



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**OBTENCION DE UNA FRACCION RICA EN ACIDO
LINOLEICO A PARTIR DE ACEITE DE GIRASOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA :

ELSA BERENICE GAONA PINEDA



MEXICO, D. F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
M É X I C O**

F A C U L T A D D E Q U Í M I C A

**OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN RICA EN ÁCIDO
LINOLÉICO A PARTIR DE ACEITE DE GIRASOL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
PRESENTA
ELSA BERENICE GAONA PINEDA



MÉXICO, D. F.

2002

Jurado asignado:

Presidente Profra. Francisca Aida Iturbe Chiñas

Vocal Profra. Maria de los Angeles Valdívila López

Secretario Prof. Arturo Navarro Ocaña

1er sup. Profra. Luz Sandra Sánchez del Angel

2do sup. Prof. Jorge Aburto Anell

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 323, conjunto E, Facultad de Química.

Asesor: M. en C. Francisca Aida Iturbe Chiñas

Francisca Aida Iturbe Chiñas

Sustentante: Elsa Berenice Gaona Pineda

Elsa Berenice Gaona Pineda



**A mis padres:
Elsa Pineda y Rodolfo Gaona
por su gran cariño, ejemplo, apoyo incondicional,
por el esfuerzo hecho para mi educación y formación.**

**Con mucho cariño a mis hermanos:
Deyanira, Rodolfo y Alethia**



UNAM - FQ



A mi novio Eder
Por su cariño y apoyo

A mis amigas



Mi agradecimiento a:
M. en C. Fca. Aida Iturbe
Por su gran interés y ayuda proporcionados en la dirección de
éste trabajo.
Por la confianza y oportunidades brindadas.

Un especial agradecimiento a:
M. en C. Ma. de los Angeles Valdivia, Dr. Arturo Navarro y
Dr. Jorge Aburto
Por el tiempo dedicado para la mejora de éste trabajo



ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
CAPITULO II. ANTECEDENTES	4
2.1 Ácido linoléico	4
2.2 Fuentes de ácido linoléico	7
2.3 Fraccionamiento de ácidos grasos	10
2.4 Análisis de ácidos grasos	15
2.4.1 Identificación y cuantificación	15
2.4.2 Deterioro oxidativo de ácidos grasos	18
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
Procedimiento general	23
Metodologías	24
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Saponificación	32
4.2 Fraccionamiento por temperatura	33
4.3 Fraccionamiento por complejación con urea	34
4.4 Análisis cromatográfico	52
4.5 Escalamiento del método seleccionado	58



4.6 Análisis de costos	61
CAPITULO V. CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO 1. Metodologías	65
ANEXO 2. Fraccionamiento por temperatura	70
ANEXO 3. Cromatogramas del escalamiento	71
ANEXO 4. Comparación de concentraciones porcentuales y concentraciones relativas	74



CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad los ácidos grasos tienen usos muy variados en diferentes industrias, como en la producción de lubricantes, pinturas, esmaltes, medicamentos, estándares para cromatografía y en la industria de los alimentos para enriquecerlos, o como aditivos.

La producción de ácidos grasos es por medio de tratamientos químicos, físicos o enzimáticos; como cristalización selectiva en solventes, formación de aductos con urea, filtración en membrana, tratamientos con enzimas, destilación molecular(4, 11), siendo en su mayoría métodos lentos, poco eficientes, caros y de difícil escalamiento; por lo que se obtienen mínimas cantidades de ácidos grasos a precios considerables.

Actualmente el ácido linoléico se encuentra en el mercado, únicamente como estándar para cromatografía; por lo que el uso de mínimas cantidades de éste implica un alto costo, siendo necesario el desarrollo de metodologías que permitan la obtención de ácido linoléico o de fracciones ricas en éste ácido de manera eficiente.



Existen líneas de investigación, que requieren de fracciones ricas en ácido linoléico (FRAL) para llevar a cabo estudios de oxidación de aceites, debido a que la metodología oficial para medir el nivel de peróxidos necesita grandes cantidades de muestra.

También como parte de otras líneas de investigación de antioxidantes naturales, se requieren FRAL, pues es un reactivo necesario en una técnica de rutina para medir ésta actividad.

Debido a que nutricionalmente, el ácido linoléico es un ácido graso esencial, FRAL tendría una aplicación potencial en la industria de los alimentos, como ingrediente y para enriquecer fórmulas, lo que aumentaría el valor nutricional de los alimentos.

Otra aplicación de FRAL estaría también en la industria de los alimentos, como aditivo, pues al ácido linoléico se usa como estabilizante, emulsificante y saborizante, ya que, productos de su oxidación imparten el sabor típico de tomate y papas fritas, entre otros.



1.1 OBJETIVOS.

Objetivo General: Establecer un esquema de obtención de fracciones ricas en ácido linoléico (FRAL), para su uso en estudios de oxidación y aplicaciones en la industria, tratando de disminuir costos.

Objetivos Específicos:

- Evaluar las metodologías de separación de ácidos grasos, mediante rendimiento e índice de yodo de las fracciones.
- Selección del método para la obtención de la fracción más rica en ácido linoléico.
- Realizar el escalamiento del método seleccionado de separación de ácidos grasos.
- Cuantificar ácido linoléico en la fracción de mayor grado de insaturación, mediante su análisis por cromatografía de gases.



CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.

2.1. ÁCIDO LINOLÉICO.

El ácido octadeca-9,12-dienoico es un ácido graso polinsaturado de cadena larga; más específicamente, de 18 átomos de carbono con dos insaturaciones, la primera entre los carbonos 9 y 10 y la segunda entre los 12 y 13, tiene un valor de índice de yodo de 181.1 (26) y un peso molecular es de 280.44 g/mol.

Desde un punto de vista nutricional el ácido linoléico, es de suma importancia; ya que, es un ácido graso esencial, pues no es sintetizado en nuestro organismo siendo importante su ingesta mediante la dieta. Es indispensable en diversas funciones metabólicas, pues tiene una importante función como precursor de los icosanoides entre los que se encuentran las prostaglandinas.

Las prostaglandinas son sustancias que intervienen en la función reproductiva, como anti-inflamatorio, en la respuesta inmune, pues activan las funciones de los linfocitos; en la formación de coágulos de sangre, porque evitan la agregación de plaquetas; regulación de la presión sanguínea, ya que actúan como vasodilatador, entre otros (5, 18).

Las fuentes del ácido linoléico son aceites vegetales provenientes de semillas como algodón, cártamo, maíz, uva ó girasol.



El ácido linoléico tiene usos muy variados en diferentes industrias, los linoleatos de manganeso y cobalto, entre otros, en la producción de lubricantes, pinturas y barnices, donde tiene una función secante. El linoleato de calcio en la producción de esmaltes actúa como emulsificante y estabilizador; mientras que el linoleato de amonio es usado en la manufactura de ceras pulidoras.

También se produce como estándares para cromatografía, se encuentra en medicamentos y en la industria de los alimentos para enriquecerlos, o como aditivos, tal es el caso del linoleato de calcio que se usa como emulsificante y estabilizador en rellenos de repostería. La oxidación del ácido linoléico produce sustancias que encuentran su aplicación como saborizantes, como el 1-octen-3-ol que presenta sabor a champiñón, 2, 4-decadienal el cual da el típico sabor a papas fritas o *cis* 3-hexenol, *cis* 3-hexenal y *trans* 2-hexenol para dar sabor a tomate.

Otro uso es como reactivo en la determinación de actividad antioxidante de otras sustancias, pues se induce su oxidación con agua oxigenada, en presencia de la sustancia con poder antioxidante, se mide la absorbancia del ácido linoléico respecto al tiempo, lo que permite comparar la eficiencia de la sustancia antioxidante con los antioxidantes comerciales (19).



La doble insaturación presente en la estructura de este ácido graso lo hace muy susceptible a la oxidación, produciendo en los alimentos los olores y sabores desagradables típicos de la rancidez. Esto representa pérdidas en el valor nutritivo del alimento, en la aceptación del producto por parte del consumidor y económicas; también puede representar un riesgo a la salud del consumidor, pues como consecuencia del proceso oxidativo se producen sustancias que pueden resultar tóxicas, dependiendo de las cantidades ingeridas y del grado de oxidación de la grasa del alimento (5, 7).

En estudios recientes se encontró que isómeros del ácido linoléico, llamados ácido linoléico conjugado (ALC), tienen beneficios potenciales para la salud humana como propiedades anti-cáncer, la disminución de los niveles de triacilgliceroles, regulación de los niveles de glucosa en sangre y disminución hasta en un 30% de arterioesclerosis. Estos efectos se observaron en ratas, conejos y cerdos alimentados con ALC (5, 22).

El ácido linoléico conjugado es intermediario en las reacciones de biohidrogenación de lípidos, dadas en los rumiantes. Los isómeros a los que se les atribuyen los beneficios potenciales a la salud humana son el ácido *cis*-9, *trans*-11 linoléico y el ácido *trans*-10, *cis*-12 linoléico. Las fuentes de ALC son: la leche de vaca, los productos lácteos y la grasa de la carne.



En humanos se han realizado estudios, donde el consumo de 3 g de ALC al día provoca la pérdida de peso; lo que indica que puede ser útil en tratamientos contra la obesidad.

2.2 FUENTES DE ÁCIDO LINOLÉICO.

a) Aceite de semilla de algodón.

Los principales ácidos grasos en éste aceite son el ácido palmítico con 17-31%, ácido oleico de 13 a 44% y ácido linoléico con 33 a 59% (16). Las características típicas del aceite refinado son: peso específico a 25 °C de 0.916 a 0.918, índice de refracción a 25 °C entre 1.468 y 1.472, índice de yodo de 99 a 113, índice de saponificación entre 189 y 198 y no contiene más de 1.5% de material insaponificable.

Se obtiene de las semillas *Gossypium hirsutum* en Estados Unidos y *Gossypium barbadense* en Egipto. El aceite se usa en la preparación de "shortenings", margarinas, aderezos y también se usa como aceite de cocina (8).

b) Aceite de maíz.

Se obtiene de la semilla *Zea mays* y el mayor productor es Estados Unidos; su principal uso es como aceite comestible y de freido (8).



Contiene de un 34 a un 62% de ácido linoléico, de ácido oleico 24 a 42% y en menor proporción ácido palmítico (9-14%) (16). Tiene peso específico a 25 °C de 0.915 a 0.920, índice de refracción entre 1.470 a 1.474, índice de yodo de 103 a 128, índice de saponificación de 187 a 193 y no más de 2% de material insaponificable.

c) Aceite de cártamo.

El aceite de cártamo es una fuente importante de ácido linoléico, pues contiene de 55 a 81%; ácido oleico (7-42%), ácido esteárico (1-10%) y ácido palmítico (2-10%) (16). El aceite refinado tiene de 0.919 a 0.924 de peso específico, entre 1.472 a 1.475 de índice de refracción, 140 a 150 de índice de yodo, 186 a 197 de índice de saponificación y no contiene más de 1.5% de material insaponificable.

El aceite se obtiene de la semilla de la planta *Carthamus tinctorius*, por India, México y Estados Unidos en mayor proporción y España, Portugal y Australia en menor proporción. Es usado como aceite comestible, en la elaboración de pinturas y resinas (8).

d) Aceite de semilla de uva.

Este aceite resulta potencialmente importante por la gran cantidad de uvas (*Vitis vinifera*) utilizadas en la producción de vino, pues por su composición, ácido linoléico (58-78%), ácido oleico (12-28%), ácido esteárico (3-6%) y ácido palmítico (5.5-11%) (16), sería posible su uso como aceite de cocina (8).



e) Aceite de girasol.

El aceite de girasol es una fuente de ácido linoléico, debido a que contiene un 85% de ácidos grasos insaturados de los cuales el 55% al 75% es ácido linoléico (C 18:2), 14-34 % de oléico (C 18:1), trazas de linolénico (C 18:3) y tan solo tiene un 15% de ácidos grasos saturados, palmítico (C 16:0) y esteárico (C 18:0); tiene un peso específico entre 0.915 y 0.919, índice de refracción a 25 °C de 1.472 a 1.474, índice de yodo entre 125 a 136, índice de saponificación de 188 a 194 y cuando ha sido bien refinado no contiene más de 1.5% de material insaponificable (8).

Los principales productores de éste aceite son Rusia, Argentina y Hungría; y en menor cantidad Estados Unidos; se obtiene por presión o extracción con solventes como hexano o éter de petróleo de la semilla decorticada de girasol (*Helianthus annuus*). Los principales usos de éste aceite son: como aceite de cocina, para la elaboración de aderezos e industrialmente para la manufactura de "shortenings" y margarinas. (8, 13, 20).



2.3 FRACCIONAMIENTO DE ÁCIDOS GRASOS.

La separación de ácidos grasos ha sido estudiada con diversos fines:

Conocer la composición de las diferentes fracciones obtenidas de aceite de girasol hidrogenado por Herrera y sus colaboradores (13) utilizando la cristalización de ácidos grasos por la disminución de temperatura. El estudio reveló que a menores temperaturas se incrementaba la cristalización; aumentando considerablemente el contenido de ácido linoléico obtenido en las fracciones cristalizadas a 12 °C, su análisis por HPLC les permitió conocer la composición del aceite de girasol procesado de forma confiable.

En el caso de separación por cristalización con urea, en las investigaciones realizadas, se comprobó que éste puede ser un método útil para la separación de ácidos grasos y sus derivados (ésteres metílicos), debido a que los "huéspedes" más adecuados en los compuestos de inclusión son las moléculas hidrocarbonadas de cadena larga, lo que indica que los ácidos grasos de cadena corta y aquellos de cadena larga con insaturaciones no formarán complejos con urea, debido a impedimentos estéricos (10, 11, 24).



En 1952, Smith (21), determinó la estructura de los cristales de los complejos de urea; la cual tiene unidad de celda hexagonal con seis moléculas de urea. La urea forma una estructura con un tunel en el cual se incluye a la molécula huésped; que en ese estudio fue el ácido hexadecanoico o palmítico. La formación de la estructura con tunel de la urea es inducida por la presencia de éstas moléculas hidrocarbonadas que son "buenos huéspedes" y la presencia de éstas mismas moléculas pueden aumentar la inclusión de "malos huéspedes" (10).

Por otro lado, Harris (10), determinó que los solventes adecuados para llevar a cabo ésta técnica, deben ser moléculas muy pequeñas, como es el caso de metanol y etanol; pues con esto se evita que se presente competencia con las moléculas "huésped" por el sitio en la estructura helicoidal de la urea y así evitar la co-inclusión de las moléculas del solvente.

Schlenk (23) fue el primero en proponer éste método como método de separación de ácidos grasos, pues en 1950 aisló hasta 800 g de complejos equivalente a 184 g de oleatos con una pureza del 97 al 98% partiendo de 500 g de aceite de oliva; también demostró que los ácidos grasos complejados con urea no forman peróxidos pues no permite la entrada de oxígeno por lo que este método ofrece la ventaja de la estabilización de ácidos grasos a la oxidación.



Traitler (27) y su grupo de investigadores en 1988 determinaron que con mayor grado de insaturación disminuye la formación del complejo, por lo que los ácidos grasos saturados son complejados primeramente. Con este método el primer paso es la separación de la fracción saturada de la insaturada como señala Hayes en 1998 (11, 12), donde determinó que la proporción entre urea y ácidos grasos es determinante en el rendimiento de los complejos; así mismo bajas cantidades de solvente (etanol) disminuyen la estabilidad de los ácidos grasos a la oxidación, pues se requieren elevadas temperaturas para su solubilización.

El autor menciona que la técnica puede ser usada como un fraccionamiento grueso para luego ser afinado con la ventaja de que resulta inofensivo al medio ambiente y de bajo costo pues los reactivos se reciclan.

Auroussea y Bauchart en 1980 (2, 3) estudiaron la separación de los ácidos hexa, hepta y octadecenóico (C16:1, C17:1 y C18:1) con propiedades químicas muy similares a través de la cristalización con urea y con acetona, con el primer método se complejó primeramente el C18:1 y los otros dos ácidos fueron mínimamente complejados.



Por otro lado en acetona a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, C 16:1 no cristalizó tan fácilmente como C17:1 y hubo mucha dispersión en el caso de C18:1, pues a concentraciones mayores al 10% se incorporaba preferencialmente en los cristales y a bajas concentraciones tenía el patrón de cristalización de C 16:1; los autores concluyen que para la separación de mezclas similares en sus propiedades la elección para una purificación eficiente es un proceso que combine las dos técnicas.

Estos autores reportan que cuando en una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados, la proporción de urea debe duplicarse o triplicarse para lograr la completa separación de éstas. Lo que se apreció en todas las investigaciones mencionadas es que para la adecuada separación de ácidos grasos es necesario realizar fraccionamientos secuenciales.

Otros métodos que se han usado para fraccionar ácidos grasos son la destilación fraccionada la cual fue perfeccionada, desarrollando las columnas empacadas con alta eficiencia en la separación, éstas encontraron su mayor aplicación en la identificación y cuantificación de los ácidos grasos.



El desarrollo de la destilación molecular ha permitido separaciones que permiten la obtención de ácidos grasos con alta pureza; esta consiste en el empleo de alto vacío para disminuir la temperatura de ebullición, evitando la descomposición de los ácidos grasos (28).

Los métodos de cristalización selectiva con solventes, como acetona, etanol y éter etílico, también son usados para separar ácidos grasos y se basan en el principio de la cristalización el cual, es usar solventes donde los ácidos grasos sean solubles en caliente y algunos insolubles en frío, lo cual hace selectivo el método. El anterior surgió como una alternativa al uso de las sales de los ácidos grasos, siendo las más usadas las sales de plomo, pero éste método no permite la separación de mezclas que contengan ácidos grasos insaturados con más de 18 átomos de carbono y ácidos grasos saturados de menos de 14 átomos de carbono (28).

Para evaluar la eficiencia de los métodos de fraccionamiento y el deterioro con el que se obtienen las fracciones se recurre a los siguientes métodos de análisis de ácidos grasos, los cuales son los comúnmente usados.



2.4 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.

2.4.1 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

En la actualidad se cuenta con varias metodologías que permiten conocer la composición de los ácidos grasos de grasas, aceites y en los procesos de purificación las fracciones obtenidas por los métodos de separación; todas ellas son técnicas cromatográficas:

a) Cromatografía de gases (14, 17, 21).

Esta es una de las más desarrolladas y aplicadas en la actualidad, para este análisis es necesaria la derivatización de los ácidos grasos a sus ésteres metílicos, con el fin de hacerlos volátiles y con esto mejorar su comportamiento cromatográfico. La formación de éstos ésteres se lleva a cabo en condiciones ácidas con catalizadores como HCl en metanol, reactivo que debe usarse recién preparado. Otra opción es con trifloruro de boro como catalizador, pero éste último es tóxico y relativamente inestable, siendo necesario su almacenamiento en refrigeración.



Otros reactivos usados para la esterificación son metóxido de sodio en metanol, reactivo que no se puede almacenar y requiere una preparación que puede ser riesgosa, debe usarse anhídrido pues de lo contrario el proceso no sería completo y no podría ser usado con fines cuantitativos pues no se derivatizarían ciertas cantidades de los ácidos grasos.

En el mercado existen una gran variedad de equipos que proporcionan mayor control y mejor manejo de datos; lo mismo que una gran variedad de columnas que permiten una mejor separación; el detector usado es el de ionización de flama (FID) y es sumamente sensible, también existen equipos acoplados a espectrometría de masas que facilitan la identificación.

b) Cromatografía en capa fina (6, 14, 21).

Con esta técnica se puede lograr una excelente separación de las clases de lípidos usando un soporte de sílica; la cual si se impregna con soluciones de nitrato de plata al 5%, se da la separación de los ácidos grasos por su grado de insaturación y aumentando la concentración de nitrato de plata al 25 %, es posible, incluso, la separación de los isómeros de los ácidos grasos insaturados, lo anterior se conoce como cromatografía de argentación.



Los solventes que conforman la fase móvil en general son mezclas de hexano: éter etílico (85:15) para ésteres metílicos y hexano:éter: ácido acético (50:50:1) para ácidos grasos.

Para la identificación y/o cuantificación la placa se revela con vapores de yodo, ácido sulfúrico, otra forma es asperjando sobre la placa 2, 7-diclorofluoresceína en solución alcohólica; el cual dará, como su nombre lo indica, fluorescencia a la luz UV. En este aspecto el método no es muy exacto, pues muchas veces el color producido no es proporcional a la concentración, ya que, la placa puede tener imperfecciones en la forma y en la densidad de la fase estacionaria; por lo que se han estado desarrollando equipos que con barridos de la superficie de la placa, cuantifiquen la intensidad del color producido por reacciones específicas.

c) Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (14, 17, 25).

Para el análisis de ácidos grasos el sistema de HPLC, no es recomendable; esto es debido a los detectores más comúnmente usados (UV), pues los ácidos grasos, salvo los poliinsaturados, no tiene respuesta apreciable al UV; por lo que no son detectados y requiere la derivatización de todos a ésteres de p-bromo fenilacilo.



Por otro lado el detector de índice de refracción detecta a los ácidos grasos saturados pero los insaturados presentan muy pobre respuesta.

En la mayoría de los casos se recurre a fases inversas, donde la columna es de carácter hidrofóbico y la fase móvil es hidrofílica, normalmente metanol y acetonitrilo, y para mejorar la separación es posible realizar la cromatografía de argentación, incluyendo en la fase móvil las soluciones de plata(14, 17, 25).

2.4.2 DETERIORO OXIDATIVO DE ÁCIDOS GRASOS (7, 9)

El deterioro oxidativo de lípidos es un proceso muy complejo donde los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles a sufrir éste deterioro; éste proceso involucra radicales libres y consta de tres etapas:

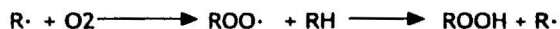
La primera es la iniciación, donde un radical libre, formado por acción de la luz o por la presencia de metales; sustrae el hidrógeno de menor energía de enlace de los ácidos grasos dando lugar a los radicales de éstos.



Otra manera como inicia la oxidación es mediante oxígeno singulete, el cual está en ese estado por la presencia de sensibilizadores, como pigmentos, luz, metales; éste oxígeno toma un electrón de las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados provocando el desplazamiento del doble enlace y la pérdida de un hidrógeno, dando como resultado radicales libres de los ácidos grasos.



En la segunda etapa, denominada propagación; como su nombre lo indica se desarrollan reacciones en cadena, donde el radical ($\text{R}\cdot$) de los ácidos grasos formará los peróxidos con el oxígeno atmosférico y estos a su vez los hidroperóxidos, sustrayendo otro $\text{H}\cdot$, generando así más radicales libres.



A su vez, debido a que los hidroperóxidos formados son muy inestables, se descomponen dando lugar a los productos secundarios, como aldehídos, cetonas, alcoholes, entre otros, algunos de ellos de bajo peso molecular, siendo responsables de los olores y sabores desagradables.

En la tercera etapa conocida como terminación, los diversos radicales formados pueden interaccionar entre sí dando una gran variedad de compuestos, como hidrocarburos, dímeros y polímeros.



- Técnicas para medir la oxidación lipídica (9, 16).

a) Índice de peróxidos (método yodométrico ó volumétrico)

Este método consiste en la titulación con tiosulfato de sodio del yodo liberado por los peróxidos a partir de KI, siendo proporcional la cantidad de yodo liberado a la cantidad de peróxidos en la muestra. Esta es la metodología oficial, pero presenta varias desventajas, entre ellas que la cantidad de muestra es grande, la detección del punto final de la titulación depende del analista por lo que implica mayor error y es un método poco sensible.

b) Índice de peróxidos (método colorimétrico).

Esta metodología se basa también en la reactividad de los peróxidos, pues oxidan al Fe^{2+} a Fe^{3+} , el cual forma un complejo colorido con tiocianato de amonio que se mide espectrofotométricamente. Es una técnica muy sensible y que requiere de mínimas cantidades de muestra.



Pero debido a que los peróxidos durante las primeras etapas del proceso oxidativo van en aumento, por su gran reactividad también se van descomponiendo, por lo que después de presentar un máximo, los niveles de peróxidos presentan un decremento en las últimas etapas, siendo necesario realizar otras determinaciones que midan los productos secundarios de la oxidación, los cuales siempre van en aumento.

c) Análisis con ácido tiobarbitúrico (TBA).

Se fundamenta en las reacciones de condensación del TBA con la molécula de malonaldehído dando una coloración roja y que se mide a 530 nm; pero no en todos los sistemas oxidados se encuentra el malonaldehído, pues los sistemas con ácidos grasos poliinsaturados son los que llevan a la producción de éste dialdehído. Por otro lado muchos alcanales y alquenes también reaccionan con el TBA dando una coloración amarilla que se lee a 450 nm.

d) Índice de Kreis.

Es una metodología que se fundamenta en la formación de una coloración rosa, que se lee a 540 nm, cuando el floroglucinol reacciona con compuestos carbonílicos, como epóxialdehídos y aldehídos; la intensidad del color es proporcional a la generación de éstos compuestos y por lo tanto se relaciona con el grado de deterioro oxidativo de la muestra.



e) Índice de paranisidina.

Fundamentado en el color amarillo que se produce cuando la paranisidina reacciona con aldehídos, que se puede evaluar espectrofotométricamente a 350 nm e igualmente es proporcional a la generación de los compuestos secundarios en el proceso oxidativo.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.

a) Materia prima:

Aceite puro de girasol, Marca CAPI.

Se seleccionó éste aceite debido a que de las fuentes de ácido linoléico mencionadas; el aceite de girasol 100% puro es el más comercial, por lo que se encuentra en cualquier supermercado. La marca se seleccionó con base al costo.

b) Todos los reactivos usados en la selección del proceso de separación y caracterización de las fracciones fueron grado analítico.

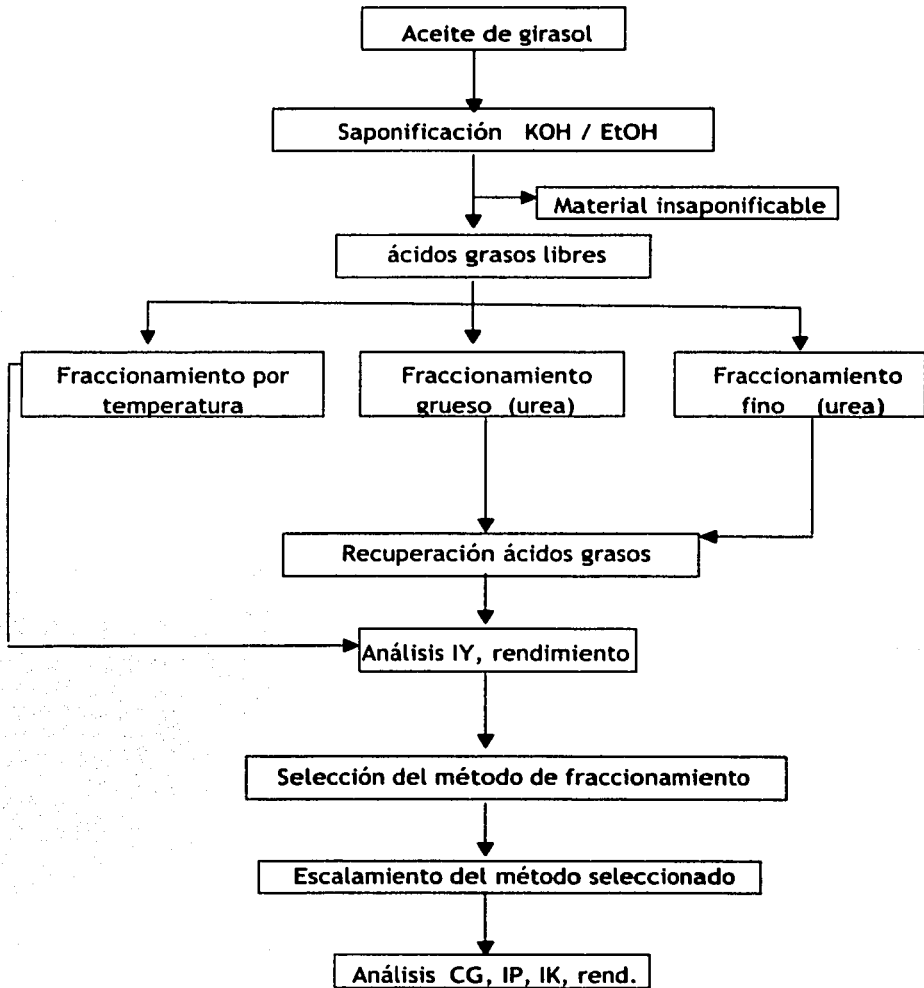
c) En el escalamiento se utilizaron reactivos grado técnico.



PROCEDIMIENTO GENERAL.

El procedimiento seguido consistió:

1. Liberación de ácidos grasos del aceite de girasol, mediante una saponificación completa.
2. Los ácidos grasos libres (AGL) se sometían a los tres métodos de separación (fraccionamiento por temperatura, formación gruesa de aductos de urea y formación fina de aductos de urea). Después de recuperar las fracciones se realizó su análisis que consistía en conocer su grado de insaturación, mediante índice de yodo (IY) y determinando su rendimiento.
3. Selección del método que permitió obtener la fracción más rica en ácido linoléico.
4. Escalamiento del método seleccionado, con el fin de evaluar el efecto del incremento de AGL a fraccionar; las cantidades de AGL fueron: 10g, 50g, 100g y 150g. Se analizó la fracción más insaturada, mediante su contenido en ácido linoléico por cromatografía de gases (CG), se determinó rendimiento, su calidad por índice de peróxidos (IP) e índice de Kreis (IK), de acuerdo al siguiente esquema. Se realizó por triplicado para cada cantidad de AGL procesados.





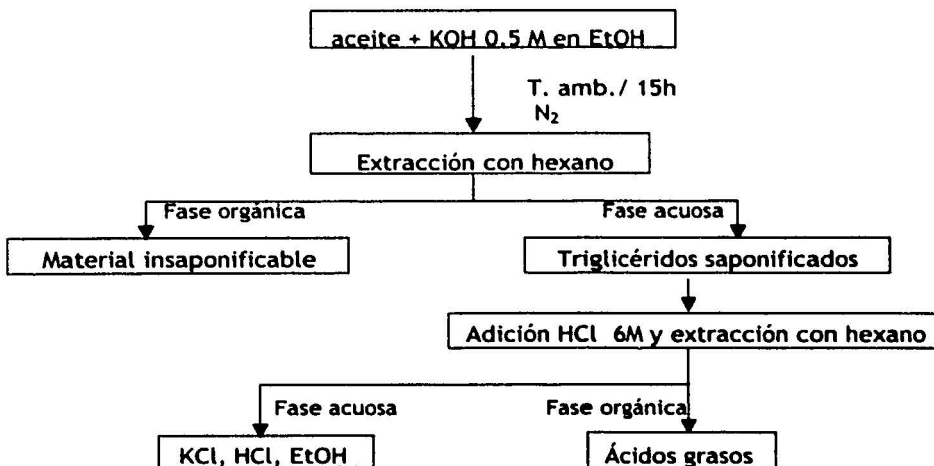
METODOLOGÍAS

1) Saponificación (1).

El método seguido es el reportado en la AOAC, modificando el tiempo y temperatura de saponificación y acidificando el residuo acuoso para recuperar los ácidos grasos libres.

Se fundamenta en el rompimiento, por una base fuerte como KOH, del enlace éster de los triacilglicerolos. Después de la separación del material insaponificable, se acidifica el medio para recuperar a los ácidos grasos libres.

Se realizaron 45 saponificaciones.





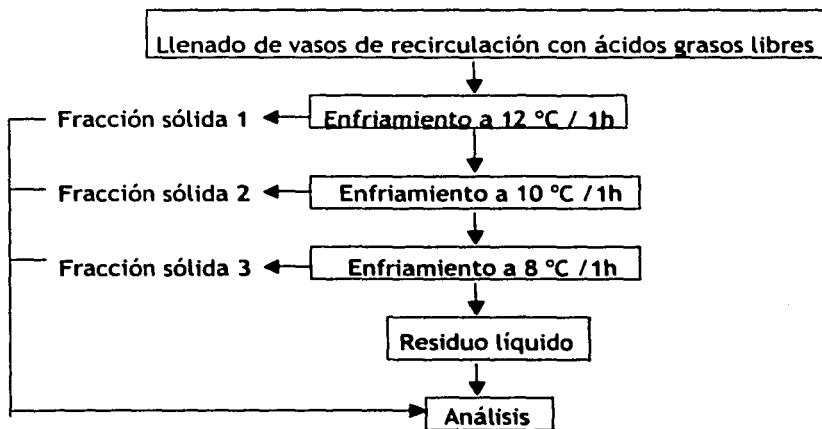
2) Separación de ácidos grasos.

2.A) Fraccionamiento por temperatura:

Cristalización por temperatura (13). Se basa en la propiedad física de punto de fusión, pues al bajar la temperatura de los ácidos grasos estos cristalizan según la temperatura correspondiente a su punto de fusión, siendo específica para cada uno. El procedimiento se realizó siete veces.

Acido graso	Punto de fusión (°C)	Acido graso	Punto de fusión (°C)
C 16:0	63-64	C 18:1	16
C 18:0	69-70	C 18:2	-6

Este método está basado en el seguido por Herrera (13), se modificó el sistema usado, el cual consistió en un recirculador/enfriador conectado a vasos de recirculación que contenían la mezcla de ácidos grasos libres. La separación se realizaba mediante un filtro de vidrio poroso de filtración gruesa.





- Con el fin de determinar las condiciones del equipo de recirculación, de marca Neslab y modelo CFT-25, que será usado en el fraccionamiento por temperatura, se realizó su curva de calibración, donde se tomó lectura de la temperatura del agua cada cinco minutos, cambiando el control de temperatura del equipo cada 20 minutos, la curva se muestra en el Anexo 2, pag. 70.

2.B y C) Fraccionamiento con urea:

Se basan en la propiedad que tienen los cristales de urea de incluir en su estructura de hélice a otras moléculas, principalmente de cadenas hidrocarbonadas largas y saturadas, mediante enlaces de van der Waals, mientras las moléculas de urea están unidas entre si por puentes de hidrógeno.

La formación de aductos de urea permite la separación de ácidos grasos, primeramente los saturados de los insaturados y posteriormente los de menor grado de insaturación de los de mayor grado. El que sea grueso a fino se debe a la velocidad de disminución de temperatura y proporción de urea.

Con base en lo anterior y a la composición del aceite de girasol, se espera que en el primer fraccionamiento sean separados los ácidos esteárico y palmítico de los insaturados; en el segundo fraccionamiento se espera separar al ácido oléico (monoinsaturado) de los ácidos poliinsaturados; por lo que el último filtrado será la fracción rica en ácido linoléico.

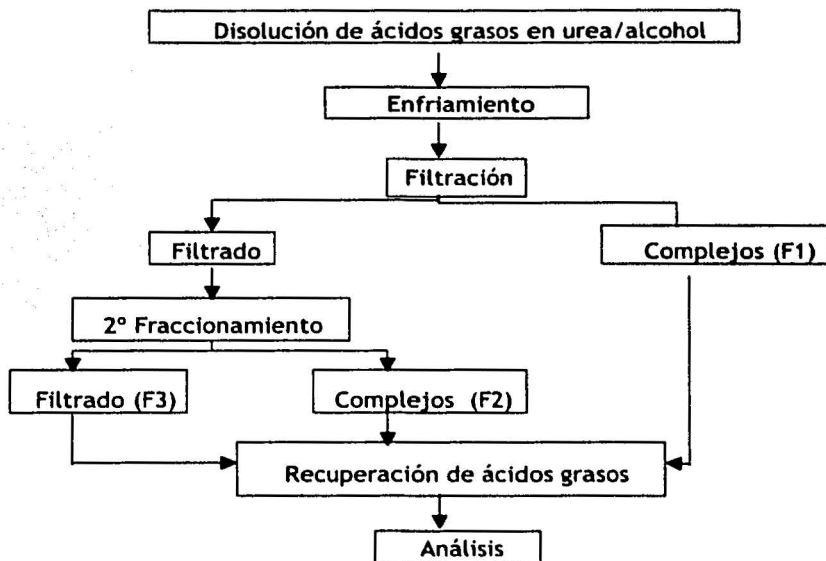


Tabla de diferencias entre los métodos de fraccionamiento fino y grueso .

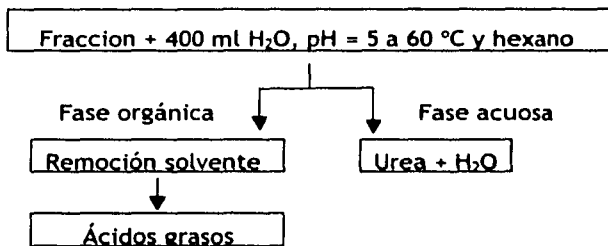
Método	2.B) Grueso (11)	2.C) Fino (3)
Relación urea/AGL	0.6 -1.2:1	1:1
Relación alcohol/AGL	4-8:1	10:1
Enfriamiento	Al chorro del agua	A T. Amb, 4°C/16-18 h
Tiempo de obtención de las tres fracciones	3 h	51 h

Se realizaron 7 separaciones por el método grueso y 18 por el método fino.



3. Recuperación de ácidos grasos (11)

Se fundamenta en la diferencia de polaridades entre la urea y los ácidos grasos, pues al solubilizar la urea en agua acidificada y tibia, éstos quedan libres para su extracción con hexano. Los ácidos grasos de los complejos se recuperaron únicamente para determinar el rendimiento total, pero no se consideró para evaluar los costos.



4. Índice de yodo. AOAC, Método 920.158. (1)

Índice de yodo (1). Se basa en la cantidad de yodo absorbido por las dobles ligaduras en los ácidos grasos insaturados, cuantificando el yodo no absorbido en forma de yoduro mediante una titulación con tiosulfato de sodio, respecto a un blanco, por lo que a mayor yodo adicionado, mayor grado de insaturación. El procedimiento se muestra en el anexo 1, pág. 65. Se realizó por duplicado de cada fracción.



5. Análisis por CG.

Se basa en la separación por diferencia de afinidades que tienen los ácidos grasos, previa su esterificación con metanol en HCl (anexo 1, pag. 69), con la fase estacionaria mientras son arrastrados por el gas acarreador, por lo que los ésteres de ácidos grasos más afines a la columna tendrán tiempos de retención mayores.

El análisis se llevó a cabo en el siguiente equipo:

- Cromatógrafo de gases, marca: HP, modelo: 5890 series II, con detector de ionización de flama (FID).
- Integrador, marca HP, modelo 3365 analyzer.

Condiciones del análisis:

- Columna: Omega wax, largo: 30m, diámetro: 0.32mm.
- Gas acarreador: Hidrógeno.
- Flujo: 1.95 ml/min.
- Split de 1:1.
- Programa de temperatura: 40 °C por un minuto, aumento 10 °/min hasta 280, donde se mantiene por 7 min.
- Temperatura del detector: 280 °C.
- Programa de presión: inicial en 5 psi, aumentando 10 psi/min hasta 400 psi.

Cada muestra se analizó por triplicado.



6. Índice de peróxidos (colorimétrico)(16).

Esta metodología se basa en la reactividad de los productos primarios del proceso oxidativo de grasas; debido a que los peróxidos formados tienen poder oxidante pasan el Fe^{2+} a Fe^{3+} , el cual forma un complejo colorido con el tiocianato, el cual se mide espectrofotométricamente y es proporcional al contenido de peróxidos en la muestra. El procedimiento se muestra en el anexo 1, pag. 67 . Se realizó por duplicado de cada muestra.

7. Índice de Kreis (16).

Esta metodología se basa en la reactividad de los productos secundarios de la oxidación de lípidos, principalmente compuestos con grupos carbonilo, pues reaccionan con floroglucinol en medio ácido para dar un compuesto colorido que se mide espectrofotométricamente. El procedimiento se muestra en el anexo1, pag. 68.

Se realizó por duplicado.

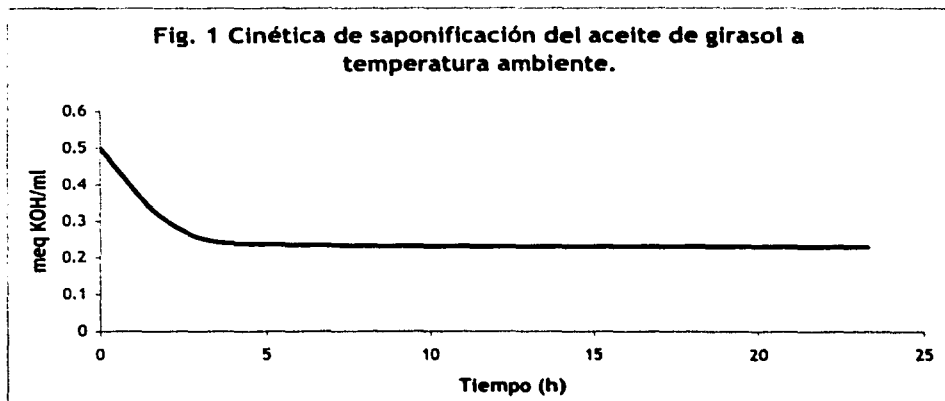
8. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS para windows, y este consistió en la media, desviación estándar, coeficientes de variación, ANOVA y DUNCAN, con un nivel de confiabilidad del 95 %.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1) Saponificación.

Para confirmar que después de 10 horas de saponificación de 10g de aceite, con la metodología usada a temperatura ambiente, ya se había dado totalmente la ruptura de los enlaces éster, se realizó una cinética de saponificación, midiendo la alcalinidad de la mezcla de saponificación mediante una titulación con HCl 0.48 N cada dos horas.



En la figura 1 se muestra la cinética de saponificación del aceite de girasol, donde se aprecia que después de las 10 horas ya no se observa una disminución en la cantidad de álcali; por lo tanto, la saponificación es completa después de éste tiempo.



Efectivamente con el tiempo que se deja la muestra saponificando es suficiente, para que se dé el rompimiento de todos los esteres y la liberación de los ácidos grasos. Lo que se confirmó con los rendimientos obtenidos, pues se mantuvieron entre el 95 y 98%.

4.2) Fraccionamiento por temperatura.

Después de 7 intentos, el fraccionamiento por temperatura fue descartado, debido a que la mezcla de ácidos grasos libres no presentó el comportamiento esperado, pues después de cinco minutos de iniciado el enfriamiento del sistema la mezcla se solidificaba uniformemente, dando la apariencia de una manteca.

Al no darse la formación de cristales, no era posible la separación pues sólo había una fase semisólida; lo que impidió realizar un análisis de grado de insaturación y determinación de rendimiento de fracciones.

Este comportamiento se debió a que las modificaciones realizadas al sistema propuesto por Herrera y colaboradores (13), no permitió la cristalización selectiva; ya que, éste último se trata de un sistema cerrado con control de temperatura, con un mezclador en el tanque y bombas que impulsaban el contenido de éste a través de filtros y de esa manera lograr la separación.



Mientras que el sistema usado en este trabajo era abierto, la agitación la proporcionaba un agitador magnético y la separación se intentó con vacío con el máximo de la línea (11.5 in Hg) y a través de filtros de vidrio poroso de filtración gruesa.

Por lo mencionado no se lograron las condiciones adecuadas para lograr la separación de ácidos grasos mediante esta metodología; siendo esta su gran desventaja, pues requiere del diseño de un sistema con las condiciones reportadas por Herrera (13).

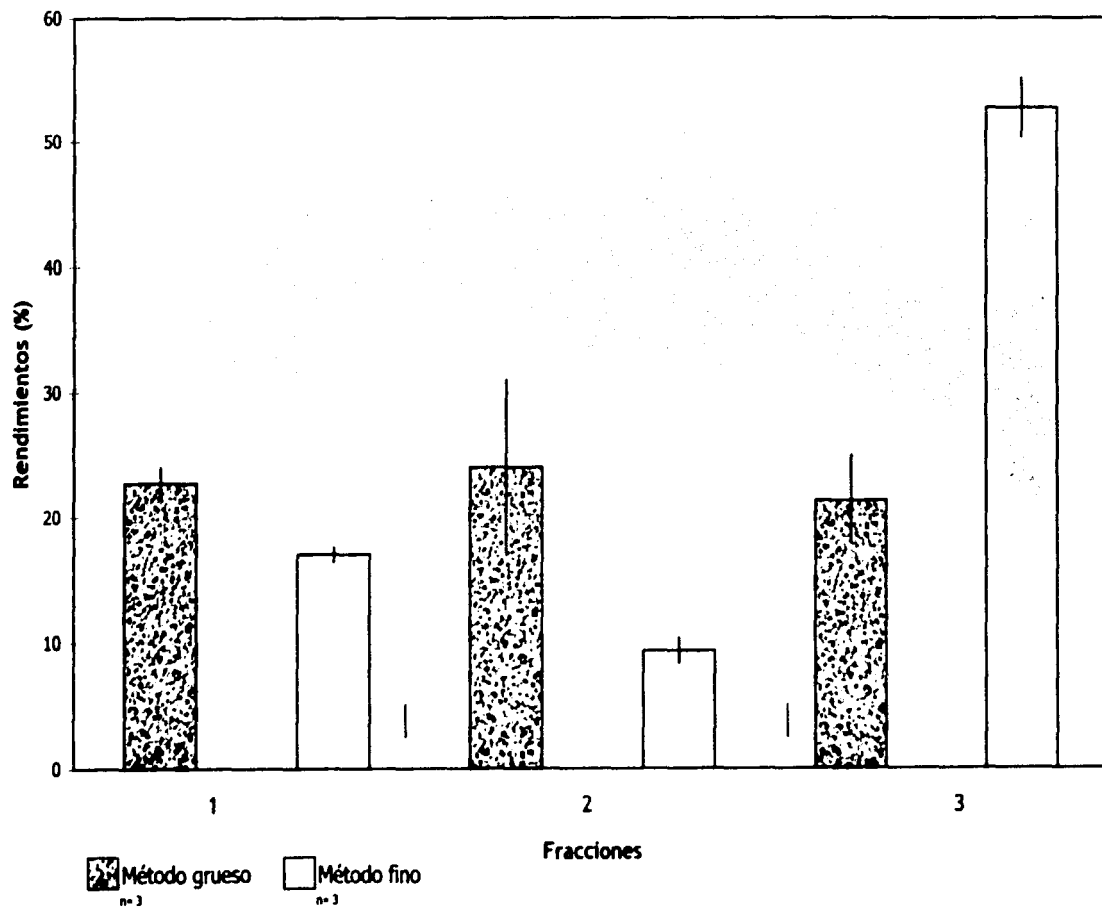
4.3) *Fraccionamiento por complejación con urea.*

En la figura 2 se observarán los rendimientos obtenidos para las tres fracciones resultantes de los dos métodos de fraccionamiento. El rendimiento se determinó para ser un parámetro de evaluación de los métodos de fraccionamiento.

Se calculó con base a los gramos de ácidos grasos libres (AGL) que se fraccionaron en tres corridas:

Rendimiento = [peso de la fracción/peso de AGL]100

Fig. 2 Comparación de los métodos de fraccionamiento por rendimientos de las fracciones obtenidas.



35



Como se puede observar en la figura 2, para el método grueso las fracciones presentan un rendimiento muy similar, alrededor del 22 %, esto se puede deber a que la cantidad de urea se mantiene en 6 g en el primer y segundo fraccionamiento independientemente de la cantidad de ácidos grasos. Lo anterior hace que en el segundo fraccionamiento, al ser menor la cantidad de ácidos grasos, la proporción de urea aumenta y se facilita la complejación de aquellos menos susceptible a la formación de compuestos de inclusión, pues la mezcla de ácidos grasos resultantes del primer fraccionamiento, en teoría se trata de la parte insaturada (oléico y linoléico), causa que explica también las mayores dispersiones en las fracciones 2 y 3 (tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio de rendimiento, dispersiones y coeficientes de variación de cada fracción obtenidos por los métodos de separación.

Método	Grueso			Fino		
	Rend. (% en peso)	σ	C.V.	Rend. (%)	σ	C. V.
1	22.82	1.19	5.21	16.94	0.54	3.18
2	23.99	7.05	29.38	9.36	0.98	10.47
3	21.37	3.54	16.56	52.84	2.34	4.42
Total	66.35	0.29	0.44	79.15	1.99	2.55

Para el método fino si hay una diferencia significativa entre los rendimientos de las fracciones; esto también se debe a que la proporción de urea:ácidos grasos en éste método no varía entre el primer y segundo fraccionamiento, lo que lo hace más selectivo.



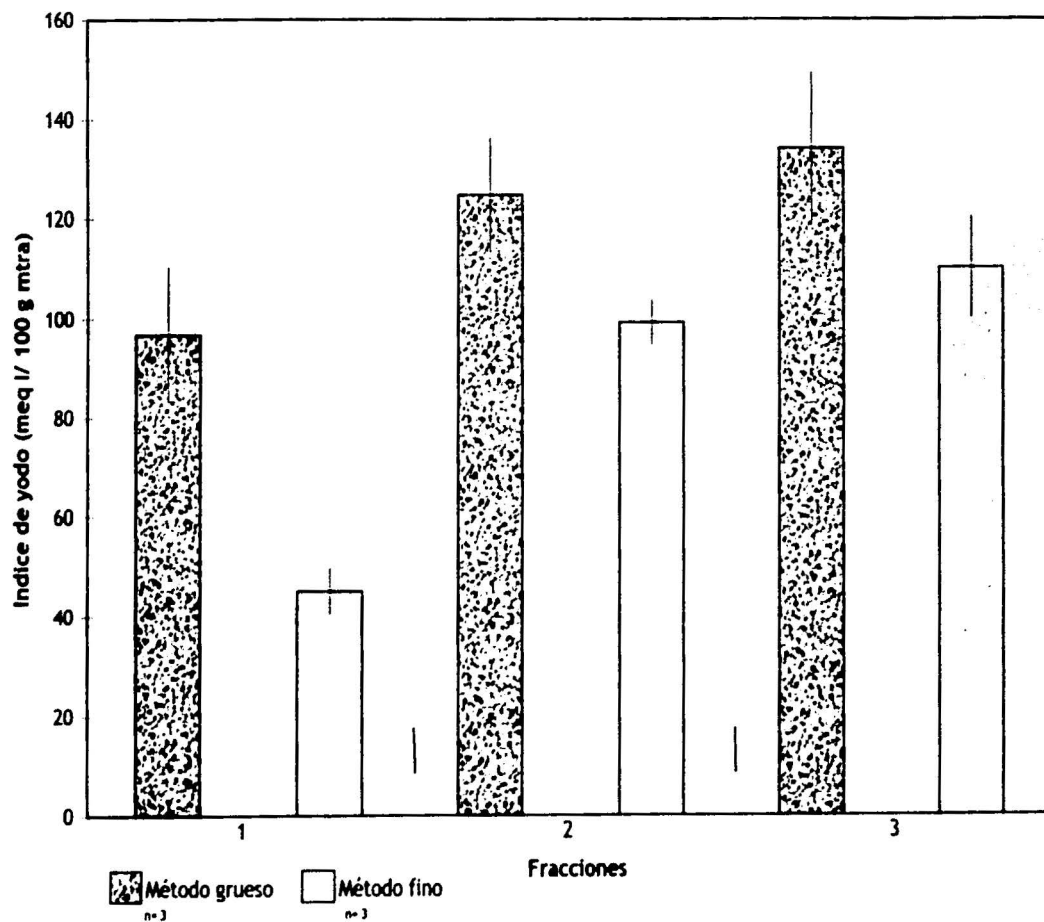
Lo anterior se puede observar en el bajo rendimiento de la fracción 2, que habla de que en la mezcla de ácidos grasos ya era poco el contenido de aquellos adecuados para la complejación (ácidos esteárico, palmítico y oléico); razón también por la cual el rendimiento de la fracción 3 es mayor, pues al ser el filtrado de la segunda complejación contiene los ácidos grasos menos susceptibles a formar los aductos (ácido linoléico y trazas de otros poliinsaturados). Es importante hacer notar que éste método presenta dispersiones menores a las dadas por el método grueso (tabla 1).

Como se puede observar en esta misma tabla, el rendimiento total para el método grueso es del 66 % y para el fino del 79%; por lo que se sospecha que existen deficiencias en la recuperación de los ácidos grasos, debido a que las condiciones usadas pudieran no ser las más adecuadas para recuperar los ácidos grasos de los complejos.

Por lo mencionado se modificó la técnica de recuperación de las fracciones usando 7 ml de agua acidificada por gramo de complejo formado y 10 ml de agua acidificada por cada ml de filtrado, según Hayes (11), mostrándose más adelante los resultados (figura 4).

En la figura 3 se muestran los índices de yodo que tienen las tres fracciones obtenidas con los dos métodos de separación, en tres corridas.

Fig. 3 Comparación de métodos de fraccionamiento por grado de insaturación de las fracciones.





En cuanto al grado de insaturación de las fracciones obtenidas, en la figura 3, se observa que éstas presentan índices de yodo diferentes entre sí, siendo menor el grado de insaturación de la fracción 1 y mayor el de la fracción 3, para ambos métodos de fraccionamiento.

Considerando que el índice de yodo de la mezcla de ácidos grasos libres es de 115, los valores que presentan las fracciones, nos hablan de que si hay una separación de ácidos grasos. Sin embargo, el grado de insaturación de las fracciones 3, no es lo suficientemente alto para considerar que ésta fracción sea exclusivamente de ácido linoléico, pues el índice de yodo teórico de éste ácido es de 181.1 (26).

El método grueso ofreció grados de insaturación mayores para las tres fracciones en comparación con el método fino, pero nuevamente la dispersión en éste método resultó mayor que la presentada en el fino (tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio de Índice de yodo, desviación estándar y coeficientes de variación de las fracciones obtenidas por los métodos de separación.

Método Fracción	Grueso			Fino		
	I Y	σ	C. V.	I Y	σ	C. V.
1	96.75	13.79	14.25	45.17	4.72	10.44
2	124.77	11.65	9.33	99.08	4.76	4.80
3	134.09	15.44	11.51	110.22	10.17	9.22



Para comprender los resultados obtenidos es necesario analizar las diferencias entre estas dos técnicas:

Las proporciones de urea respecto a los ácidos grasos en el método grueso son, en el primer fraccionamiento de 0.6:1 y en el segundo aumenta a 1.2:1; mientras en el método fino las proporciones en ambos fraccionamientos se mantienen constantes (1:1). Lo anterior no concuerda con lo esperado, pues en el método grueso, en el primer fraccionamiento el reactivo limitante es la urea y se esperaría una complejación muy selectiva, dando índices de yodo para la fracción 1 muy bajos, resultado que se encontró en la misma fracción pero con el método fino, donde la proporción de urea fue mayor(1:1).

Lo anterior indica que aunque es fundamental la proporción de urea:ácidos grasos libres, el factor que está influenciando más el proceso es la velocidad de disminución de la temperatura, pues con enfriamiento lento (método fino), la velocidad de formación de los complejos es lenta y más selectiva que con un enfriamiento rápido (método grueso).

Esto puede llevar a estructuras cristalinas diferentes, muy posiblemente con un diámetro de tunel mayor, que permita la formación de compuestos de inclusión con moléculas no tan adecuadas; lo que también podría explicar la dispersión que muestra el método grueso. Lo anterior podría confirmarse con un análisis de rayos X de los cristales formados.

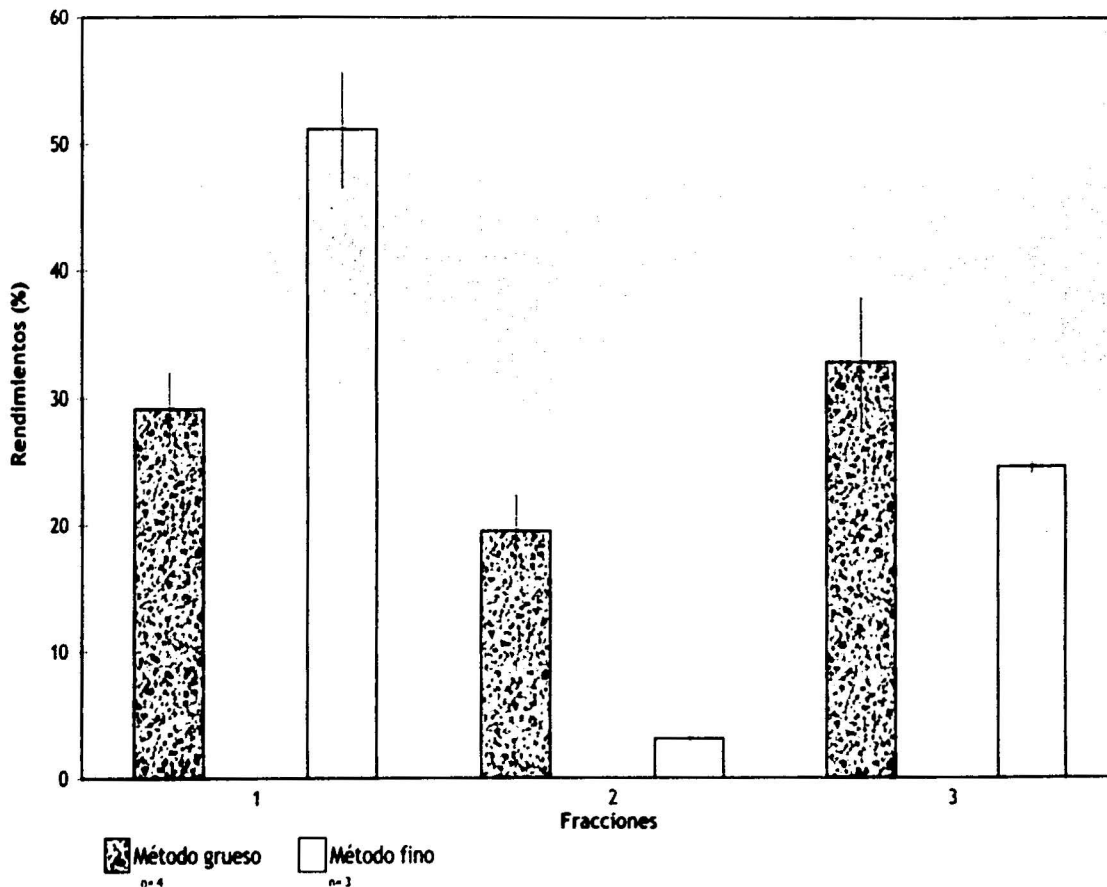


Según las investigaciones realizadas por Bauchart (3), en una mezcla de ácidos grasos que contenga moléculas saturadas es necesario duplicar o triplicar la cantidad de urea para lograr una mejor separación. Por lo mencionado, se tomó la decisión de incrementar la proporción de urea: AGL de 1:1 a 2:1 en el primer fraccionamiento para el método fino.

El método grueso permaneció sin modificaciones, pues aunque presenta una alta dispersión la fracción 3, obtenida con éste, es la más insaturada.

Los resultados obtenidos con el aumento al doble en la proporción urea/AGL en el método fino y en la recuperación de las fracciones, usando 7ml de agua/g de complejo y 10 ml de agua/ml de filtrado, en lugar de 15 ml de agua/ml de filtrado y 40 ml de agua/g de complejo; se presentan en la figura 4 para el rendimiento y en la figura 5 para grado de insaturación:

Fig. 4. Comparación de métodos de fraccionamiento por rendimientos de las fracciones obtenidas.



42

Resultados obtenidos recuperando las fracciones con 7 ml de agua/g de complejos y 10ml de agua/ml de filtrado en ambos métodos; 2 partes de urea por 1 parte de ácidos grasos en el primer fraccionamiento en el método fino.



En la figura 4 se observan los rendimientos con que se obtuvieron las fracciones con las nuevas condiciones de recuperación de los ácidos grasos, y para ambos métodos hay un incremento en los rendimientos totales; para el método grueso del 66 a 81% y para el fino del 79 a 84% siendo significativo, no así el incremento presentado para cada fracción, debido a que éstos no presentan diferencia significativa.

Aunque no hubo una diferencia entre las dos condiciones de recuperación de ácidos grasos, se seguirán manejando las nuevas (7 ml H₂O/g de complejo y 10ml H₂O/ml de filtrado) debido a que la cantidad de agua usada para la recuperación es menor, lo que facilita el manejo de las fracciones.

Los rendimientos obtenidos en el método fino, se deben a las proporciones usadas de urea; debido a que en el primer fraccionamiento ésta fue duplicada, el rendimiento de la fracción 1 se incremento de manera importante; por lo que la cantidad de ácidos grasos a separar en el segundo fraccionamiento es menor y los rendimientos para las fracciones 2 y 3 se vieron disminuidos.

El método grueso, sigue presentando la misma tendencia; es decir, las tres fracciones presentan un rendimiento similar, también con mayor dispersión que el método fino (tabla 3).

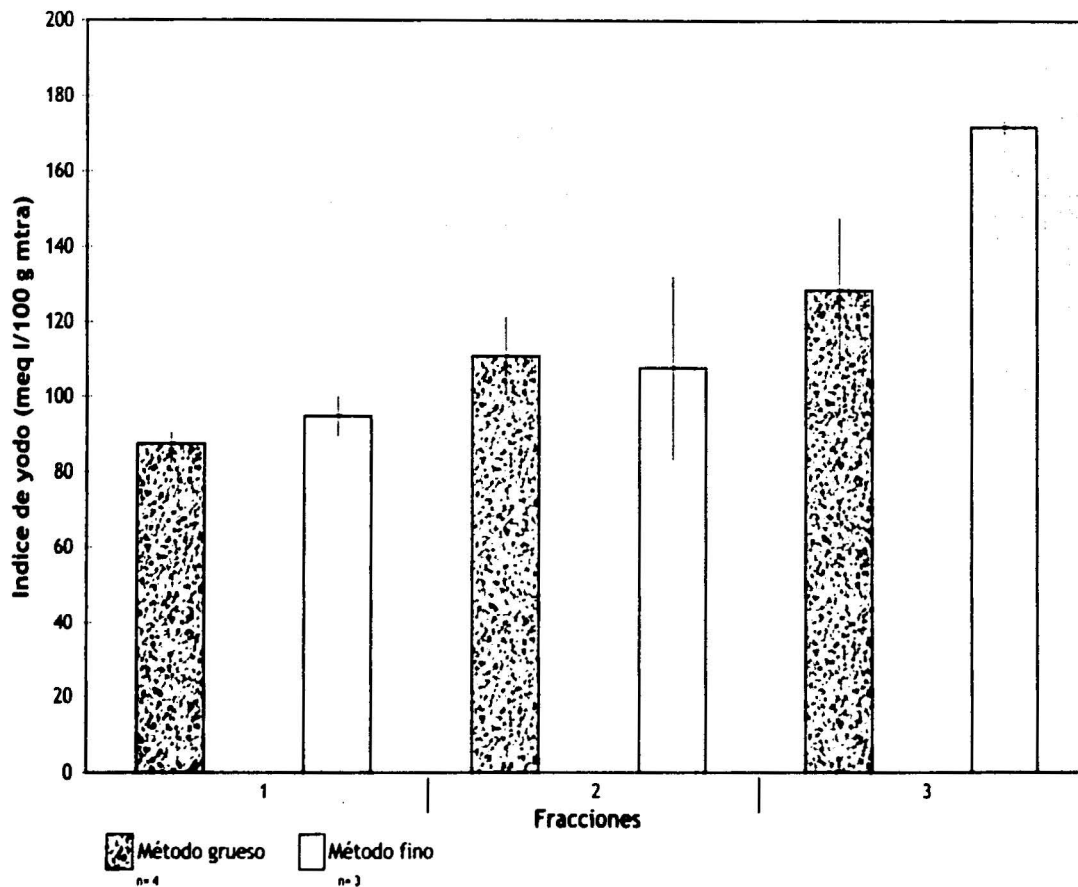


Tabla 3. Valores promedio de rendimiento, desviación estándar y coeficientes de variación obtenidos con las modificaciones en los métodos de separación.

Método	Grueso			Fino		
	Rend (% en peso)	σ	C. V.	Rend. (%)	σ	C. V.
1	29.19	2.89	9.90	51.12	4.62	9.03
2	19.54	2.86	14.63	3.09	0.26	8.41
3	32.76	5.25	16.02	29.91	1.59	5.31
Total	81.49	3.73	4.58	84.12	3.31	3.93

Los índices de yodo obtenidos para las tres fracciones por los métodos de fraccionamiento modificados, se muestran en la figura 5.

Fig. 5. Comparación de métodos de fraccionamiento por grado de insaturación de las fracciones obtenidas.



Resultados obtenidos recuperando las fracciones con 7 ml agua/g de complejos y 10 ml agua/ml de filtrado en ambos métodos; y con 2 partes de urea por 1 parte de ácidos grasos en el primer fraccionamiento en el método fino.



En cuanto al grado de insaturación de las fracciones obtenidas por el método fino (fig. 5), se observa que todas aumentaron su índice de yodo, estos cambios se deben a la cantidad de urea usada, pues al duplicarla en el primer fraccionamiento y por el enfriamiento lento se da la complejación de toda la parte saturada y parte de la insaturada. Por lo anterior, es factible decir que las fracción 3 tiene una mayor concentración de ácidos grasos insaturados.

En la figura 5 se aprecia que los valores de índice de yodo obtenidos por el método grueso presentan gran dispersión (tabla 4), lo que muestra la variabilidad del método. En el método fino, las dispersiones que presentan las fracciones 1 y 3 son bajas, pero la fracción 2 tiene una gran dispersión que se debe a que la poca cantidad que se obtenía de ésta, dificultaba su manejo. Las dispersiones encontradas en el método grueso son altas para las fracciones 2 y 3, lo que se explica nuevamente por la velocidad de disminución de la temperatura y de formación de los complejos, pues al ser más rápida que en el método fino la selectividad disminuye.

Tabla 4. Valores promedio de Índice de yodo, desviación estándar y coeficientes de variación obtenido con las modificaciones en los métodos de separación.

Método	Grueso			Fino		
Fracción	I Y	σ	C. V.	I Y	σ	C. V.
1	87.43	3.30	3.77	94.72	3.50	3.69
2	110.64	10.70	9.67	107.49	24.68	22.96
3	128.33	19.76	15.39	171.69	1.76	1.02



La metodología denominada "fina" con 2 partes de urea y 10 de metanol por cada parte de AGL en el primer fraccionamiento, dio como resultado una fracción 3 altamente insaturada (IY = 171.69) con un valor de índice de yodo muy cercano al teórico del ácido linoléico de 181.1; por lo que es posible pensar que ésta es la fracción con alto contenido en este ácido graso.

El método grueso se descarta, pues no permite la obtención de una fracción que tenga un índice de yodo mayor a 135, muy lejano al valor teórico del ácido linoléico, es un método que tiene mucha variabilidad y no asegura que los resultados sean reproducibles, por esto, no es una opción para la obtención de una fracción rica en ácido linoléico.

En el método fino debido al bajo rendimiento de la fracción 2 y a su gran dispersión se decidió eliminar el segundo fraccionamiento, y se evaluó la influencia del mismo en el rendimiento, grado de insaturación y contenido de ácido linoléico de la última fracción, determinado por índice de yodo y cromatografía de gases, respectivamente, obteniéndose los resultados reportados en la tabla 5.



Tabla 5. Efecto del número de fraccionamientos sucesivos en el método fino para la fracción más insaturada.

Condiciones	Fracción de estudio	Rendimiento (%)	Índice de yodo (meq l/100g de mtra)	Concentración relativa C 18 :2 (% área)
Dos fraccionamientos ¹	F3	29.91 ± 1.59	171.69 ± 1.76	96.21 ± 0.56
Un fraccionamiento ²	F2	34.53 ± 4.99	161.42 ± 2.86	92.86 ± 1.93

1. n= 6

2. n= 6

Los resultados reportados en la tabla 5 muestran las diferencias entre las condiciones manejadas para el método fino. Con un fraccionamiento el rendimiento de la segunda fracción aumenta; esto se debe a que se suma la cantidad de ácidos grasos de la fracción intermedia a la última y como se manipula menos la muestra, disminuyen las pérdidas por manejo.

El valor de índice de yodo así como el contenido de ácido linoléico, determinado por cromatografía de gases, disminuyen con un solo fraccionamiento, esto porque parte de las impurezas (ácido oléico), que reducen estos parámetros, no se retiran con un solo fraccionamiento; disminuyendo significativamente el contenido en ácido linoléico.



En este punto es importante aclarar que fue necesario expresar la concentración de ácido linoléico de forma relativa en porcentaje de áreas, esto se debió a que los resultados expresados en porcentaje en peso (anexo 4, tabla 11, pag. 75) eran muy bajos.

Lo anterior se pudo deber a que la técnica de esterificación no fue muy eficiente, en el sentido de que no hay seguridad de que el 100% de las moléculas de ácidos grasos presentes en la muestra hayan sido esterificadas; esta modificación fue posible hacerla debido a que los factores de respuesta de los estándares fueron muy semejantes (anexo 4, tabla 9, pag. 74).

En el mismo anexo es posible apreciar que la disminución en la concentración es más pronunciada para el ácido linoléico, debido además de lo mencionado, a la oxidación lipídica, ya que éste ácido tiene mayor susceptibilidad a sufrir éste deterioro (anexo 4, tabla 10, pag. 74).

Con el fin de evaluar la degradación oxidativa con la que se obtenía la fracción más insaturada, con dos y un fraccionamiento en el método fino, se midió su nivel de peróxidos e índice de Kreis.



Tabla 6. Incremento de la degradación oxidativa de la fracción más insaturada.

Condiciones	Fracción de estudio	Aumento de peróxidos (meq Fe/Kg grasa)	Aumento de índice de Kreis (Abs/g grasa)
Dos fraccionamientos ¹	F3	15.54 ± 2.5	1.19 ± 0.14
Un fraccionamiento ²	F2	3.21 ± 0.62	0.19 ± 0.04

Aumento de peróxidos = IP fracción más insaturada - IP AGL

Aumento de Índice de Kreis = IK fracción más insaturada - IK AGL

1. n= 6

2. n=6

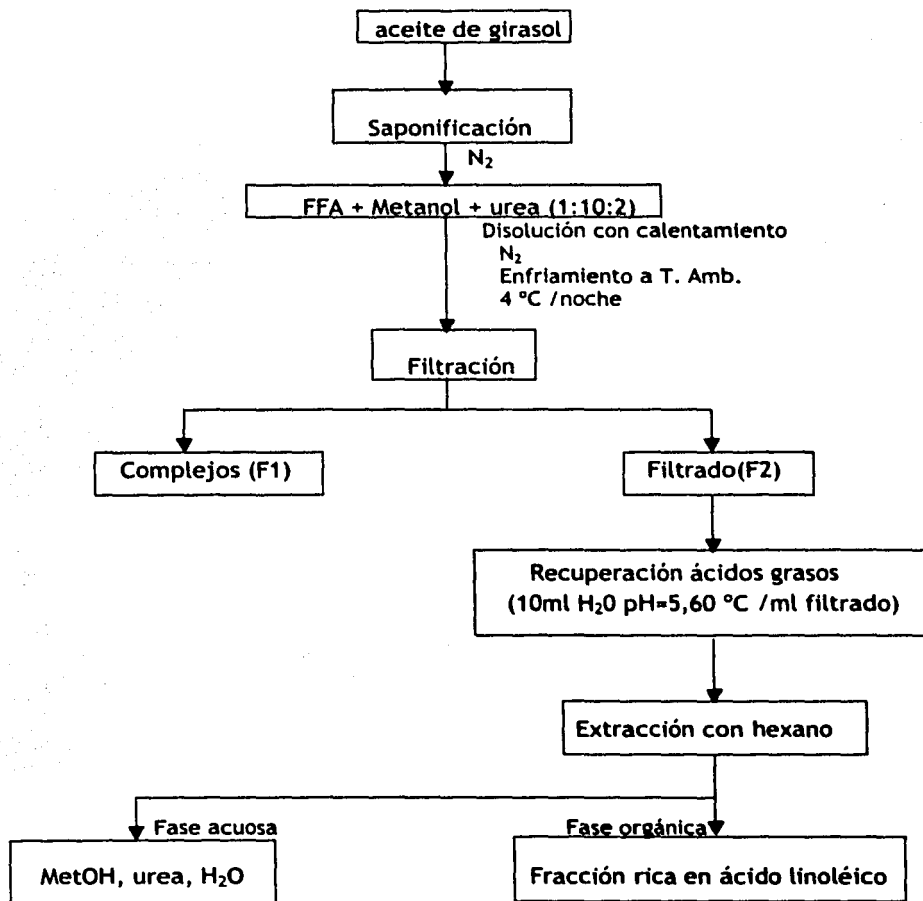
El aumento en los índices de peróxidos y Kreis resultó importante para el método donde se realizan dos fraccionamientos, lo que indica que aunque ésta fracción tenga un mayor contenido de ácido linoléico presenta un deterioro oxidativo muy importante.

Aunque hay diferencia significativa entre los contenidos de ácido linoléico, es preferible tener una fracción rica en ácido linoléico con un 93% y bajos niveles de oxidación, que tener una fracción con 96% de ácido linoléico y gran deterioro oxidativo.

Considerando el aumento en el rendimiento de la fracción más insaturada con un fraccionamiento; el escalamiento se realizará con el método fino con un solo fraccionamiento, aunque el aumento en los niveles de oxidación con estas condiciones es mucho menor, el proceso de separación implica un deterioro, por lo que se recurrió a tener atmósferas inertes donde fue posible.



La metodología de obtención de la fracción rica en ácido linoléico que se escaló es:





4.4) Análisis cromatográfico.

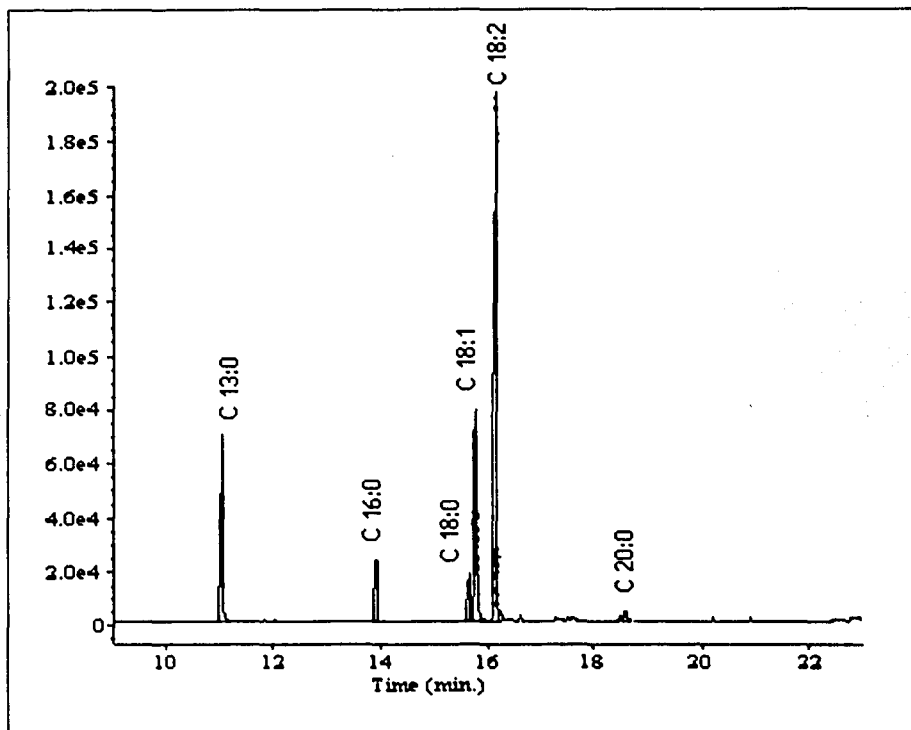
En la figura 6 se muestra el perfil de la mezcla de ácidos grasos libres del aceite de girasol usado, esto con el fin de conocer la concentración de linoléico de la materia prima y verificar que efectivamente se estaba partiendo de aceite de girasol.

En las figuras 7 y 8 se muestra el perfil de ácidos grasos en la fracción más instaurada obtenida con un fraccionamiento o con dos por el método fino.

En la figura 9 se muestra el perfil de ácidos grasos de la fracción 1 o la menos insaturada obtenida con un fraccionamiento por el método fino.



Fig. 6 Perfil de la mezcla ácidos grasos libres del aceite de girasol.

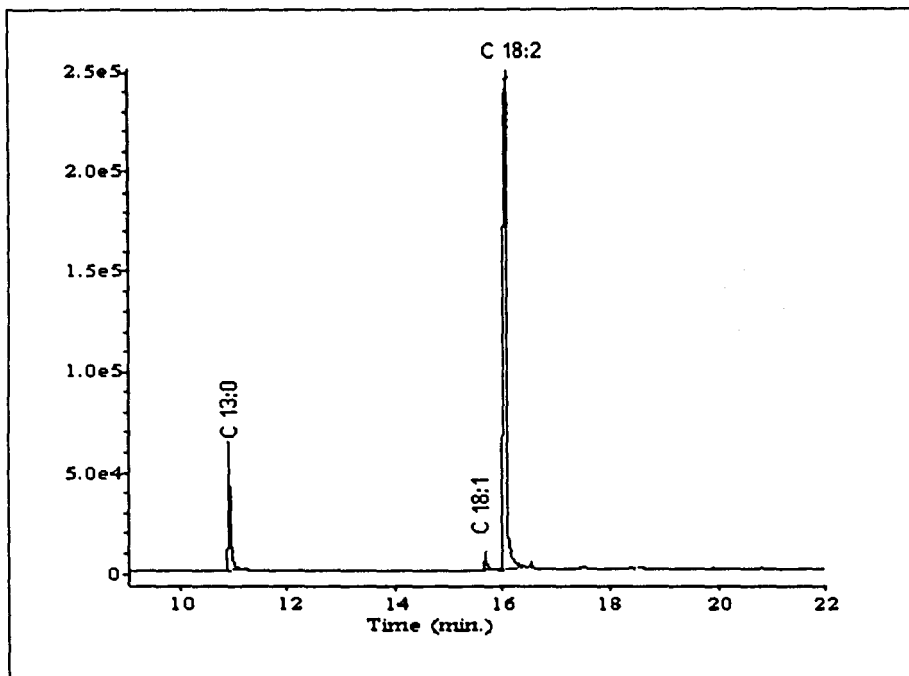


Nota: El ácido graso C 13:0 es el estándar interno usado para la cuantificación.

Acido graso	Concentración relativa (% área)	Concentración reportada (%) (16)
C 16:0	6.94	3.0 - 10
C 18:0	5.19	1.0 - 10
C 18:1	22.87	14 - 35
C 18:2	60.26	55 - 75
C 20:0	1.76	< 1.5



Fig. 7. Perfil de ácidos grasos de la fracción 3 (doble fraccionamiento).

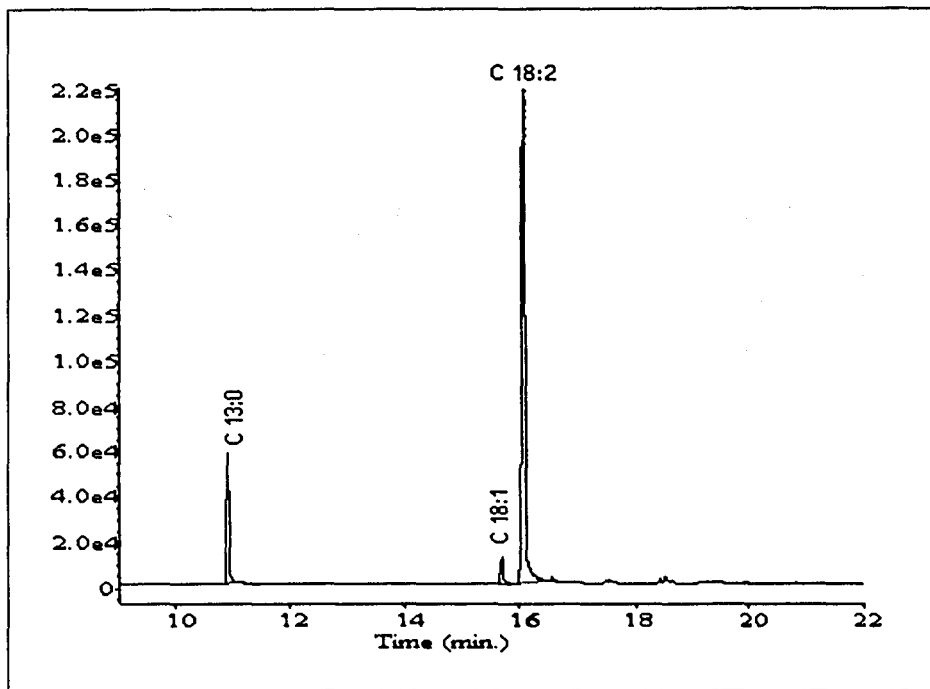


Nota: El ácido graso C13, fue usado como estándar interno en la cuantificación.

Acido graso	Concentración relativa (% área)
C 18:1	2.62
C 18:2	96.21



Fig. 8 Perfil de ácidos grasos de la fracción 2 (un fraccionamiento).

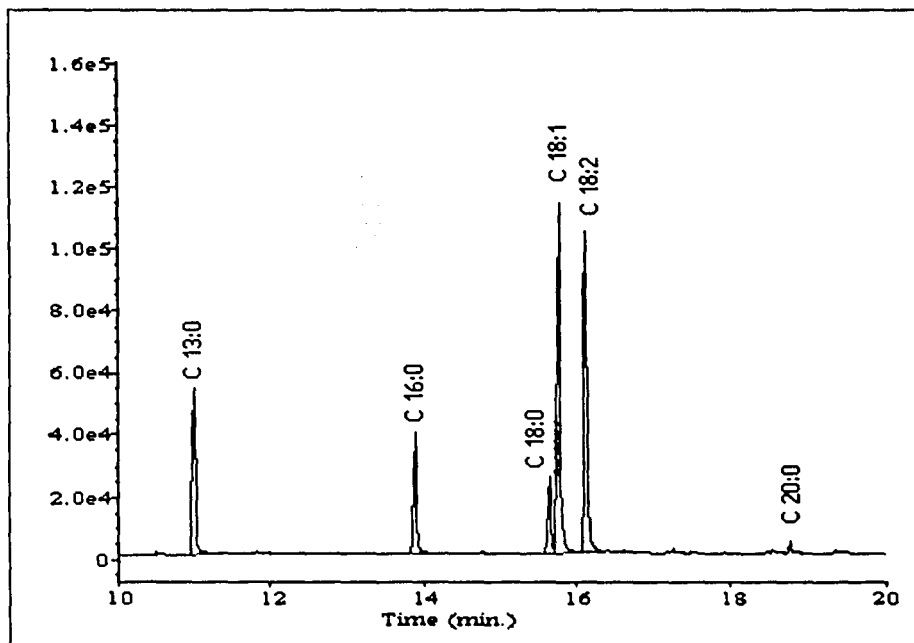


Nota: El ácido graso C 13:0 fue usado como estándar interno en la determinación.

Acido graso	Concentración relativa (% área)
C 18:1	4.18
C 18:2	92.84



Fig. 9. Perfil de ácidos grasos de la fracción 1 obtenida por el fraccionamiento fino.



Nota: El ácido graso C 13, fue usado como estándar interno.

Acido graso	Concentración relativa (% área)
C 16:0	13.21
C 18:0	9.27
C 18:1	42.14
C 18:2	35.46
C 20:0	3.12



Como se puede observar en la figura 6, efectivamente estamos partiendo de una muestra de aceite de girasol, pues la composición determinada concuerda con la reportada.

Si comparamos la figura 7 con la 8 no se aprecian diferencias. Se observa que la fracción 3 (con dos fraccionamientos) y la 2 (con un fraccionamiento) efectivamente son ricas en ácido linoléico, pues éste se encuentra en concentraciones superiores al 92.5 %, teniendo como "impurezas" al ácido oléico con un 2.7 % a 4.2 %.

En la figura 9, el contenido de ácidos grasos saturados en la fracción 1 se ven enriquecidos en comparación con su concentración en la mezcla de ácidos grasos original, lo mismo sucede con el ácido oléico. Pero también se encuentra en esta fracción ácido linoléico; esto se debe a lo dicho por Hayes; donde explica que en una mezcla con "buenos huéspedes" se aumenta la complejación de los "malos huéspedes".



4.5) Escalamiento del método fino con un fraccionamiento.

En la tabla 7 se muestran los parámetros de evaluación, en cuanto a rendimiento, contenido de ácido linoléico y deterioro oxidativo, del escalamiento del método de fraccionamiento seleccionado.

Tabla 7. Parámetros de evaluación del escalamiento en la fracción 2.

Cantidad de AGL (g)	Rendimiento (% en peso)	Contenido de C 18:2 (g)	C 18:2 (% área)	Incremento peroxidos (meq Fe/Kg grasa)	Incremento índice de Kreis (Abs/g grasa)
10	39.53 ± 1.51	37.27 ± 1.4	94.3 ± 0.1	3.21 ± 0.6	0.19 ± 0.04
50	40.60 ± 1.13	39.21 ± 1.2	96.6 ± 0.4	3.59 ± 1.8	0.20 ± 0.08
100	37.82 ± 1.64	36.34 ± 1.3	96.1 ± 0.8	8.55 ± 1.3	0.27 ± 0.08
150	34.30 ± 0.77	33.58 ± 0.6	97.9 ± 0.6	9.88 ± 0.4	0.51 ± 0.08

De los resultados encontrados en el escalamiento, mostrados en la tabla 7, el análisis estadístico revela que hay diferencia significativa entre los rendimientos para 10g, 50g y 100g respecto al de 150g siendo menor en el último; esta disminución es debido a que al aumentar la cantidad de ácidos grasos a fraccionar los volúmenes que se trabajan son mayores, por lo que se incrementan las pérdidas por el manejo de la muestra.



En cuanto al contenido de ácido linoléico en la fracción en peso, se observa un comportamiento similar al rendimiento, pues este va disminuyendo a medida que aumenta la cantidad de AGL a fraccionar, exceptuando 10 y 50 gramos pero no hay diferencia significativa. El porcentaje de ácido linoléico en las fracciones resultó muy semejante, pero presentan diferencia significativa.

Esas diferencias se deben a que las mezclas de ácidos grasos libres no tenían el mismo grado de oxidación; pues en las muestras de 100 y 150 g, se encontró un índice de peróxidos antes del fraccionamiento menor a 2, razón por la cual éstas fracciones son más ricas en ácido linoléico. Para las muestras de 50 y 10 g el índice de peróxidos inicial era cercano a 10; lo que ya afectó el contenido de éste ácido graso en la fracción. Lo anterior también explica las diferencias entre el valor reportado para 10g con un fraccionamiento de 92.86% (pag. 48) y el reportado en el escalamiento de 94.36%.

En el incremento de los índices de la degradación oxidativa, se observa que conforme aumenta la cantidad de ácidos grasos a fraccionar, los índices también aumentan; indicando un mayor deterioro en las muestras de 100 y 150 g. Lo anterior se debe a que al aumentar las cantidades a tratar, el tiempo de exposición a la luz, aire y calor aumenta, pues se requiere de un mayor tiempo para recuperar las fracciones.



Las dispersiones encontradas para estos parámetros resultan muy altas; lo cual se debe a diferencias entre las réplicas, debido a que el proceso oxidativo de estos no se lleva de la misma manera y esto fundamentalmente es como consecuencia de las pocas posibilidades de mantener el proceso de separación bajo atmósfera inerte.

Los cromatogramas obtenidos en cada punto del escalamiento se muestran en el Anexo 3, pág. 71.

En la tabla 8 se presenta la comparación del uso de reactivos grado analítico y grado industrial, usando 10 gramos de muestra.

Tabla 8. Influencia en la fracción más insaturada de la pureza de los solventes en el método de fraccionamiento.

Tipo de solvente	Rendimiento (%)	Indice de yodo	Acido linoléico (% área)
Analítico	34.53 \pm 4.99	161.42 \pm 2.86	92.86 \pm 1.93
Industrial	39.53 \pm 1.51	161.87 \pm 1.93	94.39 \pm 0.16

Por los resultados mostrados en la tabla 8, se puede decir que la pureza de los solventes usados en el proceso de fraccionamiento no afecta los parámetros de evaluación del mismo, debido a que no existe diferencia significativa entre estos; siendo válido el uso de solventes de menor pureza para la obtención de la fracción rica en ácido linoléico.



4.6) Análisis de costos.

A continuación se presentan los costos comerciales del ácido linoléico, según los catálogos de sigma e ICN del 2000-2001, y de la fracción rica en éste ácido (FRAL) obtenida en el laboratorio:

Características	Precio/Costo (pesos/g)
Acido linoléico, pureza 99%	107.05
Ácido linoléico, pureza 95 -99%	121.00
FRAL, pureza 96% ^a	23.19
FRAL, pureza 96% ^b	14.69

a. Fracción obtenida usando solventes grado analítico.

b. Fracción obtenida usando solventes grado industrial.

Nota: El costo de FRAL, ya incluye un estimado de servicios (agua y energía eléctrica) y equipo (15).

Lo que se aprecia en los costos mostrados, es una gran diferencia entre los comerciales y la fracción obtenida en el laboratorio; siendo mucho menor el costo de ésta última. Esta diferencia se debe a que nuestros costos están basados en los reactivos, solventes, materia prima, un estimado de servicios y equipo, que representa del 13 al 20% del precio; no consideramos otro tipo de costos como mano de obra, distribución, publicidad, entre otros, que la industria si considera para los precios comerciales. Por lo anterior, es posible decir que se logró el objetivo de disminuir costos, pues el costo de obtención de la fracción rica en ácido linoléico fue menor al costo comercial.



CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.

- El fraccionamiento por temperatura no permite la obtención de una fracción rica en ácido linoléico (FRAL) con las condiciones logradas en el laboratorio.
- El fraccionamiento grueso con urea si permite la obtención de FRAL con 33% de rendimiento, pero presenta una gran variabilidad.
- El fraccionamiento fino con dos fraccionamientos con urea:metanol:AGL (2:10:1) en el primero y 1:10:1 en el segundo, si permite al obtención de FRAL con 30% de rendimiento, pero con un alto deterioro oxidativo.
- El método fino con un fraccionamiento y con urea:metanol:AGL (2:10:1), permite la obtención de una fracción con 96% de ácido linoléico, con rendimientos cercanos al 40% y se consideró el más adecuado.
- Este método, permite la obtención de FRAL procesando mayores cantidades de ácidos grasos libres, hasta 150g; y se espera que fraccionando mayores cantidades a ésta la tendencia sea la misma.
- Así mismo éste método, permite la obtención de FRAL a un menor costo que el comercial.
- Debido a que durante el proceso de separación se incrementa el deterioro oxidativo, es muy importante el uso de materia prima con bajos niveles de oxidación y que éste se desarrolle bajo atmósfera inerte y/o adicionando antioxidantes.



BIBLIOGRAFÍA

1. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16th edition. Vol II. Fats and oils. 1995.
2. Arousseau, B., Bauchart, D. Compared fractional crystallization with urea or from acetone solution of Palmitoleic, heptadecenoic and oleic acids. J. Am. Oil Chem. Soc. 57 (3) : 125-128, 1980.
3. Bauchart, D., Arousseau, B. Preparation of heptadecenoic acid from *Candida tropicalis*. J. Am. Oil Chem. Soc. 57 (3):121-124, 1980.
4. Chien-An Chen, Sih, J. Chemoenzymatic synthesis of conjugated linoleic acid. J. Org. Chem. 63:9620-9621, 1998.
5. Dhiman, T. Conjugated linoleic acid: A food for cancer prevention. Feedstuffs. 72 (18):24-38, 2000.
6. Egon, S. Thin Layer Chromatography. 2ª edición. 1969.
7. Fennema, R. Química de los alimentos. 2ª edición. Editorial Acribia. España. pp 198-229, 1993.
8. Formo, W. Jurgermann, E. Bailey's Industrial oil and fat products. Vol. 1, Editorial Wiley Interscience. 4ª edición. USA pp 383 - 388.
9. Gray, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. J. Am. Oil Chem. Soc. 55 (6):539-546, 1978.
10. Harris, K. Structural and dynamic properties of urea and thiourea inclusion compounds. J. Mol. Struct. 374. 241-250, 1996.
11. Hayes, G. Bengtsson, C. Urea complexation for the rapid, Ecologically responsible fractionation of fatty acids from seeds oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 75 (10):1403-1409, 1998.
12. Hayes, G. Sttenwall, F., Urea-Based fractionation of seed oil samples containing fatty acids and acyl glycerols of polyunsaturated and hydroxy fatty acids. J. Am. Oil Chem. Soc. 77 (2): 207-213, 2000.
13. Herrera, M., Segura, J., Crystalline fractionation of hydrogenated sunflowerseed oil. HPLC Analysis. J. Am. Oil Chem. Soc. 68 (11): 793-798, 1991.



14. Hitchcock, C. Developments in food analysis techniques. Applied science publishers LTD. Capítulo 5, 1980.
15. Josep, Ma. Rosanas. Contabilidad de costos para la toma de decisiones. 2ª edición. Editorial Brouwer, S.A. 1984.
16. Kirk, Sawyer. Composición y análisis de los alimentos de Pearson. Editorial CECSA. México, D.F. 1997.
17. Lavilloniere, F. Análisis of conjugated linoleic acid isomers and content in french cheeses. J. Am. Oil Chem. Soc. 75 (3) : 343-352, 1998.
18. Lenhinger, Albert. Principios de bioquímica. 2ª edición. Ediciones omega. España. pp 240-264, 1993.
19. Madhaví, D. L. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. 4th edition. Marcel Dekker Inc. pp 148-165, 1996.
20. Pritchard, J. Analysis and properties of oilseeds. En analysis oilseeds, fats and fatty foods. Editorial Elsevier Applied Science. USA, pp 93-107, 1991.
21. Sahasrabudhe, M. Lipid composition of oats. J. Am. Oil Chem. Soc. 56 (2):81-84, 1979.
22. Raloff, Janet. The good trans fat. Science news. 159(9): 136-146. 2001
23. Schlenk, Herman, Holman, T. Separation and stabilization of fatty acids by urea complexes. J. Am. Chem. Soc. 72(12):5001-5004, 1950.
24. Smith, A. E. The crystal structure of the urea-hydrocarbon complexes. Acta Cryst. 5: 224-235, 1952.
25. Takamura, K. Determination of higher fatty acids in oils by HPLC with electrochemical detection. J. Chromatogr. 764 : 177-182, 1997.
26. The index Merk. 9ª ed. Winholz, M. Editor, Merck & Co., Inc. New Jersey. 1979.
27. Traitler, H., Wille, H. Fractionation of Blackcurrant seed oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 65(5): 755-760, 1988.
28. www.cyberlipids.org

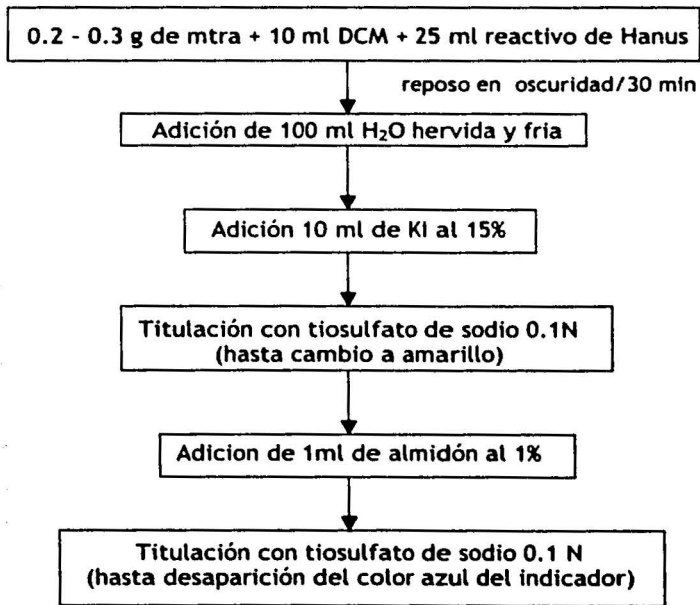


ANEXO I

En este anexo se muestran las metodologías para determinar índice de yodo, peróxidos, Kreis y para la esterificación de ácidos grasos libres.

a) Índice de yodo. Método de Hanus. (AOAC, método 920.158) (1)

La metodología requiere la realización de un blanco.



Índice de yodo = $[(\text{Vol bco} - \text{vol mtra}) (\text{N tiosulfato}) (\text{meq yodo}) / \text{g de mtra}] 100$

DCM = diclorometano.



- Preparación del reactivo de Hanus:

1. Disolver 13.615 g de yodo en 825 ml de ácido acético glacial y disolver con calentamiento y agitación.
2. Tomar 25 ml de la solución de yodo y titular con tiosulfato de sodio 0.1 N, usando 1ml de almidón al 1% como indicador.
3. Mezclar 3 ml de bromo en 205 ml de ácido acético glacial.
4. Tomar 5 ml de la solución de bromo, adicionar 10 ml de KI al 15% y titular con tiosulfato de sodio 0.1 N, usando 1 ml de almidón como indicador.
5. Obtener los miliequivalentes de bromo y yodo y calcular el volumen de la solución de bromo que se requiere adicional a los 800 ml de la solución de yodo, de forma que se tenga una solución final con el doble del halógeno:

$$\text{ml Br} = [\text{meq I (vol de I)}/\text{meq Br}]$$

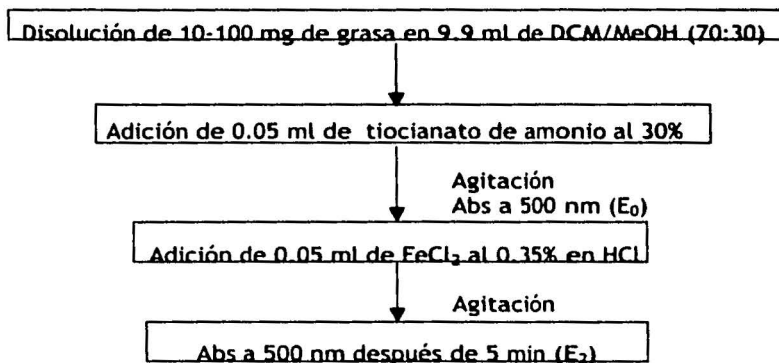
- Valoración del tiosulfato de sodio

Se realice con 0.02 g de dicromato de potasio, 0.2 g de KI, 8ml de agua hervida y fría y 2ml de HCl 1N, se deja reposar 10 minutos en la oscuridad y se titula con tiosulfato usando 0.5 ml de almidón al 1% como indicador.

$$N \text{ tiosulfato} = \text{g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7(1000)/\text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(49.032)$$



b) Metodología de Índice de Peróxidos (colorimétrico):



Se realiza simultáneamente un blanco de reactivos (E_1). La absorbancia corregida: $[(E_2 - E_1) - E_0]$ se interpola en una curva de calibración con $FeCl_3$ llevando a cabo la reacción con tiocianato de amonio, en concentraciones de 0 a 50 μg de Fe/10 ml.

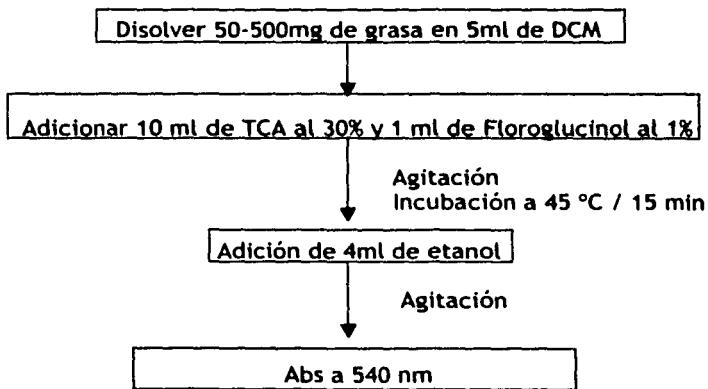
El índice de peróxidos expresado en meq de Fe/Kg de grasa se calcula:

$$IP = mg \text{ Fe} / 55.84 \times m$$

Donde mg Fe es el valor que resulta de la interpolación en la curva y m es el peso de la muestra en gramos.



c) Metodología de Índice de Kreis.

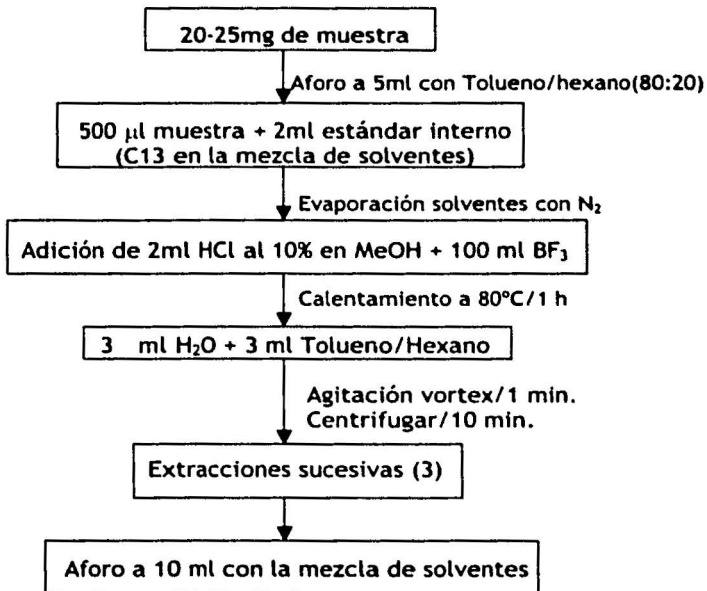


Índice de Kreis se reporta como la Abs 540 nm/g grasa.

DCM = diclorometano ó cloruro de metileno

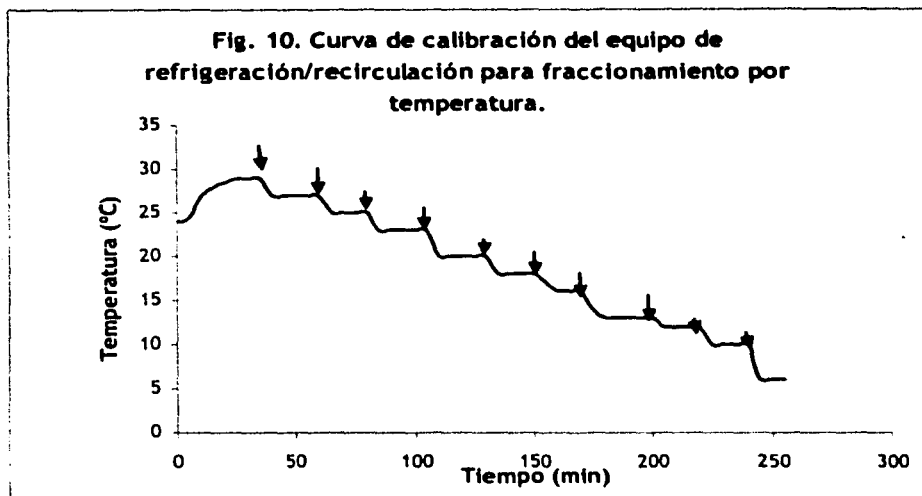


d) Metodología para la esterificación de las fracciones para su análisis en CG: (AOAC, método 969.33)(1)





ANEXO 2



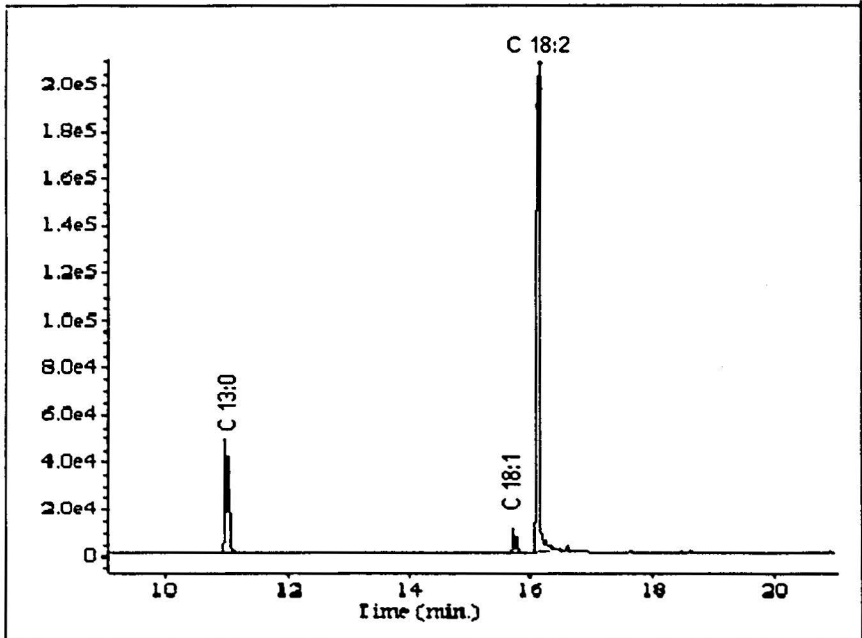
Los puntos marcados en la curva, indican el momento en que se hizo el cambio en el control del equipo para disminuir la temperatura del agua de recirculación.

En la figura 10 se muestra la curva de calibración del equipo que fue usado en el fraccionamiento por temperatura, y lo que se aprecia es que el control de temperatura del equipo está en buenas condiciones, pues marca $\pm 1^\circ\text{C}$ y ésta se mantiene con poco tiempo de estabilización, por lo que durante el fraccionamiento no se presentaron variaciones en este parámetro.



ANEXO 3

Fig 11. Perfil de ácidos grasos de la fracción 2 en el escalamiento con 50 g.

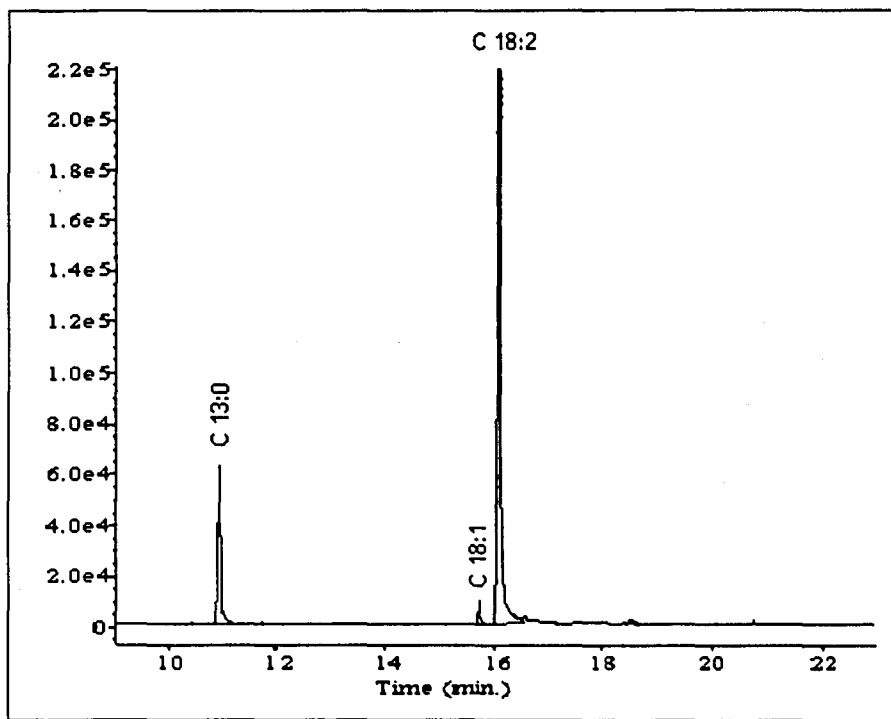


Nota: El ácido graso C13, fue usado como estándar interno en la cuantificación.

Ácido graso	Concentración relativa (% área)
C 18:1	3.40
C 18:2	96.60



Fig. 12. Perfil de ácidos grasos de la fracción 2 con escalamiento en 100 g.

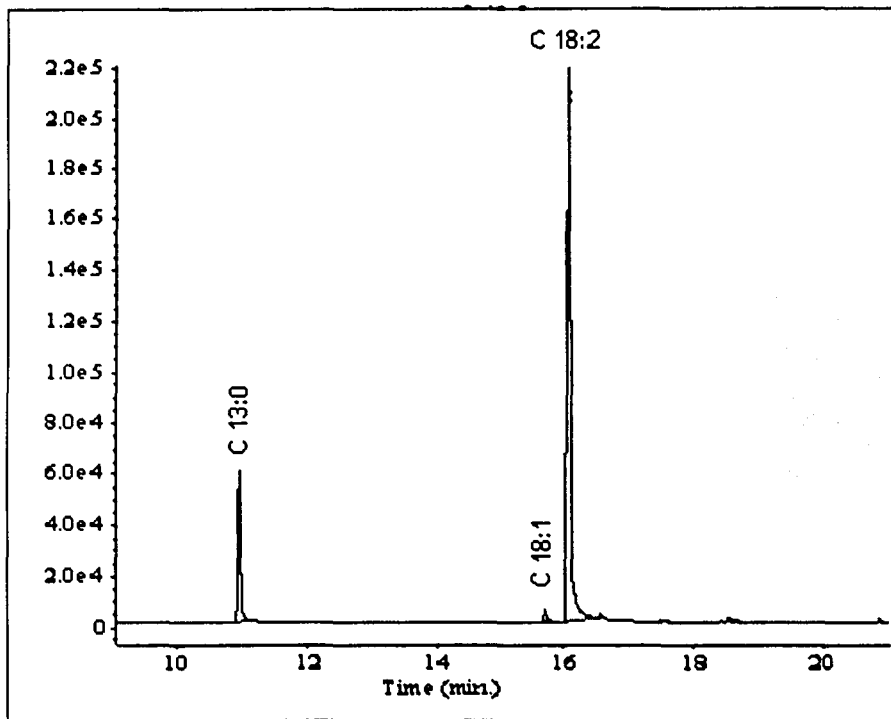


Nota: El ácido graso C13, fue usado como estándar interno en la cuantificación.

Acido graso	Concentración relativa (% área)
C 18:1	2.60
C 18:2	96.19



Fig. 13. Perfil de ácidos grasos de la fracción 2 con escalamiento en 150 g.



Nota: El ácido graso C 13, fue usado como estándar interno en la cuantificación.

Acido graso	Concentración relativa (% área)
C 18:1	1.78
C 18:2	97.90



ANEXO 4

Tabla 9. Factores de respuesta de los estándares de cromatografía usados para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos en las fracciones.

Ácido graso	Factor de respuesta
C 16:0	1.4686
C 18:0	1.4926
C 18:1	1.5318
C 18:2	1.5816
C 20:0	1.6638

Tabla 10. Comparación de las concentraciones de ácidos grasos presentes en aceite de girasol.

Ácido graso	concentración relativa (% area)	Concentración (% p/p)
C 16:0	6.94 ± 0.16	5.56 ± 0.13
C 18:0	5.19 ± 0.07	4.09 ± 0.05
C 18:1	22.87 ± 0.17	18.03 ± 0.11
C 18:2	60.26 ± 0.78	41.86 ± 0.50
C 20:0	1.76 ± 0.05	1.26 ± 0.06

En esta tabla se aprecian que efectivamente las concentraciones son bajas, pero especialmente el ácido linoléico, por las razones expuestas en el capítulo IV.



Tabla 11. Comparación de la concentración de ácido linoléico en la fracción más insaturada.

muestra	Concentración relativa (% area)	Concentración (% p/p)
10 g dos fraccionamientos	96.21 \pm 0.56	58.47 \pm 1.30
10 g un fraccionamiento	94.38 \pm 0.16	61.07 \pm 3.88
50 g un fraccionamiento	96.60 \pm 0.40	66.62 \pm 3.73
100 g un fraccionamiento	96.19 \pm 0.08	67.88 \pm 2.71
150 g un fraccionamiento	97.90 \pm 0.58	60.81 \pm 1.78