir progresivamente a los complejos más estables.

#### 3.4.1. DESCRIPCION DEL METODO.

Los ésteres metílicos del aceite fueron preparados por metanolisis del aceite y metanol anhidro (22, 26), usando hidróxido de potasio como catalizador, el producto esterificado fué lavado después con agua fría destilada acidificada y extraídos con éter etílico. El extracto fué lavado para dejarlo libre de ácidos minerales y secado sobre sulfato de sodio anhidro y removido el éter por vacío.

#### 3.4.2. FRACCIONAMIENTO POR EL METODO DE ELUCION DE LOS COMPLEJOS DE UREA.

El procedimiento general seguido por este método, fué disolver los ésteres metílicos ó ácidos grasos en mezclas de urea espolvoreada en etanol al 95%, la mezcla fué calentada y dejada reposar toda la noche a temperatura ambiente.

El complejo obtenido fué filtrado a través de un filtro de vidrio por succión, se fueron agregando cantidades adicionales al

complejo y el procedimiento de filtración fué repetido. Esta técnica de elución fué repetida varias veces cada uno de los filtrados así obtenidos fué concentrado evaporando el etanol con presión reducida. El residuo fué tratado con agua destilada acidulada, lavado para dejarlo libre de ácidos minerales y extraído con éter. Los extractos de éter fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y evaporados para remover el éter, cada una de estas fracciones analizada por valores de Iodo y saponificación. Asumiendo que las fracciones son mezclas binarias, los pesos moleculares medios de los ácidos grasos saturados en cada una de las fracciones pueda ser calculado de los valores de saponificación después de la corrección para el ácido oleico.

### 3.4.3. FRACCIONAMIENTO POR EL METODO CUMULATIVO.

Aproximadamente 25g de ácidos grasos mezclados fueron diluidos a volúmen con 500 ml de metanol, porciones de 50 ml de esta solución fueron colocadas en diferentes matraces conteniendo diferentes cantidades de urea, después fueron calentados y dejados reposar toda la noche. Los complejos fueron filtrados por succión, cada uno de los filtrados fué llevado a 100 ml con metanol, fué determinado la acidez titulable de alícuotas de 25 ml de cada uno de los filtrados. Los complejos de urea fueron descompuestos de una manera similar al método de elución y los ácidos obtenidos fueron analizados por valor de iodo y neutralización. Este método disminuye la cantidad de errores durante la extracción.

TABLA V

FRACCIONACION DE ESTERES METILICOS DE ACIDOS GRASOS DE ACEITE DE  
 CARTAMO CON UREA (MATERIALES INICIALES: 50g DE ESTERES METILICOS,  
 100g DE UREA, 250 ml DE ALCOHOL ETILICO.

FRACCION No	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL
ml DE ETANOL USA- DOS	250	200	200	200	150	150	RESI- DUO	.....
% DE ELUIDO	33.94	17.90	11.40	10.16	10.16	6.12	6.58	95.25
VALOR DE IODO DE FRACCION	159.7	153.0	145.5	130.4	105.9	72.7	74.1	.....
VALOR DE SAPONIPI- CACION DE FRACCION	190.6	.....	190.8	.....	198.4	191.3	199.5	.....
VALOR DE SAPONIPI- CACION DE ESTERES SATURADOS	.....	.....	.....	.....	.....	201.5	201.4	.....
% DE SATURADOS C <sub>18</sub>	.....	.....	.....	.....	.....	0.29	1.72	2.01
% DE SATURADOS C <sub>16</sub>	.....	.....	.....	.....	.....	0.64	3.78	4.42
% DE ESTER OLEICO	5.00	4.02	3.54	4.93	7.69	5.19	1.08	31.45
% DE ESTER LINOLEI- CO	28.94	13.88	7.86	5.23	2.47	.....	.....	58.38

Si  $x$  es la lectura de la titulación para la alícuota no tratada con urea y  $X_1, X_2, X_3$ , etc. son las lecturas de la titulación para los filtrados, entonces los pesos de los ácidos grasos serán  $X_1f/x, X_2f/x, X_3f/x$ , etc. donde  $f$  es el peso total de los ácidos grasos en cada experimento. El peso de los ácidos grasos en los complejos es la diferencia entre los ácidos grasos totales y la cantidad de los filtrados. La cantidad adicional de ácidos grasos complejados por incrementos adicionales de urea puede ser llamada la fracción diferencial; si  $a_1, a_2, a_3$ , etc. representan los ácidos grasos en cada uno de los complejos, entonces sus diferencias en peso ( $a_2 - a_1$ ), ( $a_3 - a_2$ ), etc. representan los pesos de las fracciones diferenciales. Los valores de Iodo de las fracciones diferenciales pueden ser calculadas como sigue:

$$\text{V.I. fracción diferencial } I = \frac{(I.V.a_2)(WTa_2) - (I.V.a_1)(WTa_2)}{WTa_2 - WTa_1}$$

La composición de ácidos grasos puede ser calculada de los valores de Iodo de las fracciones diferenciales suponiendo que cada una de las fracciones sea una mezcla binaria de ácidos grasos. Un conjunto típico de datos obtenidos por este método está mostrado en la table VI.

Entre los factores que afectan la estabilidad de los complejos y por lo tanto la separación de los complejos de los ácidos grasos están los siguientes:

TABLA VI  
FRACCIONACION DE ACIDOS GRASOS DEL ACEITE DE SESAMO POR EL METODO  
CUMULATIVO

OBSERVACION No	1	2	3	4	5	6	7	8	ACIDOS MEZCLADO
UREA ADICIONADA (g)	6	7	8	9	10	11	13	16	.....
TITULACION KGE-ALC. 25 ml DE FILTRADO	28.5	26.3	23.0	20.0	13.6	12.0	9.10	3.30	34.1
PESO DE ACIDOS GRA- SOS EN EL FILTRADO (g)	2.1048	1.9360	1.68 28	1.4720	1.000 8	0.868	0.669	0.2428	2.509
VI DE ADUCTOS DE ACIDOS	28.50	36.56	47.20	55.84	73.19	77.40	86.30	104.5	113.5
VALOR DE NEUTRALIZA- CION DE ADUCTOS ACI- DOS	.....	.....	202.0	201.1	200.4	200.4	200.4	200.3	.....
PESO DE ACIDOS GRA- SOS EN ADUCTOS (g)	0.404	0.573	0.826	1.037	1.508	1.611	1.840	2.266	2.509
PESO DE FRACCION DIFERENCIAL (g)	0.404	0.168	0.253	0.210	0.471	0.102	0.228	0.426	0.242
FRACCION DIFEREN- CIAL (%)	16.15	6.71	10.09	8.38	18.77	4.10	9.10	17.00	9.68
VI CALCULADO DE LA FRACCION DIFERENCIAL	28.5	55.9	71.3	90.0	113.4	140.1	148.9	183.0	197.7
% DE ACIDOS INSAT- URADOS	5.11	4.17	8.63	8.38	18.77	4.10	9.10	17.00	9.68
% DE ACIDOS SATU- RADOS	11.04	2.54	1.46	.....	.....	.....	.....	.....	.....
% DE ACIDO OLEICO	5.11	4.17	8.63	8.38	13.92	1.84	3.21	.....	.....
% DE ACIDO LINO- LEICO	.....	.....	.....	.....	4.85	2.26	5.89	16.62	7.93
% DE ACIDO LINOLE- NICO	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0.38	1.75



La linealidad de la cadena, tamaño de la cadena, insaturación, posición de las dobles ligaduras e isomería.

Estos métodos nos ayudan a trazar curvas de composición de fracciones intermedias. Las proporciones de material graso, urea y disolvente pueden ser ajustadas a una proporción del material graso deseado.

## 4.1 METODO ESPECTROFOTOMETRICO

Fundamento: Los constituyentes naturales conjugados son determinados por medio de la absorción de la región ultravioleta del espectro en longitudes de onda específicas con disolventes purificados. Constituyentes poliinsaturados no conjugados son parcialmente conjugados por calentamiento en solución KOH-Glicol, y las absorciones son redeterminadas. El porcentaje de ácidos conjugados dieno, trieno, tetraeno y pentaeno, son calculadas por unas ecuaciones simultáneas predeterminadas (31, 32, 33).

El método es aplicable a la determinación de poliinsaturados desde el dienoico hasta el pentaenoico, en grasas animales o vegetales conteniendo solamente isómeros cis, solamente pequeñas cantidades de material conjugado preformado y solamente pequeñas cantidades de pigmentos cuya absorción puede sufrir considerable cambio durante la isomerización con álcali. El método no es aplicable ó es aplicable solamente con precauciones específicas a aceites hidrogenados ú otras grasas conteniendo isómeros trans de ácidos grasos insaturados, aceites de pescado o grasas similares conteniendo ácidos mas altamente insaturados que los pentaenoicos. A grasas y aceites conteniendo grandes cantidades de ácidos grasos conjugados preformados.

Equipo utilizado en el método.

a).- Aparato de isomerización; consta de las siguientes partes:  
(ver figura 3)

1.- Baño de temperatura constante con capacidad suficiente para sumergir tubos de prueba de 25mm x 250mm a una profundidad de 114mm. Colocar el baño en una caja aislada con cubierta aislante teniendo cavidades para agitador y soportes de corcho para tubos de ensayo.

2.- Tubos de ensayo pyrex con labio de 25mm x 250mm

3.- Cabezas de distribución fijadas a los tubos de prueba con un tubo en el centro de la cabeza, teniendo ambas terminaciones abiertas y dos pequeños agujeros de 25mm x 38mm respectivamente del fondo.

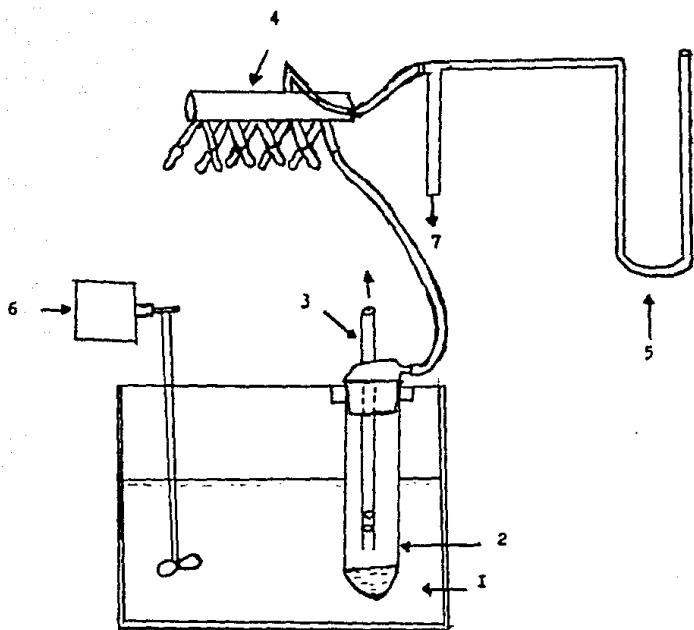
4.- Distribuidor con 10 salidas conectado a un tubo capilar de 50mm de longitud y 1mm de diámetro conectado a las cabezas de distribución por una manguera de goma.

5.- Manómetro de Nitrógeno construido de una tubería de 6mm de diámetro y ajustado de tal manera que mida la velocidad de desplazamiento de nitrógeno que debe ser de 50 a 100 ml/min

b).- Espectrofotómetro, que cubra un rango de 220nm a 360nm con una escala de longitud de onda de 0.1nm

Reactivos utilizados:

a).- Metanol absoluto, se chequea la absorción de una capa de 1cm de longitud contra agua a 220nm y el rango de longitudes de onda usado en el análisis, debe ser menor de 0.4 y la curva debe ser



APARATO DE ISOTERIZACION

FIGURA 3

- 1.- Caja aislante
- 2.- Tubo de muestra
- 3.- Salida de Nitrógeno
- 4.- Distribuidor de Nitrógeno
- 5.- Manómetro
- 6.- Agitador
- 7.- Entrada de Nitrógeno

pareja en el rango de 262-322nm

b).- Isooctano, (2,2,4 trimetil pentano) NBS grado reactivo certificado ó grado espectral, hexano ó ciclohexano son satisfactorios si son obtenidos los requerimientos de absorbancia.

c).- Solución de hidróxido de potasio-glicol. Pesar 750g de etilen glicol en un matraz E.M. de 1 lt, cerrar con un tapón con un orificio conteniendo un pequeño tubo de salida y un tubo interno a una fuente de nitrógeno libre de oxígeno (menos de 0.01% de oxígeno) y burbujear nitrógeno durante todos los periodos de preparación para excluir todo el aire y agitar el líquido ligeramente. Colocar en baño de aceite de 100 a 150°C, elevar la temperatura del baño a 190°C y retener 10 min hasta que se seque el glicol. Remover el baño y dejar que baje a 120°C. Lenta y cuidadosamente adicionar 60g de KOH al 85%, colocar la solución bajo nitrógeno. Regresar al baño de aceite y recalentar el baño a 190°C y mantener esta temperatura durante 10 min. Remover el baño y enfriar, quitar el tapón con orificio y cerrar con tapón sólido, guardar en el refrigerador a 4°C bajo nitrógeno. Checar el contenido de KOH por adición de 10g de la solución de KOH-glicol a 90 ml de metanol neutralizado con HCl 1N cuyo punto final sera detectado con fenolftaleina. Titular con solución estandarizada de HCl 1N hasta que el color rosa desaparesca.

$$\%KOH = ml \times Normalidad \times 5.61 / \text{peso de la solución}$$

Si la concentración de KOH no es de 6.5% a 6.6% secar algo de glicol por calentamiento bajo nitrógeno a 120°C como se hizo anteriormente y ajustar a 6.5% de KOH.

d).- Gas nitrógeno, gas purificado conteniendo menos de 0.01% de oxígeno

#### Procedimiento:

Agitar la muestra de aceite y filtrarla si no esta clara.

a).- Para ácidos poliinsaturados conjugados:

En una cápsula pyrex de 1ml pesar la cantidad suficiente de muestra para dar una lectura de A de 0.2 (aproximadamente 200 mg). Poner la cápsula en 75 ml de isooctano contenido en un matraz de 150 ml y rotarlo hasta disolver la muestra calentando si es necesario. Enfrisar a temperatura ambiente y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, diluir a volumen con disolvente y mezclar perfectamente, medir A en la region del ultravioleta en celdas conteniendo solamente disolvente, diluir la solución si es necesario para que la absorbancia quede en un rango de 0.2-0.8. Tomar las lecturas a las siguientes longitudes de onda; 233 y 268 nm.

Procedimiento de isomerización para ácidos poliinsaturados no conjugados.

Pesar 100mg  $\pm$  0.5mg de la muestra en una cápsula pyrex de 1ml aparte pesar 11  $\pm$  0.1g de la solución de KOH-glicol en un tubo de prueba pyrex de 25 x 250 mm, llevar a cabo dos determinaciones blancos. Cubrir los tubos con las cabezas de distribución y

permitir que pase por los tubos un flujo de nitrógeno entre 50 y 100 ml/min. Permitir que el nitrógeno pase por el tubo un minuto para remover el aire, después sumergir los tubos en el baño a una profundidad de 114 mm en el baño a  $180 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Checar la temperatura frecuentemente y estandarizar el termómetro a intervalos frecuentes.

Después de 20 minutos remover la cabeza de distribución y poner la cápsula de 1 ml con la muestra previamente pesada en uno de los tubos, y en los tubos blancos poner cápsulas sin muestra. Colocar la cabeza de distribución en su lugar remover el tubo del baño y agitar vigorosamente con movimientos circulares durante unos pocos segundos y regresar al baño; después de un minuto examinar la solución, si es clara regresar al baño, si no es clara indicando incompleta saponificación, agitar el tubo 2 o 3 veces y regresar al baño, repetir la operación a intervalos de un minuto hasta que la saponificación sea completa. Colocar el baño a una temperatura de  $180 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Exactamente 25 minutos después de colocar la muestra en el tubo, removerlo del baño limpiándolo y enfriar en un recipiente con agua.

Continuar pasando nitrógeno a través de la solución. Después del enfriamiento remover las cabezas y lavar con metanol purificado, colectando los lavados en el tubo de prueba. Insertar un agitador de vidrio de 30 cm de longitud con fin curvado hasta el fondo del tubo de prueba, remover las capas y mezclar la solución. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 100 ml y diluir a volumen con metanol purificado y mezclar bien. Medir la absorbencia A usando KOH-glicol como blanco de referencia, si se re-



cuiera diluir la solución, hacer diluciones similares con los blancos, si los blancos no chequean repetir las pruebas incrementando el flujo de nitrógeno.

Cálculos:

a).- Absortividad para constituyentes conjugados.

$$a = A/bc$$

Donde:

$a$  = absortividad

$A$  = Absorbancia

$b$  = longitud de celda

$c$  = concentración de la muestra en g/100 ml

Absortividad a 233 nm corregida para absorción para grupos ácidos o grupos éster

$$a_2 = a_{233} - a_0$$

Donde:

$a_0$  = 0.07 para ésteres y 0.03 para jabones y ácidos grasos

b).- ácidos conjugados:

$$\% \text{ de dieno conjugado } C_2 = 0.9Ia_2$$

c).- absortividades para constituyentes no conjugados (después de isomerización). Cálculo de  $a'$  para las longitudes de onda en la determinación

$$a' = A/bc$$

Absortividades a 233 nm corregida para ácidos dienicos conjugados originalmente presentes.

$$a'_2 = a'_{233} - a_2 - 0.02$$

d).- Ácidos no conjugados (como el linoleico)

$$\% \text{ de ácido Linoleico} = X = 1.036 a_2 - 1.324(a_{268}^1 - a_{268}^2)$$

#### 4.2. USO DEL VALOR DE IODO (IV) Y VALOR DE TIOCIANOGENO (TV) EN LA DETERMINACION DE ACIDO LINOLEICO.

El índice ó valor de iodo es la cantidad de iodo absorbida por gramo de grasa ó aceite (31, 49). Constituye una medida del grado de insaturación (número de dobles enlaces). Para su determinación suelen usarse varios métodos, entre estos están: El de HAMMIS, WIJS, KAUFMANN, y otros, en este caso describiremos el primero por ser mas fácil y por que las diferencias numéricas con los otros son despreciables.

Reactivo.

Los official methods de la AOAC recomiendan preparar el reactivo del siguiente modo: Mézclense 825 ml de ácido acético (99.5%) y disuélvase en ellos 13.615g de Iodo, calentando para ello. Enfríese y titúlense 25 ml de esta disolución con tiosulfato de sodio 0.1N. Mézclense otros 200 ml de ácido acético y añádanse 3 ml de bromo. Tómense 5 ml de esta disolución, añádanseles 10 ml de IK al 15% y titúlense con tiosulfato de sodio 0.1N. Calcúlese la cantidad de la disolución de bromo necesaria para duplicar el contenido en halógenos de los restantes 800 ml de la disolución de Iodo del siguiente modo:

$$A = B/C$$

Donde:

A = ml de la disolución de bromo requeridos

B = 800 X equivalente en tiosulfato de I ml de la disolución de iodo

C = equivalente en tiosulfato de I ml de la disolución de bromo.

Si fuera necesario, dilúyase la mezcla de las disoluciones de iodo y bromo con ácido acético a la concentración adecuada. Guárdese a refrigeración en un lugar oscuro.

#### Determinación.

Pésense unos 0.5g de la grasa ó aceite filtrados, 0.25g de filtrado (0.1g si se sabe que es rica en dobles enlaces) en un matraz con tapón de vidrio de 500 ml, disuélvase en 10 ml de  $Cl_3CH$ . Mídase con pipeta 25 ml del reactivo de Nams y añádase al matraz con la grasa dejando escurrir la pipeta durante determinado periodo de tiempo, déjese en reposo durante exáctamente 30 minutos, el exceso de iodo añadido no debe ser inferior al 60%. Añádase 10 ml de una disolución de IK al 15%, agítase intensamente y añádase 100 ml de agua recientemente hervida y enfriada, arrastrando con elle el iodo del tapón. Titúlese el iodo con una disolución de tiosulfato de sodio 0.1N, mediante la adición gradual de la misma con agitación constante, hasta la casi total decoloración de la disolución que al principio es amarilla. Añádase unas cuantas gotas de una disolución al 1% de almidón soluble y continúese la titulación hasta que el color azul desaparece. Cuando esté

próximo el término de la titulación, tápese el matraz y agítase violentamente para extraer las trazas de iodo que pudieran permanecer en el  $\text{Cl}_3\text{CH}$ .

Háganse simultáneamente con las de la muestra problema dos determinaciones en blanco, dejando escurrir la pipeta del reactivo de Hanus durante exactamente el mismo período de tiempo que en la determinación del índice de las muestras problema.

$$\text{Índice de iodo} = \frac{(B-S) \times N \times 12.69}{\text{peso de la muestra}}$$

Donde:

B = título del blanco

S = título de la muestra

N = Normalidad de la disolución de tiosulfato

Nota: El aceite debe **filtrarse** a través de un filtro seco y todo el material de vidrio debe hallarse completamente seco.

Índice de tiocianógeno.

Este índice mide también el grado de insaturación de los aceites y las grasas, se expresa en términos del número de centigramos de iodo absorbido por cada gramo de la grasa ó el aceite. El tiocianógeno no se adiciona a los ácidos linoleico o linoléico en la misma proporción que el iodo, por lo que determinando ambos índices, el de iodo y el de tiocianógeno puede calcularse la composición de ácidos grasos de la muestra.

## Equipo.

Todo el material de vidrio utilizado debe limpiarse previamente con mezcla crómica y ser secado en estufa de aire a 105°C.

## Reactivos.

Precaución, todos los reactivos deben ser totalmente anhidros.

a).- Ácido acético anhidro. Añádanse 40 ml de anhídrido acético a 500 ml de ácido acético (99.5% o más) en un matraz de boca esmerilada equipado con un refrigerante de aire, sométase la mezcla a una ebullición suave durante 3 horas, adáptese un tubo de cloruro cálcico al extremo superior del condensador y enfríese hasta temperatura ambiente. Analícese el contenido del ácido y el anhídrido acético en sustancias reductoras diluyendo 2 ml con 10 ml de agua destilada y añadiendo 0.1 ml de una disolución 0.1N de permanganato de potasio, el color rosa no debe desaparecer por completo en dos horas.

b) Disolución de tiocianógeno. Tanto la AOCG como la AOAC dan las instrucciones necesarias para obtener la sal de plomo  $(\text{SCN})_2\text{Pb}$ . Hoy son innecesarias, puede adquirirse de Eastman No. P8183.

Preparación de la disolución 0.2N de tiocianógeno.

Suspéndanse 50 g de  $(\text{SCN})_2\text{Pb}$  en 500 ml de ácido acético anhidro. Disuélvase 5.1 ml de bromo en otros 500 ml de ácido acético.

anhidro. Añádase la disolución de bromo a la suspensión de  $(\text{SCN})_2\text{Pb}$ , fíltrese a vacío a través de un papel cualitativo desecado en estufa de vacío y recójase el filtrado en un matraz de 2 litros terminada la filtración colóquese el embudo de Büchner sobre otro matraz de 2 litros y pásese el líquido por segunda vez a través del mismo papel filtro. El filtrado debe estar ahora perfectamente clero, guárdese en frasco de color topacio provisto de tapón de vidrio en un lugar frío ( $19^{\circ}\text{C}$ - $21^{\circ}\text{C}$ ). La disolución se puede conservar de acuerdo con la AOAC durante aproximádsmente una semana.

#### Determinación.

1.- Pénsese de 0.10 a 0.70g de la grasa ó aceite en un matraz con tapón de vidrio de 500 ml, el peso de la muestra debe permitir un exceso del 150-200% del reactivo de  $(\text{SCN})_2\text{Pb}$  en relación con la cantidad del mismo absorbida, por ejemplo, si se trata de un aceite del que se espera un índice de tiocianógeno igual ó superior a 150 pénsese de 0.12 a 0.14 gramos, si el índice esperado es de 100 pénsese de 0.21 a 0.25 gramos, si se espera un índice de 50 pénsese de 0.4 a 0.5 gramos, etc.

2.- Añédanse con una pipeta 25 ml de la disolución de  $(\text{SCN})_2\text{Pb}$ , agítese hasta que el aceite se disuelva y manténgase en la obscuridad durante 24 horas a  $19$ - $21^{\circ}\text{C}$

3.- Prepárense tres blancos con cada grupo de muestras, añédanse

a uno de ellos 1.66 gramos de IK, agítase rápidamente por rotación durante dos minutos, añádanse 30 ml de agua y titúlese de inmediato con tiosulfato de sodio, añádase hacia el final de la titulación la disolución al 1% de almidón soluble hervida y continúese la titulación hasta que desaparezca el color azul. Trátense los otros dos blancos exactamente igual que las muestras como se indica en (2) y (4).

4.- Transcurridas 24 horas añádanse 1.66 gramos de IK y 30 ml de agua y titúlese según se indica en (3).

Nota; Si la diferencia entre los títulos del blanco antes y después de transcurridas las 24 horas excede de 0.2 ml de tiosulfato 0.1N por cada 25 ml de la disolución de  $(\text{SCN})_2\text{Pb}$  descártese y remuévese esta disolución.

Calculos.

el índice de tiocianógeno en términos de su equivalente en iodo es igual a:

$$\text{Índice de tiocianógeno} = \frac{(B-S) \times N \times 12.6}{\text{peso de la muestra}}$$

Donde:

B = título del blanco

S = título de la muestra

N = normalidad de la disolución de tiosulfato.

Las ecuaciones para determinar la composición son ligeramente distintas según que los índices de Iodo y tiocianógeno se hayan determinado sobre una mezcla de ácidos grasos ó triglicéridos.

He aquí las constantes de algunos ácidos grasos (tabla VIII).

TABLE VIII

Algunas constantes de ácidos grasos

Acido	Expresado en %	Índice de Iodo (IV)	Índice de tio- cianógeno (TV)
Linoléico	X	237.7	167.1
Linoleico	Y	181.1	96.7
Oleico	Z	89.9	89.3
Saturado y sustan- cias insaponificables	S	*0	*0

\* No valen exáctamente cero, pero se supone así para el cálculo. Si existe ácido linoléico es preciso determinar independientemente los ácidos grasos saturados.

Cuando se determinan estos valores en una mezcla de ácidos grasos en la que no interviene el linoléico pueden calcularse así los porcentajes de cada uno de los ácidos grasos:

$$Y = 1.194 \text{ I.V.} - 1.202 \text{ T.V.}$$

$$Z = 2.421 \text{ T.V.} - 1.293 \text{ I.V.}$$

$$S = 100 - (Y+Z)$$



La derivación de estas fórmulas, y las que a continuación se citan figuran en los official and tentative standards AOCs official methods Cd 2-38

Si en la mezcla interviene el ácido linoléico.

X = I.5902 T.V. - 0.1290 I.V. - 1.30403 - 130.40

Y = I.3565 I.V. - 3.2048 T.V. - 1.6423 + 164.23

Z = I.6146 T.V. - 1.2275 I.V. - 0.66178 - 66.17.

He aquí los índices de iodo y tiocianógeno en los glicéridos de los aceites (Tabla IX)

TABLA IX

Valores de iodo y tiocianógeno en los glicéridos

Calculados a partir de los ácidos grasos

Glicerido	Expresado en %	Indice de iodo (IV)	Indice de tiocianogeno (TV)
Linolenina	X	261.8	159.8
Linoleina	Y	173.3	92.5
Oleina	Z	86.0	85.5
Saturado y substancias insaponificables	S	*0	*0

\*Estos valores no son realmente igual a cero pero se supone así para los cálculos. Cuando no hay linolenina queda:

Y= I.246 I.V. - 1.253 T.V.

Z = 2.525 T.V. - 1.348 I.V.

S = 100 - (Y+Z)

Cuando si hay linolenina:

X = 1.6610 T.V. - 0.1322 I.V. - 1.3056 S - 130.56

Y = 1.4137 I.V. - 3.3449 T.V. - 1.6441 S + 164.41

Z = 1.6839 T.V. - 1.2805 I.V. - 0.6615 S + 66.15

#### 4.3 METODO DE CROMATOGRAPIA DE GASES PARA VALORACION DE ACIDO LINOLEICO.

Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos en aceites y grasas.

Esterificación en presencia de ácido sulfúrico

Método de trifloruro de boro

Principio.

Glicéridos y fosfolípidos son saponificados, y los ácidos grasos son liberados y esterificados en presencia de  $\text{BF}_3$  como catalizador para análisis adicionales por I.R. o C.G. (31, 32, 33).

El método es aplicable a aceites vegetales y animales comunes, grasas y ácidos grasos. Substancias insaponificables no son removidas y si se presentan en grandes cantidades pueden interferir con subsecuentes análisis.

El método no es conveniente para la preparación de ésteres metálicos de ácidos grasos que contienen grandes cantidades de epóxidos, hidroperóxidos, aldehidos, cetonas, grupos ciclopropil y ciclopropenil, poliinsaturados conjugados y compuestos acetilénicos por que hay parcial ó completa destrucción de estos grupos.

#### Aparatos.

- a).- Matraces de reacción, matraces de 50 y 150 ml con salidas unidas.
- b).- Condensador, de reflujo de agua fría con chaqueta de 20-30 cm y entredas unidas.

#### Reactivos.

- a).- Reactivo de  $\text{BF}_3$ , 125g de  $\text{BF}_3$ /I litro de metanol, el compuesto está disponible ó preparar como sigue:

Pesar un matraz de 2 litros conteniendo un litro de metanol, enfriar en un baño de hielo y con el matraz aún en el baño burbujear  $\text{BF}_3$  a través de un tubo de vidrio al metanol hasta que sean absorbidos 125g. Trabajar en campana el  $\text{BF}_3$  debe ser pasado por el tubo de vidrio antes de usarlo y hasta que es removido del metanol para prevenir que el líquido se empiece a tirar por la válvula cilíndrica del sistema. El gas no debe fluir tan rápido que desprenda vapores blancos del matraz.

El reactivo es estable por dos años ( precaución remueve los

vapores de  $\text{BF}_3$  con un dispositivo adecuado para esto. Evite el contacto con piel, ojos y tracto respiratorio.

b).- Solución metanólica de hidróxido de sodio 0.5 N.

Disolver 2 gramos de  $\text{NaOH}$  en 100 ml de metanol conteniendo menos de 0.5% de agua. Un precipitado blanco de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  formado por el almacenamiento prolongado puede ser ignorado.

c).- Heptano, puro para cromatografía de gases. Si la muestra no contiene ácidos grasos de más de 20 átomos de carbono este puede ser substituido por hexano.

d).- Solución de rojo de metilo, 0.1% en alcohol al 60%

e).- Nitrógeno, debe contener menos de 5 ng de  $\text{O}_2/\text{Kg}$ .

Checar la partida de reactivos, particularmente  $\text{BF}_3$ , por preparación y cromatografiado de ésteres metílicos de ácido oleico puro. Si aparecen picos extraños (en la región  $\text{C}_{20}\text{-C}_{23}$  con  $\text{BF}_3$ ) rechace el reactivo.

#### Preparación.

Trabaje bajo campana. Lavar todo el material de vidrio utilizado inmediatamente después de usarlo.

Si hay ácidos grasos que contengan más de dos dobles ligaduras, remover el aire del metanol y matraz pasando una corriente de

nitrógeno unos minutos. Los ésteres metílicos deben ser analizados tén rápido como sea posible. Si es necesario la solución de heptano puede ser guardada bajo nitrógeno en el refrigerador, para almacenamiento prolongado séllelo en ampolletas y guárdelo en el congelador ó agregue el equivalente de 0.005% de 2,6-di-terbutil-4metil fenol (BHT). Para análisis infrarojo el disolvente debe ser removido tén completamente como sea posible, para cromatografía de gases 5-10% de solución es conveniente.

No se requieren pesadas precisas, será necesario conocer el tamaño de la muestra solo para determinar el tamaño del matraz y la cantidad de reactivos, de acuerdo a la tabla X

TABLA X

Muestra (mg)	Matraz (ml)	NaOH 0.5N (ml)	BF <sub>3</sub> (ml)
100-250	50	4	5
250-500	50	6	7
500-750	100	8	9
750-1000	100	10	12

Una muestra de 350mg es recomendada para cromatografía de gases.

a).- Para grasas y aceites, agregue la muestra al matraz y agregue también la solución metanólica de NaOH, hervir un poquito, coloque el condensador y refluje hasta que los glóbulos de grasa desa-

parezcan (usualmente de 5 a 10 minutos), agregue la solución de  $BF_3$  con una pipeta automática ó con un bulbo a través del condensador y continúe hirviendo por dos minutos. Agregue de 2 a 5 ml de heptano a través del condensador y continúe hirviendo por un minuto. Remueva el condensador, el calentador y agregue unos mls. de solución saturada de cloruro de sodio. Note el matraz vigorosamente algunas veces, agregue heptano con solución de cloruro de sodio a través del cuello del matraz. Transfiere un ml de la parte superior del matraz que contiene el heptano al tubo de ensaye y adicione cantidades pequeñas de sulfato de sodio anhidro para remover el agua. Si es necesario diluya la solución a concentración de 5-10% para cromatografía de gases.

Para recuperar los ésteres secos, transfiera la fase acuosa y heptano a un embudo de separación de 250 ml, extraer con dos porciones de 50 ml de éter ó hexano.

Lave los extractos combinados con porciones de 20 ml de agua hasta que esté libre de ácido usando como indicador rojo de metilo, seque con sulfato de sodio, filtre y evapore el disolvente bajo corriente de nitrógeno sobre el baño de vapor. Si la muestra es menor de 500 mg reduzca los volúmenes de disolvente y agua.

Los ésteres mas volátiles pueden perderse si la evaporación es prolongada ó también si el paso de nitrógeno es vigoroso.

Para espectroscopía infrarojo terminar la evaporación tan rápido como el disolvente sea removido, para cromatografía de gases, el método es aplicable para ácidos grasos con mayor ó igual a ocho átomos de carbono si el disolvente no es completamente removido.

b).- Para ácidos grasos.

Agregue la muestra de ácidos grasos al matraz adicionando solución de  $\text{BF}_3$  y continúe como en (a) con dos minutos de ebullición bajo reflujo.

Método de cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos en aceites y grasas.

Esteres metílicos de ácidos grasos de grasas animales y vegetales conteniendo de 8-24 átomos de carbono son separados y determinados por cromatografía de gases. El método no es aplicable a epóxidos, oxidaciones ó ácidos grasos polimerizados.

Aparato.

a).- Cromatógrafo de gases, con mínimo espacio muerto en el sistema de inyección, que es mantenido de  $20^{\circ}$  a  $50^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura de la columna. Manteniendo la temperatura de la columna de  $220^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Si el calentamiento es programado se recomiendan columnas duales.

b).- Columnas de 1 a 3 mts. por 2 a 4 mm, de vidrio ó de acero inoxidable con componentes poliinsaturados con más de 3 dobles ligaduras, use columnas cortas cuando estén presentes cadenas cuyas longitudes sean mayores de 20 átomos de carbono.

c).- Empaque, tierras diatomas ácido-lavadas salinaceas con

rango estrecho (25 micras), el tamaño de grano entre 125-250 micras (No. 50-120) el tamaño de grano es inversamente relacionado al ancho y directamente relacionado al largo de la columna, recubrir con líquido poliéster de tipo polar 5-20%.

Fase estacionaria (dielilén glicol polisuccinato, butanediol polisuccinato, etilén glicol poliacipato) u otro líquido (ciano-silicones) con una eficiencia esperada y con especificaciones de resolución. La fase no polar puede ser usada para ciertas separaciones

La condición de la columna, mientras esté desconectada del detector a 185°C con corriente de gas inerte 20-60 ml/min por mas de 16 horas y por dos horas adicionales a 195°C

Las condiciones de temperatura pueden variar según con las especificaciones de la fase líquida

a).- Jeringa, con volumen máximo de 10 microlitros graduada a 0.1 microlitro.

e).- Registrador, con rango de 0-2.5 ó 5 m.v. menor de 1.5 segundos de respuesta de valoración (tiempo para que la pluma grafique de 0-90% siguiendo la introducción momentaria de la señal de 100%), 25 cm mínimo de ancho del papel y 25-100 cm/h la velocidad del papel, con switch atenuador para cambio de rango. Si es usado integrador debe tener respuesta lineal con sensibilidad adecuada y satisfactoria corrección de línea base.

Si es usado detector de conductividad térmica, las condiciones



deberán ser modificadas como sigue:

Columnas, de 2-4 m x 4 mm

Soporte, tamaño de grano 150-250 micras (No 60-100)

Gas acarreador, Helio ó Hidrógeno

Gas auxiliar, no

Fase estacionaria, 15-25%

Temperaturas, columna 180-200°C, inyector de 40-60°C arriba de la temperatura de la columna

Flujo de gas acarreador, 60-80 ml/min

Registrador, con rango de 0-1 m.v.

Cantidad de la muestra inyectada, 0.5-2 microlitros

Serán usados factores de corrección

Reactivos.

a).- Gas acarreador, N, He, Argón seco y conteniendo menos de 10 mg/Kg de O<sub>2</sub>.

b).- Otros gases, H<sub>2</sub> libre de impurezas orgánicas, aire ú oxígeno libre de impurezas orgánicas (menos de 2 ppm de hidrocarburos equivalentes a CH<sub>4</sub>)

c).- Estándares de referencia, mezclas conocidas de ésteres metílicos de aceites de composición conocida, preferiblemente similar al material que será analizado.

Condiciones de operación

Las siguientes variables son requeridas en la selección de las

condiciones de prueba apropiadas; a).- longitud y ancho de la columna, b).- flujo de gas acarreador, c).- temperatura de columna d).- resolución requerida, e).- tamaño de muestra y f).- tiempo de análisis.

El tamaño de muestra sería tal que se obtenga respuesta lineal del detector y electrómetro. En general siguiendo las condiciones se eluirán estearatos metílicos dentro de 15 min a mas de 2000 platos teóricos.

Si el aparato permite el inyector estará a 200°C y el detector a una temperatura arriba de la temperatura de la columna. El flujo del hidrógeno puede ser la mitad que la del gas acarreador (el flujo de hidrógeno, puede ser igual al flujo del gas acarreador con nitrógeno y 2mm de ancho de columna), el flujo de oxígeno de 5 a 10 veces mas que de hidrógeno como es mostrado en la tabla XI

TABLA XI

Ancho de la columna mm	Flujo del gas acarreador ml/min	Conc. fase estacionaria %	Temp. columna °C
2	15-25	5	175
3	20-40	10	180
4	40-60	15	185
		20	185

Especificaciones de funcionamiento:

Hacer un análisis sobre una mezcla de estearato de metilo y oleato de metilo en igual proporción (ésteres metílicos de mantequilla de cocoa) ajustar la cantidad de muestra, la temperatura de la columna y el flujo del gas acarreador, así como el pico de estearato de metilo es graficado 15 minutos después del pico del disolvente a 1/4 de la escala completa, medir el ancho de la base en mm de estearato de metilo y oleato de metilo ( $w_1$  y  $w_2$ ) respectivamente entre los puntos de intersección con la línea base de tangentes trazadas prolongadas a los puntos de inflexión de las curvas. Igualmente la medida de la distancia de retención en mm (s) del inicio del pico máximo para estearato de metilo y distancia en mm entre el pico máximo para estearato de metilo y oleato de metilo.

Cálculo de los platos teóricos n (eficiencia) y resolución R

$$n = 16(s/w_1)^2$$

$$R = 2K (v_1 + w_2)$$

Seleccionar condiciones para obtener n mayor que 2000 platos teóricos y R mayor que 1.25. En la adición de ácido linoleico (18:3) los ésteres metílicos será separado de ácido araquídico (20:0) y ácido gadoleico (20:1). Las columnas mostrarán gradual pérdida de R con el uso; cuando los valores den menores de 1.25 sustituir las.

Con el aparato mostrando la línea base estable, inyector de 0.1-2 microlitros de una solución 5-10% de heptano de ésteres metílicos, s

trazas de compuestos es deseado, la muestra puede ser incrementada menor que 10X. Perfore el séptum de la entrada del puerto y descargue rápidamente la muestra. Retire la aguja y observe en la carta el pequeño punto ó pico debido al aire ó disolvente. Marque el inicio como punto de referencia. Ajuste el tamaño de la muestra si el mayor punto no es atenuado mas que 8X, preferiblemente menor. Ceroe de colocación el atenuador tan necesario para conservar los picos sobre el papel carta. Marcar la colocación del atenuador sobre la carta.

Para determinación de ácidos menores de 12 átomos de carbono una columna de baja temperatura sera necesaria, para mayores de C<sub>20</sub> temperatura alta, la programación de la temperatura es útil en ambos casos.

Con ácidos con menos de C<sub>12</sub> inyectar a 100°C y elevar la temperatura de 4-6°C/min a la óptima ó programar a una temperatura fija y continuar a temperatura constante, hasta que todos los componentes sean eluidos. Si el aparato no usa calentamiento programado, operar en dos temperaturas fijas entre 100 y 195°C.

#### Identificación.

Analizar las mezclas de estándares de referencia bajo las mismas condiciones de operación como para la muestra. Medir las distancias de retención (s) para ésteres conocidos. Graficar el logaritmo de (s) como función del número de átomos de carbono de los ácidos. Bajo condiciones isotérmicas las gráficas de ésteres de

cadena recta del mismo grado de insaturación serán líneas rectas aproximadamente paralelas. La identificación de los picos de la muestra de estas gráficas, interpolando si es necesario. Evitar condiciones que permitan la aparición de picos fantasmas, los cuales no son lo suficientemente resueltos.

Los ésteres aparecen en orden del incremento del número de átomos de carbono y del incremento en la saturación para el mismo número de átomos de carbono.  $C_{16}$  está adelante de  $C_{12}$  y ésteres metílicos de  $C_{18}$  aparecen en el siguiente orden: Estearato (18:0), oleato (18:1), linoleato (18:2) y linolenato (18:3). Ester estándar de  $C_{20}$  (araquídico 20:0) usualmente aparece antes del éster (18:3), pero puede ser a la inversa en algunas columnas, ó las posiciones pueden cambiar por el uso de la columna.

#### Cálculos.

Uso del método de normalización, el cual supone que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma, así la suma de las áreas representa el 100% de constituyentes (elución total).

Si el instrumento es equipado con integrador, use figuras mostradas, si no, use triangulación. Dibuje líneas para cada pico tangentes a los costados e intersectando con la línea base. Calcule el área del triángulo resultante multiplicando altura (corregida para algún cambio de atenuación) por la mitad de la base. Para picos automáticamente atenuados obtener la anchura del pico por

las tangentes del dibujo en los costados internos del pico (esto debe ser la carta completa y 2/3 partes superiores del pico pueden ser usados) y la intersección con la línea base.

Si cantidades significativas de componentes con menos de 12 átomos de carbono están ausentes, calcular el % por peso de cada componente expresado como éster metílico.

$$C_1 = G_1 \times 100 / \sum G_1$$

Donde:

$G_1$  = Área del pico correspondiente al componente 1

$\sum G_1$  = Suma de las áreas bajo todos los picos.

En ciertos casos en presencia de componentes con menos de 12 átomos de carbono, grandes diferencias en pesos moleculares y presencia de grupos secundarios, deben usarse factores de corrección para convertir áreas de picos en % en peso. Determinación de factores de corrección para análisis de estándares de referencia conocidos de ésteres metílicos de composición similar a la de la muestra bajo condiciones idénticas de operación. Para estándares de referencia:

$$\% \text{ peso por componente } 1 = B_1 \times 100 / \sum B_1$$

Donde:

$B_1$  = Peso del componente 1 en el estándar de referencia

$\sum B_1$  = Peso total de todos los componentes en el estándar de referencia calculado del cromatograma.

$$\% (\text{área/área}) \text{ de componente } i = G_i \times 100/G_i$$

De lo cual, el cálculo del factor de corrección para cada componente es:

$$K_i = (B_i/B_1) \times (C_1/C_i)$$

Determinación de los factores de corrección relativos al ácido palmítico  $K_{16}=1$  así:

$$K' = K/K_{16}$$

Entonces para calcular el % de cada componente ( como éster metílico) multiplicar su área por el factor de corrección apropiado y sumar las áreas corregidas

$$\% \text{ por peso de componente } i = (K'_i \times G_i) \times 100 / (K'_i \times G_i)$$

En ciertos casos cuando todos los componentes no son eluidos, usar un estandar interno S, tal como éster metílico de  $C_{15}$  ó  $C_{17}$  y determinar su factor de corrección así:

$$\% \text{ por peso de componente } i \text{ como éster metílico} = (W_i/W) \times (K'_i/K'_S) \times 100$$

Donde:

$$W_S = \text{miligramos de estandar interno}$$

$d$  = miligramos totales de la muestra

Subíndice  $S$  = se refiere al estandar interno del componente.

Resultados reportados siguiendo figuras significantes, con una figura mas alla del punto decimal en todos los casos: 3 para mas de 10%, 2 para 1-10% y 1 para menos del 1%

### Precisión

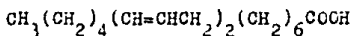
a).- Repetibilidad, dos simples determinaciones llevadas a cabo el mismo dia por el mismo operador con el mismo aparato sobre muestras para constituyentes en cantidades mayores al 5% no deberán diferir por mas de 3% relativo, con un valor absoluto de 1%

b).- Reproducibilidad.- Dos simples determinaciones llevadas a cabo en diferentes laboratorios para componentes mayores del 5% no deberán diferir por mas del 10% relativo, con un valor absoluto de 3%



CAPITULO V. USOS DEL ACIDO LINOLEICO COMO COMPLEMENTO  
DIETETICO.

Las reglas dietéticas y nutricionales de grasas y aceites son bastante complejas, esto se hace evidente en los nuevos hallazgos biológicos acerca de algunos de sus componentes que son esenciales para el hombre. Las grasas y aceites deben ser consideradas por su aspecto cualitativo y cuantitativo, sus composiciones en ácidos grasos y sus relaciones con dietas promedio en diferentes estados. A causa de algunos efectos fisiológicos adversos atribuidos a los ácidos grasos saturados, una tendencia a incrementar la ingestión de aceites vegetales poliinsaturados ha llevado a proveer una buena fuente de ácidos grasos esenciales principalmente ácido linoleico:



Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA<sub>n</sub>), son ácidos grasos que tienen dos ó mas dobles ligaduras uniendo átomos de carbono en la molécula. En su totalidad ellos tienden a estar en forma líquida, a menos que formen complejos con otros ácidos. No todos los líquidos grasos son ricos en PUFA<sub>n</sub>.

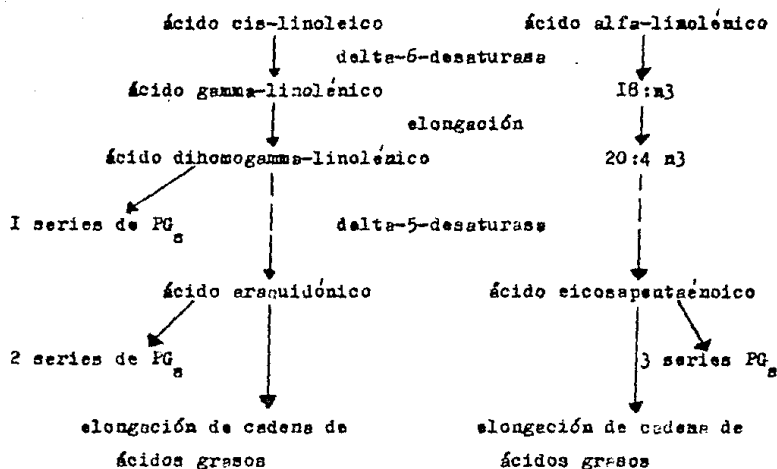
Ácidos grasos esenciales (EFA<sub>s</sub>), son factores dietéticos que fueron descubiertos en la universidad de Minnesota por George y Mildred Burr en 1929. Como las vitaminas los EFA<sub>s</sub> no pueden ser sintetizadas por el organismo, por lo que deben ser tomados junto

con los alimentos. Para actuar como un EPA son requeridas estructuras químicas altamente específicas. Hay dos series de EPA, los n-6 derivados del ácido cis-linoleico, y los n-3 derivados del ácido alfa-linolénico. Los números indican la posición de la primera doble ligadura al fin de la molécula. Las series n-6 parecen ser considerablemente más importantes, pero las series n-3 están siendo intensamente investigadas con referencia particular a sus roles en función cardiovascular y en el cerebro. Como ciertas vitaminas, los ácidos cis-linoleico y alfa-linolénico no tienen actividad biológica por si mismos, aparte de que sean oxidados para proveer energía. Para que ellos funcionen como EPA, requieren una transformación bioquímica específica dentro del organismo. Las secuencias de reacciones se muestran en la figura 4. Las funciones exactas de cada uno de los ácidos grasos en la secuencia intermedia no son completamente conocidas. Se sabe que a menos que el ácido cis-linoleico pueda ser convertido a ácido gammalinolénico (GLA) no tendrá actividad biológica como un EPA. Las dos series de EPA, las series n-3 y n-6 no son intercambiables en animales. Sin embargo las enzimas que metabolizan las series n-3 y n-6 parecen ser idénticas.

Los EPA son importantes por dos razones diferentes:

Primero, son constituyentes de todas las membranas en todos los tejidos del cuerpo, estos juegan un papel vital en la determinación de las propiedades biológicas de todas estas membranas. Por lo tanto, no es sorprendente que las deficiencias en EPA lleva a profundos distúrbios en todos los tejidos.

FIGURA 4



Segundo, los EFA<sub>3</sub> son precursores de un grupo de moléculas altamente reactivas, las prostaglandinas (PG<sub>2</sub>) y los leucotrienos (LT<sub>5</sub>). Hay arriba de 50 tipos de PG<sub>2</sub> y LT<sub>5</sub> y casi todas las PG<sub>2</sub> son removidas de la sangre durante el paso a través de los pulmones. Por lo tanto las principales acciones de estas sustancias parecen ser como mensajeros locales que regulan la actividad de los tejidos en los que son producidos.

Los PG<sub>2</sub> y LT<sub>5</sub> tienen una gran variedad de efectos, algunos desec-

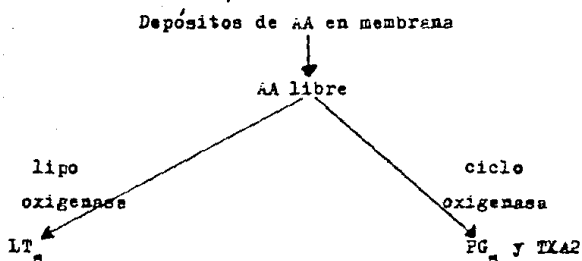
bles y otros indeseables. Tres de los EPA<sub>g</sub> pueden actuar como precursores para prostaglandinas, de las series n-6 tenemos el ácido dihomo $\gamma$ -linolénico (DGLA) y el ácido araquidónico (AA), y de las series n-3 tenemos el ácido eicosapentaenoico. DGLA puede seguir dos caminos, ya sea que se transforme en PGE<sub>1</sub> (I series de prostaglandinas), ó bien que llegue a ácido araquidónico (AA). PGE<sub>1</sub> tiene acciones muy deseables como; es un activador de la formación del A<sub>2</sub>P<sub>c</sub> cíclico, un inhibidor de la agregación de plaquetas, un vasodilatador, un inhibidor de reacciones inflamatorias y un activador de la función linfocito (T).

AA, en contraste produce una variada mezcla de sustancias, a diferencia de DGLA éste puede llegar a LT<sub>g</sub> que son muy pro-inflamatorios. Temolen de aquí podemos tener unas series de prostaglandinas que tienen efectos deseables, como, inhibición de agregación de plaquetas y vasodilatación. Además podemos tener otro tipo de sustancias como tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub> una sustancia muy relacionada con las prostaglandinas) y que tiene efectos indeseables, como, promoción de vasospasmos, trombosis e inflamación. Las PG<sub>g</sub> y los tromboxanos son formados de AA por un sistema enzimático ciclooxigenasa, mientras que los LT<sub>g</sub> son formados por un sistema enzimático lipooxigenasa (ver figura 5) .

EPA<sub>g</sub> metabolismo en humanos.

En ratas, la delta-5-desaturasa que convierte DGLA en AA es muy activa, y así el ácido linoleico en la dieta es rápidamente

FIGURA 5

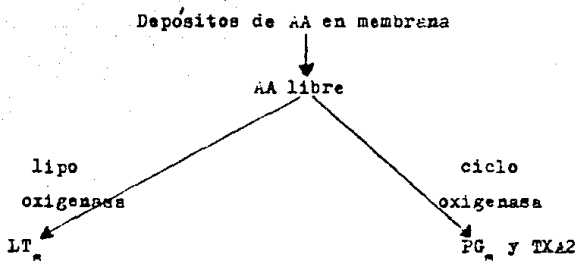


convertido en AA. Sin embargo, en humanos adultos DGLA es convertido a AA en muy pocas cantidades.

Debido a la baja actividad de la delta-5-desaturasa en humanos el balance entre las series de  $PG_1$  y 2 puede ser influido rápidamente por la dieta. El ácido linoleico que se transforma en DGLA proviene principalmente de fuentes vegetales, aunque, la carne contiene un poco. El ácido araquidónico proviene principalmente de carne y algunas comidas del mar, siendo los camarones una fuente particularmente rica. Debido a esto la dieta de las personas vegetarianas contiene principalmente precursores para las primeras series de prostaglandinas ( $PGE_1$ ), mientras que, la carne contiene ambos. Algunas de las diferencias de salud entre personas que comen carne y personas vegetarianas pueden ser debidas a esto.

Deficiencia aguda de  $EPA_3$  en animales.

FIGURA 5



convertido en AA. Sin embargo, en humanos adultos DGLA es convertido a AA en muy pocas cantidades.

Debido a la baja actividad de la delta-5-saturasa en humanos el balance entre las series de PG<sub>1</sub> y 2 puede ser influido rápidamente por la dieta. El ácido linoleico que se transforma en DGLA proviene principalmente de fuentes vegetales, aunque, la carne contiene un poco. El ácido araquidónico proviene principalmente de carne y algunas comidas del mar, siendo los camarones una fuente particularmente rica. Debido a esto la dieta de las personas vegetarianas contiene principalmente precursores para las primeras series de prostaglandinas (PG<sub>1</sub>), mientras que, la carne contiene ambos. Algunas de las diferencias de salud entre personas que comen carne y personas vegetarianas pueden ser debidas a esto.

Deficiencia aguda de EPA<sub>3</sub> en animales.

En animales la privación total de BPA<sub>g</sub> puede llevar a una serie de profundas anomalías, las principales son:

- 1.- Caída del cabello, desarrollo de lesiones en la piel e hipertrofia de glándulas sebáceas.
- 2.- Falta de cicatrización de las heridas (de como normalmente su cede) aparentemente debido a la falta de formación de tejido conectivo.
- 3.- Falta de crecimiento normal.
- 4.- Todas las membranas se hacen excepcionalmente permeables. En particular la piel pierde su habilidad para prevenir el paso de agua, grandes cantidades de agua se pierden a través de la piel, llevando a la paradoja de tener sed y una orina muy concentrada.
- 5.- Fallos en la reproducción, especialmente en verones, las hembras pueden quedar preñadas, pero frecuentemente abortan y raramente llegan a terminar de criar.
- 6.- Los riñones se hipertrofian y desarrollan fallos hemorrágicos y renales
- 7.- El hígado sufre degeneración de grasas.
- 8.- Las glándulas exócrinas se atrofia
- 9.- El sistema inmune se vuelve defectuoso y hay gran susceptibilidad a las infecciones.

En el tiempo que los animales alcanzan la adultez la mayoría que ha llevado una dieta normal han acumulado depósitos de BPA<sub>g</sub>, esto dificulta demostrar alguna deficiencia aguda de BPA, sin embargo recientemente se ha establecido que tales privaciones

llevan a una rápida caída en producción de  $PG_a$ .

Deficiencia aguda en humanos.

Es muy poco lo que se sabe sobre esto y lo que se conoce es de circunstancias inusuales. En los años 50<sub>s</sub> cuando fue hecha mucha investigación en las preparaciones de leches artificiales para infantes, en algunas formulaciones los niveles de  $EFA_s$  eran muy bajos. Las observaciones hechas a estos infantes fueron las siguientes; Piel escamosa, eczema, sarpullido, irritabilidad y un incremento substancial en calorías ingeridas. Los infantes de esta formulación tuvieron mucho más apetito que sus contemporáneos que tuvieron una dieta normal de  $EFA_s$ . La adición de  $EFA_s$  a la formulación redujo el apetito y produjo un esclarecimiento de la piel. En los años 70<sub>s</sub>, cuando fueron desarrollados fluidos para nutrición parenteral total, la American Food and Drug Administration no permitió que los  $EFA_s$  fueran incluidos. El resultado fue una serie de reportes de deficiencia aguda de  $EFA_s$  en adultos, con sarpullido en la piel parecido a psoriasis ó eczema, fracaso en la cicatrización e irritabilidad.

Deficiencia crónica de  $EFA_s$

No hay un trabajo específico sobre deficiencia crónica de  $EFA_s$  en animales ó en humanos, por lo tanto no son conocidos los efectos a largo plazo de una deficiencia parcial de  $EFA_s$  en animales



ó en humanos.

Sin embargo, hay dos caminos clásicos de investigación sobre los efectos que tiene un nutriente esencial. El primero, es privar a individuos de éste nutriente y observar que sucede. El segundo, es administrar un exceso del nutriente, si se da un exceso aparente del nutriente ciertas manifestaciones de desorden desaparecen, entonces es legítimo concluir que estas manifestaciones pueden ser el resultado de un largo tiempo de deficiencia parcial. En los últimos años este segundo tipo de estudio ha sido hecho repetidamente usando PUFA<sub>g</sub> como fuente de EPA<sub>g</sub>. Esto contrasta con el uno por ciento de calorías total que es adecuado para soportar un desarrollo normal de animales jóvenes. Curiosamente, los EPA<sub>g</sub> son los únicos nutrientes que la profesión médica aconseja a sus pacientes tomar en mega-dosis. Se ha establecido que estas mega-dosis tienen un efecto deseable en varios problemas como; cardiovasculares, diabetes, problemas de pecho, ciclo menstrual y esclerosis múltiple.

#### Importancia de la delta-6-desaturasa (D6D).

La enzima delta-6-desaturasa (D6D) es absolutamente vital para un entendimiento de los EPA<sub>g</sub>, ya que es el guardián de entrada para las series n-6 y n-3 (fig 4), convierte ácido cis-linoleico a ácido gamma-linolénico (GLA) y ácido alfa-linolénico a ácido 18:4 n3. Durante 20 años Brenner ha conducido una investigación sistemática del comportamiento de esta enzima. Sus resultados y los de otros grupos son los siguientes:

- 1.- Grasas saturadas inhiben la actividad de la enzima.
- 2.- Ácidos grasos "trans" formados por el procesamiento de aceites vegetales inhiben la enzima.
- 3.- En animales diabéticos la actividad de la enzima es baja
- 4.- El alcohol inhibe la enzima.
- 5.- La vejez lleva a baja en la actividad enzimática.
- 6.- La adrenalina inhibe la enzima
- 7.- La inanición inhibe la enzima, pero una dieta restringida en calorías puede incrementar la actividad de la enzima hasta tres veces.
- 8.- Glucocorticoides inhiben la enzima.
- 9.- Una dieta muy baja en proteínas inhibe la enzima, mientras, una dieta muy alta en proteínas la activa.
- 10.- La administración de glucosa a animales normales inhibe la enzima.
- 11.- Virus oncogénicos y radiación ionizante inhiben la enzima.

Por lo anterior es aparente que un gran número de agentes que son conocidos tienen efectos profundos en la salud. Estos agentes tienen grandes efectos sobre la D6D, y así regulan la obtenibilidad de EPA<sub>3</sub> para el cuerpo.

Fuentes de EPA<sub>3</sub> en alimentos.

- 1.- Ácido linoleico; Ciertos aceites de semillas como; Girasol, cártamo, maíz, pámala y soya lo contienen en grandes cantidades.

- 2.- Acido gammalinolénico, lo contienen leche humana y aceite de primula.
- 3.- Acido dihomo-gamma-linolénico, la leche humana contiene un poco y han sido establecidas pequeñas cantidades en algunas carnes orgánicas como suprarrenales, bazo y riñones.
- 4.- Acido araquidónico, hay en carnes, productos lácteos, algunas algas marinas y camarones.
- 6.- Acido eicosapentaenoico, se ha detectado principalmente en aceites marinos.

#### Diferencias entre $EFA_g$ y $PUPA_g$ .

Los efectos benéficos de  $PUPA_g$  (ácidos grasos poliinsaturados) parece ser que es totalmente debido a su contenido en  $EFA_g$  (ácidos grasos esenciales).

Los mas importantes  $PUPA_g$  no- $EFA_g$  son los ácidos grasos "trans" formados durante el procesamiento de aceites vegetales. Las dobles ligaduras entre átomos de carbono en una cadena pueden existir en configuración "cis" ó "trans". Casi todos los ácidos grasos insaturados en la naturaleza tienen la doble ligadura en forma "cis", solamente los ácidos grasos que tienen sus dobles ligaduras en la forma "cis" pueden actuar como  $EFA_g$ . Las ligaduras "trans" solamente se encuentran en la naturaleza producidos en modestos valores por fermentación bacteriana en el intestino de rumiantes. todos los productos lácteos también contienen ácidos grasos "trans" en pequeñas cantidades.

Sin embargo los aceites vegetales procesados son la mayor fuente de ácidos grasos "trans" en la dieta. Las ligaduras "trans" son un tanto mas estables y confieren mejores propiedades de conservación, y así, durante el procesamiento de los aceites vegetales deliberadamente tratan de pasar los ácidos grasos a la forma "trans". PUFA<sub>s</sub> "trans" son ahora establecidos en valores substanciales en todos los alimentos procesados incluyendo, productos de panadería, dulces, galletas y alimentos fritos. Estos ácidos grasos "trans" tienen la habilidad de interferir con la delta-6-desaturasa para incrementar el requerimiento de EPA<sub>s</sub>, probablemente como una consecuencia de la inhibición de la enzima se incrementan los niveles de colesterol en el suero de humanos.

#### 5.1 EPA<sub>s</sub> Y DESORDENES CORONARIOS.

Estudios epidemiológicos han confirmado repetidamente que siempre que la grasa saturada consumida es alta en relación a los EPA<sub>s</sub> ingeridos, entonces es común el desorden coronario. Estos estudios llevan a una campaña en los Estados Unidos con el objeto de reducir el consumo de grasas saturadas e incrementar el consumo de PUFA<sub>s</sub>. En los últimos años la mortalidad coronaria en los Estados Unidos ha bajado por un notable 20-25%. Muchos factores pueden haber contribuido a éste cambio, pero sobre todo la evidencia de peso indica que un incremento en el consumo de PUFA<sub>s</sub> ha sido crucial. Poblaciones como Gran Bretaña, donde no ha sido

equivalente al aumento de consumo de PUFA<sub>9</sub>, no ha mostrado decremento en mortalidad coronaria. En este periodo los niveles de ácido linoleico en tejido adiposo han subido en USA, pero no en Gran Bretaña. En Escocia, donde la mortalidad coronaria es una de las mas altas del mundo, los niveles de ácido linoleico en tejido adiposo son bajos comparados con Suecia que tiene una muy baja mortalidad coronaria.

Una variedad de factores fundamentales contribuyen a mortandades coronarias, éstos incluyen; Niveles elevados de colesterol, elevada presión sanguínea, elevación de agregación de plaquetas, obstrucción vascular por arteroma y espasmo vascular.

## 5.2 EPA<sub>9</sub> Y OBESIDAD.

En los años 50<sub>9</sub>, estudios en infantes mostraron que las calorías ingeridas (y por lo tanto apetito) fue notablemente incrementada cuando los EPA<sub>9</sub> ingeridos fueron reducidos. Un estudio mayor sobre 600 hombres en Heidelberg Alemania Occidental establecieron una fuerte correlación inversa entre obesidad, hipertensión y colesterol sérico por un lado y el nivel de ácido linoleico por el otro. Suplementación de EPA<sub>9</sub> en pacientes siquiátricos y normales se asoció en alguna medida con baja de peso en ausencia de dieta esto pudo ser asociado con incremento de glicerol en plasma, un indicador de movilización de tejido adiposo. Un estudio de rutina en una clínica, sin embargo, fracasó al mostrar algún efecto con la suplementación de EPA<sub>9</sub>. Esto sugiere que los efectos de EPA<sub>9</sub>

sobre obesidad pueden ser confinados a casos en los que la obesidad severa es asociada con una anomalía metabólica.

### 5.3 EPA<sub>3</sub> Y DIABETES MELLITUS.

En los últimos años algunos estudios dispersos sugieren que la suplementación de EPA<sub>3</sub> fue de valor en el mejoramiento de tolerancia a la glucosa.

Los efectos de EPA<sub>3</sub> sobre diabetes fueron recientemente investigados en una investigación mas controlada llevada a cabo durante un periodo de 5 años en la Universidad de Erasmos en Rotterdam. Un grupo fue alimentado con una dieta normal conteniendo alrededor de 3.5% de calorías como ácido linoleico. El otro grupo comió una dieta enriquecida en EPA<sub>3</sub> en las cuales las calorías ingeridas como ácido linoleico fue alrededor de 13% en total. El desarrollo de retinopatía y complicaciones cardiovasculares en el grupo suplementado con EPA<sub>3</sub> fue menos de la mitad de el grupo que comió una dieta normal. Los efectos sobre tolerancia a la glucosa, respuesta de la insulina a la glucosa y colesterol sérico difieren notablemente entre hombres y mujeres. En hombres no fue claro el efecto del enriquecimiento en ácido linoleico sobre estos parámetros. En contraste con mujeres, hubo un notable mejoramiento en tolerancia a la glucosa y en respuesta de la insulina a la glucosa y una modesta baja en colesterol sérico. Esta diferencia de sexo puede relacionarse al hecho de que el requerimiento de EPA<sub>3</sub> en animales machos parece ser de 2 a 3

veces mas alta que en hembras. Esto puede explicar por que los hombres tienen menor respuesta en este estudio, y también, por que los homores parecen ser mas susceptibles que les mujeres a efectos cardiovasculares de dietas occidentales.

#### 5.4 EPA<sub>3</sub> DESORDENES DE PECHO Y CICLO MENSTRUAL.

En los lugares en donde las grasas saturadas ingeridas son altas en relación a la ingestión de EPA<sub>3</sub>, son comunes desórdenes de pecho y ciclo menstrual.

Estas observaciones epidemiológicas alentan la posibilidad que el incremento de EPA<sub>3</sub> ingeridos pueden revertir ó prevenir el desarrollo de problemas de pecho y ciclo menstrual, las mujeres con desórdenes de pecho tienen altas proporciones de producción de sebo y una marcada deficiencia de EPA<sub>3</sub>. Además PGE I inhibe algunas de las acciones periféricas de prolactina una hormona que ha sido implicada en problemas de pecho y ciclo menstrual. Tres pruebas de suplementación de EPA<sub>3</sub> han dado apoyo para la practicalidad de este concepto. Dos estudios controlados de placebo, uno de la universidad de wales y otro en la universidad de Dundee han mostrado que tres gramos de Efamol (fuente de EPA<sub>3</sub>) por dia pueden significativamente atenuar el dolor de pecho y nodularidad. En el hospital médico de santo Thomas fue llevado a cabo un estudio con el mismo producto (Efamol) en 68 mujeres con síndrome premenstrual severo que se mostraban refractarias a otra forma de tratamiento. Dos tercios exhibieron remisión completa de

todos sus síntomas y otro 22% tuvo una respuesta parcial. 26 de 36 con dolor de pecho y premenstrual experimentaron completo alivio y unas 5 adicionales tuvieron una respuesta parcial. Es por lo tanto posible que la suplementación de  $EF_2$  puede sobre un periodo de tiempo actuar como un importante controlador de estos desórdenes comunes de las mujeres.

#### 5.5 $EF_2$ E INFLAMACION.

Mientras alguna forma de inflamación se esté llevando a cabo son encontrados productos del ácido araquidónico (AA). Para que éstos productos sean formados, el AA debe ser primero liberado de los depósitos de la membrana y convertido a la forma libre. El AA puede entonces ser convertido a leucotrienos ( $LT_3$ ) y compuestos relacionados ó bien a 2<sup>a</sup> series de prostaglandinas (derivadas del ácido araquidónico, compuestos que son muy pro-inflamatorios). Aspirina y otros fármacos anti-inflamatorios no esteroideos inhiben la inflamación por bloqueo de la ciclooxigenasa, si los  $LT_3$  son importantes en una reacción como es en asma, por ejemplo, aspirina y fármacos relacionados pueden dejar que mas AA sea convertido a  $LT_3$  y así provocar una exacerbación. Este parece ser el mecanismo por el cual aspirina induce a asma. Los esteroides son mucho mas potentes anti-inflamatorios que los compuestos como aspirina por que ellos bloquean la liberación de ácido araquidónico y así inhiben la liberación de  $PG_2$  y  $LT_3$  (inflamatorios).  $FG_2$  I tiene una acción como esteroide bloqueando la movilización de



ácido artraicidónico.

Así DGLA (ver figura 4) puede tener efectos anti-inflamatorios por que es capaz de elevar PGE I. Además ha sido recientemente establecido que un hidroxiácido derivado de DGLA es capaz de bloquear la producción de leucotrienos proveyendo otra forma de efecto anti-inflamatorio.

La suplementación de EPA<sub>3</sub> atenúa gráficamente el desarrollo de artritis en ratas. En humanos produce un mejoramiento en artritis reumatoide.

### 5.6 EPA<sub>3</sub> Y ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

La esclerosis múltiple (MS), es un desorden donde hay una considerable evidencia de una anomalía de la función inmune, y también evidencias de una anomalía del metabolismo de EPA<sub>3</sub>. Algunas de las evidencias son:

1.- La suplementación de EPA<sub>3</sub> atenúa gráficamente el desarrollo de encefalomielitis experimental (EAE) en ratas y en puercos de Guinea. Los efectos de EPA<sub>3</sub> en EAE dependen del bazo y de la conversión de EPA<sub>3</sub> a PG<sub>2</sub>, por lo que una operación del bazo ó inhibición de la síntesis de PG<sub>2</sub> aboliría las acciones favorables.

2.- Las células rojas de la sangre de pacientes con MS tienen movilidad electroforética anormal en presencia de EPA<sub>3</sub>. Esta anomalía fue propuesta como una prueba de diagnóstico para MS. Inicialmente fue recibido con escepticismo, pero su valor ha sido ahora independientemente confirmado. El tratamiento de pacientes

con  $2FA_g$  lleva a la normalización de esta prueba.

3.- Los niveles de ácido linoleico en la sangre de pacientes con MS son enormemente bajos especialmente durante recaída. Aunque esto ha sido discutido, las observaciones hechas recientemente lo han confirmado. Como los  $2FA_g$  regulan la actividad de linfocitos T supresores y como los niveles de células T supresoras bajan durante la recaída en MS, los cambios en  $2FA_g$  y linfocitos pueden estar conectados.

4.- En unas series de cuidadosos estudios por mas de 30 años, Swank ha seguido el curso de MS en pacientes tomando una dieta baja en grasas saturadas y relativamente rica en  $FUPA_g$ . Esta dieta parece bajar lentamente ó detener los progresos de los desórdenes en comparación con pacientes con MS que no tienen esta dieta. Solamente raras veces la dieta causa alguna reversa substancial de un estado de desórdenes que ya existen, y los efectos se aprecian mas en quienes empiezan la dieta pronto después del diagnóstico. Relativamente pequeños efectos se observan cuando se empieza la dieta mucho después en el curso de estos desórdenes.

5.- Ha habido tres ensayos de efectos de suplementación de  $2FA_g$  en la recaída y progresión de MS. Dos de estos mostraron un efecto significativamente positivo y uno no mostro efecto. La prueba negativa ignoró en su diseño la evidencia que los pacientes que han estado enfermos por un largo tiempo son improbables a beneficio. Re análisis de los resultados de estas pruebas mostraron que la dieta fue efectiva cuando empezó pronto en el curso de los desórdenes, pero no cuando empezó tarde.

## 5.7. EPA<sub>g</sub> Y DESORDENES SIQUIATRICOS.

EPA<sub>g</sub> forman una parte substancial de los lípidos en el sistema nervioso. Sería sorprendente si sustancias establecidas en tal abundancia no fueran importantes. Ellas probablemente juegan roles importantes en la estabilidad de la estructura de la envoltura de la mielina y otras membranas de células nerviosas. Como en otros tejidos ellos proveen un reservorio del que pueden ser formados PG<sub>g</sub>. Ha sido establecido que los PG<sub>g</sub> tienen acciones en una variedad de aspectos del funcionamiento del sistema nervioso. Ellas modulan la velocidad de conducción y la amplitud de acciones potenciales, ellas regulan la liberación de transmisores, y tienen efectos post-sinápticos que modifica la función transmisora. En respecto neurotransmisores como catecolaminas regulan la liberación de prostaglandinas y hay complejas relaciones recíprocas entre las PG<sub>g</sub> y los varios transmisores. Hasta la fecha se ha prestado poca atención a la idea que PG<sub>g</sub> y EPA<sub>g</sub> pueden jugar roles importantes en enfermedades mentales, pero se está incrementando el interés en esta idea.

## 5.8. EPA<sub>g</sub> Y ALCOHOLISMO.

El alcohol etílico tiene por lo menos dos efectos en el metabolismo de PG<sub>g</sub>:

Primero, aumenta la conversión de UGLA a FGA I. Hay buena evidencia que este efecto puede contar para algunas de las acciones

iniciales sobre el comportamiento de alcohol. Una medida de éstos efectos iniciales es, tiempo de sueño alcohol-inducido en animales. El tiempo de sueño alcohol-inducido es reducido por fármacos, que bloquean la formación de  $PG_B$ , y aumentado por la previa administración de  $ASA$ . Además los niveles de  $PGI_1$  son elevados en manía, una condición que en un número de caminos semejan intoxicación alcohólica aguda. Ha sido reportado que infusiones de  $PGI_1$  dadas para desórdenes periféricos vasculares llevan a la sensación de sentirse bien y una suave euforia. El efecto de alcohol de estimulación tenderá a vaciar los depósitos de  $DGLA$ . Como resultado de esto cuando las acciones del alcohol bajan los niveles de  $DGLA$  pueden ser reducidos, y los niveles de  $PGI_1$  pueden quedar abajo de lo normal.

El segundo efecto del alcohol es el bloqueo de la delta-6-desaturasa, entorpeciendo así la conversión de ácido linoleico a  $GLA$ . Esta baja vacía los depósitos de  $DGLA$  y no puede ser reemplazado normalmente de ácido linoleico, y el exceso crónico de alcohol llevará a largo plazo a una deficiencia funcional de  $EPA_B$ . Muchos de los efectos a largo plazo del alcohol pueden relacionarse a la baja de  $EPA_B$ .

En base a los datos obtenidos en la recopilación de información en el desarrollo de este trabajo, podemos decir que:

Se recomienda la separación del ácido linoleico por medio de la combinación de dos técnicas; Cristalización fraccionada a baja temperatura y formación de complejos de inclusión de urea, ya que por medio de la primera podemos separar compuestos debido a su diferente solubilidad a diferentes temperaturas en disolventes orgánicos ó mezclas de disolventes, y por medio de la segunda la separación de ácidos grasos se hace conforme a su grado de insaturación

Se recomienda almacenar los ácidos grasos (ácido linoleico) en forma de ésteres, ya que, estos son mas estables contra la oxidación por aire, por lo que se deben almacenar en recipientes bien cerrados y protegidos de la luz.

En conclusión, en este trabajo se recopila la información necesaria para separar y valorar el ácido linoleico, así como, sus usos dentro del ramo farmacéutico.

- 1.- R. E. Landers and D. K. Mathmann. Vegetable Oils; Effects of Processing Storage and Use on nutritional Values. The Journal of the American Oil Chemist's Society. vol 58, No 3 p 255 (1981).
- 2.- Bailey's. Industrial Oil and Fat Products, 3<sup>a</sup> edition. D. Swern Interscience Publishers , New York (1964).
- 3.- E. J. Campbell. Sunflower Oil. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 60 No 2 p 339A (1983).
- 4.- D. G. Cummins, J. E. Marlon, J. P. Craigmiles and R. E. Burns. Oil Content, Fatty Acid Composition, and Other Agronomic Characteristics of Sunflower Introductions. The Journal American Oil Chemist's Society, vol 44, No 10 p 581 (1967).
- 5.- Dr. Y. El-Shatory and Dr. F. S. Taha. Statistical Studies on Physical and Chemical Characteristics and Fatty Acid Composition of Sunflower seed oils. Grasas y Aceites, vol 31 p 83 (1980).
- 6.-Gonzalez Gonzalez Alfonso, Mendoza Calderon T. Anteproyecto de una Planta para la Obtención de Aceite de Girasol. Tesis, Facultad de Química UNAM Mex. (1975)
- 7.- S. Muller. ISI's New Sunflower Oil Plant. The Journal of the

American Oil Chemist's Society, vol 60 No 2 p 345A (1983).

8.- W. Herbert Morrison III, and James A. Robertson, Richard B. Russell. Solvent Winterization of Sunflower Seed Oil. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 52 No 5 p 148 (1975),

9.- J. B. Brown and G. Y. Shinowara. Studies on the Chemistry of Fatty Acids II, Preparation of Pure Oleic Acid by a Simplified Method. Chemical Abstracts, vol 59 , p 6 (1937).

10.- J. B. Brown and George G. Stoner. Studies on the Chemistry of the Fatty Acids I, The purification of Linoleic Acid by Crystallization Methods. Chemical Abstracts, vol 59 p 3 No 3 (1937).

11.- K.P. Kreulen. Fractionation and winterization of the Edible Fats and Oils. The Journal of the American Oil Chemist's Society vol 53 p 393 (1976).

12.- G. Riverola, M. C. Añon and A. Calvello. Crystallization of Waxes During Sunflower Seed Oil Refining. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 62 p 150 (1985).

13.- K. T. Zilch. Separation of Fatty Acids. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 56 p 740A (1979).

14.- L. M. Du Plessis, J. B. K. De Villiers and W. H. Van Der Walt.

Stability Studies on Methyl and Ethyl Fatty Acids Esters of Sunflower Seed Oil. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 62 p 748 (1985).

15.- L. G. Adlof and E. A. Amken. Synthesis and Purification of Polyunsaturated Triglycerides. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 61 p 83 (1984).

16.- Haraldson. Separation of Saturated/Unsaturated Fatty Acids. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 61 p 219 (1984).

17.- Werner Escheu. The Use of Bleaching Part in Fatty Acid Production. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 61 p 214 (1984).

18.- D. G. Chobanov and Ing. K. R. Topalova. Solvent Fractionation of Tallow and Interesterified Tallow. Grasas y Aceites, vol 33 p 19 (1982).

19.- D. Bauchart and B. Auroseau. Preparation of Heptadecenoic Acid from *Candida Tropicallis*. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 57 p 121 (1980).

20.- V. V. R. Subrahmanyam and K. T. Achaya. Crystallization of Indian Beef Tallow Fatty Acids from Aqueous Ethanol. The Journal



of the American Oil Chemist's Society, vol 35 p 356 (1958).

21.- O. J. Privett, E. Drezult, J. B. Covell, L. H. Nurdie and W. O. Lunberg. Solubilities of Fatty Acids and Derivatives in Acetone. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 35 p 366 (1958).

22.- Hernan Schlenk and Ralph Thomas. Separation and Stabilization of Fatty Acids by Urea Complex. The Journal of Chemist's Society, p 5001 nov. 1950

23.- E. W. Lockey. Vegetable fats and Oils, 1<sup>B</sup> edition, New York pags. 772-777, (1954).

24.- T. N. Lehta and S. B. Dabhade. Fractionation of Sesame and Jafflower Oil Fatty Acids with Urea. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 35 p 501 (1958).

25.- Herbert J. Lutton, Catherine R. Lancaster and Ordean L. Brekke. Fractionation and Structure of Soybean Glycerides. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 35 p 25 (1950).

26.- Herbert A. Newey, Eduard C. Shokal, Albert C. Lueller and Theodore F. Bradley. Industrial and Engineering Chemistry, vol 42, No 12 p 2538 (1950).

27.- G. K. List, K. L. Hoffmann, Helen A. Kosser and C. D. Evans.

Odor Evaluation of Fatty Methyl Esters Purified as Urea Adducts. The Journal of The American Oil Chemist's Society, vol 44 p 485 (1967).

28.- B. Arousseau and D. Bauchert. Stepwise Purification of Fatty Acids, Compared Fractional Crystallization with Urea or from Acetone Solutions of Palmitoleic, Heptadecanoic and Oleic Acids. The Journal of the American Oil Chemist's Society, p 125 March (1980).

29.- N. Hoagsma, C. A. Van Gent, J. B. Luten, H. W. de Jong and L. Van Door. Preparation of an  $n_3$  Fatty Acid Concentrate from Cod Liver Oil. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 59 No 3 p 117 (1982).

30.- Kevin J. Harrington and Catherine D'Arcy-Evans. A Comparison of Conventional and in situ Methods of Trans Esterification of Seed Oil from a Series of Sunflower Cultivars. The Journal of the American Oil Chemist's Society vol 62 No 6 p 1009 (1985).

31.- Official Methods of Analysis (AOAC). Fourteenth Edition, 1984, p 511-515.

32.- O. Korver, E. T. Alderlieste and C. Boelho. Analysis of Linoleate and Linolenate by Isomerization with Potassium Tertiary

Butoxide in Mixtures of Tertiary Butanol and ethylene Glycol Dimethyl ether. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 43 p 484 (1966).

33.- J. H. Mitchell Jr.; H. R. Kreybill and F. P. Zscheile. Quantitative Spectral Analysis of Fats. Industrial and Engineering Chemistry (Analytical Edition) vol 15, p 1 (1963).

34.- Daniel Swern, H. B. Knight, O. D. Shreve and E. R. Heether. Comparison of Infrared Spectrophotometric and Lead Salt Alcohol Methods for Determination of Trans Octadecenoic acids and Esters. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 27 p 17 (1950).

35.- A. R. Baldwin and L. S. Sniogowski. Fatty acid Compositions of Lipids from Corn and Grain Sorghum kernels. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 35 p 24 (1951).

36.- G. N. Jham, F. F. F. Teles and L. G. Campos. Use of Aqueous HCl/MeOH as Esterification Reagent for Analysis of Fatty Acids Derived from Soybean Lipids. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 59 p 32 (1982).

37.- Akihiko Nagao and Megumi Yamazaki. Lipid of Sunflower Seeds Produced in Japan. The Journal of the American Oil Chemist's Society vol 60 p 1654 (1983).

- 38.- I. D. Metcalfe. Traditional Analytical Chemistry of Fatty acids and Their Derivatives. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 56 p 786a (1979).
- 39.- J. T. O'Connor, D. C. Heinzelman, P. C. Peck and R. W. Flanck. A Method for Determination of Linoleic Acid and Conjugated Dienoic Acids in Materials Containing Oleostearic Acids. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 27 p 132 (1953).
- 40.- Report of the seed and meal analysis Committee 1949. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 27 p 21 (1950).
- 41.- D. Chobanov and R. Chobanova. Alterations in Glyceride Composition During Interesterification of Mixtures of Sunflower Oil with Lard and Tallow. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 54 p 47 (1977).
- 42.- L. Masson. Relative Nutritional Value of various Dietary Fats and Oils. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 59 p 249 (1981).
- 43.- Hermann Stege. Fatty Acid Fractionation by Column Distillation Purity, Energy Consumption and operating Conditions. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 61 p 204 (1984).
- 44.- Anna Johansson. The effect of Processing on the Content and

Composition of Free Sterols and Sterole Esters in Soybean Oil. The Journal of the American Oil Chemist's Society, vol 56 p886 (1979).

45.- Dr. J. Gracian y Dr. J. Arevalo. Composición de las Ceras del Aceite de Girasol. Grasas y Aceites, vol 32 p I (1981).

46.- Marcia Gutcho. Edible Oils and Fats (Recent Developments) I<sup>a</sup> Edition, New Jersey USA 1979, pags 357-362.

47.- E. Bernardini. Tecnologia de Grasas y Aceites, I<sup>a</sup> Edición, España 1981, pags 368-373.

48.- David P. Horrobin. Essential Fatty Acids, a Review. Eden Press Inc. 1982.

49.-P. Leslie Hart A. M. and Harry Johnstone Fisher. Analisis Moderno de los Alimentos. Editorial Springer Verlag, I<sup>a</sup> Edición, España 1971, pags 345-378

50.- H. A. Boekennoogen. Oils, Fats and Fats Products, I<sup>a</sup> Edition vol I, Interscience Publishers, 1964, pags 86-92.