



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN PROCESO DE EXTRACCION PARA LA
OBTENCION DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE
ESCUALENO A PARTIR DE AMARANTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ERNESTO SANDOVAL CORTES



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m. 345817



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.

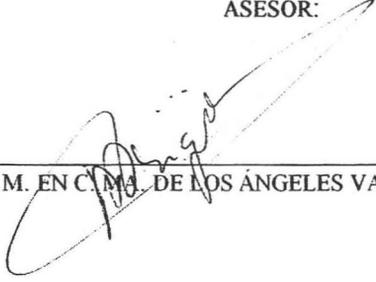
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. MA. DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ
VOCAL PROF. ARTURO NAVARRO OCAÑA
SECRETARIO PROF. GLORIA DIAZ RUÍZ
1ER SUPLENTE PROF. LUZ SANDRA SÁNCHEZ DEL ANGEL
2º SUPLENTE PROF. KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIÉRREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIOS 322-323, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR:



M. EN C. MA. DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ

SUSTENTANTE



ERNESTO SANDOVAL CORTÉS

AGRADECIMIENTOS:

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO a la que me ha formado en todos los aspectos de mi vida.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA en la que pase una de las partes más importantes de mi vida compartiendo y aprendiendo momentos importantes.

A LA PROFESORA MA. DE LOS ANGELES VALDIVIA a quien le agradezco infinitamente la confianza, la paciencia, la enseñanza y su amistad otorgada a lo largo de todo este periodo para la elaboración de la tesis así como lo aprendido en sus clases.

Al Dr. ARTURO NAVARRO, por todo el apoyo otorgado para este proyecto y que sin su ayuda no hubiera podido terminar.

A JULIETA SANDOVAL, por su apoyo y amistad en todos los aspectos.

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO, en particular al Dr. José Luis Arellano Vázquez quien amablemente dono las semillas para la investigación de este trabajo así como la información compartida.

DEDICATORIAS:

En especial a mi mama, gracias por esa fortaleza que me has enseñado a través de todo este tiempo y que siempre serás un ejemplo a seguir., mil gracias por todo.

A mi papa por todo ese apoyo que siempre me ha dado para seguir avanzando por el buen camino y por sus buenas enseñanzas.

A mis hermanos por su todas las experiencias compartidas a través de todo este tiempo y soportarme en mis neurosis por los exámenes y tareas.

A Al por que me enseñaste a valorar muchas cosas que nunca olvidare y que siempre las tendré presentes.

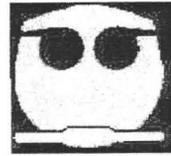
A todos aquellos que en su momento compartimos momentos agradables en el transcurso de la carrera pero en especial a mis amigas y amigos que he compartido muchos momentos muy inolvidables en los últimos tiempos y que hicieron que fuera muy divertida la estancia en los laboratorios: Joanna, Fabiola, Miriam, Magali, Susan, Gaby Aguilar, Leo, Carlos y checo. Así como a Brenda, Claudia, Vianney, Luís.

También agradezco su amistad y apoyo a Judith, Caro, Moni, Rigo, Osvaldo, Gerardo, Jorge. Seguimos n contacto aunque estemos lejos.

A todos ustedes: *Gracias.....*

SI BÚSCAS RESULTADOS DISTINTOS NUNCA HAGAS LO MISMO....

ALBERT EINSTEIN



INDÍCE

Introducción.....	1
Objetivos.....	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES	
1.1 La semilla de amaranto.....	3
1.2 Clasificación botánica del amaranto	3
1.3 Vía C ₄ y de los ácidos tricarbóxicos.....	4
1.4 Bancos de germoplasma de amaranto.....	5
1.5 Características físicas de la semilla.....	5
1.6 Zonas de producción en México y rendimientos.....	7
1.7 Principales usos de la semilla.....	8
1.8 Propiedades químicas de la semilla de amaranto.....	9
1.8.1 Lípidos en la semilla de amaranto.....	11
1.8.2 El escualeno.....	13
1.9 Actuales fuentes de extracción del escualeno.....	15
1.10 Síntesis del escualeno en plantas y animales.....	16
1.10.1 Biosíntesis general de los terpenoides en plantas.....	16
1.10.2 Síntesis de escualeno en animales.....	17

1.11.1 Propiedades biológicas del escualeno en la dieta.....	20
1.11.2 Otros efectos del escualeno ingerido en la dieta	22
1.12 Posibles mecanismos de acción del escualeno en la dieta.....	23
1.12.1 Estabilidad química del escualeno.....	23
1.13 Escualeno en la industria.....	24

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS.

ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGIA.....	25
2.0 Tratamiento de la semilla.....	26
2.1 La selección.....	26
2.1.2 La limpieza.....	27
2.2 Molienda y tamizado de la semilla.....	27
2.2.1 La molienda.....	27
2.3. El tamizado.....	27
2.4 Técnicas de extracción.....	27
2.4.1 Soxhlet.....	28
2.4.2 Agitación 24 horas.....	28
2.4.3 Sonicación.....	28
2.4.4 Goldfish.....	29
2.5 Extracción de lípidos.....	30
2.6 Saponificación.....	30
2.6.1 Material insaponificable.....	30
2.7 Cuantificación de escualeno por gases.....	31
2.8 Fraccionación del material insaponificable.....	32
2.9 Determinación por HPLC.....	32
2.10 Identificación de la estructura del escualeno por medio de RMN ¹³ C, ¹ H.....	33

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de la semilla.....	34
3.2 Molienda y tamizado (fraccionación en tamices).....	34
3.3 Influencia de la técnica de extracción en el rendimiento de la grasa (g/100g).....	35
3.4 Identificación de las fracciones ricas en material lipídico.....	36
3.5 Extracción de la grasa de la fracciones ricas en lípidos por medio de un equipo de extracción Soxleth.....	37
3.5.1 Grasa obtenida de las diferentes variedades.....	37
3.5.2 Influencia de la variedad en el porcentaje de grasa.....	38
3.6 Obtención del material insaponificable.....	39
3.7 Escualeno total en material insaponificable por Cromatografía de gases.....	40
3.8 Fraccionación del material insaponificable.....	43
3.9 Identificación de estructura por RMN ¹³ C, ¹ H.....	46
3.10 Identificación del escualeno por HPLC.....	46
3.11 Tabla general de resultados en las determinaciones de escualeno en las variedades De amaranto.....	48
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51
APÉNDICES.....	56

INTRODUCCIÓN:

El escualeno ha despertado mucho interés, tanto en la industria como en la investigación, este hidrocarburo insaturado, es demandado principalmente en la industria farmacéutica; ya que es usado para la manufactura de cosméticos de calidad, cremas como fotoprotector contra los rayos ultravioleta. También es utilizado como lubricante para finos instrumentos electrónicos, asimismo es tema de estudio en investigaciones en el área de la medicina ya que se ha visto que este triterpeno disminuye el cáncer de colon por lo que se le considera como un nutracéutico.

La principal fuente de extracción para este hidrocarburo es el aceite de los hígados tanto del tiburón como de ballena (que llegan a tener hasta un 80% del total del aceite), se dificulta su purificación debido a la presencia de compuestos tales como el colesterol lo que aumenta su costo; aunado a esto hay organizaciones mundiales que están en contra de la matanza discriminada de estos animales.

En la búsqueda de nuevas fuentes de escualeno se ha encontrado (en diferentes variedades del mundo) que el grano de amaranto tiene entre un 6-8 % de escualeno del total del aceite de la semilla lo que la hace una fuente muy importante de extracción, tomando como referencia que el aceite de olivo es la fuente vegetal con mayor contenido de este hidrocarburo (0.3% del total del aceite) y de donde en la actualidad se extrae.

Se han realizado varios estudios con el fin de cuantificar la cantidad de escualeno presente en variedades de semillas de diferentes regiones del mundo. En cuanto a las variedades de México se les han hecho perfiles de ácidos grasos, cuantificación de escualeno, etc; pero no se indica en ninguno de estos estudios extranjeros, de que parte se obtienen las semillas (ni de las variedades) solo se indica el género (*crnentus* ó *hipochondriacus*), por lo que este trabajo se enfocó a variedades de México que más se distribuyen en el territorio nacional, ver que variedad es la que posee mayor cantidad de este triterpenoide y así darle otro interés distinto al nutricional.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Conocer la influencia de las variedades más cultivadas en México de la semilla de amaranto sobre la concentración de escualeno.

Objetivos particulares:

- Establecer un esquema analítico de extracción de escualeno de las tres variedades que más se cultivan y distribuyen en México.
- Caracterización química del escualeno a través de herramientas analíticas tales como HPLC, cromatografía en capa fina (CCF), Gases, RMN (^{13}C , ^1H .)

1.1. LA SEMILLA DE AMARANTO

Son pocas las plantas que tienen orígenes históricos o culturales como la familia Amaranthaceae, ya que desde tiempos precolombinos la semilla de amaranto fue uno de los alimentos básicos. Al igual que maíz y frijol, su cultivo data de 7,000 u 8,000 años y llega a la cúspide durante la cultura Maya, Azteca, Inca y otras culturas de Centro y Sudamérica (Becker y Wheeler, 1981).

1.2 CLASIFICACIÓN BOTANICA DEL AMARANTO

Técnicamente el grano de amaranto es considerado como un pseudo cereal, ya que tiene características similares a la de los granos de cereales verdaderos de las monocotiledóneas. La terminología botánica está basada sobre la genética de los tejidos y órganos de la semilla. El endospermo es derivado de células tripoides y el perispermo es derivado de células diploides, en algunas plantas dicotiledóneas el desarrollo del embrión utiliza enormes porciones de reservas de energía del endospermo, esto parece ser el caso con el amaranto en el cual la estructura y localización del endospermo es similar al de la remolacha (D. Word; et al, 1981) (tabla 1)

Tabla 1.- Descripción botánica del amaranto. (Becker y Saunders, 1984; Casillas, 1977)

Reino	Vegetal
División	Embryophytasipphonograma
Subdivisión	Angiosperme
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Archiclomidae
Grupo	Thalamifloreae
Orden	Caryophylales
Género	Amaranthus
Especie	Amaranth

La semilla de amaranto contiene cantidades importantes de almidón, con la diferencia de que éste se encuentra almacenado en el perispermo y el embrión ocupa gran parte del grano, conformando así una buena fuente de lípidos y también de proteínas. Sin embargo, por ser una dicotiledónea, no es considerado como un cereal verdadero.

Existen notables diferencias entre las especies de amaranto productoras de grano y las que se utilizan como verdura (por sus hojas comestibles). Las plantas que se utilizan por su grano han sido también aprovechadas como ornamento, como colorante y son generalmente especies cultivadas. El proceso de domesticación de estas especies las ha llevado a alcanzar mayores tamaños, con inflorescencias enormes y con mayor producción de semillas.

Por otra parte, las especies productoras de verdura, es decir; que se utilizan por sus hojas comestibles, son generalmente malezas, plantas no cultivadas que dedican gran parte de su energía a la producción de follaje, son de menor tamaño que las cultivadas y presentan flores más pequeñas y de color oscuro.

1.3 VÍA C₄ Y DE LOS ACIDOS TRICARBORXILICOS

El amaranto es una planta de rápido crecimiento debido a que utiliza la vía C₄ de la fotosíntesis (Wood, 1981). El aceptor primario de CO₂ es el fosfoenolpiruvato (PEP) y con la ayuda de la fosfoenolpiruvato-carboxilasa es convertido en oxalacetato y esta a su vez se convierte en malato (ciclo de los ácidos dicarboxílicos) el cual sufre una descarboxilación, el CO₂ desprendido entra al ciclo de Calvin por medio de la carboxidismutasa que se une a la ribulosa-1,5-difosfato y con esto se inicia la síntesis de nuevos carbohidratos. En la figura 1 se sitúa finalmente los terpenoides en el esquema global del metabolismo Hess, (1980).

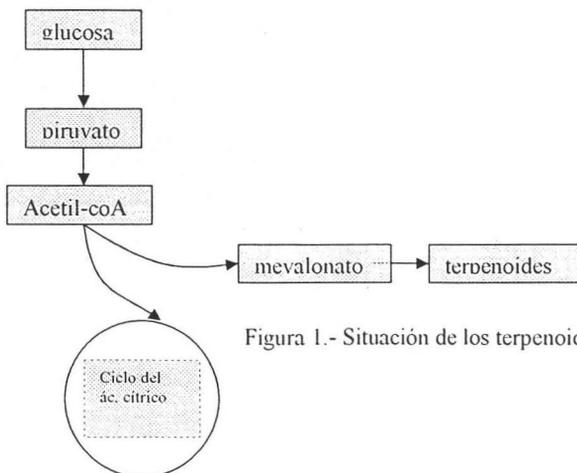


Figura 1.- Situación de los terpenoides en el metabolismo (Hess, 1980)

1.4 BANCOS DE GERMOPLASMA DE AMARANTO

El principal banco de germoplasma de amaranto se encuentra en Iowa USA, en el North Central Regional plant Introduction Station, el cual en 1999 contaba con 3380 registros de variedades provenientes de todo el mundo, por lo que es considerado la colección más importante. India posee el segundo banco más importante de germoplasma (El National bureau of Plant Genetic resources, en Shimla) para 1995 contaba hasta con 3000 registros. En México se encuentra un importante banco de germoplasma localizado en la Universidad Autónoma de Chapingo, el INIFAP; en 1993 este banco contaba ya con 495 registros (Becerra, 2000).

1.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA SEMILLA

Actualmente la universidad de Chapingo ha obtenido variedades mejoradas en la semilla de amaranto *hipochondriacus* con las siguientes características físicas (Tabla 2).

Tabla 2.- características físicas de las variedades mejoradas genéticamente. (Arellano, 1999).

variedades	Color de planta	Color de panoja	Altura de planta (m)	Días de madurez
Rojita	verde	púrpura	1.50	120-130
Revancha	verde	verde	1.70	140-160
Nutrisol	Púrpura	púrpura	2.50	160-180
Gitana (precomercial)	Verde-púrpura	Rosa, coral, verde	1.80	140-160

La altura de la planta llega a ser de 2 a 3 metros, en la parte superior de la planta se encuentra la inflorescencia que es una especie de saco o bolsita en donde se producen una cantidad significativa de semillas, que son de colores muy variados y van desde el blanco amarillento, beige, café claro, rojas, hasta negras que son de especies silvestres (Becker y Wheeler, 1981). Cada semilla llega a pesar en promedio entre 0.6 – 1.2 g (Jain y Hauptli, 1980).

El amaranto es una planta anual con excelente follaje y brillantes colores, su tallo es estriado y hueco en el centro (en la etapa de madurez), tiene un solo eje central con pocas ramificaciones, la raíz es corta pero robusta y provista de numerosas raicillas secundarias, sus hojas varían de forma y color, según la especie pueden ser largamente pecioladas, romboides o cónicas; el color va de verde oscuro a púrpura, además de que son pocas las plantas que sus hojas pueden ser aprovechadas como vegetales frescos (Becker y Wheeler, 1981; Bressani y López, 1987) (tabla 3).

Las variedades de esta planta crecen vigorosamente, incluso se adaptan a climas adversos en condiciones de desarrollo mínimas, son capaces de resistir la sequía por la ruta metabólica que poseen (C₄), también resisten enfermedades, etc. En otros términos, el cultivo de esta planta concuerda con las condiciones exactas que prevalecen en el mundo subdesarrollado.

Tabla 3.- Características físicas del desarrollo de la planta de variedades mejoradas y tolerancia a enfermedades (Arellano, et al., 1999).

variedad	Tamaño de panoja		Tolerancia a enfermedades	Rendimiento en resistencia
	Largo	ancho	Kg/ha	
Rojita	40	15	1,400	Moderada
Revancha	40	30	1,800	Resistente
Nutrisol	40	35	2,500	Resistente
Gitana	60	30	2,000	Resistente

1.6 ZONAS DE PRODUCCIÓN EN MÉXICO Y RENDIMIENTOS

Existe en México una amplia variedad en las especies del género de *Amaranthus*, pero solo dos de ellas son cultivadas: *A. hypochondriacus* con 4 variedades (Rojita, Revancha, Nutrisol, Gitana), originario de México y *A. cruentus*, originario de Guatemala pero que se ha podido extender su siembra en México por la regiones de Puebla (variedad Atlixco) y Morelos. Al sureste de México también se encuentra la especie *A. caudatus*, cuyo origen es de América del sur pero su cultivo se ha ido disminuyendo en nuestro país (Arellano, et al, 1999).

En la mesa central de México se cultivan alrededor de 1,200 ha. de las variedades: rojita, revancha, nutrisol, gitana y Atlixco (cruentus) con buenos rendimientos (1.64.Ton/ha).

Las principales zonas productoras de la semilla se localizan en los estados de Morelos, Puebla, Tlaxcala, Estado de México y el Distrito Federal. Actualmente la expansión del cultivo de amaranto a otras regiones agrícolas de México, obedece a una demanda de productos alimenticios de tipo natural con alto valor nutritivo y también, al logro de una mayor rentabilidad del cultivo, en comparación con los cultivos básicos. (Arellano, et al, 1999). Los rendimientos que se obtienen en la actualidad de la siembra en la meseta central de México se describen en la tabla No. 4

Tabla 4- Cantidad de semilla de amaranto sembrada, número de plantas, panojas y rendimiento por hectárea. (Arellano, et al., 1999).

Semilla Kg/ha	Plantas/ ha (30 días)	Panojas/ ha (etapa de madurez)	% de plantas con panoja	Rendimiento Ton /ha
2.0	1 millón 140 mil	270 mil	23	1.55
4.0	1 millón 140 mil	330 mil	22	1.73
6.0	2 millones 70mil	360 mil	17	1.63

Al parecer se lograría el mismo resultado al sembrar 2, 4 ó 6 Kg. de semilla, sin embargo, sembrar de manera directa 2.0 Kg. de semilla es muy laborioso y el terreno se vería rápidamente invadido por la maleza debido a que el amaranto crece muy lento durante el primer mes. Utilizar 6.0 Kg. de semilla/ ha en siembra directa, facilita la distribución de la semilla en el surco, asegura mayor número de plantas bajo condiciones de deficiente preparación del terreno y humedad y permite lograr ventaja competitiva del crecimiento de amaranto respecto a la maleza. Así que, se recomienda la siembra de 6.0 Kg./ ha de semilla, tomando en cuenta que los terrenos de los productores pueden presentar ciertas dificultades para la emergencia de la plántula, por lo cual se esperaría que el número de plantas establecidas por hectárea sea menor a las experimentales y el número de panojas mayor. (Arellano, et al, 1999).

Perú es el país donde se han logrado los mayores rendimientos. En algunos campos experimentales se han alcanzado a producir hasta 7,200 Kg/ha de grano, significativamente mayor que el promedio mundial que va de los 1000 a los 3000 Kg./ ha. (Becerra, 2000). India es uno de los principales productores de amaranto en el mundo solo después de China la cual llega a cultivar hasta 150 000 ha por año

1.7 PRINCIPALES USOS DE LA SEMILLA

El uso de la semilla en épocas prehispánicas era con fines religiosos, es decir; se elaboraban figuras humanas (huautli) con la semilla molida que se mezclaba con miel y sangre humana que después eran consumidas durante las ceremonias. Hace algunas décadas solamente algunos pueblos de Centro y Sudamérica así como México incluían las semillas de amaranto en su dieta en formas diversas como son atole, tamales, las hojas se llegan a utilizar como vegetales frescos y se preparan en ensaladas u otros guisos de acuerdo a las costumbres del lugar (Brezan y López, 1987), inclusive en Guatemala se estudia la posibilidad de utilizarlo como forraje para pollos, con el fin de obtener mejores rendimientos de los mismos (Becker y Saunders, 1984).

En México, el único producto que ha prevalecido a través del tiempo y con el cual se identifica a la semilla del amaranto a nivel nacional es el dulce conocido como alegría. El dulce es elaborado a partir de semilla “reventada”, es decir, colocada directamente sobre el fuego (método tradicional) y mezclada con miel (Becker y Wheeler, 1981).

Por otra parte, el cultivo del amaranto se ha diversificado o difundido por todo el mundo de manera que India es uno de los países que ha adoptado el amaranto de manera mas decidida tanto, que poseen una gran variedad de platillos que se preparan con la semilla y con las hojas del amaranto (Rosalba, 2000).

Actualmente la harina de la semilla de amaranto cada vez más es utilizada en la industria alimentaria para la elaboración de tortillas, pan, galletas, pasta, mazapán y como ingrediente para cereal de desayunos comerciales (Rita A. Teutonico y Dietrich Knorr, 1985), así como (barras energéticas, dulces, concentrados, entre otros).

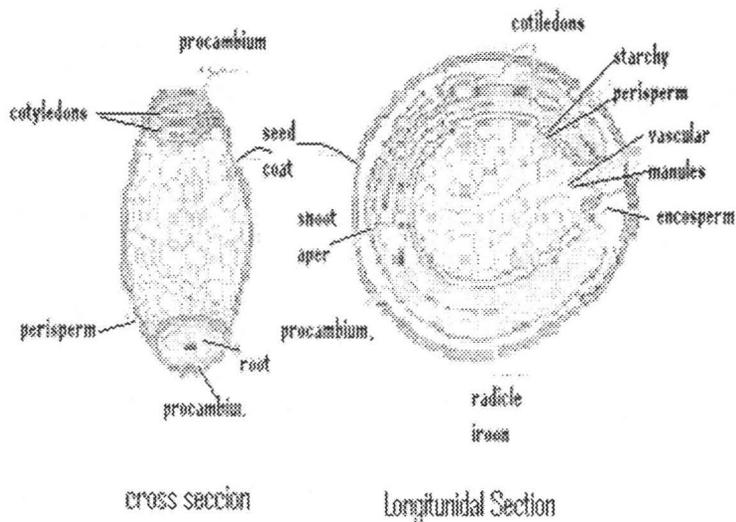
Estados unidos y Japón han puesto mayor interés sobre esta semilla, ya que en los últimos años son los que han invertido más dinero en investigación tanto en agronomía como en nueva tecnología para el uso del grano en el desarrollo de nuevos productos (Becerra, 2000).

1.8 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA SEMILLA AMARANTO

El germen y el salvado constituyen el 9 y 16% del peso total de la semilla, el 58 y 66 % restante corresponde al endospermo. El germen puede contener como máximo 30% de proteína y un 20% de aceite. El salvado tiene un alto contenido de proteína, fibra cruda, vitaminas y minerales, ya que cuando la semilla es sometida al proceso de molienda, estos nutrientes se concentran en el mismo salvado (Bressani y López, 1987; Casillas, 1981).

El almidón es el componente más abundante de la semilla de amaranto, pues representa entre 50 y 60% de su peso en seco. Figura 2 (Word, 1981).

Figura.- 2 morfología de la semilla de amaranto (Word, 1981)



La composición de los amino ácidos presentes en las diferentes variedades estudiadas de la semilla de amaranto han mostrado niveles altos de lisina por lo que la hace muy importante para la alimentación humana por ser un aminoácido esencial (Becerra, 2000).

Análisis hechos a semillas de amaranto en varias especies indican que la proteína, grasa, cenizas y minerales especialmente el sodio y calcio son generalmente más altos que en otros granos de cereales. La cantidad de taninos o ácidos tánicos es igual a la del resto de las semillas (Budin, 1996).

1.8.1 LÍPIDOS EN LA SEMILLA DE AMARANTO

El contenido de lípidos presente en el endospermo de la semilla de amaranto va de 7 a 8%. En estudios recientes han encontrado un contenido relativamente alto de escualeno, aproximadamente 6-8% del aceite de la semilla (Becerra, 2000) (Tabla 5).

Tabla 5- Composición de los ácidos grasos de la semilla de amaranto. (Lyon y Becker, 1987).

Ácidos grasos ^b	Aceite crudo % peso
16:0	13.4
18:0	2.74
18:1	20.4
18:2	62.1
18:3	1.06
20:0	0.66
Escualeno ^c	6.96

Promedio de 3 a 6 determinaciones, ^b Porcentaje de metil ésteres, ^c Porcentaje de aceite.

En la tabla 6 se muestra la cantidad y composición de los ácidos grasos de diferentes semillas así como del amaranto cruentus y de *hipochondriacus* (Jahaniaval., et al, 2000).

El aceite de la semilla de amaranto es similar en cuanto a su composición a los aceites de las semillas de algodón y maíz; ya que contienen casi las mismas cantidades de ácidos grasos (linoleico, oleico y palmítico) (Lyon , 1987).

Tabla 6.- comparación de ácidos grasos de la semilla de amaranto con respecto a otras semillas (Jahaniaval, et al, 2000).

Ácidos grasos	Trigo	Maíz	Arroz	Soja	Ajonjoli	Quinoa	Semilla de algodón	A. <i>Hipochondriacus</i>	A. <i>cruentus</i>
	% de composición en los ácidos grasos								
14:0	0.24	---	0.51	0.12	0.02	0.32	1.00	0.26	0.27
16:0	19.5	11.6	18.6	12.7	9.51	11.4	25.7	23.4	22.2
16:1	0.25	0.14	0.23	0.11	0.11	0.07	0.53	0.15	0.11
18:0	2.18	1.91	1.75	3.96	5.41	0.79	2.45	3.68	3.57
18:1	37.1	27.8	42.4	21.7	40.0	25.6	17.7	31.5	30.1
18:2	35.5	56.5	34.8	53.9	43.5	52.8	52.1	39.4	42.2
18:3	1.93	1.65	1.10	7.23	0.33	7.00	0.22	0.65	0.69
20:0	1.49	0.40	0.49	0.28	0.60	0.29	0.25	0.60	0.68
20:1	---	0.05	---	0.04	0.18	1.00	0.05	0.24	---
22:0	1.31	0.05	---	0.05	0.14	0.24	0.05	0.19	0.24
22:1	---	0.05	---	---	---	0.52	0.05	0.39	---
24:0	0.51	0.05	---	---	0.09	---	---	---	---
S/U ^a	0.34	0.16	0.27	0.2	0.19	0.15	0.41	0.39	0.37

^aS/U relación de ácidos: saturados / insaturados

1.8.2 EL ESCUALENO

El escualeno fue descubierto en Japón en el año de 1906 iniciándose desde mediados de los años 30 su estudio y análisis en el ámbito científico.

Se trata de un hidrocarburo no saturado, del que la fórmula científica es $C_{30}H_{50}$, su nombre químico es (2,6,10,15,19,23- hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracoxaheno) ver. Fig.3, CAS. no: 111-02-04 y peso molecular 410.70. Su función fisiológica principal es la de oxigenar de forma eficiente las células, mejorando el metabolismo. Otra función que se le ha encontrado a este triterpeno, es que juega un papel muy importante en la síntesis del colesterol en animales y esteroides en plantas, es decir; es un intermediario en la síntesis de esteroides.

El cuerpo humano produce escualeno en muy pequeñas cantidades, las proporciones van del 10 al 15% en los lípidos existentes en la superficie de la piel, actuando como detoxificante y antioxidante al potenciar nuestro sistema inmunológico y rehidratar en el ámbito celular el organismo, además de estar considerado como un elemento profiláctico para la lucha de cáncer. Es un precursor biosintético de todos los esteroides. En los animales acuáticos aunque no se conoce exactamente su biología, se sabe que el escualeno sustituye al oxígeno por la falta de este, por lo que entre mayor profundidad alcance el animal más es la cantidad de escualeno presente en el hígado que llega a alcanzar hasta un 80% del total de los lípidos existentes en dicho órgano. La síntesis de este triterpeno en los animales parte del acetil-coA. (figura 5).

1.9 FUENTES ACTUALES DE EXTRACCIÓN DEL ESCUALENO

La fuente tradicional para el escualeno es el aceite de hígado del tiburón (*Centrophorus squamosus*) y de la ballena (*Physeter macrocephalus*) (Han-Pe, 2002).

El uso del escualeno en productos cosméticos esta limitado debido a que grupos internacionales protegen a los animales marinos. Además la presencia de componentes similares como el colesterol, dificultan la purificación del escualeno. Esto ha obligado a buscar nuevas fuentes potenciales para la extracción del triterpeno. Se ha encontrado escualeno en varios tipos de plantas, Han-P., et al, 2002 (tabla 7).

El principal hidrocarburo del aceite de oliva es el escualeno, el aceite de oliva extra virgen contiene escualeno en una cantidad aproximada de 400-450 mg/100 g, mientras que el aceite de oliva refinado contiene alrededor de un 25 % menos (Owen, 2000).

Smith (et al, 2000), detectó la existencia de unos niveles de escualeno de aproximadamente 200-700 mg/100 g en el aceite de oliva extra virgen.

Tabla 7.- Cantidad de escualeno presente en diferentes semillas

Fuente	Cantidad % (base seca.)
coco	<u>0.002</u>
Algodón	<u>0.01</u>
Cacahuate	<u>0.03</u>
Salvado de arroz	<u>0.3</u>
Aceite de olivo	<u>0.4</u>
Amaranto	3.6-8% (<i>A. hypochondriacus</i>) 6.1% Tr017 (<i>A. tricolor</i>) *

*en base seca Han-P., et al, (2002).

Actualmente hay varios estudios que se han realizado con el fin de cuantificar la cantidad de escualeno presente en variedades de semillas de diferentes regiones del mundo. En cuanto a las variedades de México se les han hecho estudios por parte de grupos de investigadores del extranjero (Budin, et al.,1996; Han-Ping, et al.,2002) , pero no se indica en ninguno de estos estudios, de que lugar se obtienen las semillas (ni de las variedades) solo se indica la especie (*cruentus* ó *hipochondriacus*), por lo que este trabajo se enfocó a variedades de México que más se distribuyen por el territorio nacional, con el objetivo de ver que variedad es la que posee mayor cantidad de este triterpenoide y así darle otro uso distinto al nutricional.

1.10 SÍNTESIS DE ESCUALENO EN PLANTAS Y ANIMALES

1.10.1 BIOSÍNTESIS GENERAL DE LOS TERPENOIDES EN PLANTAS

En cuanto a las plantas la biosíntesis de los isoprenos inicia de igual forma que la de los animales con el acetyl-coA pero la ruta de estos terpenoides se lleva a cabo a través de la ruta acetato-malonato.

La biosíntesis empieza con el acetyl-coA que se une con una segunda unidad de acetyl-coA formando aceto-acetyl-coA. Participa entonces una tercera unidad de acetyl-coA y así resulta una molécula de 6 átomos de carbono hidrogenado llamado ácido mevalónico. A partir de él se forma, bajo descaboxidación, escisión de agua y utilización de ATP, el isopreno activo isopentenilpirofosfato (IIP).

El IIP está en equilibrio con su isómero dimetil-alil-pirofosfato. Este compuesto es el que inicia la síntesis de terpenoides sin el cual no podría llevarse a cabo, pues solo con el dimetil-alil-pirofosfato se puede unir el IIP bajo escisión de pirofosfato, formándose un monoterpeno abierto, el geranyl-pirofosfato. Del geranyl-pirofosfato se llega a los siguientes monoterpenos abiertos y cíclicos.

Uniendo ahora una unidad de IPP más al geranyl-pirofosfato se obtiene farnesil-pirofosfato, un sesquiterpeno. La adición tiene lugar de cabeza a cola: el IIP coloca su <<cabeza>>, el grupo CH_2 , en el extremo pirofosfato que es la <<cola>>, del geranyl-pirofosfato. El farnesil-pirofosfato resultante se puede transformar en los siguientes sesquiterpenos. Sin embargo, hay un hecho más importante: dos moléculas de farnesil-pirofosfato pueden ser unidad <<cola con cola>> formando un triterpeno abierto. De aquí derivan luego otra vez los triterpenos cíclicos, entre los cuales se cuenta los esteroides necesarios para la vida de todos los organismos.

1.10.2 SÍNTESIS DEL ESCUALENO EN ANIMALES

En cuanto al organismo animal el escualeno proviene de la formación de mevalonato a partir de acetil-coA, que posteriormente se transforma o es un intermediario en la síntesis del colesterol.

La biosíntesis del colesterol de novo puede tener lugar en todas las células del organismo, en un proceso que se lleva a cabo de forma escalonada y que ocurre en su totalidad en el exterior de las mitocondrias, con participación de fracciones microsómicas y soluble del plasma. Esta capacidad de síntesis es mayor en estructuras como el hígado, el intestino, corteza suprarrenal y tejidos reproductores como los ovarios testículos o placenta, debido a que la biosíntesis del colesterol requiere de una fuente de átomos de carbono y un considerable poder reductor para generar los numerosos enlaces carbono-hidrógeno y carbono-carbono. Todos los átomos de carbono del colesterol provienen del acetato. Aunque esta síntesis tiene lugar en el exterior de la mitocondria, requiere acetil-CoA como sustrato, la cual se encuentra en el interior de la misma y de la que sale empleando los mismos mecanismos que para los ácidos grasos.

La síntesis global del colesterol puede quedar dividida en tres etapas o fases fundamentales:

- Formación de mevalonato a partir de acetil-CoA.
- Transformación de mevalonato en escualeno.
- Transformación del escualeno en colesterol.

La figura 5 muestra la ruta metabólica de la síntesis del escualeno así como del colesterol y como este precursor a la vez se sintetiza en varias hormonas por diferentes rutas.

síntesis de escualeno y colesterol

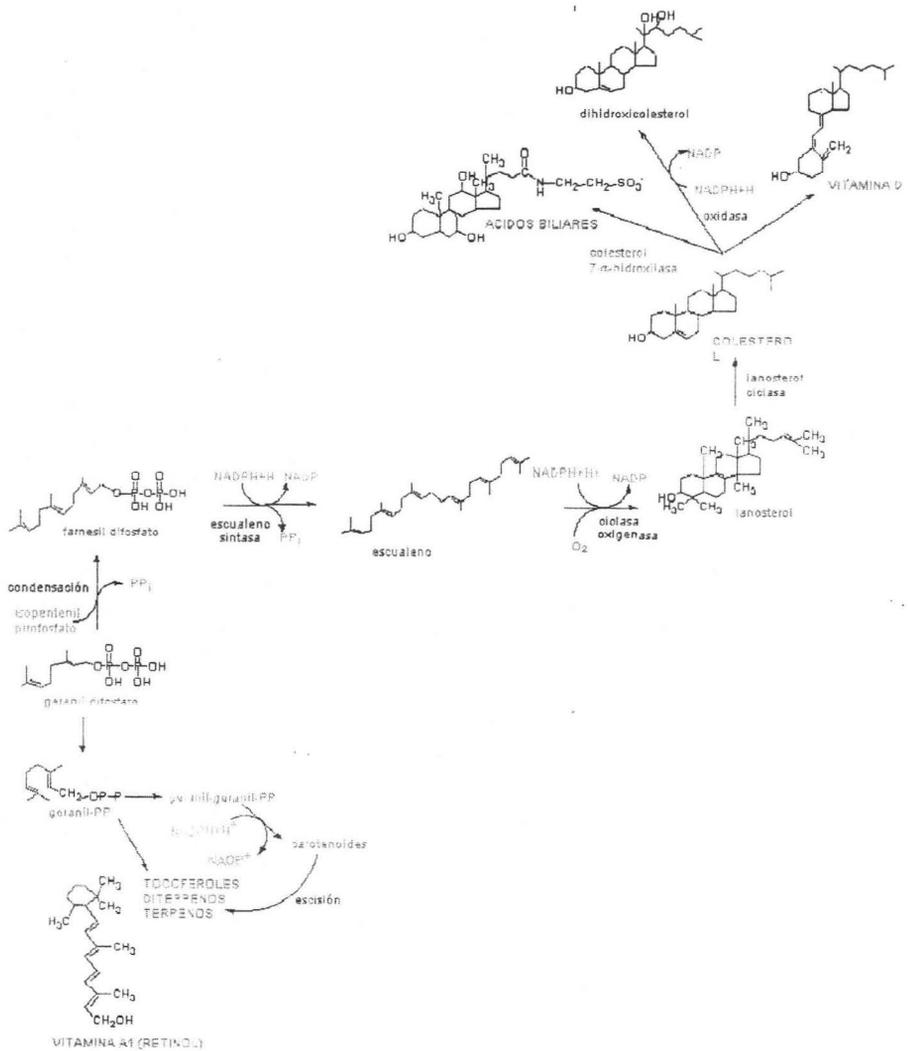


Figura 4. - Metabolismo del escualeno (un intermediario en la síntesis de colesterol).

1.11.1 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL ESCUALENO EN LA DIETA

Tal como se ha mencionado anteriormente, el escualeno es un metabolito de la síntesis del colesterol. Así pues, teóricamente, el escualeno de la dieta puede transformarse en colesterol en el organismo e incrementar, en consecuencia, los niveles séricos de colesterol. El primer requisito para obtener tal efecto sería la absorción de cantidades considerables. Kelly (1999) y posteriormente Smith (2000), encontraron indicios que apuntan que se pueden absorber entre un 60 y 80 por ciento del escualeno alimentario a partir de una dosis oral. Además, los datos indican que, en los seres humanos, una cantidad sustancial del escualeno ingerido en la dieta se convierte en colesterol. Sin embargo, este incremento de la síntesis de colesterol no está asociado a aumentos constantes de los niveles séricos de colesterol, posiblemente como resultado de un aumento concomitante en la eliminación fecal (Strandberg, 1990).

Aunque Miettinen y Vanhanen (1994) detectaron un incremento de las concentraciones séricas totales y del colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (colesterol-LDL) después de un suplemento dietético, con una dosis diaria muy elevada de escualeno (1g), los valores podrían normalizarse al reducir posteriormente dicha dosis de escualeno hasta un nivel inferior (0,5 g al día).

En general, la inquietud que suscita la creencia de que dosis bajas de escualeno contribuyen a unos niveles séricos de colesterol elevados parece fuera de lugar. A unos niveles dietéticos razonables, de 0,5g al día o inferiores, el escualeno aparentemente carece de efectos adversos sobre las concentraciones de colesterol en suero

Cabe mencionar un estudio que reviste especial interés, en el que se pone de manifiesto que el escualeno, añadido a un protocolo con la administración de pravastatina a dosis bajas, intensifica la eficacia de este hipolipemiente como fármaco reductor de los niveles de colesterol (Chan, et al; 1996).

En opinión de Gylling y Miettinen, 1994; los individuos podrían incluso llegar a un consumo diario máximo de 1 g de escualeno con sus regímenes alimentarios. Aparte del escualeno, también cabe destacar la presencia de otros hidrocarburos, como por ejemplo la provitamina A β -caroteno, aunque en cantidades muy pequeñas (β -caroteno: 0,03 - 0,36 mg/100 g) (Kiritsakis y Markakis, 1987)

Según datos del último estudio, la ingesta media de escualeno en EE.UU. es de 30 mg al día. Sin embargo, con un consumo elevado de aceite de oliva virgen extra, la ingesta puede alcanzar 200-400 mg diarios, tal como se constata en el caso de los países mediterráneos

Por otra parte estudios epidemiológicos revelan que el aceite de oliva ingerido en la dieta ejerce un efecto protector contra el cáncer (Newmart, 1999).

En países como Grecia y España se han dedicado ha estudiar los efectos anticancerígenos del escualeno en mujeres que consumen una cantidad elevada de grasas totales provenientes del aceite de oliva extra virgen. Los resultados muestran una incidencia de cáncer de mama apenas de un tercio de la manifestada en mujeres estadounidenses (Landa, et al; 1994, Trichopoulou, et al; 1995).

Cabe mencionar que la mujer de Europa en su dieta diaria, el 80% del aceite comestible proviene del aceite de olivo, lo cual apunta hacia el efecto protector de la ingesta de este tipo de aceite, mientras que las mujeres de América en general, consumen aceite de otro tipo de semilla oleaginosa (Martín Moreno JM, et al; 1994).

Dos científicos cuyos trabajos son notorios en este campo: Theresa J. Smith y Harold L. Newmark en 1999, sugirieron que dicho efecto protector podría atribuirse a la gran cantidad de escualeno que contiene el aceite de oliva extra virgen, presunción avalada por un considerable acopio de estudios experimentales realizados en animales.

La mayoría de los estudios anteriores han investigado el efecto del escualeno, aplicado por vía tópica o administrado por vía sistémica, en las neoplasias malignas, inducidas químicamente, tanto de piel como de colon y pulmón de ratones. Por otra parte, resultados revelan de un modo inequívoco que el escualeno ingerido en la dieta posee unos efectos anticarcinogénicos (Duren y Goldschmidt, 1976; Yamaguchi, et al, 1985; Rao, 1998; Smith y Yang, 1998; Kim, et al, 1999).

1.11.2 OTROS EFECTOS DEL ESCUALENO INGERIDO EN LA DIETA

Los primeros estudios indican que la ingesta alimentaria de escualeno podría ejercer otros efectos beneficiosos adicionales a sus propiedades anticancerígenos. Se ha observado que el escualeno es un inhibidor altamente potente del oxígeno singulete reactivo en la superficie cutánea humana (Cono, et al; 1995). En modelos animales, parece ser que el escualeno desempeña asimismo un papel importante en la salud ocular, especialmente en las células fotorreceptoras del bastón retiniano (Fliesler and Séller, 1997). Además, según han informado diversos grupos, los animales que han ingerido escualeno poseen mayor capacidad de excreción de toxinas, como es el caso del hexaclorobenceno o la estricnina (Kamimura, et al, 1997; Richter y Fichtl, 1982; Richter y Schafer, 1982), aunque algunos de estos efectos precisaron dosis muy altas de escualeno.

1.12 POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESCUALENO EN LA DIETA

El escualeno es un paso intermediario en la biosíntesis del colesterol, ácidos biliares y esteroides, es posible que el efecto inhibitor del escualeno por medio de la dieta pueda ser la modulación de la síntesis del colesterol por medio de la vía biosintética.

En ratas que se les administró el 1% de escualeno en la dieta durante 5 días suprimieron fuertemente la actividad de HMG - CoA reductasa ($\approx 80\%$) de los microsomas del hígado.

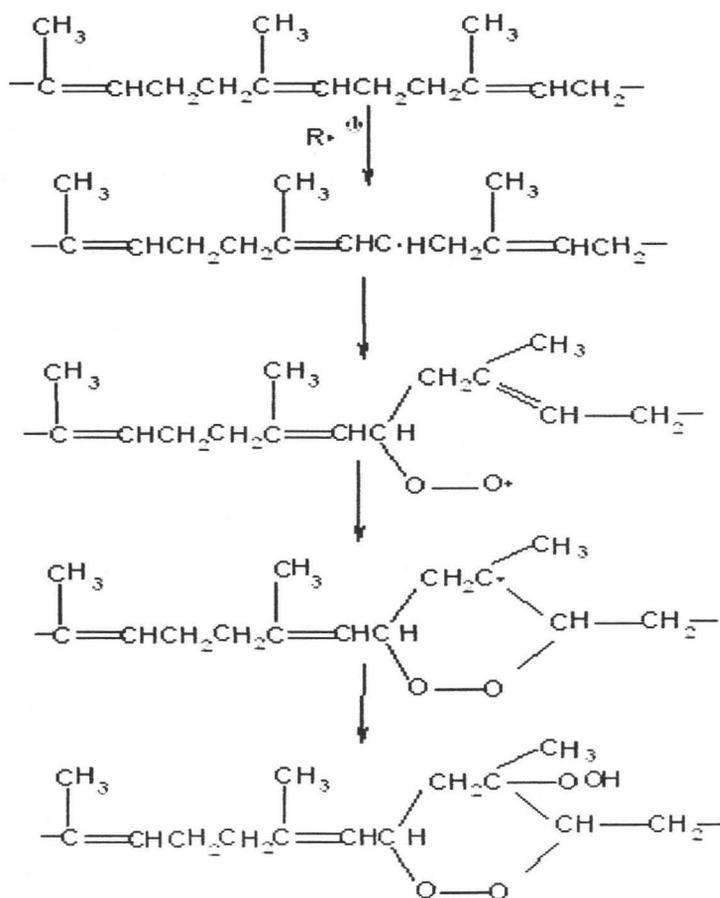
La inhibición de ésta enzima resulta un paso limitante en el control para la vía de síntesis del colesterol, es decir; la inhibición de HMG- CoA reductasa puede conducir a la reducción de una serie de intermediarios tal como el mevalonato, geranyl pirofosfato y el farnesil pirofosfato.

Y por ejemplo la inhibición del farnesil pirofosfato es una fuente para la farnesilización de oncogenes tal como ras^{-p21}. Este proceso si se ve alterado por la inhibición del farnesil pirofosfato se suprime la activación de proteínas oncogénicas, es decir; en la transducción de señales que regulan células que están en actividad de transformación. Así que es posible que la dieta de escualeno pueda inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa en las células de la mucosa llevando a que los compuestos carcinogénicos se vean suprimidos. Así mismo el escualeno posiblemente puede modular la biosíntesis de los ácidos biliares que promueven tumores en colon (ya que estudios preliminares han demostrado que los ácidos biliares promueven fuertemente el cáncer de colon).

1.12.1 ESTABILIDAD QUÍMICA DEL ESCUALENO

El escualeno es susceptible de sufrir oxidación. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de oxidación en el escualeno solo se tiene un supuesto mecanismo de oxidación que a continuación se muestra para el escualeno: El mecanismo de oxidación esta dado por 4 pasos en los cuales se forma un compuesto cíclico. Figura 5

Figura 5. Posible mecanismo de oxidación del escualeno.



1.13 ESCUALENO EN LA INDUSTRIA:

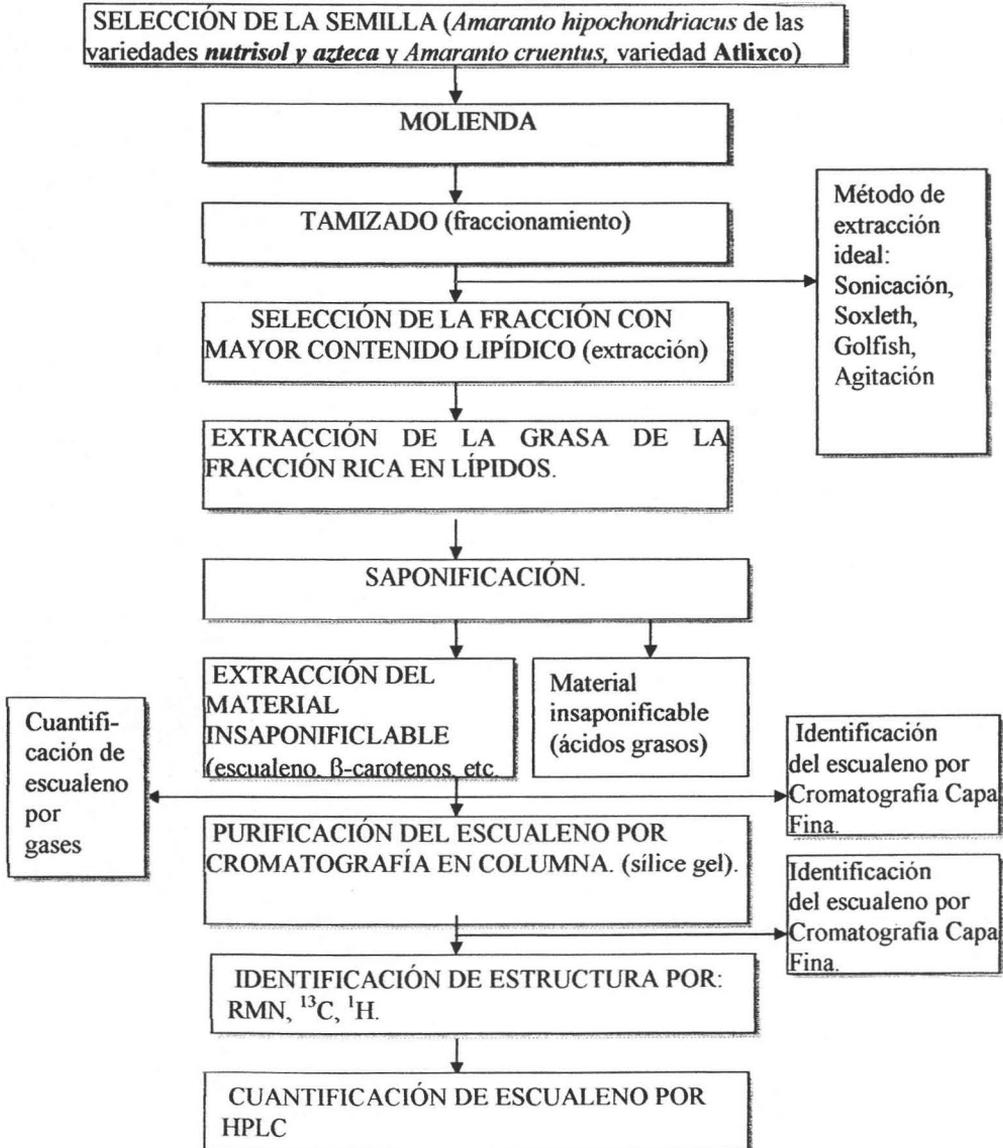
Es un importante ingrediente en los cosméticos para la piel, también tiene el papel de fotoprotector y como característica fisicoquímica tiene la propiedad de ser termoestable por su alto punto de fusión que posee, lo que es empleado para los discos de computadora así como también es usado como reactivo analítico en laboratorios.



Materiales y Metodología

A continuación se presenta el esquema general de la experimentación

ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGIA:



2. Tratamiento de la semilla:

2.1.1 La **selección** de la semilla de amaranto se llevó a cabo a través de criterios basados en las variedades más representativas que se cultivan en México, es decir; en las variedades comerciales que más se distribuyen por la República.

Para este trabajo se utilizaron 2 variedades de semilla de *Amaranto hypochondriacus* (revancha y nutrisol) proporcionadas por la Universidad Autónoma de Chapingo; las cuales fueron mejoradas genéticamente y que actualmente se siembran en la meseta central del país. Adicionalmente se utilizó otra especie de amaranto y está fue la de *A. Cruentus* (var. Atlixco) originaria de Puebla. Tabla 8.

Las semillas de todas estas variedades tienen características físicas muy parecidas, de un color beige de forma lenticular y de aproximadamente 1.00 mm de diámetro.

En la tabla 8 se muestran las variedades de amaranto evaluadas

Género:	Amaranto		
especie	hipochondriacus		cruentus
Variedad:	Revancha	Nutrisol	Atlixco
Raza:	Mercado	Azteca	---
Origen de semilla tratada genéticamente:	Chapingo	Chapingo	Chapingo
origen de la semilla:	Santa Lucía	Desconocido	Puebla
Cosecha:	1999	1998	---
Germinación:	Intermedia	Tardía	---

Tabla 8.- tipificación de las semillas utilizadas.

2.1.2 La **limpieza** de la semilla se hizo por medio de un tamiz de malla no. 20 (28 pulgadas, 0.589 mm) (The Tyler Estándar), esto fue con el fin de eliminar el polvo y materia extraña. Asimismo se eliminaron las semillas de color oscuro, con el fin de homogenizar al máximo la muestra (todo se hizo manualmente).

2.2 Molienda y tamizado de la semilla:

2.2.1 La **molienda** consistió en disminuir la partícula para poder extraer con mayor facilidad la grasa presente en la muestra, en este paso se eliminó el pericarpio el cual no posee grasa significativamente.

Para la molienda se colocaron 100g de semilla y se colocaron en un molino (Flour Grinding Mill, Type SC, Marca Chuo Boeki Goshi Kaisha) haciendo pasar 3 veces a la semilla por el molino.

2.3 El **tamizado**, después de la molienda la semilla se pasó a través de 7 tamices que fueron del número No. 40, 50, 60, 70, 80, 90 y estos se colocaron en un tamizador, se mantuvo la agitación en los tamices durante 30 minutos con el fin de que se distribuyera adecuadamente la semilla a través de los diferentes tamices.

También se hizo una prueba en la que se extrajo la grasa de toda la semilla (completa, sin quitar pericarpio, es decir; no se tamizo la semilla y se introdujo a Soxhlet directamente después de la molienda) para ver si había alguna diferencia significativa entre la que si tenía y la que no (sin pericarpio), esto solo se hizo para la variedad de revancha.

2.4 Técnicas de extracción

Para determinar la cantidad de grasa presente en la semilla de amaranto se evaluaron 4 técnicas de extracción de grasa (Sonicación a 1hr, agitación 24 hr, Soxhlet y Goldfish a 6hr) con el objeto de ver cual es la más eficiente en rendimientos.

2.4.1 Soxhlet (Ref. 941.07 AOAC)

Se pesaron 50 g de semilla molida se envolvieron en un papel delgado y se colocaron en un cartucho de celulosa Whatman (se tapó la superficie con un poco de algodón) dentro de un extractor de grasa Soxhlet a temperatura constante de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, el equipo utilizado fue el mod. Electromantle (Marc Electrothermal), se agregaron 2 cargas y media de solvente orgánico (éter etílico) 150ml aproximadamente y se tuvieron a reflujo durante 6 horas con 30 minutos (aproximadamente), se concentraron los matracos de bola y trasvasó el contenido lipídico a dos viales a peso constante y se cuantificó la grasa extraída por diferencia de pesos.

2.4.2 Agitación 24 horas

Se colocaron 30g de semilla molida con 600 ml de metanol en un matraz erlenmeyer de 1L. El matraz se colocó en una parrilla con agitación magnética por 24 hr. La muestra se mantuvo aislada de la luz y en atmósfera inerte con N_2 . transcurrido el tiempo se filtró el contenido de cada matraz y el filtrado se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min en un centrífuga IEC modelo HT (Bruni, 2000).

2.4.3 Sonicación

Se colocaron 5 g de semilla molida y 100 ml de hexano en un matraz erlenmeyer de 250 mL aislado de la luz. Se burbujeo N_2 para mantener una atmósfera inerte. El matraz fue colocado en un sonicador mod. 4.6, (Cavitator Mettler electronics) a una frecuencia de 50/60 Hz y 85 Watts durante una hora. Trancurrido el tiempo se filtró el contenido de cada muestra y el filtrado se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min en una centrífuga IEC modelo HT (Bruni, 2001).

2.4.4 Goldfish

Para esta parte de la experimentación se utilizó un equipo de extracción de grasa Goldfish (LABCONCO). Se introdujeron muestras de 5 g se envolvieron en un papel delgado y se colocaron en un cartucho de celulosa Whatman (se tapó la superficie con un poco de algodón). El solvente seleccionado fue éter etílico (P.e.= 35° C) ya que este solvente disuelve la mayoría de los lípidos, se colocaron 50 mL aprox. Se mantuvieron las muestras durante 6 horas con 30 min aprox.

El extracto obtenido de cada método de extracción se concentró a sequedad evaporando los solventes utilizados para cada técnica en un rotavapor mod. R-205 (Büchi) con baño B-490 a 40-60°C. el aceite obtenido se transfirió a matraces a peso constante y se pesó cada uno en una balanza analítica (Ohaus) con una sensibilidad de 0.0001 g; para evaluar el porcentaje de grasa obtenido por cada técnica.

Cálculos

Se calculó el porcentaje de grasa extraída en la muestra:

$$\%grasa = [VG - v / H]100$$

Donde:

VG = masa (g) vial con grasa

V = Masa (g) vial

H= Masa (g) semilla molida

Nota: para las tres técnicas

2.5 Extracción de lípidos

Para poder identificar en donde se encontraba el mayor contenido lipídico en la semilla molida, a cada fracción obtenida se le hizo una determinación de cantidad de grasa utilizando un equipo de extracción Goldfish, técnica descrita en el punto 2.4.4.

Extracción de la grasa a partir de las fracciones ricas en lípidos.

Determinadas las fracciones que obtuvieron mayor contenido lipídico, se hizo la extracción de la grasa pero ahora con un equipo Soxhlet a temperatura constante, el equipo utilizado fue el mod. Electromante (Marc Electrothermal). Técnica descrita en el punto 2.4.1.

2.6 SAPONIFICACIÓN:

Para la saponificación se montó un equipo de reflujo, se colocaron muestras de 2g de lípidos por duplicado en matraces y se adicionaron 25 ml de solución alcohólica de KOH (0.5 M en etanol al 95%). Se llevó a ebullición suave y mantuvo el calentamiento durante 25 minutos aproximadamente.

Para la titulación: Se adicionó 1 ml de solución de fenolftaleína. Se tituló en caliente el exceso de álcali con ácido clorhídrico valorado 0.5 N. Se preparó un blanco de reactivos y se calculó el índice de saponificación (mg de KOH necesarios para saponificar los ácidos grasos totales de un gramo de muestra)

2.6.1 Para el **material insaponificable**, se transfirió el líquido de la saponificación a un embudo de separación, usando 50 ml de agua para lavar el matraz.

Se extrajo la solución con 50 ml de éter etílico (3 veces), se juntaron los extractos etéreos y se lavaron 2 veces en un embudo de separación con 20 ml de agua. Inmediatamente después se deshidrató pasándolo por un filtro de papel (Whatman, no. 4, 125 mm día) con sulfato de sodio anhidro.

Se recuperó el extracto etéreo en un matraz y se evaporó el disolvente en un rotavapor hasta sequedad. Después el contenido se trasvaso a viales a peso constante y se concentraron en su totalidad aplicando nitrógeno. Se cuantificó el material insaponificable por diferencia de pesos.

2.7 Cuantificación de escualeno por gases

La fracción insaponificable se diluyó a 1 mg/mL aproximadamente y posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de gases mod. G1530A (Agilent 6890) con torreta de inyección automática de 100 viales mod. 18593B. La detección y cuantificación se realizó en un detector de ionización de flama. Se utilizó una columna Hewlett Packard HP-%MS Cross-Linked 5% Fenil metil polisiloxano (19091S-443) con un diámetro interno de 0.25 μm (tabla 9). Para la identificación y cuantificación de escualeno se inyectó una curva patrón con los estándares de los compuestos: escualeno (Sigma S-1270). El sistema de análisis de datos para la cuantificación en cromatografía de gases se realizó con la ayuda del software ChemStation version AA.05.02 673 MX95245561.

Tabla 9.- condiciones de separación e identificación del escualeno por cromatografía de gases.

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

2.8 FRACCIONACIÓN DEL MATERIAL INSAPONIFICABLE.

Para la purificación del escualeno se hizo la fraccionación (es decir; se separó el escualeno del resto de los hidrocarburos contenidos en el material insaponificable de acuerdo a su polaridad). Para esto se utilizó una columna de vidrio de las siguientes características: 30 cm de largo (3 cm de punta), 1.7 cm de diámetro interno. También se utilizó: Gel de sílice 60, tamaño de la partícula 0.063 – 0.200 mm (70-230, mesh ASTM) MERK (25 g)

Se colectaron fracciones de 8.5 ml aproximadamente y se fueron tomando cromatoplasmas de capa fina (CCF) para ir monitoreando en cuales fracciones fue coeluyendo el escualeno. Por ultimo se juntaron todas las fracciones donde eluyo el triterpeno; se evaporaron en un rota vapor mod. V-800. (Bûchi R-205).

Se trasvasaron a un vial a peso constante y se cuantificó el peso de escualeno por diferencia de peso (todas las muestras obtenidas de escualeno se guardaban bajo nitrógeno y refrigeración para asegurar que no sufrieran oxidación).

Para la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) se utilizaron placas para cromatografía en capa fina (Al de sílicegel 60 F₂₅₄, MERCK). La fase móvil fue: éter etílico- éter de petróleo (1:99 v/v) y para la referencia se adquirió escualeno, SIGMA 98 % de pureza. Dichas placas fueron reveladas con sulfato ácido cérico (300g de hielo, 22.2 ml H₂SO₄, 12g sulfato cérico).

2.9 Determinación por HPLC

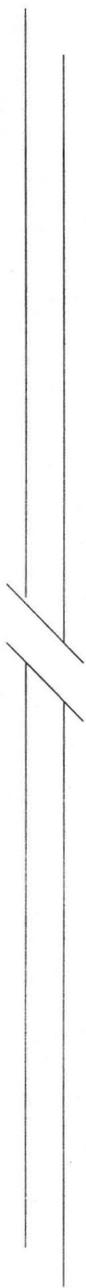
Para la Cuantificación del escualeno se utilizó un equipo **HPLC** mod. 110B (Beckman). Columna HPLC: C-18 nucleosil 5 μ 100 °A, 100 x 4.0 mm (Metachem technologies).

Después de probar varias mezclas con diferentes solventes y polaridades se encontró que la fase móvil ideal fue isocrática MeoH: Isopropanol: ác. Acético (91.95:8:0.5, V/ V) con un volumen de inyección de 20 μ l, flujo 1 ml/ min y a una velocidad de la carta de 0.5 seg.

Se determinó la cantidad existente de escualeno por medio de una curva patrón, la cual fue elaborada con las concentraciones de acuerdo a las áreas obtenidas de las muestras inyectadas de las diferentes variedades de amaranto.

2.10 IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL ESCUALENO POR MEDIO DE RMN, ^{13}C , ^1H .

El extracto de escualeno que se obtuvo de la cromatografía en columna fue disuelto en chloroform-D1 (CCl_3D), MERCK. Y se llevo a analizar a 75.5 MHz para el caso de ^{13}C y 299.7 MHz para ^1H



Resultados y Discusión

3.3 INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN EL RENDIMIENTO DE LA GRASA. (g /100g)

Los resultados de la tabla 11 muestran los rendimientos obtenidos a partir de la variedad revancha utilizando diferentes técnicas de extracción.

Método de extracción	de	grasa/100g de semilla entera
agitación 24 hr. MeOH		2.58
sonicación a 1 hr. MeOH		3.2
sonicación a 1 hr Hexano		6.64
Goldfish 6 hr éter etílico		5.91
Soxhlet (6 hr.) éter etílico		6.72

Tabla 11.- comparación entre los diferentes métodos de extracción al extraer la grasa de la semilla.

Los resultados muestran que los equipos de extracción de grasa Soxhlet a 6 hr y sonicación a 1hr son las más eficientes en la extracción de los lípidos.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES RICAS EN MATERIAL LIPÍDICO

La determinación del contenido de lípidos para cada fracción de la variedad de Atlixco (cruentus), se hizo mediante la técnica de Goldfish (se utilizó esta técnica debido a la cantidad de muestra, 5g) durante 6 horas con 30 minutos, aprox. en éter etílico. Los resultados arrojados fueron los que se muestran en la **tabla 12**.

No. De tamices	% de grasa
40	1
50	2.4
60	4.9
70	5.5
80	6.4
90	8.5

Fracciones para extraer escualeno.

Tabla 12 - cantidad de material lipídico contenidos en las diferentes fracciones.

El contenido de material lipídico presente en cada fracción se incrementa conforme disminuye el tamaño de la partícula (tabla 12), es decir; se observa que el pericarpio del grano tiene una menor cantidad de grasa que se representa principalmente en las fracciones 40 y 50 cada una (1 y 2.4 %, respectivamente). De acuerdo a la referencia bibliográfica (E.A. Tosi, et al; 2001) entre el 9 y 16% de la semilla corresponde a la fibra, por lo que no es significativo el valor de la grasa presente en dichas fracciones. Así que solo se utilizaron las fracciones 60 – 90 para extraer el triterpeno. La molienda tiene como objetivo principalmente el disminuir la partícula del endospermo (almidón) lo que ocasiona que los lípidos queden más expuestos al solvente, por lo que haciendo pasar tres veces la semillas por el molino basto para extraer en su totalidad a los lípidos.

3.5 EXTRACCIÓN DE LA GRASA DE LAS FRACCIONES RICAS EN LÍPIDOS MEDIANTE UN EQUIPO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

3.5.1 GRASA OBTENIDA DE LAS DIFERENTES VARIEDADES

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos de los contenidos de grasa de las variedades de amaranto analizadas. Las variedades de amaranto *hipochondriacus* (nutrisol y revancha) presentan 7.64 y 6.72 g de grasa en 100g de muestra, respectivamente; por lo que entre las variedades de amaranto *hipochondriacus* no hay diferencia significativa

En cuanto a las muestras de cruentus de variedad *atlixco* se extrajeron 9.84 g de grasa en 100 g de muestra, estadísticamente la diferencia es significativa a las de *hipochondriacus*.

De acuerdo a Budin, (1996), Escudero, (2004) Han-Ping (2002), el género de amaranto reporta entre sus variedades un rango típico de lípidos que va del 4.8 al 9.53 % aunque algunas especies (*A. spinosus* y *A. tenuifolius*) llegan a reportar hasta 17 y 19.3 % de lípidos, respectivamente.

Las grandes diferencias en cuanto a la cantidad de lípidos que hay en las distintas variedades se debe en mucho a los diferentes tipos de suelos, es decir; la composición de la semilla depende de la calidad de la tierra. Algunos terrenos llegan a ser muy áridos o con estrés hídrico lo que llega a provocar que la planta acumule cantidades altas de oxalatos y nitratos <<principalmente en las hojas>>, pudiendo desequilibrar la química de la planta). Algunos componentes llegan a estar en mayor o menor proporción que en otras de la misma especie dependiendo de las condiciones climáticas en la que se desarrolle la planta. Sin embargo las especies nacionales muestran una cantidad de grasa aceptable o dentro del intervalo promedio reportado para mayoría de las semillas (Becerra, 2000), (Berganza, 2003).

3.5.2 INFLUENCIA DE LA VARIEDAD EN EL PORCENTAJE DE GRASA

El bajo rendimiento (6.31 g de grasa en 100 g de semilla entera) obtenido de la extracción de *hipochondriacus* variedad revancha se debe probablemente a que se introdujo con todo el pericarpio (fibra), el cual como ya se ha mencionado anteriormente este no contiene cantidades significativas de lípidos por lo que baja el rendimiento en la extracción a diferencia de la extracción sin el pericarpio, ya que los lípidos se encuentran en el tejido embrionario de la semilla (7.64 g de grasa en 100 g de harina) (Han-Ping, 2002), por lo que se recomienda extraer la grasa sin el pericarpio para poder obtener una mayor eficiencia en la extracción, es decir; se concentre la muestra (tabla 13).

Tabla 13.- extracción de la grasa en las diferentes variedades nacionales.

Genero	especie	variedad	g grasa / 100 g harina (semilla) *	C.V
amaranto	<i>hipochondriacus</i>	revancha	7.64	2.3
		revancha (semilla entera)	6.31	3.5
		nutrisol	6.72	2.6
	<i>cruentus</i>	Atlixco	9.84	1.9

* C/u de las muestras es un promedio de 6 determinaciones.

3.6 OBTENCIÓN DEL MATERIAL INSAPONIFICABLE

Para obtener la fracción insaponificable, la grasa se sometió a un procedimiento de saponificación para separar los triglicéridos.

La variedad de *hipochondriacus*, *nutrisol* es la que presenta mayor cantidad de material insaponificable con un 24.17% presente en la grasa de la semilla, mientras que *hipochondriacus* *revancha* en promedio tuvo 19% y *cruentus* solo el 16 % (tabla 14). Aparentemente las variedades de *hipochondriacus* tienen una mayor concentración en compuestos como puede ser el mismo escualeno, vitamina e, tocoferoles. Posiblemente esto es debido a la bioquímica de la planta, a las condiciones agroclimáticas en la que se desarrollo que pudieron haber favorecido la cantidad de hidrocarburos en la grasa. (Becerra, 2000). (Berganza, 2003).

INFLUENCIA DE LA VARIEDAD EN EL PORCENTAJE DE MATERIAL INSAPONIFICABLE

TABLA 14.- extracciones de material insaponificable de las variedades de amaranto

Genero	especie	variedad	% de material insaponificable obtenido *	C.V
amaranto	<i>Hipochondriacus</i>	Revancha	19.13	3.2
		Nutrisol	24.17	2.8
	<i>Cruentus</i>	Atlixco	16.98	3.3

* El valor de c/u de las muestras representa el promedio de seis determinaciones.

El material insaponificable se mantuvo siempre bajo ambiente de nitrógeno y de refrigeración mientras se utilizaba para el fraccionamiento para proteger principalmente al escualeno de una posible oxidación.

3.7 ESCUALENO TOTAL EN MATERIAL INSAPONIFICABLE, CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para conocer la cantidad de escualeno total presente en el material insaponificable se evaluó por cromatografía de gases la muestra, se encontró que la mayor cantidad de escualeno esta presente en la variedad de nutrisol (42 g de escualeno en 100 g de material insaponificable). Asimismo la variedad revancha tuvo 38 g de escualeno en 100 g de material insaponificable, mientras que la variedad Atlixco de cruentus solo tuvo 28 g de escualeno en 100 g de material insaponificable (ver figuras de las cromatogramas 6-8).

Resultan ser buenas fuentes de escualeno comparadas con otras, por ejemplo el aceite de olivo, tiene 0.35 g de escualeno en 100 g del total de la grasa, mientras que las variedades nacionales presentan una cantidad de 5.5 g/ 100 g de grasa y 5.6 g/ 100 g de grasa en nutrisol y revancha, respectivamente; mientras que la variedad Atlixco (cruentus) 3.9 g /100 del total de la grasa. Budin, (1996), Han-Ping (2002), Escudero (2004), mencionan un rango en promedio de escualeno de 3.8 a 9.53 en 100 g de grasa en diferentes variedades del mundo.



Figura 6.- Cromatograma (por CG) variedad nutrisol, escualeno con tiempo de retención a 4.680 min.

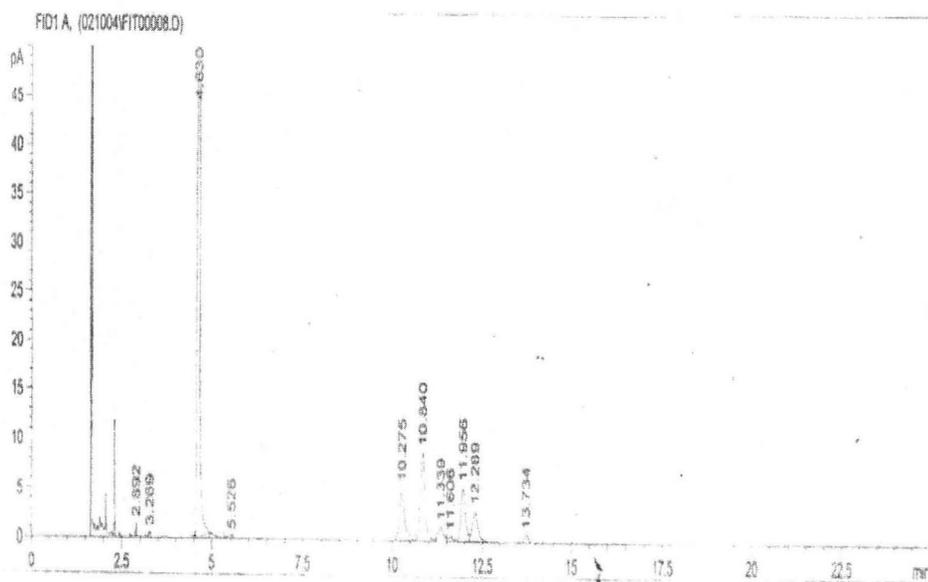


Figura 7.- Cromatograma (por CG) variedad Atlixco *cruentus*, escualeno con tiempo de retención a 4.630 min.

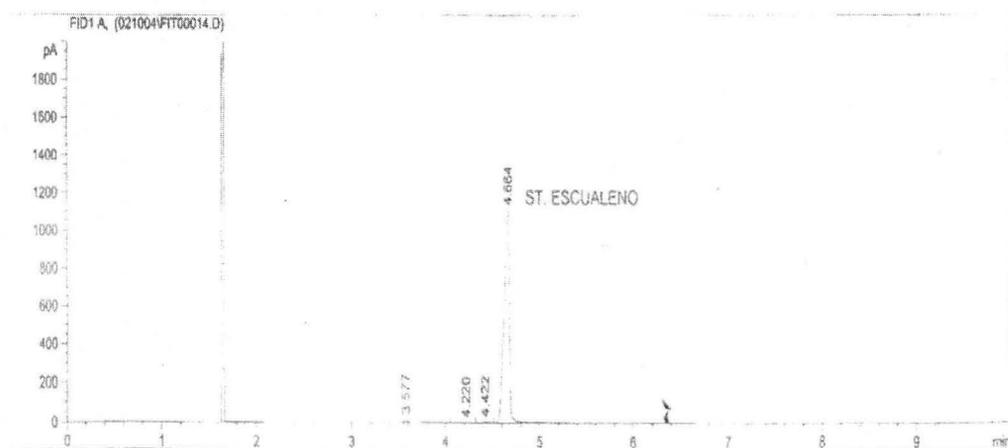


Figura 8.- Cromatograma (por CG) del estándar de escualeno (SIGMA, pureza 98%), con un tiempo de retención de 4.664 min.

Las figuras 6, y 7 corresponden a los cromatogramas de las fracciones obtenidas de las diferentes columnas de purificación de las variedades nutrisol y cruentus, respectivamente. Se detectó en todas ellas escualeno, el cual fue identificado por el mismo tiempo de retención del estándar (figura 8) y por su espectro de masas. Aunque las variedades de nutrisol y revancha presentaron varios compuestos que se hace suponer que son esteroides.

3.8 FRACCIONACIÓN DEL MATERIAL INSAPONIFICABLE

Para separar el triterpeno del resto del material insaponificable se manejaron diferentes condiciones de trabajo. Entre las que se encuentran distintas longitudes de columnas, diámetro interno de la columna se fue modificando y por último se probaron diferentes tipos y cantidades de sílice así como de mezcla de solventes. De estas condiciones se desprendieron las que finalmente se trabajo y son:

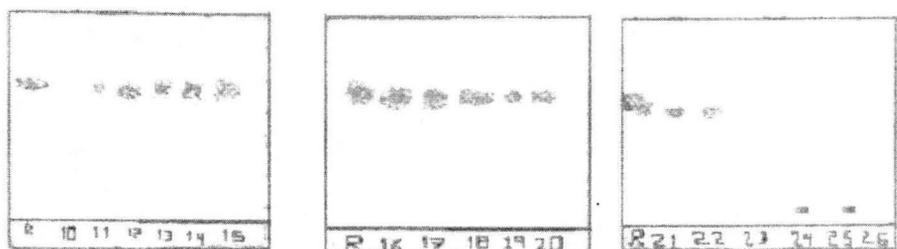
- Columna largo: 30cm (punta 3cm).
- Diámetro 1.7cm
- Sílice gel de malla 70 – 230 (25 gramos)
- Eluyente; éter petróleo: éter etílico: (99:1 v/v)
- Cantidad de material insaponificable 274 mg (en promedio de todas las columnas distribuidos y homogenizados en celita (punto de aplicación) los cuales fueron vertidos en la columna de separación antes descrita.

Las fracciones colectadas fueron de aproximadamente de 8.5 ml. El escualeno estuvo presente desde la fracción 8 hasta la 20 (en promedio), cada una de las fracciones o alícuotas identificadas con escualeno fueron comparadas con un estándar (escualeno, 98% SIGMA).

Se logró obtener fracciones ricas de escualeno (100 % de pureza) sin embargo los rendimientos no fueron los deseados en las variedades de nutrisol y revancha de la especie *hipochondriacus*.

El escualeno es un triterpeno insaturado de cadena larga con carácter no polar, razón por el cual eluye en primera instancia antes que todos los compuestos polares (por ejemplo fitoesteroles). Las cromatoplasmas de la variedad de Atlixco (*cruentus*) muestran la separación total del escualeno y se confirma su pureza en el cromatograma (figura 12). De las fracciones 11 hasta la 22 se hace presente dicho hidrocarburo, a partir de la fracción 24 co-eluye otro compuesto de polaridad cercana (figura 9).

Figura 9.- Cromatoplasma del escualeno obtenido después de la fraccionación del material insaponificable de la especie *cruentus* variedad Atlixco (R= estándar, fracciones 10-26).



El escualeno que se recuperó en la variedad *cruentus* es más alto en rendimiento (80%) comparado con las variedades nutrisol y revancha de la especie *hipochondriacus*, los cuales fueron erráticos, el escualeno eluyó en las fracciones 10 hasta las 26 pero a partir de la fracción 20 coeluye otro compuesto de polaridad parecida. El bajo rendimiento de estas dos variedades (nutrisol y revancha) probablemente se debió a que no se tenía estandarizado las metodologías por lo que se vio afectado en la aparición de otro compuesto de polaridad parecida. (Figura 11).

El R_f del escualeno es 0.82 (R_f experimental = 0.81), mientras que para el R_f teórico del compuesto más cercano es de 0.74 (referido a la polaridad) que de acuerdo a la referencia Sun, et al; (1997) se trata o hace suponer que son esteroides (R_f experimental = 0.64).

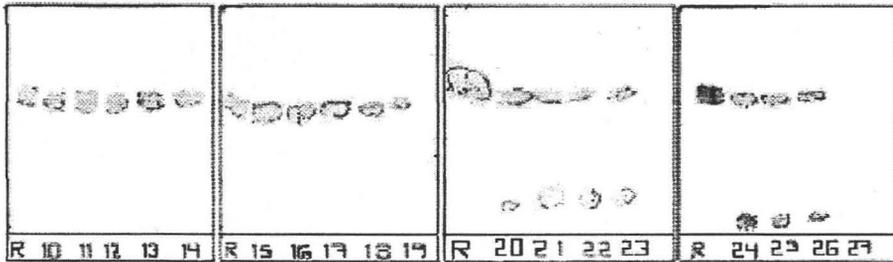
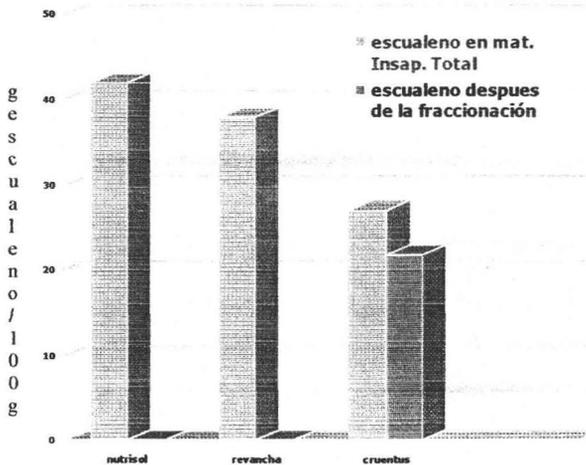


Figura 10.- Cromatopla de las fracciones que eluyeron en el sistema de separación de la variedad Atlixco especie cruentus (R = estándar, fracciones 10-26).

Figura 11.- de escualeno en las diferentes variedades de amaranto al fraccionar en columna.



3.9 Identificación de estructura por: RMN, ^{13}C , ^1H .

La estructura del Escualeno purificado fue verificada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) por medio de ^1H y ^{13}C y los datos de los espectros mostrados son los siguientes:

Para ^1H de la RMN (300 MHz, CDCl_3 ; en los apéndices F y G (estándar) que muestran grupos de metilos a δ 1.60 (s, 18 H) y δ 1.68 (s,6H), grupos metilenos a δ 1.99 – 2.03 (m, 20H) y señales internas de vinilos a δ 5.06 – 5.15 (m,6H).

Los resultados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) Apéndices F y G (estándar) muestran 8 metil carbonos a 16.0 – 25.7, 10 carbonos metilenos a δ 26.7 – 39.8 y 12 dobles enlaces de carbonos a δ 124.3 – 135.1

Los espectros de RMN (apéndices D, E) de las variedades nutrisol, revancha, cruentus; fueron iguales de acuerdo a los publicados en las referencias citadas (Han- P, 2002) así como del estándar comparado. Aquí solo se muestran los de nutrisol, debido a que no hay diferencias entre ellos.

3.10 Identificación del escualeno por medio de HPLC

Los resultados en el HPLC confirman la pureza de los extractos de escualeno obtenidos del sistema de elusión de compuestos por polaridad (columna), ya que solo se observa un solo pico bien definido a un tiempo de retención en promedio de 6.36 minutos, el tiempo de retención fue el mismo que con el estándar (escualeno, SIGMA). En las figuras 12 y 13 se muestran los registros obtenidos para el escualeno.

Por otro lado se inyectaron las fracciones 20 – 26 donde el escualeno aparece con la presencia del otro compuesto, el resultado del cromatograma (figura 14) muestra la presencia de dos compuestos a diferentes tiempos de retención, el escualeno aparece a 5.73 minutos mientras que el compuesto secundario aparece a 1.54 min.

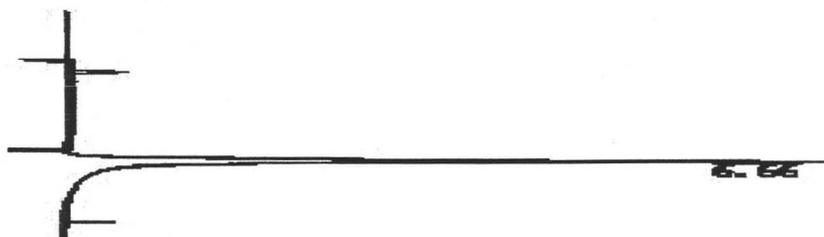


Figura 12 Cromatograma con la depuración total del escualeno, donde aparece totalmente puro y con un tiempo de retención de 6.66 min.



Figura 13 Cromatograma con la depuración del escualeno, tiempo de retención para el escualeno 5.85 (Columna mejorada)

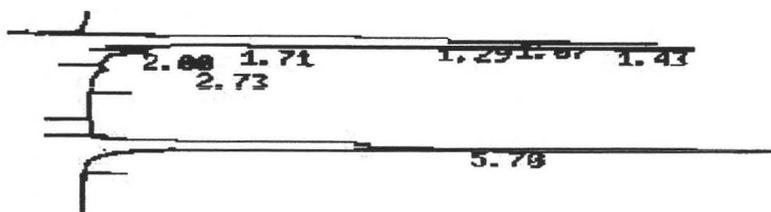


Figura 14 Cromatograma con presencia de otro compuesto, variedades revancha y nutrisol (escualeno a un tiempo de retención de 5.70 min.)

3.11 TABLA GENERAL: RESULTADOS EN LAS DETERMINACIONES DE ESCUALENO EN LAS VARIEDADES DE AMARANTO

Variedad	Hipocondriacus		cruentus	cruentus
	Nutrisol	Revancha	Atlixco	Referencia ^{a,b}
% escualeno en grasa $\left(\frac{\text{g de escualeno}}{100 \text{ g grasa}} \right)$	5.5	5.6	3.9	3.6 - 9.53
% escualeno en material insaponificable $\left(\frac{\text{g escualeno}}{100 \text{ g mat. Insap}} \right)$	42	38	28	37 - 43

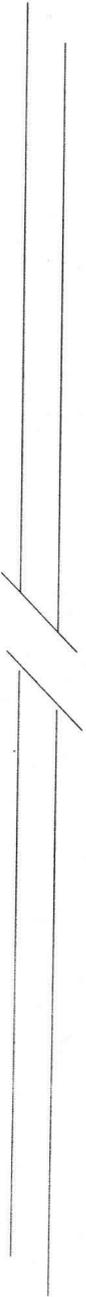
Tabla 15.- Comparación de las diferentes extracciones de escualeno entre las variedades de las especies de hipocondriacus y cruentus.

^a Han - Ping He, et al, 2002

^b Escudero, et al; 2004

Los datos reportados en la bibliografía Budín (1996), Han-Ping (2002) acerca de la cantidad de escualeno presente en semillas mexicanas, no dan referencia a las variedades ni del lugar originario de la semilla, los resultados obtenidos muestran semejanzas con las referencias (aunque no se puedan comparar del todo), cruentus presentó mayor cantidad de grasa en la semilla aunque no se logró purificar en su totalidad pero si se obtuvo en alta pureza (tabla 15).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



Conclusiones

CONCLUSIONES

- ◇ Se encontró que las variedades de nutrisol y revancha tienen 5.5 y 5.6 g de escualeno en 100 g de aceite, respectivamente, por lo que no hay diferencia significativa entre ellas; en contraste con la variedad Atlixco presentó 3.9 g de escualeno en 100 g de aceite por lo que sí hay diferencia significativa entre las especies de *hipochondriacus* y *cruentus*.
- ◇ Al purificar el escualeno de la variedad de *cruentus* en la columna cromatográfica, tiene un 80 % de recuperación del total del escualeno presente en el material insaponificable. Se obtuvieron 22 g de escualeno partiendo de 28 g de escualeno presentes en el material insaponificable. En cuanto a las variedades nutrisol y revancha no hubo altos rendimientos, por lo que se seguirá mejorando y se estandarizará la técnica de cromatografía en columna para obtener mayores rendimientos en las variedades.
- ◇ El planteamiento analítico para cuantificar, elucidar la estructura del escualeno a partir de la semilla de amaranto, resultaron ser buenas técnicas para obtener resultados comparables con las referencias aunque no se hayan logrado buenos rendimientos.
- ◇ La técnica de cromatografía en columna de vidrio, resulta ser excelente método para la purificación de compuestos determinados, ya que se obtuvo escualeno con una pureza del 100% pero el rendimiento fue bajo. Al purificar este triterpeno que se encontraba en el material insaponificable en las distintas variedades de las semillas hubo rendimientos bajos.
- ◇ Existe diferencia significativa entre las variedades de *hipochondriacus* con respecto a la variedad de *cruentus* en cuanto a la cantidad presente de grasa en la semilla (revancha 7.64 g en 100 g de semilla y Atlixco 9.84 g de aceite en 100 g de semilla), pero no existe diferencia significativa entre las variedades de la misma especie (revancha y nutrisol) 7.64 y 6.72 g de grasa en 100 gramos de semilla, respectivamente.
- ◇ El escalamiento a planta piloto, la extracción del escualeno bajo la técnica de purificación resultaría en un alto costo, ya que la obtención de 100 ml estaría cerca de 1100 pesos aprox. mientras que los mismos 100 ml de escualeno a nivel comercial andan en los 500 pesos. Aunque el escualeno del que se obtendría sería totalmente puro.

BIBLIOGRAFÍA:

- ♣ Arellano, J.L., Espitia, R.E., Estrada, A.V., (1999). Tecnología de producción agropecuaria para el Estado de México., 20:28-34.
- ♣ Becerra, R., (2000), El amaranto_ Biodiversitas (boletín bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad). 5 (30), 1-6
- ♣ Becker, R. y Saunders, M.R., (1984). Amaranthus. A potential food and feed resource., *Advances in cereal science and technology*, (VI).
- ♣ Becker, R. y Wheeler, E.L., (1981). A compositional study of amaranth grain., *Journal Food Science*, 46, 1175-1180.
- ♣ Berganza, E.B., Moran W.A., Rodriguez, M.G., Coto,M.N., Santamaria, M., y Bressani, R., (2003) Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth., *Plant Foods for Human Nutrition* 58: 1-6.
- ♣ Budin, J.T., William, M.B., y Putnam, D.H., (1996). Some compositional properties of seeds and oils of eight amaranthus species., *Journal American Oil Chemist Society*, 73: 475-481.
- ♣ Casillas, G.,(1977). Anteproyecto técnico económico de una planta industrializadora de semilla de alegría., Tesis. Fac. Química.
- ♣ Chan, P., Tomlinson, B., Lee, C.B. y Lee, Y.S. (1996). Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia., *Journal Clinical. Pharmacology*, 36:422-427.
- ♣ Chinthalapally, V.R., Harold, L.N., y Bandaru, S.R. (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer., 19:287-290.
- ♣ Escudero, N.L., Arellano, M.L., Luco, J.M., Giménez, M.S., y Mucciarelli, S.I., (2004). Comparison of the chemical composition and nutritional value of amaranthus cruentus flour and its protein concentrate., *Plant Food for Human Nutrition*., 59: 15-21
- ♣ Fliesler, S.J. y Keller, R.K. (1997). isoprenoid metabolism in the vertebrate retina., *International Journal Biochemical Cell Biology*, 29: 877-894.

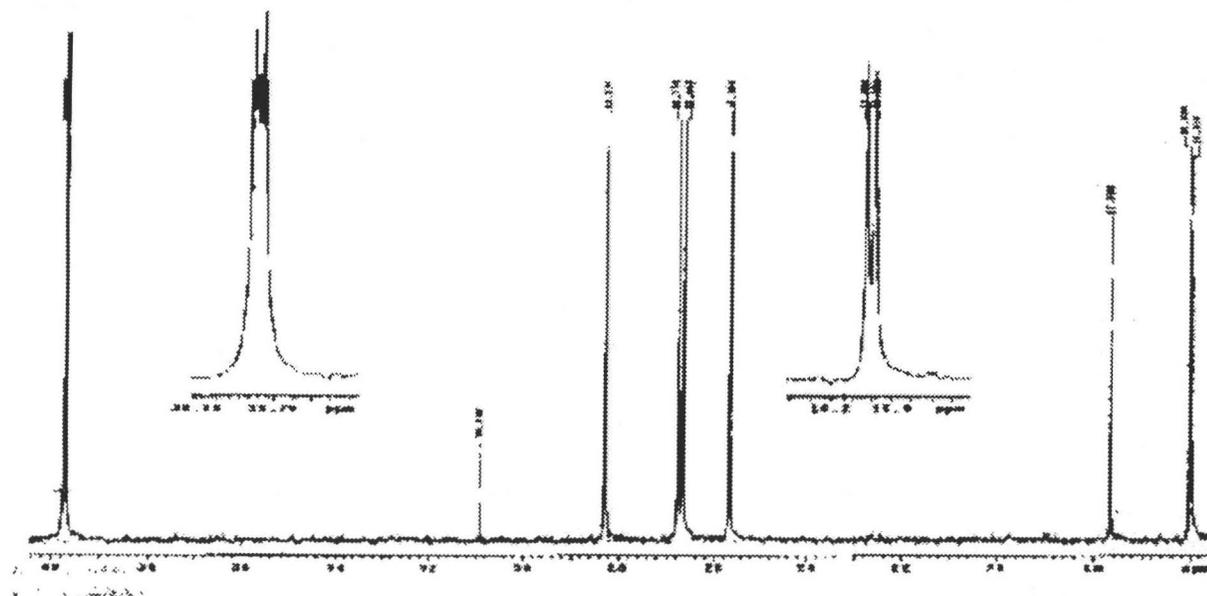
- ♣ Franceschi, S., Favero, A., Decarli, A., et al. (1996). Intake of macronutrients and risk of breast cancer., *Lancet*, 347:1351-1356.
- ♣ Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, A., y Albi, M.A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved., *Journal Agricultural. Food Chemical*, 47:121-127.
- ♣ Gylling, H., y Miettinen, T.A., (1994). Postabsorptive metabolism of dietary squalene., *Atherosclerosis*. 106:169-78.
- ♣ Han-Ping He, Yizhonh., et al., (2002). Extracción and purification of squalene from amaranthus Grain., *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 50:2, 368-372
- ♣ Hess, Dieter., *Fisiología vegetal (1980) fundamentos moleculares y bioquímico-fisiológicos del metabolismo y desarrollo.*, Ediciones Omega, S. A., Barcelona, 61-70.
- ♣ Sun, H., Wiesenborn, D., Tostenson, K., Gillespie, J., and Rayas-duarte, P. (1997). Fractionation Of squalene from amaranth seed oil, *Journal American Oil Chemist Society*, 74 (4): 413-418
- ♣ Jahaniaval, F., Kakuda, y Marcone, M.F. (2000). Fatty acid triacylglycerol compositions of seed oils of five amaranthus accessions and their comparison to other oils., *Journal American Oil Chemist Society*, 77: 847-852
- ♣ Jones, P.J., MacDougall, D.E., Ñaños, F., y Vanstone, C.A. (1997). Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans., *Cancer Journal Physiology Pharmacology*, 75: 217-27.
- ♣ Kamimura, H., Koga, N., Oguri, K., y Yoshimura, H. (1992). Enhanced elimination of theophylline, phenobarbital and strychnine from the bodies of rats and mice by squalane treatment., *Journal Pharmacobiodyn.* 15: 215-21.
- ♣ Nelly, G.S., (1999), Squalene and its potential clinical uses, *Alternative. Medical Review.* 4: 29-36.

- ♣ Kiritsakis, A., y Markakis. (1987), P. Olive oil a review., Metanálisis sobre el aceite de oliva., *Advanced. Food Research.* 31: 453- 482.
- ♣ Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagaoka, S., Takahashi, M., y Mukai, K. (1995), Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol., *Biochemist. Biopsychology Acta.*, 6: 1256-1262 .
- ♣ Landa, M.C., Frago, N., y Tres, A. (1994), Diet and the risk of breast cancer in Spain., *Europa. Journal Cancer Prev.* (3: 313-20.
- ♣ La Vecchia, C., y Negri, E., (1997), Fats in seasoning and the relationship to pancreatic cancer., *Europa. Journal Cancer Prev.* 6: 370-3.
- ♣ López, M., Bressani, R., (1987), la energía metabolizable verdadera de la semilla de amaranto (*Amaranthus sp.*) en aves de corral., *El amaranto y su potencial.*, Boletín no. 3 *Arch. Lat. De nutr.* , INCAP, Guatemala.
- ♣ Lyon, C.K., Becker, R., (1987), Extraction and refining of oil from amaranth seed., *Journal American Oil Chemistry Society*, 64: 2 .
- ♣ Martín-Moreno, J.M., Willett, W.C., Gorgojo, L., et al., (1994), Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk., *International Journal Cancer*, 58:774-80.
- ♣ Miettinen, T.A., y Vanhanen, H., (1994), Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding., *American Journal Clinical Nutrition.*, 59: 356-63.
- ♣ Newmark, H.L., (1999), Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis., *Ann. N Y. Acad. Sci.* 889: 193-203.

- ♣ Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalter, B., y Bartsch, H., (2000), Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene., *Food Chemical Toxicology*. 38: 647-59.
- ♣ Rao, C.V., Newmark, H.L., y Reddy, B.S., (1998), Chemopreventive effect of squalene on colon cancer., *Carcinogenesis*, 19:287-90.
- ♣ Richter, E., Fichtl, B., y Schafer, S.G., (1982), Effects of dietary paraffin, squalene and sucrose polyester on residue disposition and elimination of hexachlorobenzene in rats., *Chemical Biology Interaction*. 40: 335-44.
- ♣ Richter, E., y Schafer, S.G., (1982), Effect of squalene on hexachlorobenzene (HCB) concentrations in tissues of mice., *Journal Environment. Science. Health B*, 17:195-203.
- ♣ Smith, T.J., (2000), Squalene potential chemopreventive agent. *Expert. Opin. Investig. Drugs*: 1841-1848.
- ♣ Smith, T.J., Yang, G.Y., Seril, D.N., Liao, J., y Kim, S., (1998); Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene., *Carcinogenesis*, 19: 703-6.

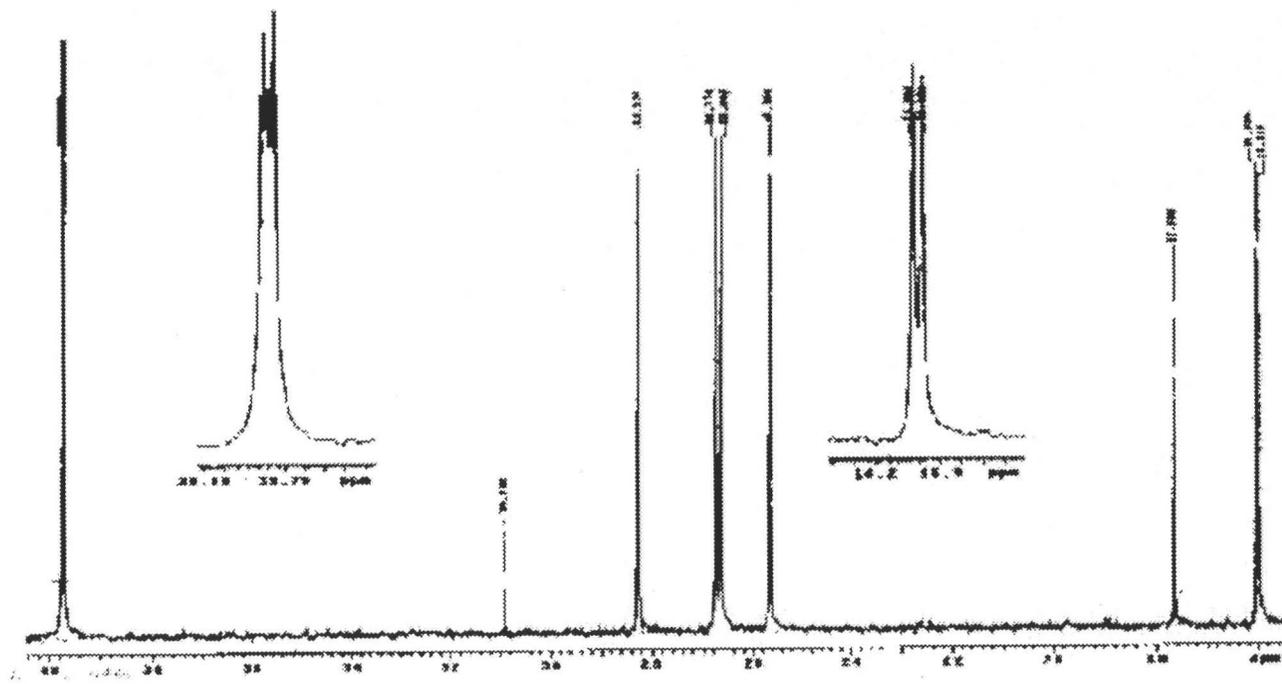
- ♣ (1999) Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NKK)-induced lung tumorigenesis and DNA oxidation by dietary squalene., Proceedings of the American Association for Cancer Research 40, 262. Tipo de ref.: Periódico (publicación íntegra).
- ♣ Strandberg, T.E., Tilvis, R.S., y Miettinen, T.A., (1990), Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment., *Journal Lipid Research.*, 31: 1637-43.
- ♣ Trichopoulou, A., Katsouyanni, K., Stuver, S., et al., (1995), Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece., *Journal National. Cancer Inst.* 87: 110-6.
- ♣ Van Duuren, B.L., y Goldschmidt, B.M., (1976), Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis., *Journal National. Cancer Inst.* 56: 1237-42.
- ♣ Word, D., Irving, et al., (1981), Morphological studies on *amaranthus cruentus*., *Journal of food science*, (46).
- ♣ Yamaguchi, T., Nakagawa, M., Hidaka, K. et al., (1985), Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-1-(2-chloroethyl)-nitrosourea in a murine tumor system.. *Jpn., Journal Cancer Research.* 76:1021-6.

APÉNDICE A



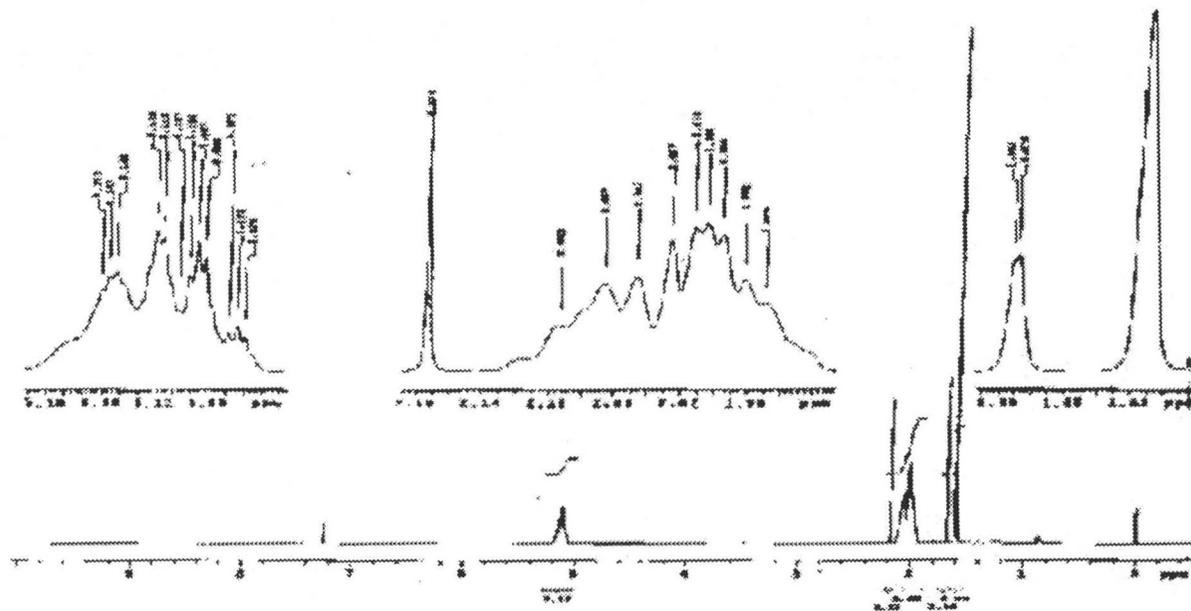
RMN ^{13}C - I DE LA VARIEDAD NUTRISOL FRACCIONES 20 - 26 CON LA PRESENCIA DE OTRO COMPUESTO

APÉNDICE B



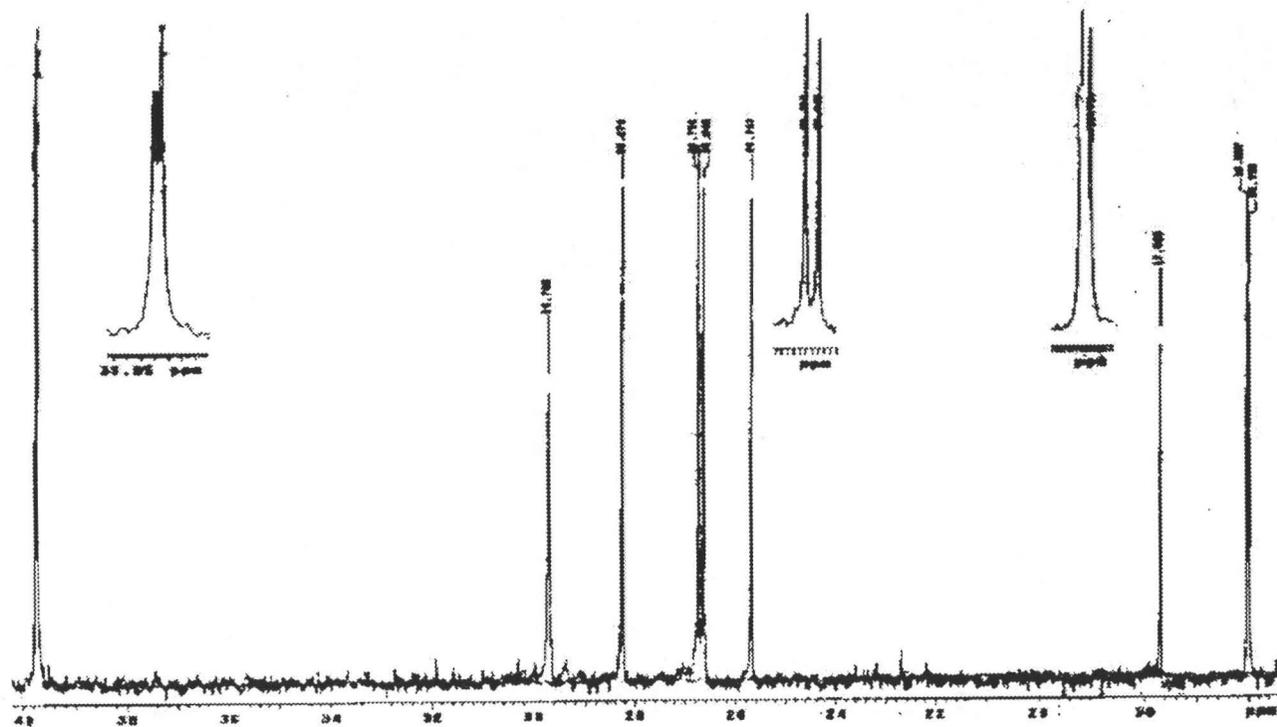
RMN ^{13}C - II DE LA VARIEDAD NUTRISOL FRACCIONES 20 - 26 CON LA PRESENCIA DE OTRO COMPUESTO

APÉNDICE C

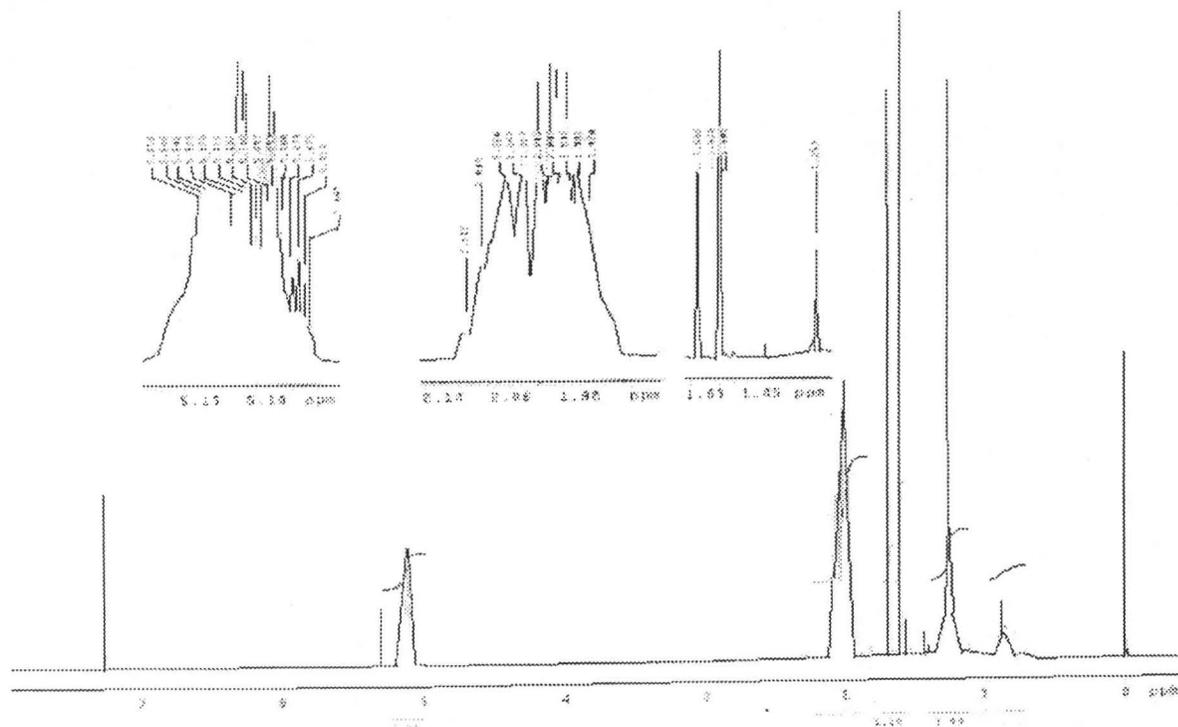


RMN ^1H DE LA VARIEDAD NUTRISOL FRACCIONES 20 - 26 CON LA PRESENCIA DE OTRO COMPUESTO

APÉNDICE F



APÉNDICE G



RMN DEL ESTÁNDAR, SIGMA. ¹H