

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



**EI AGUACATE CRIOLLO CULTIVADO EN DIFERENTES REGIONES DE
MÉXICO COMO FUENTE POTENCIAL DE NUTRACÉUTICOS: ÁCIDOS
GRASOS INSATURADOS Y FITOESTEROLES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

PESCADOR DIONICIO ADRIANA

MÉXICO, D. F.

2007



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: M. en C. Francisca Iturbe Chiñas

Vocal: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Secretario: Prof. Luis Orlando Abrajan Villaseñor

1er. Suplente: Prof. Luz Sandra Sánchez del Angel

2o. Suplente: Prof. María de Lourdes Osnaya Suárez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 321, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Sustentante: Adriana Pescador Dionicio

Dedicatorias

A mi mamá, la Sra. *Adriana Dionicio Morales*, por su apoyo, comprensión, dedicación y amor incondicional. Ma, para tí con todo mi corazón, te agradezco la fortaleza, el coraje y la confianza que me has dado, pero sobretodo por contribuir con tu ejemplo a mi vida. Te quiero mucho.

A mis hermanos, *José Alfonso, Ana Lilia y Luis Antonio Pescador Dionicio*, por su amor, protección, apoyo y confianza. Poncho, Nanec y Pato, gracias por ser parte de mi vida y compartir todos los momentos, esos que nos hacen reir y los que no tanto, los quiero muchísimo.

A mis sobrinos, *Ale, Saúl, Aline, Ray, Hannah y Naomi*, por darme su cariño y alegría, por recordarme que son necesarias dos cosas: conservar la capacidad de asombro y que la lectura rinde muy buenos frutos, los quiero mucho.

A *Pável E. Oropeza A.*, por demostrar y hacerme sentir su comprensión, confianza y apoyo, por los momentos de alegría, humor y tristeza vividos, por estar a mi lado y enseñarme lo maravilloso que es compartir la vida, los ideales, la admiración, pero sobretodo por su amor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por contribuir a mi formación en el ámbito profesional y humano, sobretodo, porque durante mi estancia en ella, reconocí la importancia de defender mis ideas, experimente la libertad de pensamiento y conocí el significado de la amistad.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña, por la oportunidad, tiempo y los conocimientos brindados para el desarrollo de éste trabajo.

A la M.C. Fanny Iturbe y al Prof. Orlando Abrajan, por el tiempo empleado en la revisión de éste trabajo, en especial por los comentarios y aportaciones hechas para mejorarlo.

A mi familia, Abue, Tías, Tíos, Primas y Primos, por brindarme su cariño y apoyo.

A Eliza y Raymundo, por ser parte de mi familia y mostrarme su cariño y apoyo en todo momento.

A mi papá, que aunque no estés presente, te agradezco los años que estuviste conmigo, suficientes para recordarte y guardarte en mi corazón. Pa, te quiero.

A mi amiga Cristina Velázquez P., por las risas y los llantos que hemos vivido durante un largo rato, por el privilegio de ser tu amiga y aprender que día con día se debe cultivar el pensamiento y el espíritu. Kris, gracias por tu ejemplo y fortaleza, te quiero mucho.

A mi amiga Mónica Vidal Hernández, Moe, te agradezco el apoyo, los ánimos y la confianza que me has brindado durante todo éste tiempo. Gracias por compartir conmigo los momentos chuscos, divertidos y de presión, pero sobretodo por manifestarme tu cariño. Te quiero. No quiero dejar pasar la oportunidad para agradecer a tu familia por todo el apoyo, en especial a tu mamá, la Sra. Aquilina Hernández, por su aportación y hospitalidad en nuestras largas jornadas de estudio.

A Esteban Olvera M., por demostrarme el significado de la incondicionalidad, por la fortuna de contar contigo en todo momento, agradezco infinitamente tu amistad. Gracias por todo.

A la Familia Oropeza Alfaro, por el apoyo que me han brindado, por su hospitalidad y atenciones, de forma muy especial, quisiera agradecerle al Sr. Tomás Oropeza por todo. Gracias.

A los amigos de la imprenta, Mayra, David, Carlos, Christian, Esteban, Ricardo, Leo, Hugo, Sandra, Mónica, Pável y Angel. Gracias por la amistad y los momentos de aprendizaje, por ser parte de la historia de la Universidad, por la oportunidad de conocer a gente con convicciones e ideales por defender.

Índice general

1. Introducción	2
2. Objetivos	4
3. Antecedentes	5
3.1. Alimentos Funcionales	5
3.1.1. Orígenes	5
3.1.2. Definición	6
3.1.3. Funciones	7
3.1.4. Componentes	8
3.1.5. Ejemplos de Alimentos Funcionales	10
3.1.6. Legislación a Nivel Mundial	14
3.1.7. La Dieta Mediterránea	15
3.2. Nutracéuticos	19
3.2.1. Definición	20
3.2.2. Clasificación y Función	21
3.2.3. Compuestos de Interés: Lípidos y Fitoesteroles	25
3.2.4. Mercado Mundial	33
3.3. El Aguacate	36
3.3.1. Origen y Dispersión	36
3.3.2. Características Botánicas	38
3.3.3. Ecología del aguacate	41

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	II
3.3.4. Composición y Valor Nutricional	42
3.3.5. El aguacate como Alimento Funcional	48
3.3.6. Producción Mundial	50
3.3.7. Producción Nacional	51
3.3.8. El Aguacate Criollo	54
4. Metodología	57
4.1. Etapa 1: Preparación de la Muestra	57
4.2. Etapa 2: Extracción y Cuantificación de Nutraceuticos	58
4.3. Descripción de Etapa 1	59
4.4. Descripción de Etapa 2	60
4.4.1. Análisis Cromatográfico	64
5. Resultados y Discusión	67
5.1. Etapa I	67
5.2. Etapa 2	74
6. Conclusiones	95

Índice de cuadros

3.1. <i>Contenido de esteroles en diferentes fuentes</i>	33
3.2. <i>Descripción Sistemática</i>	38
3.3. <i>Composición química del aguacate</i>	43
3.4. <i>Composición de ácidos grasos en diferentes fuentes</i>	44
3.5. <i>Perfil cromatográfico del aguacate</i>	44
3.6. <i>Contenido de aminoácidos</i>	45
3.7. <i>Análisis típico del aceite de aguacate y oliva</i>	48
3.8. <i>Países Productores de Aguacate y % de Participación Mundial</i>	51
3.9. <i>Estados Productores de Aguacate</i>	52
3.10. <i>Epocas de cosecha del Aguacate</i>	53
3.11. <i>Composición nutrimental del aguacate criollo</i>	55
3.12. <i>Evaluación de características en el aguacate criollo</i>	55
3.13. <i>Estados Productores de Aguacate Criollo</i>	56
4.1. <i>Condiciones de Cromatografía en Capa Fina</i>	62
4.2. <i>Condiciones Cromatográficas empleadas en el análisis</i>	65
5.1. <i>Características morfológicas</i>	68
5.2. <i>Porcentajes de componentes del aguacate criollo</i>	72
5.3. <i>Porcentaje de Humedad en pulpa de aguacate</i>	73
5.4. <i>Porcentajes de aceite en la pulpa y semilla del aguacate</i>	75
5.5. <i>Porcentajes de aceite en diversos frutos</i>	77

5.6. Fracciones insaponificable y de ácidos grasos en aceite de la pulpa de aguacate	79
5.7. <i>Fracciones presentes en el aceite de semilla de aguacate</i>	81
5.8. <i>Rf de compuestos del insaponificable del aceite de pulpa</i>	83
5.9. Contenido de fitoesteroles presentes en la fracciones insaponificable del aceite de pulpa y semilla del aguacate	85
5.10. <i>Contenido de sitoesterol en diferentes frutos</i>	88
5.11. <i>Contenido de fitoesteroles en aceites</i>	89
5.12. <i>Ácidos grasos presentes en el aceite de pulpa del aguacate</i>	90
5.13. <i>Acidos grasos presentes en la semilla del aguacate</i>	93
1. <i>Descripción del Equipo de Laboratorio</i>	98
2. <i>Reactivos de grado analítico</i>	99
3. <i>Análisis de Varianza (ANOVA) para características evaluadas en el aguacate criollo</i>	100
4. <i>Análisis de varianza para componentes del aguacate</i>	101

Índice de figuras

3.1. Estructuras de componentes activos I	11
3.2. Estructuras de componentes activos II	12
3.3. Pirámide alimenticia de la dieta mediterránea	16
3.4. Aceite de oliva empleado en la dieta mediterránea	19
3.5. Estructuras de ácidos grasos insaturados	25
3.6. Ácido oleico	27
3.7. Estructura general de los fitoesteroles	27
3.8. Ruta metabólica para la obtención de esteroles	28
3.9. Clasificación de los esteroles	29
3.10. Fitoesteroles más comunes en vegetales	29
3.11. Diferentes formas esterificadas de los esteroles en alimentos	30
3.12. Benecol, producto adicionado con fitoesteroles	34
3.13. Aguacatero	38
3.14. Flor del aguacate	39
3.15. Morfología del aguacate	40
3.16. Aceite de aguacate comercializado	47
3.17. Aguacate criollo	54
4.1. Preparación de la muestra	57
4.2. Extracción y Cuantificación de Compuestos Nutraceuticos	58
5.1. <i>Gramaje de muestras de aguacate</i>	69

5.2. <i>Características del aguacate</i>	70
5.3. Porcentajes de pulpa y semilla en el aguacate criollo	72
5.4. <i>Porcentaje de Humedad en la pulpa del aguacate criollo</i>	73
5.5. <i>Porcentaje de aceite en pulpa y semilla del aguacate</i>	75
5.6. <i>Fracción insaponificable y de ácidos grasos en pulpa de aguacate</i>	79
5.7. <i>Fracciones presentes en el aceite de semilla del aguacate.</i>	80
5.8. Cromatopla de la fracción insaponificable del aceite de pulpa de aguacate criollo	82
5.9. Cromatopla de fracciones insaponificables del aceite de semilla de aguacate criollo	84
5.10. <i>Concentración de esteroides en la pulpa del aguacate criollo</i>	86
5.11. <i>Concentración de esteroides en la semilla del aguacate</i>	87
5.12. Cromatograma de esteroides obtenido mediante Cromatografía de Gases	89
5.13. <i>Ácidos grasos presentes en aceite de pulpa del aguacate</i>	91
5.14. <i>Concentración de ácidos grasos insaturados en aceite de semilla de aguacate</i>	94
1. Curva Patrón de Ácidos Grasos	102
2. Curva Patrón de Ácido Linoléico	103
3. Curva Patrón de β -Sitoesterol	103
4. Curva Patrón de Estigmasterol	104

Resumen

A lo largo de éste trabajo se presentan las características que hacen atractivo al aguacate criollo, iniciando por su origen, distribución, descripción botánica y composición. Además se enfatizan los compuestos bioactivos que contiene éste cultivo y su efecto sobre la nutrición y salud del hombre.

Para llevar a cabo el análisis del fruto, se puso especial atención en la extracción del aceite de la pulpa y semilla de las muestras provenientes de diferentes regiones del país. Cada extracto se saponificó y a las fracciones obtenidas se les analizó por separado, utilizando cromatografía de gases.

Lo anterior nos permitió identificar y cuantificar fitoesteroles como: estigmasterol y β -sitoesterol. Además se determinó el perfil de ácidos grasos, donde son de relevancia los ácidos grasos insaturados, oléico, palmitoléico y linoléico. Con ello, se observa la oportunidad de aprovechamiento que ofrece el fruto, para caracterizarse como alimento funcional y en forma concentrada obtener nutraceuticos, dado el contenido de compuestos bioactivos que pueden extraerse, por lo que podría ser una opción en respuesta a la creciente necesidad de la población para prevenir y combatir enfermedades.

Capítulo 1

Introducción

Una de las primeras nociones que se tiene sobre la estrecha relación que guardan la dieta y la salud data del año 1000 a. de C. en la medicina china, seguida y retomada por Hipócrates hace más de 2500 años, quien utilizaba la frase: "deja que la alimentación sea tu medicina y que la medicina sea tu alimentación".

Es durante las últimas décadas que se ha incrementado el interés en la influencia que la alimentación tiene sobre la generación o prevención de enfermedades. En especial, la investigación se ha enfocado en la acción preventiva y curativa de la dieta diaria, sus componentes y la función que desempeñan.

Aunque existen diversas causas que han originado el estudio de la dieta y su acción, se reconoce que las de mayor relevancia son: la variación en el patrón de alimentación, la generación de enfermedades crónico degenerativas y el envejecimiento de la población mundial. La búsqueda de terapias como alternativa para el tratamiento de dichas causas, además de la posible aplicación de los avances en la tecnología, han ayudado a desarrollar en la ciencia de los alimentos y la nutrición el concepto de *Alimentos funcionales*, dado que contribuyen, además de la función nutricional básica, con efectos benéficos en forma relevante al organismo para mejora del estado de salud.

Por ello, se ha llevado a cabo la integración del conocimiento de los macro y micronutrientes en los alimentos (carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y otros compuestos como antocianidinas, flavonoides, tocoferoles, esteroides, etc.) y la función que desempeñan a nivel molecular con sus respectivos estudios epidemiológicos.

En base al interés que se generó y a las aportaciones de los estudios realizados en los compuestos activos de los alimentos, se contribuyó a la formación del campo de estudio denominado: *nutracéuticos*. Este concepto ha servido como herramienta para el mejoramiento de la calidad de vida, pues son promotores de la salud al combatir, prevenir y reducir el riesgo de contraer enfermedades crónico degenerativas.

Existen varias opciones para la obtención de nutracéuticos, algunas son el aprovechamiento de residuos provenientes de la industria alimentaria y el uso de productos que no tienen gran demanda en el mercado. El aguacate criollo es un claro ejemplo, ya que además de ser un fruto que aporta nutrientes y ser una fuente importante de energía, con sabor agradable, contiene compuestos, que pueden caracterizarlo como alimento funcional y que además puede ser materia prima para la generación de nutracéuticos. A pesar de ello, no cuenta con gran difusión, pues únicamente es consumido en las regiones donde es cultivado.

En México, el aguacate es un producto de suma importancia por la derrama económica que genera. La producción principal la constituyen las variedades Hass y Fuerte, dejando de lado al tipo criollo. El estudio de la variedad *criolla* radica en su aprovechamiento, utilizando la semilla y pulpa para determinar la potencialidad de dicho fruto como materia prima en la obtención de aceite rico en ácidos grasos insaturados y fitoesteroides (ambos compuestos con actividad nutracéutica), además de proporcionar una opción para convertirlo en un recurso de carácter nutracéutico y darle un valor agregado.

Capítulo 2

Objetivos

General

- Identificar y cuantificar compuestos nutraceuticos (ácidos grasos insaturados y fitoesteroles) presentes en la fracción lipídica del aguacate criollo, proveniente de diferentes zonas de producción del país, haciendo uso de técnicas cromatográficas, para aprovecharlo como alimento funcional y ser una opción como materia prima en la extracción de dichos compuestos.

Particulares

- Obtener el aceite de la pulpa y semilla del aguacate criollo, mediante la extracción con disolventes.
- Conocer la relación de las fracciones saponificable e insaponificable en la fracción lipídica del aguacate.
- Identificar y cuantificar los fitoesteroles presentes en la fracción insaponificable usando Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía de Gases.
- Determinar el perfil de ácidos grasos y su concentración, empleando Cromatografía de Gases.

Capítulo 3

Antecedentes

3.1. Alimentos Funcionales

3.1.1. Orígenes

Desde tiempos muy antiguos, la idea de que algunos alimentos curan o previenen enfermedades e incluso modifican el estado de ánimo ha estado profundamente arraigada en la mente humana. En el tiempo de Hipócrates (460-377 d.C.) se reconocía ya la relación estrecha entre los alimentos y la salud, éste filósofo enfatizaba: "...las diferencias en las enfermedades dependen del nutrimento..."(Andlauer, 2002).

Aunque la relacion entre la dieta y el estado de salud personal fue reconocida hace ya muchísimo tiempo, es durante las últimas décadas que se observa una clara preocupación en nuestra sociedad. Incluso se acepta sin reparos que la salud es perfectamente controlable a través de la alimentación, de ahí que en el mercado alimentario se haya generado el concepto de *Alimentos Funcionales*.

Los primeros indicios de lo que ahora son considerados alimentos funcionales aparecen en el mercado en la década de los 60, como alimentos diseñados para ser incluidos en dietas estrictas, exentas de gluten, bajas en sodio, pobres en calorías. Pero es hasta la década de los años 80 que el término alimentos funcionales fue desarrollado en Ja-

pón, como respuesta a la necesidad de disminuir el alto costo de los seguros de salud, los cuales incrementaban la necesidad de proveer cobertura a una población cada vez mayor en edad (Chasquibol, 2003). Debido al éxito de dichos alimentos y bebidas, se necesitaba una reglamentación por parte de consumidores y compañías del sector, para evitar el empleo de frases sobre salud fuera de contexto e injustificadas. El gobierno japonés inició por lo tanto, un sistema aprobatorio voluntario, en el que el término alimento funcional sería sustituido por Alimentos para Uso Específico de la Salud (Foods for Specified Health Use or FOSHU), logrando así el reconocimiento del Ministerio de Salud y Bienestar del gobierno japonés.

En países de occidente, los primeros indicios del empleo de éste término fueron las prácticas de fortificación con vitaminas y minerales, así como la integración de algunos componentes en los alimentos procesados para complementar alguna deficiencia de la población.

La alimentación además de satisfacer el hambre, es una fuente de prevención de problemas generados por deficiencias de la dieta, provee los compuestos estructurales de la nutrición (agua, proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales) para el mantenimiento y reparación de los tejidos. Se piensa en la dieta como la primera línea de defensa en la prevención de enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, enfermedades cardíacas, osteoporosis, artritis y degeneración muscular relacionada con la edad (Hasler, 2000).

3.1.2. Definición

No existe una definición universalmente aceptada, pues se trata de un concepto, más que de un grupo de alimentos. Algunos autores como Hasler (2000) definen a los alimentos funcionales como, alimentos que en virtud de la presencia de *componentes fisiológicamente activos* que proveen beneficios más allá de la nutrición básica, atribuyéndoles por ello, acciones curativas o preventivas.

En Europa, el primer documento de consenso sobre conceptos científicos en relación a los alimentos funcionales, fue elaborado en 1999 por un grupo de expertos coordinados por el ILSI (por sus siglas en inglés de *International Life Sciences Institute*) según el cual: *un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, si es demostrado satisfactoriamente que tiene efectos benéficos, con una o más funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales; de modo relevante o mejora el estado de salud y bienestar o reduce el riesgo de enfermedad* (Verhagen, 2004).

En países como Estados Unidos y Japón, donde se tiene un consumo importante de éstos, se maneja que un alimento funcional puede ser cualquier alimento procesado o no, cuyos ingredientes ayudan a funciones específicas y proporciona beneficios a la salud además de los tradicionalmente nutricionales. Los japoneses cuentan con una clasificación propia, dividida en tres categorías:

- Alimentos a base de ingredientes naturales.
- Alimentos que deben consumirse como parte de la dieta diaria.
- Alimentos que al consumirse cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano, las cuales son: mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica, prevención y recuperación de alguna enfermedad específica, control de las condiciones físicas y mentales, retardo en el proceso de envejecimiento (Chasquibol, 2003).

3.1.3. Funciones

Actualmente, las funciones y objetivos de salud a los que se ha dirigido la investigación en el campo de éstos alimentos son:

- **Crecimiento y Desarrollo.** Durante el embarazo se generan adaptaciones de la

madre en la gestación, desarrollo fetal y crecimiento. Existe gran influencia de alimentos con alto contenido de ácidos grasos (ω -3 y ω -6) y Vitaminas A y D.

- **Metabolismo de sustancias.** Mantenimiento de funciones corporales como peso, control de glucemia, nivel de colesterol y triglicéridos plasmáticos.
- **Defensa contra el estrés oxidativo.** Su función es de barrera frente al efecto nocivo de los radicales libres sobre el ADN, proteínas y lípidos del organismo.
- **Sistema cardiovascular.** Reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a que los alimentos son enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados, poliinsaturados, sustancias de acción antioxidante y fitoesteroles.
- **Función del sistema gastrointestinal.** Se cuenta con alimentos que actúan como probióticos, prebióticos y enriquecidos con fibra soluble e insoluble para mejorar la digestibilidad.
- **Funciones psicológicas y conductuales.** Se lleva a cabo un tratamiento en relación con el apetito y sensación de saciedad, el rendimiento cognitivo, el humor o tono vital y manejo de estrés. Uso de alimentos ricos en fibra, con aminoácidos específicos y sustancias excitantes como cafeína o tranquilizantes extraídos de plantas.

3.1.4. Componentes

Los componentes que hacen que un alimento sea funcional han estado siempre presentes en la naturaleza, pero es en las últimas décadas que se han identificado y determinado los beneficios concretos que aportan al organismo.

- **Fibra dietética.** Hidratos de carbono que el organismo no es capaz de digerir ni absorber, como la celulosa, hidroximetilcelulosa y pectinas, entre otros. Se encuentran de modo natural en vegetales y cereales de grano entero. La fibra **soluble** tiene gran capacidad de absorción de agua, forma geles de gran viscosidad y es

fermentada en mayor proporción en el colon por la flora intestinal. La fibra **insoluble** forma con el agua mezclas de baja viscosidad y es escasamente fermentada en el colon, favorece el tránsito intestinal y aumenta el bolo alimenticio, previniendo el estreñimiento. Mejora el control de la glucemia (Belitz, 1997).

- **Aminoácidos.** Componentes más simples de las proteínas. Triptófano, glutamina, arginina y cisteína son los más estudiados. Se encuentran naturalmente en alimentos ricos en proteína como: carnes, pescado, huevos, lácteos y derivados, legumbres, cereales y frutos secos. Actúan favorablemente en el sistema nervioso y en el funcionamiento del sistema inmunológico. Poseen un efecto hipnótico y sedante, que ayuda a regular el sueño y mejora las situaciones de ansiedad y estrés emocional. Favorecen la recuperación de daños musculares (Badui, 1995).
- **Ácidos grasos insaturados.** Se encuentran del tipo monoinsaturado y poliinsaturado. Dentro de los ácidos grasos monoinsaturados encontramos al ácido oléico, característico del aceite de oliva y aguacate. Entre los ácidos grasos poliinsaturados encontramos al omega-6 (linoleico) y omega-3 como el ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA). Se encuentran en aceites de semilla de girasol, maíz y soya, así como en pescados y aceite de hígado de bacalao. Protegen sistema cardiovascular, ya que reducen niveles de colesterol en sangre. Algunos tienen acción antiagregante plaquetaria y vasodilatadora.
- **Fitoesteroles.** Sustancias de origen vegetal, muy similares al colesterol. Sitoesterol, estigmasterol y campesterol son los más comunes. Se encuentran naturalmente en almendras, nueces, cacahuates, cereales de grano entero y aceites vegetales. Benéficos en el caso de hipercolesterolemia.
- **Antioxidantes.** Compuestos como carotenoides y polifenoles. Se encuentran en aceites vegetales, cítricos, tomates, zanahorias, pescado, huevos y mariscos. Componentes que evitan, frenan o neutralizan la acción de radicales libres.
- **Bacterias ácido-lácticas.** Microorganismos vivos, que al ser ingeridos en canti-

dades suficientes tienen efectos benéficos para la salud. Se encuentran en leches fermentadas y yogures. Contribuyen a equilibrar la flora intestinal (beneficio en casos de diarrea, estreñimiento e intolerancia a la lactosa), potencian el sistema inmunológico (infecciones recurrentes).

- **Prebióticos.** Son aquellos alimentos que contienen ingredientes que el organismo no es capaz de digerir, pero que tienen la propiedad de mejorar la salud al promover el crecimiento de bacterias intestinales benéficas. Se encuentran en vegetales como cebolla, alcachofa, alfalfa, espárrago, plátano, etc. Mejoran la microflora y tránsito intestinal, además de proporcionar un efecto protector ante cáncer de colon, acción positiva sobre sistema inmunológico y además de favorecer la absorción de calcio en el organismo.
- **Vitaminas y Minerales.** Nutrientes esenciales, fundamentales para el buen funcionamiento del organismo. Vitaminas como B1, B2, ácido fólico, niacina, B12, A y D. Minerales como: hierro, calcio, fósforo y yodo. Tanto las vitaminas como los minerales se encuentran distribuidos en la naturaleza en distintos alimentos.

3.1.5. Ejemplos de Alimentos Funcionales

Entre algunos ejemplos de éstos alimentos destacan aquellos que contienen vitaminas, minerales, ácidos grasos, fitoesteroles, fibra dietética, sustancias antioxidantes y probióticos.

El rol de los beneficios potenciales de los alimentos funcionales se enfatiza en The American Dietetic Association, pues señala el hecho de que éstos alimentos deben ser consumidos como parte de una dieta variada en niveles efectivos (Cozzolino, 2000). En la siguiente tabla (Ejemplos de alimentos funcionales) se enlistan algunos alimentos y compuestos denominados alimentos funcionales y las estructuras químicas de los componentes activos, Ver figuras 3.1 y 3.2.

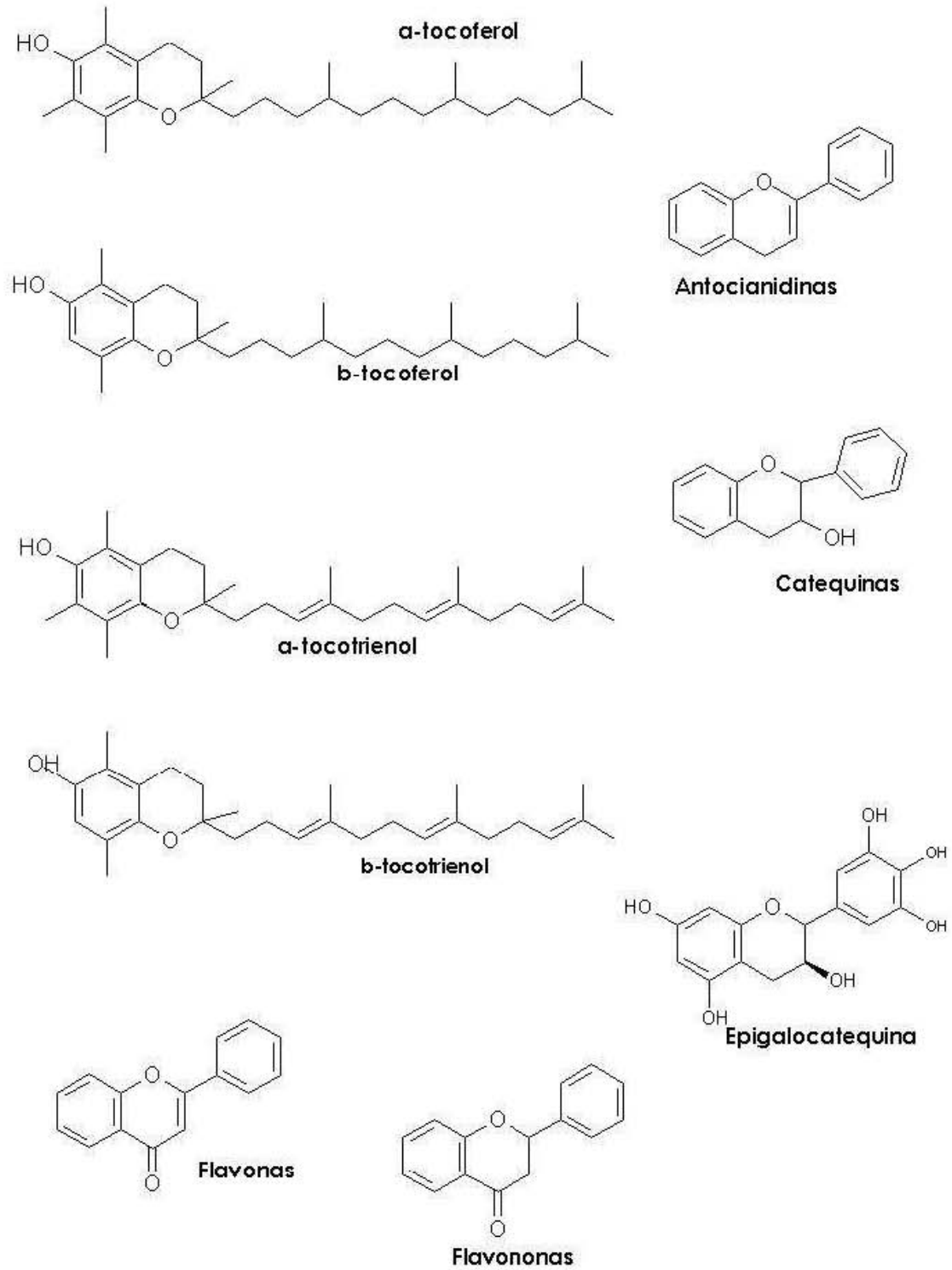


Figura 3.1: Estructuras de componentes activos I

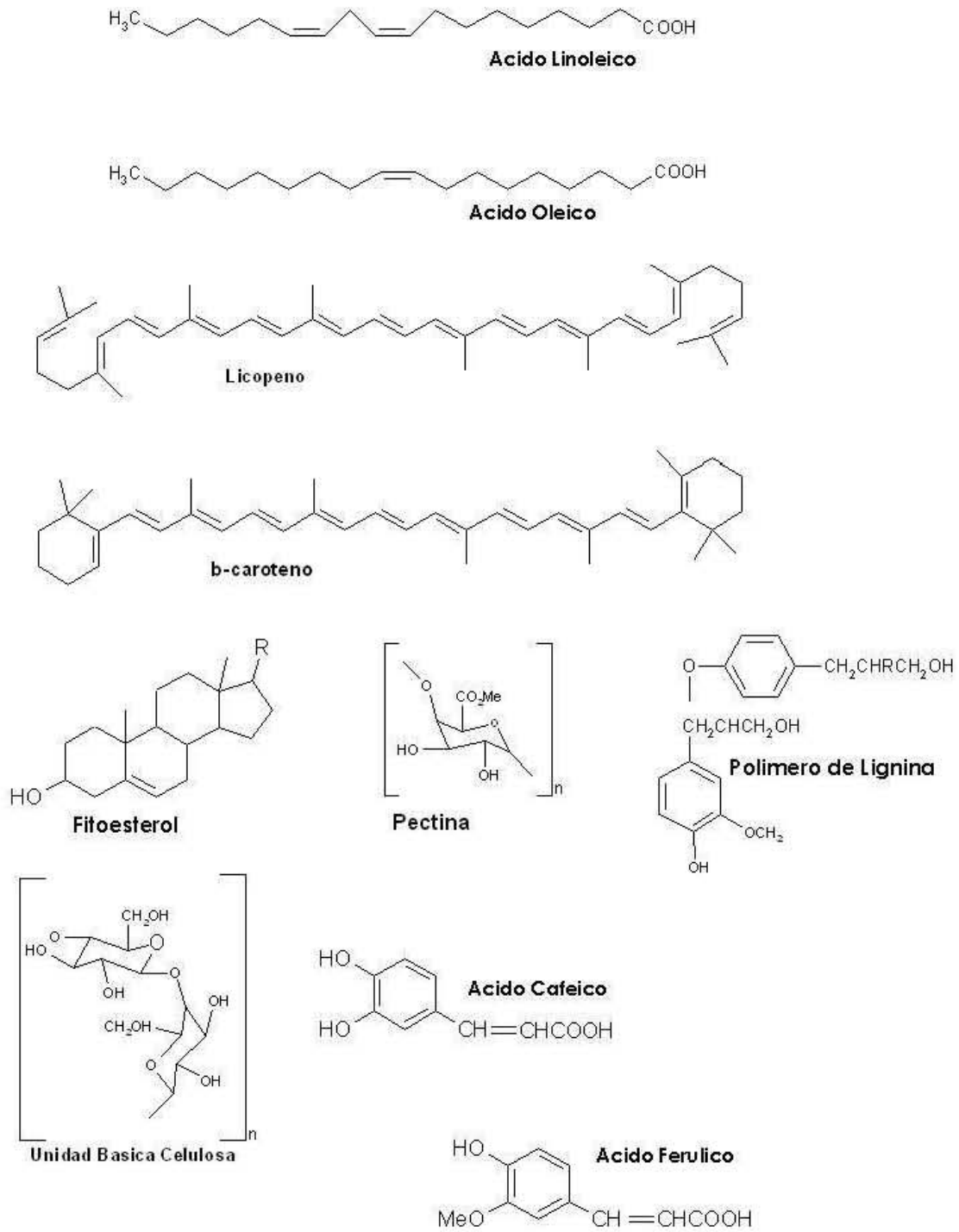


Figura 3.2: Estructuras de componentes activos II

Ejemplos de alimentos funcionales y componentes activos.

Fuente/Alimento	Componente	Función
	Carotenoides	
Zanahorias	α -Caroteno	Neutralizan radicales libres
Frutas y vegetales	β -Caroteno	Neutralizan radicales libres
Vegetales verdes	Luteína	Mantenimiento de salud visual
Tomates y derivados	Licopeno	Reducen riesgo de cáncer de próstata
Huevos, cítricos y maíz	Zeaxantina	Mantenimiento de salud visual
	Ácidos Grasos	
Atún, pescado	Ácidos grasos Ω -3	Reduce riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV)
Aceites de origen marino	DHA/EPA	Funciones visuales
Quesos	Ácido Linoleico conjugado	Disminuye el riesgo de cáncer
	Fenoles	
Frutas, vegetales y cítricos	Ácido caféico	Actividad antioxidante
	Ácido Ferúlico	Disminuye enfermedades degenerativas
	Flavonoides	
Frutas, té	Antocianidinas	Neutralizan radicales libres
Cítricos		Reducen riesgo de cáncer
	Esteroles vegetales	
Maíz, Soya	Ésteres de estanol	Disminuye niveles de colesterol en sangre
Trigo y aceite de pino		Inhibe absorción de colesterol
Frutas (aguacate)		
	Fibra Dietética	
Fibra de Trigo	Fibra Insoluble	Reduce riesgo de cáncer de colon
Avena	β -Glucanos	Reduce riesgo de enfermedades CVS

3.1.6. Legislación a Nivel Mundial

Dado que no hay una definición universal, se complica la función de regulación y legislación, pese a ello, cada país ha tratado de preparar el camino legal que debe fundamentar el uso de éstos productos. En éste apartado, se mencionan las situaciones para los países que han presentado mayor demanda de éstos alimentos.

En Estados Unidos existen 2 regulaciones: **NLEA** (Nutritional Labelling and Education), da los criterios para el rotulaje de alimentos e indicaciones para alimentos sólo en la relación nutriente-disfunción. La **DSHEA** (Dietary Supplements Health and Education Act), reglamenta los suplementos nutricionales y sus ingredientes, determina el uso obligatorio de frases alertando que un producto no se destina a tratar curar o prevenir enfermedades.

En Canadá no existe actualmente una legislación específica, sólo se reglamenta a todos los alimentos y medicamentos mediante The Canadian Food and Drug Act and Regulations.

Japón es el único país que posee una legislación específica para la comercialización y rotulaje, conocida como Foods for Specified Health Use (**FOSHU**).

Para la Unión Europea no hay una legislación específica, no obstante, hay reglamentos entre los países miembros debido a determinado factor de riesgo.

En nuestro país, aunque el término se usa entre la comunidad científica, a la fecha, no hay leyes que reglamenten el uso de éstos alimentos.

Dentro del Codex Alimentarius -programa conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (UNFAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se establecen normas alimentarias, con autoridad indiscutible por la importancia en el comercio internacional y que son empleadas como base por muchos países que se encuentran desarrollando nuevas legislaciones-, el debate se encuentra en la etapa inicial y los principales temas en los que se pretende trabajar, son los alegatos en cuanto a la reducción del riesgo de padecer enfermedades, la necesidad de verificación científica y el etiquetado de dichos alimentos (Cozzolino, 2000).

3.1.7. La Dieta Mediterránea

La alimentación como medicina es una idea del mediterráneo que data de unos 2,000 años atrás. Los griegos y romanos establecieron la importancia de la relación entre el estilo de vida, dieta y estado de salud.

En la década de 1960 se demostró que aspectos considerados irrevocables e intrínsecos de la constitución del individuo como tipo de organismo, niveles de grasa en sangre (colesterol), presión sanguínea, situación cardíaca y respuesta al estrés eran modificables por el cambio en la composición, cantidad de la dieta y actividad física (Rivera, 2004).

Los efectos benéficos en la salud de la dieta mediterránea han sido demostrados en diferentes grupos étnicos y culturales, fuera de la región del mediterráneo. En Suecia por ejemplo, se utilizó una dieta mediterránea con algunas modificaciones, en un grupo de adultos de entre 33 a 73 años, se demostró una reducción en los signos y síntomas de artritis reumatoide, mientras que no se observaron cambios en el grupo control (edad de 35 a 75 años). Aquellos que adoptaron dicha dieta, obtuvieron una reducción en la actividad del padecimiento.

Esta alimentación está constituida por 9 componentes (Ver figura 3.3):

- Elevado consumo de aceite de oliva y bajo consumo de lípidos de origen animal.
- Elevado consumo de vegetales.
- Elevado consumo de legumbres.
- Elevado consumo de cereales.
- Elevado consumo de frutas.
- Consumo moderado a elevado de pescado.
- Bajo consumo de leche y derivados.
- Bajo consumo de carne y productos derivados.
- Consumo moderado de vino.



Figura 3.3: Pirámide alimenticia de la dieta mediterránea

Existen variantes en la dieta mediterránea, depende de los países a lo largo de la costa del mar mediterráneo, aunque la dieta griega tradicional, originaria de Creta, es considerada el prototipo. Consta de vegetales, legumbres, frutas y aceite de oliva. Algunos de los constituyentes relevantes de la dieta son enlistados a continuación:

Legumbres

Específicamente, lentejas y frijol, son excelente fuente de folatos, nutriente esencial para reducir riesgo en defectos en tubo neural. Los isoflavonoides que prevalecen en éstos alimentos exhiben actividades estrogénicas, antiangiogénica, antioxidante y anticancerígenas.

Frutas y Vegetales

Las frutas y vegetales están fuertemente asociadas con la reducción de cáncer en tracto digestivo y riesgo de hiperplasia prostática. Algunos compuestos polifenólicos como ácido caféico y ácido clorogénico, pueden contribuir al potencial antioxidante y hepatoprotector.

La capsaicina, presente en chiles, ha sido usada como analgésico local, es un agente que bloquea el proceso de transducción. Recientemente se documentó que éste compuesto produce la muerte de células tumorales, mediante la apoptosis, pero con baja selectividad.

El licopeno está presente en tomates y frutas cítricas, es uno de los antioxidantes más potentes. Se le asocia con la disminución del riesgo de enfermedades crónicas como cáncer y cardiovasculares.

Cereales

Existe un efecto protector de alimentos ricos en fibra, contra cáncer colorectal. El aceite del germen de trigo es una fuente rica en tocoferol, el cual, actúa como antioxidante, antiinflamatorio, disminuye el riesgo de cáncer y previene el Alzheimer.

Nueces

Contienen gran cantidad de proteína y un nivel elevado de arginina, importantes en la relación óxido nítrico-óxido nítrico sintetasa, importantes no sólo en la prevención de enfermedades cardiovasculares, sino también en sistema inmunológico.

Vinos y Uvas

Los polifenoles presentes en éstos alimentos poseen actividad antioxidante y modifican potencialmente factores de riesgo asociados con arterogénesis y enfermedades cardiovasculares.

Alimentos locales: oliva, higo y ajo

El **aceite de oliva** (Ver Figura 3.4) protege de enfermedades cardiovasculares, su mecanismo de acción involucra efectos sobre lípidos en sangre, otros mecanismos que incluyen efectos sobre funciones inmunológicas endoteliales y rutas de coagulación. Contiene también biofenoles, reconocidos por su actividad antioxidante, éstos se han asociado a la textura y características organolépticas de los productos alimenticios, dándoles un valor funcional agregado.

La región del Mediterráneo cuenta con una gran diversidad de árboles de higo. El **higo** provee más fibra que otras frutas comunes, tienen un alto contenido de minerales, especialmente calcio. Contiene polifenoles, benzaldehído, cumarinas y potasio.



Figura 3.4: Aceite de oliva empleado en la dieta mediterránea

El **ajo** es un condimento típico del mediterráneo. Contiene gran cantidad de sustancias activas que poseen efectos favorables como, decremento en lipoproteínas de baja densidad, antioxidantes, antitrombosis y supresión de la agregación plaquetaria (Rivera, 2004).

3.2. Nutraceuticos

Este término ha sido empleado recientemente para enfatizar el desarrollo y evolución de la investigación científica (Pszczola, 1992). Según Biesalski, nutraceutico es un término desarrollado en 1979 por Stephen DeFelice (1994), aunque otras fuentes, indican que se estableció hasta 1989, como tal, por la Fundación para la Innovación en Medicina (Foundation for Innovation in Medicine New York).

Además de los nutrientes con actividad metabólica normal, los alimentos poseen componentes que son promotores de la salud, se les llama **nutraceuticos** y están presentes en los alimentos que se consumen con frecuencia, especialmente frutas, legumbres, cereales y leguminosas. El esfuerzo actual se encamina a incrementar su presencia y concentración mediante el uso de la ingeniería, diseño y desarrollo de alimentos.

3.2.1. Definición

Un nutraceutico se define como: *aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo en un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal* (Hasler, 2000).

Sin duda muchos de estos productos poseen funciones fisiológicas y actividades biológicas de valor, por lo que se cree son la interfase entre alimentos y medicamentos (Ramos, 2004).

Por la reciente generación y desarrollo en investigación de dichos compuestos, existen diferentes definiciones empleadas en los países donde el consumo y auge de éstos es relevante. El común denominador de los conceptos empleados es el uso del compuesto aislado.

En la Unión Europea se les considera como suplementos alimenticios que pueden ser adicionados a los alimentos o ingeridos en forma de pastillas, tabletas o polvos.

En Canadá se les conoce como productos aislados o purificados de los alimentos que generalmente se vende en forma de pastillas, polvos y otras formas farmacéuticas generalmente no asociados con los alimentos y se ha demostrado que tienen beneficios fisiológicos o proveen protección contra enfermedades crónicas.

3.2.2. Clasificación y Función

Aunque existe diversidad de éstos compuestos, generalmente se considera que su acción se ejerce en múltiples sistemas, especialmente en gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico. Debido a que se encuentran concentrados, su aportación tiene gran impacto en el desarrollo, metabolismo de nutrientes, expresión génica y el estrés oxidativo. En las tablas *Clasificación de Nutraceuticos parte 1, 2 y 3* se describe la clasificación de mayor aceptación (Chasquibol, 2003, Hasler, 2000).

A continuación se presentan tres tablas que recopilan de manera general los compuestos, fuente de extracción y función de los nutraceuticos de mayor relevancia en los últimos tiempos. Se dividieron de ésta forma debido a que la información obtenida es extensa.

En la Tabla 1: Clasificación de nutraceuticos, se encuentran compuestos de interés para éste trabajo, los ácidos grasos insaturados, que generalmente se encuentran como poliinsaturados en fuentes como pescado y productos marinos, ayudando a reducir el riesgo de generación de enfermedades cardiovasculares, disminuyen la relación LDL/HDL e incrementan el nivel de HDL en sangre.

En la Tabla 2: Clasificación de nutraceuticos Parte 2, se localizan los fitoesteroles como ésteres de estanol, destaca su presencia en vegetales verdes, semillas y aceite de pino, fuente de extracción principal a nivel industrial. En ésta recopilación destacan los antioxidantes y los compuestos que reducen el riesgo de generar enfermedades cardiovasculares.

En la Tabla 3: Clasificación de nutraceuticos, Parte 3, se enlistan compuestos que destacan por su acción como antioxidantes y disminución de riesgo de enfermedad por cáncer, como los tocoferoles y tioles.

Tabla: Clasificación de Nutraceuticos. Parte 1 Fuente: Chasquibol, 2003

<i>Compuesto</i>	<i>Fuente</i>	<i>Función</i>
Ácidos Grasos Poliinsaturados		
Familia n-3 y n-6	Pescado y aceites de productos marinos	Reduce el riesgo de Enfermedades Cardiovasculares (ECV)
	Algas	Actúan como inmunopresores
Ácido linoleico conjugado	Queso y productos cárnicos	Disminuye relación LDH/HDL, incrementan nivel HDL
Carotenoides		
α -Caroteno	Zanahoria	Secuestrantes de radicales libres
β -Caroteno	Frutas y verduras	Neutralizan radicales libres
Luteína	Vegetales verdes	Mantenimiento de la salud visual
Licopeno	Tomates y derivados	Reducen riesgo de cáncer de próstata
Zeaxantina	Huevo, cítricos y maíz	Mantiene la salud de la visión
Colágeno		
Colágeno Hidrosilato	Gelatina	Disminución de osteoartritis
Fenoles		
Ácido Caféico	Frutas y vegetales	Protección contra daños oxidativos
Ácido Ferúlico	Cítricos	Bloquean acción de enzimas que ocasionan inflamación
Fibra Dietética		
Celulosa	Fibra de trigo	Reducen riesgos de ECV
Hemicelulosa		Incrementan el bolo alimenticio
Lignina	Granos y cereales	Reduce riesgos de ECV
Pectina	Frutas	
β -Glucanos	Avena	Reduce riesgo de ECV

Tabla: Clasificación de Nutraceuticos. Parte 2

<i>Compuesto</i>	<i>Fuente</i>	<i>Función</i>
Fitoesteroles		
Ésteres de Estanol	Vegetales verdes y amarillos Semillas, maíz y soya Aceite de pino	Bloquean absorción de colesterol Bloquean desarrollo de tumores de colon Disminuyen desarrollo de cáncer de próstata
Flavonoides		
Antocianidinas	Frutas	Antioxidante y secuestrante de radicales libres
Catequinas (epigalocatequina y galato de epigalocatequina)	Té verde	Antioxidante y secuestrante de radicales libres
Flavononas y Flavonas	Frutas y vegetales	Antioxidantes y quelación de metales pesados
Saponinas	Soya y derivados	Reduce riesgo de ECV
Lignanós		
Enterodiól	Frutas y verduras	Protección contra ECV
Enterolactona	Soya y productos derivados	Reduce riesgo de cáncer Estimulan la absorción de calcio
Taninos		
Proantocianidinas	Cocoa, chocolate y zarzamora	Reduce el riesgo ECV

Tabla: Clasificación de Nutraceuticos. Parte 3

<i>Compuesto</i>	<i>Fuente</i>	<i>Función</i>
Prebióticos-Probióticos		
Fructo-oligosacáridos	Cebolla y yogurth	Mejoran funciones gastrointestinales
Lactobacilos	Lcteos	
Terpenos		
Limonoides	Frutas y vegetales	Previenen cáncer en pulmón. Inhiben regulación de proteínas para el crecimiento de celulas cancerígenas
Tioles		
Súlfidos alílicos	Ajo, col y nabos	Desintoxicación enzimática
Indoles e isoprenoides	Mostaza	Reducen el riesgo de cáncer
Tocoferoles	Semillas oleaginosas	Inhiben oxidación de lípidos
Tocotrienoles	Hojas y partes verdes de plantas	Inhiben cáncer de mama

3.2.3. Compuestos de Interés: Lípidos y Fitoesteroles

Dado que los nutraceuticos engloban gran variedad de compuestos, en éste trabajo se enfatiza la acción de dos componentes:

Lípidos

Los lípidos son sustancias orgánicas insolubles en agua que pueden extraerse con disolventes no polares (Astiasaran, 1999). Son componentes principales del tejido adiposo y estructurales de las células vivas.

La mayoría de las grasas y aceites se obtienen por medio de prensado, extracción con disolventes, con previo acondicionamiento de la materia prima. Dependiendo de la materia prima y el método de obtención, se pueden encontrar diferentes tipos de sustancias: lípidos polares, especialmente fosfolípidos, ácidos grasos libres, sustancias sápidas y olorosas, ceras, pigmentos, compuestos azufrados, compuestos fenólicos, trazas de metales, contaminantes y productos de la autooxidación.

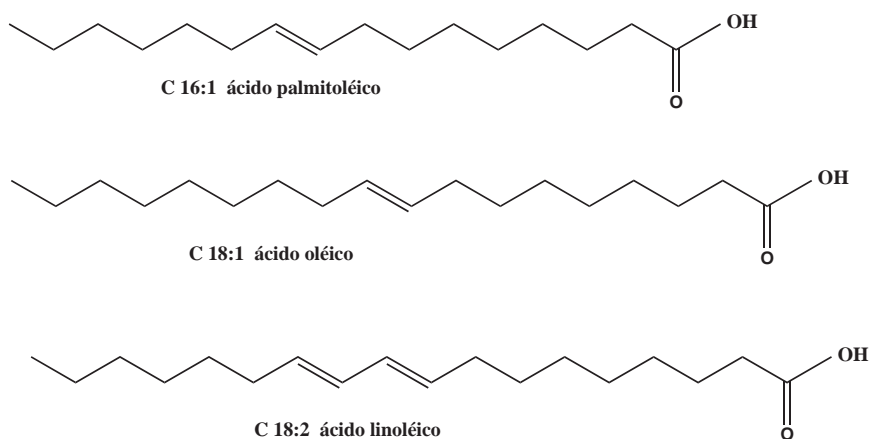


Figura 3.5: Estructuras de ácidos grasos insaturados

Las funciones de mayor relevancia de los ácidos grasos insaturados (Ver Figura 3.5) que se consideran aportaciones como nutracéuticos son:

- Disminución del nivel de colesterol LDL en sangre, evitando el riesgo de generar enfermedades cardiovasculares.
- Sufren desaturaciones y elongaciones, para dar origen al ácido araquidónico, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), para contribuir así a la producción de sustancias similares a las prostaglandinas y leucotrienos (sustancias que intervienen en la función reproductiva).
- Disminuyen presión arterial de individuos hipertensos.
- Actúan como antiinflamatorios, activando la respuesta de linfocitos y se comportan como vasodilatadores.
- A nivel celular, mantienen las bicapas lipídicas de las membranas celulares.
- Regulan la conformación de las proteínas en la membrana (Hasler, 1998).

Las fuentes más importantes para la obtención de éstos compuestos son algunos frutos y semillas oleaginosas, ya que contienen una elevada concentración de ácidos grasos insaturados. Existen aceites provenientes de frutos de relevancia como: oliva y palma.

El aceite de oliva a diferencia de los aceites de semillas puede ser consumido sin haber sido sometido a un proceso de refinado, obteniendo como ventaja la presencia intacta de la fracción insaponificable. El ácido graso predominante es el ácido oléico (Ver Fig 3.6), seguido por las aportaciones de cantidades significativas de ácidos linoléico y linolénico (Astiasaran, 1999). Los aceites de semillas son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como omega-6 y omega-3.

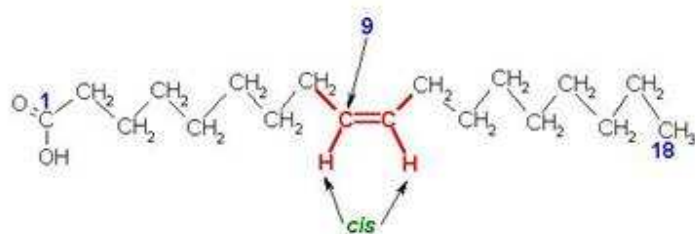


Figura 3.6: Ácido oleico

Fitoesteroles

Los fitoesteroles son compuestos conocidos como esteroides vegetales, pertenecen a la familia de los triterpenos, contienen de 27 a 30 átomos de carbono, uno o dos dobles enlaces carbono-carbono, un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo A y una cadena lateral ramificada de ocho o más átomos de carbono localizada sobre el carbono 17 del anillo D. Sus estructuras varían dependiendo de las modificaciones en el sistema de anillos y en la cadena lateral (Figura 3.7), (Abidi, 2001, Moreau, 2002).

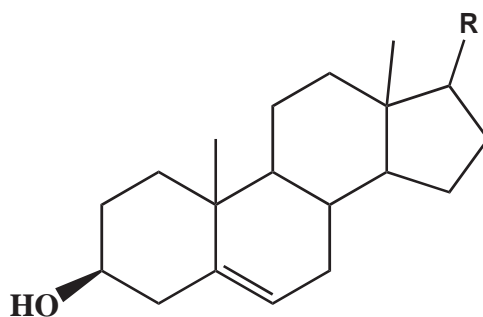


Figura 3.7: Estructura general de los fitoesteroles

Todos los triterpenos son sintetizados en el hígado a partir de la reducción de HMG-CoA a mevalonato, según la ruta metabólica del ácido mevalónico (Badui, 1995). Se necesitan seis unidades de mevalonato que al unirse con dos moléculas de farnesildifosfato producen escualeno. Mediante un proceso enzimático se forma el cicloartenol y se forma la estructura general de los triterpenos (Ver Figura 3.8).

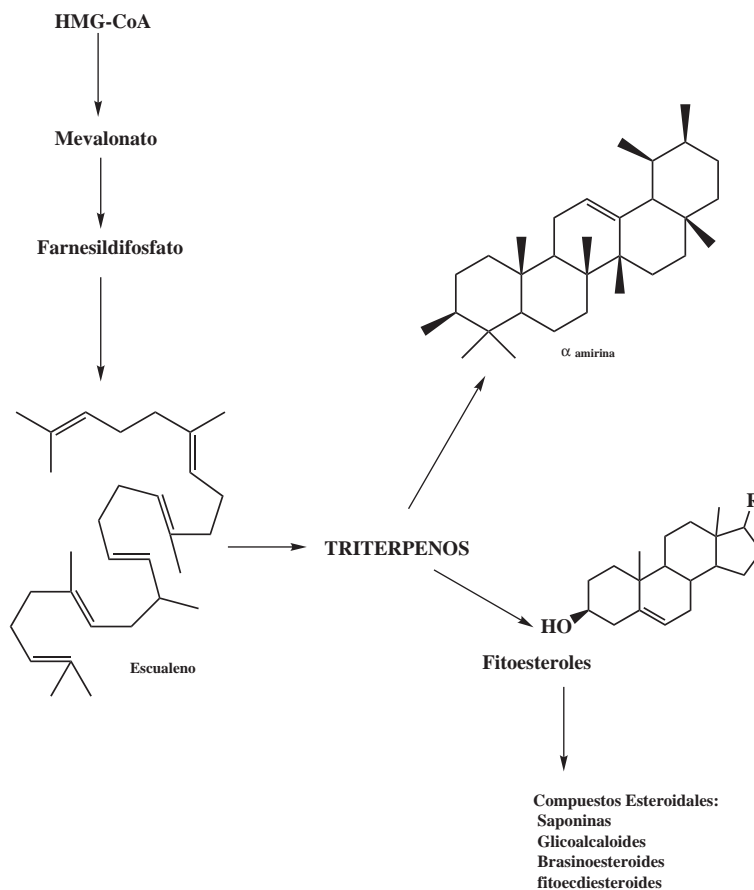


Figura 3.8: Ruta metabólica para la obtención de esteroides

Pueden ser clasificados en tres grupos principales, basados en la presencia o ausencia de los grupos metilo en la posición 4 en el anillo A (Figura 3.9) (Hicks, 2001):

- **I.** 4,4-desmetilesteroides: β -sitosterol (24- α -etilcolesterol), campesterol (24- α -metilcolesterol) y estigmasterol.
- **II.** 4 α -metilesteroides: 4- α -metil-24-metilen-5 α colest-8-en-3 β ol (obtusifoliol). En el átomo de C 4 tienen un grupo metilo en posición α .
- **III.** 4,4-dimetilesteroides: α y β -amirina, aunque el más representativo es el ácido oleánico, componente del aceite de oliva. Son considerados precursores de productos finales (Abidi, 2001, Piironen, 2003).

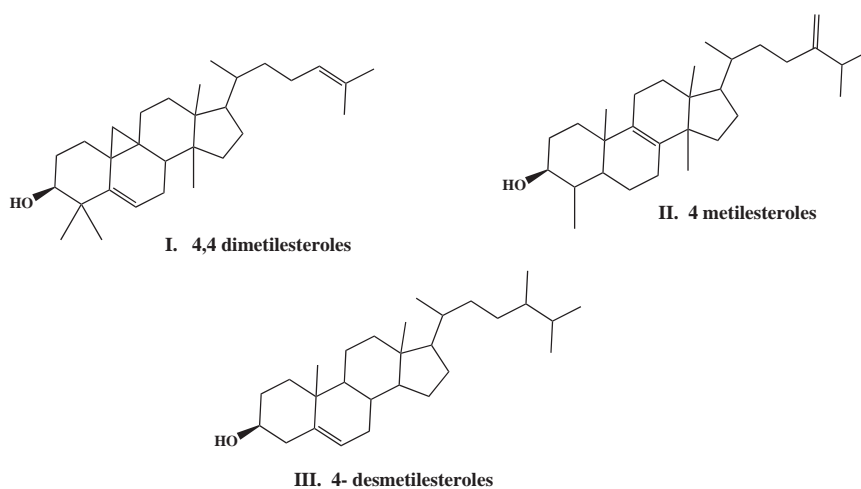


Figura 3.9: Clasificación de los esteroides

De acuerdo a lo reportado en literatura existen más de 250 tipos diferentes, pero los más conocidos son β -sitosterol, estigmasterol, campesterol y β -sitostanol (Figura 3.10). Aunque el más frecuentemente encontrado en mayor cantidad es el sitosterol (aproximadamente 80 %) (Piironen, 2003).

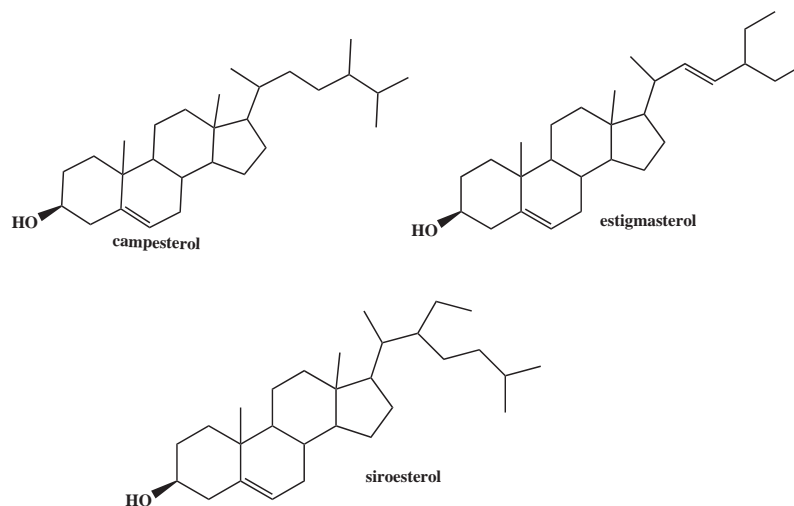


Figura 3.10: Fitoesteroides más comunes en vegetales

Tanto en alimentos como en plantas se encuentran como: esteroides libres (FS), ésteres de ácidos grasos (SE), esterilglicósidos (SG), acetilsterilglicósidos (ASG) y esteril

ésteres de hidroxicinamatos (HSE) y debido a ésto, sus propiedades físicas, químicas y nutricionales son diferentes (Ver Figura 3.11).

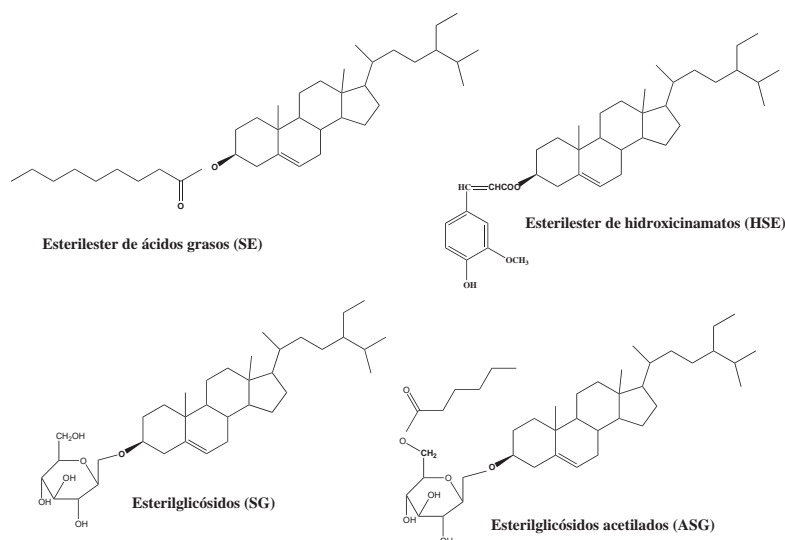


Figura 3.11: Diferentes formas esterificadas de los esteroides en alimentos

Entre las diferentes poblaciones la ingesta diaria en la dieta es de 150 a 450 mg aproximadamente. Se ha evaluado que las frutas, vegetales y bayas contribuyen aproximadamente con 60 mg del total reportado. La concentración de éstos depende de factores como: información genética, madurez del tejido y efectos post-cosecha (Pironeen, 2002, Toivo, 2001).

Como nutraceuticos, las funciones que los hacen destacar son:

- Estabilización de las bicapas lipídicas, control de la fluidez y permeabilidad en la células vegetales debido a que cuentan con un grupo hidroxilo que actúa en las interacciones específicas con los fosfolípidos y proteínas de la membrana.
- Señales de transducción además de ser factores importantes para la adaptación de la membrana a los cambios de temperatura.
- Disminución del riesgo de enfermedades coronarias al inhibir o bloquear la absorción del colesterol a nivel del intestino, ésto debido a que los esteroides y el

colesterol son parecidos químicamente y compiten por el espacio en la estructura de las micelas.

- Producción del efecto protector sobre la roliferación del desarrollo de colonocitos, inhibición del crecimiento de células HT presentes en el cáncer de colon.
- Disminución en el desarrollo de tumores y síntomas de hiperplasia prostática (Toivo, 2001).

Se sabe que los fitoesteroles tienen efectos metabólicos como reemplazar al colesterol de las micelas, por ser más hidrofóbicos, lo que ocasiona una reducción en la concentración de colesterol micelar y consecuentemente, disminuye su absorción (Jong, 2004, Casanueva, 2000).

Los esteroides son pobremente absorbidos en el intestino (0.4 a 3.5 %) en contraste con la absorción del colesterol que se encuentra entre los 35 y 70 %. La razón de la baja absorción de los esteroides puede ser, la pobre esterificación, posiblemente debido a la baja afinidad de la acetilcoenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT) por estos compuestos. Al ser absorbidos los esteroides son transportados hacia el hígado, y más tarde vertidos en el tracto digestivo a través de la bilis.

Además de que éstos compuestos pueden reducir el índice de esterificación del colesterol en el enterocito y en consecuencia la cantidad de colesterol excretado vía quilomicrones. El efecto de los esteroides sobre la absorción del colesterol continúa por varias horas después de su ingestión (Jong, 2004). Se sabe que existen dos genes que codifican las proteínas que intervienen en el transporte de esteroides de origen vegetal, éstas actúan como bombas dependientes de ATP excretándolos hacia la luz intestinal.

Los efectos de los esteroides han sido documentados ampliamente en la literatura, en estudios seleccionados del periodo 2000 a 2004 se demostró que 0.8 g de esteroides libres en productos untables disminuyen sólo el 1.6 % la concentración de LDL. Esta cantidad

puede reducir en 8.7 % el número de apoproteínas B, influyendo por ello, en la disminución de las LDL. En dosis de 150 a 300 mg presentes en las fuentes naturales, como aceite de maíz, se ha demostrado que se reduce la absorción del colesterol. En el trigo, el contenido de esteroides es de 328 mg y reducen la absorción de colesterol en 42.8 %. Estos resultados indican que dichos compuestos son biológicamente efectivos tanto en suplementos como en fuentes naturales, son herramientas para disminuir los niveles de colesterol y colesterol-LDL a través de la reducción de la absorción del colesterol (Berger, 2004).

Las principales fuentes de éstos compuestos son los tejidos vegetales, donde se encuentran como esteroides libres, esteroides esterificados a ácidos grasos, azúcares o fenoles. Se ha demostrado que nueces, aceites vegetales y productos derivados son las fuentes más ricas, seguidas de cereales, oleaginosas y en pequeñas cantidades, en frutas y vegetales (Abidi, 2001).

En aceites vegetales, generalmente crudos, se encuentran alrededor de 1 a 5 g/Kg. Aquellos que destacan por el contenido de fitoesteroides son productos de consumo cotidiano, como aceite de oliva, aceite de arroz y aceite de sésamo, en tanto que el contenido en nueces y alimentos similares es de 290 hasta 2200 mg/Kg. En los cereales, se distribuyen en la aleurona, endospermo, pericarpio y germen. Según evaluaciones realizadas en cereales como centeno, trigo y avena los valores obtenidos son considerables, alrededor de 1100, 760 y 520 mg/Kg respectivamente.

En vegetales, la cantidad varía, cuando se encuentran frescos, el contenido puede ser de 51 a 370 mg por kilogramo y como materia seca el valor va de los 250 a 4100 mg por kilogramo (Piironen, 2003). En frutas se sabe que el contenido es aproximadamente de 60 a 750 mg/Kg y 370 a 2930 mg/Kg para las bayas. En la Tabla 3.1 se enlista algunos fuentes y su concentración de esteroides.

Tabla 3.1: *Contenido de esteroides en diferentes fuentes*

Fuente	Esteroides mg/kg	Fuente	Esteroides mg/kg
Papa	50	Semilla de sésamo	7140
Tomate	70	Aceite de cacahuete	2070
Espinaca	61	Aceite de Sésamo	8650
Maíz dulce	2760	Aceite de oliva	2210
Chícharo	222	Aceite de soya	2500
Lechuga	10	Aceite de algodón	3240
Zanahoria	1200	Aceite de girasol	4440
Cebolla	150	Aceite de arroz	11900
Brócoli	30	Aceite de maíz	9680
Coliflor	200	Frijol de soya	1610
Pera	80	Garbanzo	1270
Aguacate	257	Cacahuete	2200
Manzana	122	Nuez	1580
Kiwi	140	Almendra	1430
Naranja	128	Plátano	160
Higo	310	Uva	144

A nivel industrial, el principal proceso empleado para su obtención es a través de la refinación de aceites. La fuente potencial, es la pulpa de pino, donde el aceite del tallo es refinado, purificado e hidrogenado químicamente (Dias, 2002). Otra fuente de importancia es la deodorización mediante destilación fraccionada de la refinación de aceites vegetales, como aceite de soya, maíz y arroz.

3.2.4. Mercado Mundial

La preocupación de la sociedad por la alimentación, el estado de salud personal y la generación de enfermedades crónicas (cáncer, obesidad, hipertensión, trastornos cardiovasculares) ha propiciado una marcada preferencia en el mercado alimentario por

los productos que promueven beneficios a la salud. El factor clave en el desarrollo de la industria de los nutraceuticos, es la aceptación del consumidor, por lo que es necesario proporcionar la información que contribuya a su conocimiento y empleo, fortaleciendo con estudios fundamentados, actualizaciones en la regulación de dichos productos y estudios de mercado.

El mercado global de los nutraceuticos desde sus inicios ha ocupado un amplio segmento de la industria alimentaria, para el 2002, ha presentado un incremento, pues se estima en 30 billones de dólares, con crecimiento del 5 % anual (Andlauer, 2002). Los productos con demanda en el mercado son alimentos para bebé, repostería, cereales, alimentos diarios, carnes, bebidas energéticas y deportivas (Alzamora, 2005).

Actualmente se emplean los esteroides de esterol como ingrediente en aceites vegetales o bases untables en cantidades que no excedan el 20 %, un ejemplo de éstos productos es Benecol, Figura 3.12 (Hicks, 2001).



Figura 3.12: Benecol, producto adicionado con fitoesteroides

Para el año 2001 en el mercado de los fitonutrientes, los esteroides representan el 5 %, con valor de 27 millones de dólares (Alzamora, 2005). De acuerdo a Jenkins (2005), se establece que el costo de los esteroides es menor a 0.10 USD/día y puede reducir el colesterol LDL en un 10 a 15 %

Según Davenport (2005) se estiman que existe un mercado global de los nutraceuticos de aproximadamente \$ 110 billones de dólares en el 2005. Cerca del 70 a 75 por ciento, pertenece a ingredientes activos concentrados como nutraceuticos (suplementos). En Estados Unidos se ha proyectado el aumento en el consumo de esteroides en un 15 % anual, esto debido a la difusión de su acción en la disminución de colesterol.

Frecuentemente los fitoesteroides se emplean como emulsificantes en la fabricación de cosméticos y como abastecedores de intermediarios y precursores para la producción de hormonas. Se emplean también en la inhibición del deterioro de aceites, ya que sirven como agentes potenciales de antipolimerización de aceites para freír. Se emplean también en mezclas agua-aceite, en la preparación de ésteres de esteroides para aplicarlos en margarinas (Phillips, 2002).

Es importante señalar que no hay disponible un método oficial para la determinación de esteroides en alimentos. De acuerdo a la mayoría de los autores, la evaluación de éstos compuestos y la confiabilidad de los resultados requieren técnicas analíticas adecuadas para la extracción, aislamiento, separación, purificación, detección y análisis cuantitativo.

Hasta el momento en literatura, el procedimiento general para el análisis de esteroides en alimentos, involucra la extracción de la fracción lipídica, hidrólisis alcalina (saponificación), extracción de la fracción insaponificable, derivatización, separación, caracterización y cuantificación de éstos compuestos mediante una gran variedad de técnicas cromatograficas incluyendo, cromatografía en columna (CC), cromatografía de gases (GC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), HPLC en fase reversa y electrocromatografía capilar y pueden ser detectados mediante ionización a la flama (FID), detección UV, Infrarojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS) (Abidi, 2001).

El aislamiento y separación de las diversas clases de esteroides puede llevarse a cabo mediante cromatografía en columna o por cromatografía de capa fina cuando el tamaño de la muestra sea de más de 200 mg. Estas técnicas son adecuadas para la limpieza, purificación y cuantificación del extracto crudo, para obtener una estimación preliminar de los esteroides presentes en las muestras de interés.

La cromatografía de gases es la técnica usada frecuentemente en la identificación y cuantificación de esteroides, se reconoce como la técnica más adecuada, dado que puede llevarse a cabo mediante la inyección directa del extracto o como derivados volátiles y porque las nuevas columnas capilares pueden separar eficientemente los componentes de la mezcla en comparación con las columnas empacadas usadas anteriormente.

En la mayoría de los métodos reportados en literatura, se utilizan columnas con fases de polisiloxano de características no polares como: DB-5, DB-5MS, SPB-5, RTX-5 y HP5MS y detectores de ionización de flama (FID). La fase que ha presentado muy buenos resultados contiene 5 %-fenil-metilpolisiloxano, con la ventaja de presentar volatilización baja de la fase estacionaria a las temperaturas de trabajo, con excelente sensibilidad y con intervalos de trabajo desde -60 °C hasta 325/350 (Abidi, 2001).

3.3. El Aguacate

3.3.1. Origen y Dispersión

La palabra aguacate, proviene del náhuatl *ahuacacuáhuatl*, que significa árbol de los testículos, de ahuácatl: testículo y cuáhuatl: árbol (InfoAserca, 2002).

En base a diferentes evidencias arqueológicas, se sabe, éste fruto ha estado presente desde tiempos muy remotos, aproximadamente, 7 a 8 mil años. El área de origen no es conocida con precisión, pero se considera como tal, a la parte central de México, a

través de Guatemala, hasta gran parte de Centroamérica. De ésta región, el consumo de aguacate se extendió hacia Norteamérica por México, hasta el Sudeste de los E.U.A., las Antillas, todo Centroamérica y gran parte de Sudamérica: Colombia, Venezuela, Las Guyanas, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. La dispersión tan amplia a través de las áreas de desarrollo de las civilizaciones antiguas, se explica por el alta estima que los indígenas tenían por éste fruto carnoso, nutritivo y de sabor único (InfoAserca, 2002).

En las antiguas civilizaciones, el cultivo del aguacate se inició probablemente hace unos 6 mil años, aunque no se sabe cuando se originó la selección consciente del fruto, para mejorar su calidad y lograr su propagación. En cuanto a su domesticación, se cree ocurrió cuando los pobladores movieron plantas de su medio silvestre para colocarlas en las cercanías de su morada. Aunque el fomento del cultivo y explotación extensiva, con perspectivas comerciales y de mercado se inició en Michoacán desde 1932, extendiéndose por todas las regiones tropicales y semitropicales del país.

Existen tres variedades botánicas o razas ecológicas:

- Mexicana (*P. americana ssp. drymifolia, aoacaquauitl*), de regiones con altura de 1500 a 2,000 metros sobre nivel del mar (msnm).
- Guatemalteca (*P. americana ssp. guatemalensis, tlacacolaocatl*), de zonas con altura de 500 a 1000 msnm.
- Antillana (*Persea americana ssp.americana, quilaocatl*), en lugares con menos de 500 msnm (Sánchez, 1999).

El nombre científico del aguacate es *Persea americana Mill.* Es miembro de la familia vegetal de las Lauráceas, la cual cuenta con más de 50 géneros, entre los que destaca *Persea*. Aunque según varios autores aún es desconocido el número de especies existentes. La descripción sistemática vegetal se establece en Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Descripción Sistemática

Taxonomía	
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledónea
Orden	Ranales
Suborden	Magnolíneas
Familia	Lauraceae
Género	<i>Persea</i>

3.3.2. Características Botánicas

Árbol

De porte generalmente elevado, extremadamente vigoroso, con un hábito de crecimiento rápido, erecto, semiabierto y abierto. Es perenne y puede alcanzar hasta 30 metros de altura, pero dependiendo del clima, suelo y técnicas de cultivo puede ser más reducido (Ver Figura 3.13). La cantidad de frutos que produce cada árbol depende de la variedad así como de los cuidados que haya tenido la planta durante su desarrollo, pero en promedio se calcula que puede producir entre 1000 y 1500 frutos al año.

Figura 3.13: Aguacatero



Raíz

Columnar primaria, poco profunda, semidura y muy ramificada. La absorción de los nutrientes se realiza por medio de las partes jóvenes colocadas en los ápices radiculares, está desprovista de pelos radiculares.

Tallo

Presenta un tronco de sección circular y tiende siempre a seguir una línea recta, con ramificaciones vigorosas y erguidas. La corteza es rugosa y bajo ésta se encuentra un tejido maderable de color rojizo y de escasa resistencia.

Hojas

Son abundantes, brillantes, alternadas y pedunculares. Están presentes en todas las ramificaciones secundarias, de consistencia coriácea, con variaciones en su forma, van desde ovals hasta elípticas, con ápices por lo general agudos. Además son enteras, de color verde oscuro en el haz y un poco más claro en el envés.

Flor

La inflorescencia en el aguacate se presenta en panículas axilares. Cada panícula está constituida por un eje central ramificado del que surgen largos pedicelos que en su extremo terminan en una pequeña flor (Figura 3.14).



Figura 3.14: Flor del aguacate

La flor está constituida por un perígono (dos venticilios florales de tres segmentos cada uno), los segmentos del perígono son todos iguales, de color verde cremoso a verde amarillo y ambos se encuentran cubiertos por una fina pubescencia. El androceo presenta doce estambres, de los cuales nueve tienen función, teniendo cada uno antenas con cuatro cámaras polínicas. El gineceo se compone de ovario, estilo y de estigma. El ovario es unilocular, con un sólo óvulo de placentación libre central.

Fruto

Según la variedad, el aguacate presenta diferentes características: es una drupa de forma globosa, ovoide o periforme, su tamaño es variable y puede alcanzar 10 centímetros de longitud y un peso comprendido entre los 100 y 200 gramos. La cáscara puede estar constituida por una gruesa y rugosa corteza o una fina y lisa película, de coloración entre verde, rojizo y violácea. La pulpa es de consistencia firme, brillante, con sabor agradable y encierra una semilla gruesa y globulosa (Ver Figura 3.15).

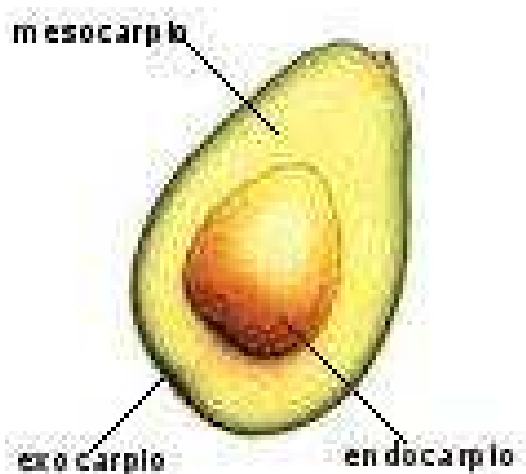


Figura 3.15: Morfología del aguacate

El aguacate está constituido por: **exocarpio** (cáscara), **mesocarpio** (pulpa) y **endocarpio** (semilla), los que en conjunto constituyen el pericarpio (García, 1999). El endocar-

pio es un tejido denso, muy delgado. El mesocarpio está constituido por tejido parenquimatoso, pulpa, lugar donde se lleva a cabo la formación de aceite.

Semilla

Se encuentra adherida al mesocarpio y representa aproximadamente el 15 % en peso del fruto . Es de forma globosa, constituida por dos cotiledones ricos en almidón y en cuyo interior se localiza el embrión y es en el eje embrionario donde se almacena la grasa.

3.3.3. Ecología del aguacate

Se menciona la ecología del aguacate debido a que ésta disciplina estudia la vida de los seres vivos en relación al medio en el que se desenvuelven, por lo que es necesario establecer los requerimientos a cubrir para el desarrollo del cultivo del aguacate, éstos factores son:

Clima

Se le considera el factor más importante en su producción, puesto que determina las posibilidades potenciales, la calidad y el rendimiento frutícola de una zona determinada.

El clima donde se desarrolla espontáneamente y donde se originó éste frutal es tropical. Se localiza en la zona comprendida entre los 10 a 30 ° L N y ° L S respectivamente. La pluviosidad anual debe ser de 800 a 2000 mm durante todo el año, aunque el valor promedio de 1,200 mm es suficiente si se distribuye en forma regular. Los valores en las temperaturas anuales van de 20 a 26 ° C y a temperaturas no inferiores a los -5 ° C.

Suelo

El suelo constituye el medio que aporta nutrientes y actúa como sostén de la planta. Para que pueda realizar bien su función, las condiciones físicas y químicas deben ser óptimas. Se requiere de un drenaje con profundidad de 1 a 2 metros (para evitar problemas de

asfixia radicular y enfermedades de la raíz), con subsuelo poroso preferentemente, de textura franca o migajones, arena-limosos a arcillosos arenosos, con un pH que oscila entre 5.5 a 7.5.

3.3.4. Composición y Valor Nutrimental

El aguacate es considerado un fruto de importancia en la dieta diaria, ya que cubre necesidades nutritivas que aseguran la formación y mantenimiento del cuerpo humano. Dependiendo de la variedad, la composición química de la porción comestible de éste fruto es 65 a 80 % de agua; 1 a 4 % de proteína; 1 % de carbohidratos y 3 a 30 % de lípidos. En la Tabla 3.3 se presentan los valores promedio de cada uno de los componentes nutrimentales más importantes de éste fruto (Sinyinda, 1998).

Agua

Se considera relativamente escasa. Además del plátano y aceituna, no existe otro fruto que presente bajo contenido de agua, por lo que éste es un indicio de ser un fruto concentrado, de gran capacidad nutritiva y calorífica, dependiendo de la variedad.

Lípidos

Los lípidos presentes en el aguacate son altamente digeribles y contribuyen a la consistencia del fruto y al sabor que lo caracteriza (Sinyinda, 1998). Es uno de los frutos más ricos en grasa (hasta un 20 %). En la Tabla 3.4 se enlistan el contenido de aceite en diferentes frutos. Se estima que el aguacate cuenta con una composición similar a la del aceite de oliva.

La porción comestible de la fruta es rica en ácidos grasos insaturados (80 a 85 %), se encuentran: ácido oleico, palmítico, linoléico y palmitoléico en gran proporción, mientras que el ácido esteárico sólo se encuentra en trazas (Oleata, 1999). En la Tabla 3.5 se enlistan los ácidos grasos de mayor relevancia.

Tabla 3.3: Composición química del aguacate

Componente	Cont. en 100 g aguacate	Componente	Cont. en 100 g aguacate
Aporte Calórico	161.1 Kcal	Vitamina A	85.00 μ g
Agua	74.3 g	Vitamina D	10.00 μ g
Proteína	1.9 g	Vitamina E	3.00 μ g
Grasa	15.6 g	Vitamina K	8.00 μ g
ácidos grasos saturados	16-22 %	Vitamina B1	0.11 mg
ácidos grasos monoinsaturados	66-72 %	Vitamina B2	0.20 mg
ácidos grasos poliinsaturados	8-11 %	Vitamina B6	0.45 mg
Carbohidratos	2.4 g	Niacina	1.6 mg
Fibra	5.0 g	Ac.Pantoténico	1.0 mg
Cenizas	1.04 g	Ac.Fólico	32 μ g
Calcio	10.0 mg	Biotina	10.0 μ g
Hierro	1.06 mg	Vitamina C	14.00 mg
Fósforo	40.0 mg	Cobre	0.35 mg
Magnesio	41 mg	Manganeso	2.3 mg
Sodio	4 mg	Zinc	1 mg
Potasio	463 mg	Selenio	0.4 mg

Otro compuesto presente en gran cantidad es la lecitina, con funciones importantes para el metabolismo de las grasas. Cuenta también con un importante nivel de materia insaponificable, constituida principalmente por esteroides, carotenos y tocoferoles.

Proteínas y Aminoácidos

El aguacate es uno de los frutos frescos más ricos en proteínas, que según la variedad, alcanzan el 2 % de su peso. Contiene presentes en su aminograma, siete de los cuales no son sintetizados en el organismo, por lo que deben ser incluidos en la dieta (Ver Tabla 3.6).

Tabla 3.4: Composición de ácidos grasos en diferentes fuentes

textbfAceite	% Saturados	% Monoinsaturados	% Poliinsaturados
Girasol	10	21	64
Maíz	13	25	58
Oliva	14	72	9
Aguacate	10	78	10
Cacao	59	32	3
Coco	86	6	2
Palma	49	37	9

Tabla 3.5: Perfil cromatográfico del aguacate

Fórmula	Ácido	Porcentaje (%)
C 16:0	Palmítico	13.76
C 16:1	Palmitoléico	5.98
C 18:0	Esteárico	1.48
C 18:1	Oléico	64.87
C 18:2	Linoléico	11.3
C 18:3	Linolénico	2.52
C 20:0	Araquidónico	0.09

Carbohidratos

Presentes en pequeñas cantidades como azúcares solubles. Ha sido recomendado su consumo a personas que padecen diabetes, debido a la presencia de manosa. Además es uno de los frutos frescos que contiene más fibra dietaria, alrededor de 5 %.

Vitaminas

La pulpa presenta tanto vitaminas liposolubles como hidrosolubles, cubriendo un buen porcentaje de las recomendaciones de ingesta diaria. Contiene 12 de las 13 vitaminas,

Tabla 3.6: Contenido de aminoácidos

Compuesto	mg/100 g	Compuesto	mg/100 g
Isoleucina	47	Metionina	29
Leucina	46	Fenilalanina	48
Lisina	59	Treonina	40
Triptofano	-	Valina	63
Tirosina	32	Arginina	47
Histidina	25		

destaca su concentración de vitaminas del complejo B (componentes que ayudan a la formación del tubo neural y otras funciones del sistema nervioso). La provitamina A y vitamina E, potentes antioxidantes naturales (tocoferoles) que en presencia del ácido ascórbico aumentan su efecto.

Minerales

Es rico en minerales como hierro, cobre, potasio y magnesio (InfoAserca, 2002). Existe una relación favorable entre potasio y sodio, pues se obtiene el descenso de la presión arterial y la disminución de la susceptibilidad a ciertas enfermedades cardiovasculares y vásculo-cerebrales que no dependen de la presión arterial.

El contenido en cobre es significativo, indispensable en el metabolismo del hierro en la síntesis de hemoglobina, melanina y proteínas del tejido conectivo. Su deficiencia se asocia con trastornos neurológicos y cardíacos.

Es fuente de manganeso, micronutriente esencial en el funcionamiento del encéfalo y el metabolismo de los carbohidratos. Aporta magnesio, catión intracelular, participa en el metabolismo de glúcidos, lípidos y calcio, en equilibrio ácido - base y procesos de oxidoreducción. Con escaso contenido de calcio, su absorción es óptima en presencia de vitamina D y ausencia de ácido oxálico.

Usos

Como cosmético, ofrece muchas ventajas, pues es un excelente agente en la penetración trans-epidérmica, permitiendo la nutrición de las diferentes capas de la piel. Se usa en la formulación de lociones, cremas y jabones por su rico contenido de Vitamina E.

Es un árbol maderable usado en la construcción, genera leña y herramientas de trabajo y sombra. En la cocina tradicional se emplea como condimento y recientemente como aceite comestible (Sánchez, 1999).

Tanto las hojas, como semilla y cáscara tienen un amplio uso en la medicina tradicional de México. La infusión o el polvo de éstas se emplean en tratamientos para eliminar parásitos, desintería, alivio de dolor en hígado, diarrea, mareo, entre otros padecimientos. Incluye cataplasmas con hojas y aceites vegetales (Argueta, 1999).

La mayor parte de la producción de aguacate se destina a su consumo como alimento fresco, sin embargo se ha extendido su procesamiento, usándolo en la producción de aceite para el consumo como alimento o para la industria farmacéutica. En alimentos se usa para la preparación de alimentos enlatados y aderezos para condimentar pastas, pescados, etc., imprimiéndoles un sabor delicado.

Aceite de Aguacate

El aceite de aguacate se produce en México para utilizarlo en forma comercial, embotellado para la elaboración de aderezos, cremas y productos de belleza o cuidado de la piel. Se emplean los excedentes de las cosechas y el aguacate que por su apariencia física no reúne las cualidades requeridas para su consumo como producto fresco, Ver Figura 3.16.

El aguacate Hass por su alto contenido de pulpa y porcentaje de aceite es óptimo para el proceso de extracción. Su contenido puede variar entre 16 y 17 % en Septiembre y hasta 25 ó 30 % en Abril. Los bajos niveles de ácidos grasos libres le proporcionan un punto de humeo muy alto, por lo que es empleado para freír. Contiene una fracción insaponificable la que se le relaciona con la inhibición de la enzima lisil-oxidasa, la cual se activa por una combinación de enlaces en el colágeno por oxidaciones de grupos de aminoácidos de lisina. La inhibición de la actividad enzimática puede abrir áreas para el tratamiento de heridas y quemaduras.



Figura 3.16: Aceite de aguacate comercializado

En la Tabla 3.7, se encuentra la composición y parámetros fisicoquímicos del aceite de aguacate, el cual frecuentemente ha sido tomado como sustituto del aceite de oliva, por su similitud en contenido de ácidos grasos (Pacetti, 2006).

Se caracteriza por:

- Un alto valor nutritivo, por su alto contenido en vitaminas A, D y E.
- Concentración de aproximadamente 70 % de ácidos grasos monoinsaturados.
- Emolencia, fácil absorción por la piel, poder humectante y buena estabilidad.

Tabla 3.7: Análisis típico del aceite de aguacate y oliva

Evaluación	Aguacate	Oliva
Color	40 - 60 ppm	4 - 6
I.A. en C 18:1 (%)	0.08 a 0.17	0.15 a 0.25
Gravedad específica	0.915 a 0.916	0.914 a 0.918
Valor de Yodo	82 a 84	75 a 82
β -sitoesterol	0.45 a 1.0	0.1 a 0.2
Vitamina E mg/Kg	130 a 200	100 a 150
α -tocoferol (mg/Kg)	130	100
β/γ -tocoferol	15	10

3.3.5. El aguacate como Alimento Funcional

Aunque existe la descripción de las propiedades nutrimentales de éste fruto, a continuación se hará referencia a la presencia de compuestos activos que destacan, pues cumplen además con otras funciones como:

- **Ácidos Grasos Insaturados.** Excelente fuente de grasa monoinsaturada (ácido oléico), importante para reducir niveles de colesterol en sangre.
- **Glicolípidos y Esfingolípidos.** Componentes importantes de la membrana celular, actúan como mensajeros de varios procesos celulares, como la diferenciación, senescencia y apoptosis. Junto con el colesterol son encargados de la agregación y respuesta inmune.
- **Vitamina E** (α -Tocoferol, 2.3 mg/100 g). Actúa como antioxidante, retarda el proceso de envejecimiento, protege contra enfermedades del corazón y varias formas de cáncer por neutralizar los radicales libres que pueden ocasionar daño celular (Lozano, 1963).
- **Vitamina B6.** Es el fruto fresco con mayor concentración de ésta vitamina: 0.5 mg/100g. Con acción sobre el funcionamiento óptimo del sistema nervioso.

- **Vitamina A.** Antioxidante que contribuye al funcionamiento celular y protección de daño por estrés oxidativo. Además de favorecer las funciones reproductoras.
- **Luteína** (284 mcg/100 g). Carotenoide que ayuda en la protección de enfermedades de los ojos, como cataratas y degeneración macular. Previene también los trastornos prostáticos. Se sugiere que es el compuesto responsable del color característico.
- **Avocatines.** Compuestos aislados de la cáscara del fruto, con propiedades antivirales e insecticida (Kashman, 1969).
- **Sodio y Potasio.** Minerales que se encuentran en relación tal que disminuyen la presión arterial.
- **Cobre.** En 100 gramos de porción comestible se cubre el 21 % del requerimiento diario promedio para un adulto. Indispensable en el metabolismo de hierro en la síntesis de hemoglobina, melanina y proteínas del tejido conectivo.
- **Hierro.** Con el mayor contenido de éste mineral en frutas frescas, 1.02 mg/100 g. Recomendado en casos donde se requiera un mayor consumo de hierro, de mayor asimilación en la adolescencia y el embarazo.
- **D-manoheptulosa.** Azúcar que ayuda a la piel a preservar el equilibrio entre los mecanismos cutáneos de defensa, donde la epidermis funciona como barrera antimicrobiana.
- **Glutación.** Se encuentra en una concentración tres veces mayor que en muchas frutas. Compuesto que funciona como antioxidante, atrapando radicales libres, por lo que reduce el estrés oxidativo y previene cáncer de boca y faringe.
- **Fitoesteroles.** Contiene β sitosterol (76 mg/100 g), que actúa como agente reductor de colesterol y triglicéridos de baja densidad en sangre.
- **Fibra Dietética.** Disminuye la presencia de trastornos digestivos, protege las mucosas por su acción alcalina.

3.3.6. Producción Mundial

Actualmente, el aguacate es una fruta que se ha ido incorporando día con día a la dieta de un importante número de consumidores en E.U.A., la Unión Europea, Canadá y Japón, por señalar algunos de los mercados de importancia a nivel mundial.

Según ASERCA con datos de FAO-STAT ¹ la producción mundial de éste fruto en el periodo 1997-2001 fue en promedio de 2,370,240 toneladas métricas, lo cual indica que, el aguacate ha dejado de ser considerado un fruto exótico, pues se ha transformado en un cultivo disponible en diversas partes del mundo. Es importante en el mercado internacional porque presenta un crecimiento en forma sostenida, hecho que se observa en los indicadores de producción, exportación e importación.

Para el año 2001, se cultivó en 58 países, con una superficie de cosecha de 345 mil hectáreas, asegurando su presencia en el mercado por más tiempo, además de generar una cultura de su consumo.

En la Tabla 3.8, se presentan los países que en conjunto reúnen cerca del 58 % de la producción mundial, destacando: México, Estados Unidos, Brasil, Colombia, Perú, y Chile. Nuestro país con aproximadamente el 36.5 % del total, ocupa el primer lugar mundial (InfoAserca, 2002).

Los países que concentran la exportación son básicamente siete: México, España, Israel, Sudáfrica, Chile, Países Bajos y E.U.A, que en conjunto representan el 82.9 % del total de las exportaciones mundiales, México participó durante éste período con el 22.9 %. En lo que respecta al mercado de las importaciones, destaca Francia, pues absorbe cerca del 34 % del volumen total destinado a éste rubro.

El fortalecimiento que presenta el aguacate en el crecimiento del mercado mundial se

¹Claridades Agropecuarias, SAGARPA, Octubre 2002

Tabla 3.8: Países Productores de Aguacate y % de Participación Mundial

País	Toneladas	% Participación
México	907	34.5
E.U.A.	217	8.2
Indonesia	146	5.5
Rep. Dominicana	82	3.1
Brasil	86	3.3
Sudáfrica	82	3.1
Perú	84	3.2
Israel	81	3.1
Chile	98	3.7
España	56	2.1
Resto del Mundo	791	30.0
Total Mundial	2,630	100

debe en mucho, a su carácter nutracéutico -situación que obedece a la tendencia mundial en el aumento del consumo diario de productos sanos y naturales-, y al cosmocéutico, importante en la elaboración de aceite, shampoo y otros cosméticos.

El aceite de aguacate no está reconocido como un producto significativo porque el costo de la materia prima es relativamente alto y aunque tiende a incrementarse, la producción es muy pequeña.

3.3.7. Producción Nacional

México cuenta con una firme cultura en el cultivo y consumo del aguacate, se caracteriza por tener el mayor consumo mundial per-cápita, con cerca de 10 kilogramos por año.

De acuerdo a la SAGARPA², el aguacate es un fruto que se cosecha a lo largo de la República Mexicana durante todo el año. Se estima que 28 entidades federativas, destinaron un total de 94,147 hectáreas de superficie en su cosecha durante el 2001, predominando el cultivo de las variedades Hass, Fuerte y criollo. Cabe mencionar que del total de la superficie destinada a éste frutal, el 88 % corresponde a la pequeña propiedad, mientras que el 12 % restante pertenece al sector social.

En la Tabla 3.9 se encuentran los datos sobre cinco entidades que han concentrado cerca del 92 % del total de la superficie aguacatera. Michoacán contribuye con el 82 % de ésta, siendo el estado que encabeza la producción del país y actualmente produce cuantitativa y cualitativamente nuevas plantaciones con variedades mejoradas. Morelos sigue en importancia, pues para el año 2000 ocupó el segundo lugar, en la producción nacional al contribuir con el 2.1 %. En tanto que, el Estado de México se situó en cuarto lugar con el 1.7 % manteniendo su participación estable con relación al resto de los estados productores. Puebla generó el 1.6 % de la producción total, lo que lo sitúa en el quinto lugar, a pesar de ser el lugar donde se descubrieron los vestigios más antiguos del aguacatero.

Tabla 3.9: *Estados Productores de Aguacate*

Estado	Superf. Cosechada (ha)	Vol. Producido (ton)	Rendimiento (ton/ha)
Nacional	94,148	940,229	9.99
Michoacán	78,573	820,224	10.44
Nayarit	2,301	21,875	9.51
Morelos	2,374	23,823	10.04
México	2,003	13,307	6.64
Puebla	2,402	12,485	5.20
Otros	6,495	48,516	

²Claridades Agropecuarias, SAGARPA, Octubre 2002

En el periodo 1994 a 2001, el rendimiento de la producción nacional pasó de 8.9 a 9.99 ton/ha., respectivamente. En lo que respecta al precio medio rural nacional, pasó de \$1,480 por tonelada en 1994 a \$5,351 por tonelada para el 2001. El valor de la producción anual se ha incrementado de tal forma que durante éste último año reportado, se encuentra en el octavo lugar de la producción agrícola nacional, tan sólo detrás de productos como maíz, caña de azúcar y frijol.

Las técnicas empleadas para la producción y explotación del aguacate en los diferentes estados de la república han propiciado que en algunos de éstos, en especial en Michoacán se coseche alternadamente las variedades Hass y criollo durante todo el año, aunque desde luego, la cosecha más intensa se da en los meses de octubre a marzo, mientras que de mayo a septiembre se registra la época menos productiva. En la Tabla 3.10 se muestran los estados productores y la información acerca de sus épocas de producción.

Tabla 3.10: *Epocas de cosecha del Aguacate*

Estados	Temporada
Michoacán	Octubre a Marzo
Nayarit	Junio a Diciembre
México	Mayo a Septiembre
Puebla	Mayo a Diciembre
Chiapas	Mayo a Septiembre
Guanajuato	Mayo a Septiembre

3.3.8. El Aguacate Criollo

Características

Se designa con el nombre científico de *Persea americana Mill.*, variedad criolla. El fruto posee características que lo distinguen de los demás (Ver Tabla 3.12), entre ellas destaca su apreciado aroma y sabor.



Figura 3.17: Aguacate criollo

Su forma es variable (Ver Figura 3.17), puede ser periforme, obovata, oval-ovata, lacrimoide o globuloso. La cáscara es delgada y suave, de color café oscuro a negro cuando está maduro. La pulpa, es suave de color verde claro, con espesor menor al de las variedades comerciales (75 a 80 % del peso total del fruto). Su semilla es globulosa y proporcionalmente más grande, en relación con la pulpa (alrededor del 25 a 20 %). En las Tablas 3.11 y 3.12 se encuentran los valores promedio de los componentes nutricionales y características del aguacate criollo.

Dependiendo del lugar en el que es cultivado, presenta diferentes temporadas de floración, fructificación y cosecha, por lo que es posible encontrarlo y comerlo durante casi todo el año. La mayoría de las variedades criollas son vendidas en los mercados locales y consumidas tradicionalmente. Algunas de magnífica calidad y otras de consistencia fibrosa, quizá característica no agradable en la preferencia de la población.

Tabla 3.11: *Composición nutricional del aguacate criollo*

Componente	Cont. en 100 g de fruto	Componente	Cont. en 100 g de fruto
Porción comestible	53 %	Humedad	74 %
Energía	144 Kcal	Proteína	1.6 g
Grasa Total	13.5 g	Saturados	2.44 g
Monoinsaturados	8.97 g	Poliinsaturados	1.84
Calcio	24 mg	Fósforo	42 mg
Hierro	0.5 mg	Magnesio	45 mg
Sodio	4 mg	Potasio	604 mg
Retinol	200 mcg	Vitamina C	14 mg
Tiamina	0.09 mg	Riboflavina	0.14 mg
Niacina	1.9 mg	Piridoxina	0.28 mg
Hidratos de carbono	7.6 g	Fibra	2.5 g

Tabla 3.12: *Evaluación de características en el aguacate criollo*

Característica	Descripción
Forma	Periforme - Obovata
Peso	47.20 - 273g
Color	Verde o negro homogéneo
Diámetro	3.72 a 7 cm
Longitud	6.05 a 16.05 cm
Cáscara	1.27 a 10.52 %
Pulpa	49.06 a 86.95 %
Semilla	11.09 a 45.76 %
Grasa	6.12 a 32.56 %
Humedad	52.12 a 82.87 %
Cenizas	0.12 a 0.46 %

Distribución y condiciones de cultivo

En México, existe una gran variedad de tipos criollos, cada una con peculiaridades típicas (tamaño, forma, color, porcentaje de pulpa, cantidad de grasa y fibra), las cuales están condicionadas al medio ecológico, tipo de suelo y ubicación geográfica (Rozeto, 1999).

Los árboles en general se localizan en forma dispersa, a veces silvestre, o a nivel del huerto familiar y en pocos casos en forma ordenada (Sánchez, 1999). Se siembra en áreas templadas (de altura) o áreas semicálidas, pero se adapta a diferentes condiciones de clima.

Se puede decir que las principales zonas de producción de ésta variedad se localizan dentro de dos clasificaciones climatológicas. La primer área involucra municipios del estado de Michoacán, Puebla y Estado de México donde la temperatura media anual es de 17 a 18 °C con una precipitación de 800 y 1000 mm. La segunda, está formada por los estados de Morelos, Chiapas y Veracruz, donde la temperatura media es de 24 a 26 °C y precipitación de 1200 a 1800 mm, aunque es posible que resistan a temperaturas drásticas, de 0 a -4 °C (Ver Tabla 3.13).

Tabla 3.13: *Estados Productores de Aguacate Criollo*

Estado	% de producción	Epoca de Cosecha
Guanajuato	Criollo 100 %	Abril-Septiembre
México	Criollo, Zutano y Rincón 40 %	Octubre-Febrero
Michoacán	Criollo 7 %	Octubre-Febrero
Morelos	Criollo 95 %	Julio-Septiembre
Puebla	Criollo 65 %	Septiembre-Diciembre
Veracruz	Criollo 75 %	Noviembre-Febrero
Sinaloa	Criollo 32 %	Octubre-Noviembre

Capítulo 4

Metodología

La metodología empleada en éste trabajo se dividió en dos etapas:

4.1. Etapa 1: Preparación de la Muestra

Se realiza una evaluación preliminar, donde se identifican, acondicionan y tratan tanto la pulpa como la semilla hasta la obtención de éstas secciones molidas y secas, Ver Figura 4.1.

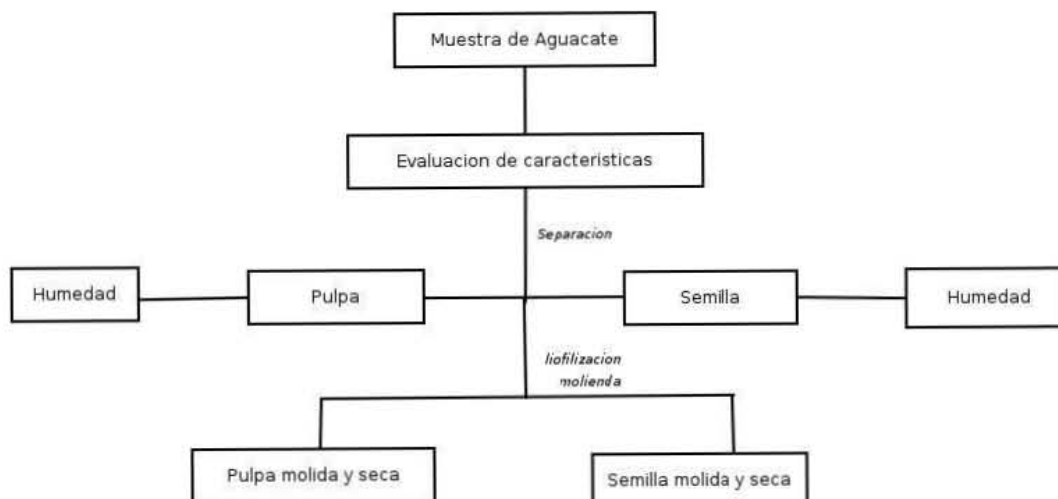


Figura 4.1: Preparación de la muestra

4.2. Etapa 2: Extracción y Cuantificación de Nutraceuticos

En ésta segunda parte, se emplean las muestras molidas y secas, para obtener el extracto etéreo y cuantificar los esteroides y ácidos grasos empleando Cromatografía de Gases, Ver Figura 4.2.

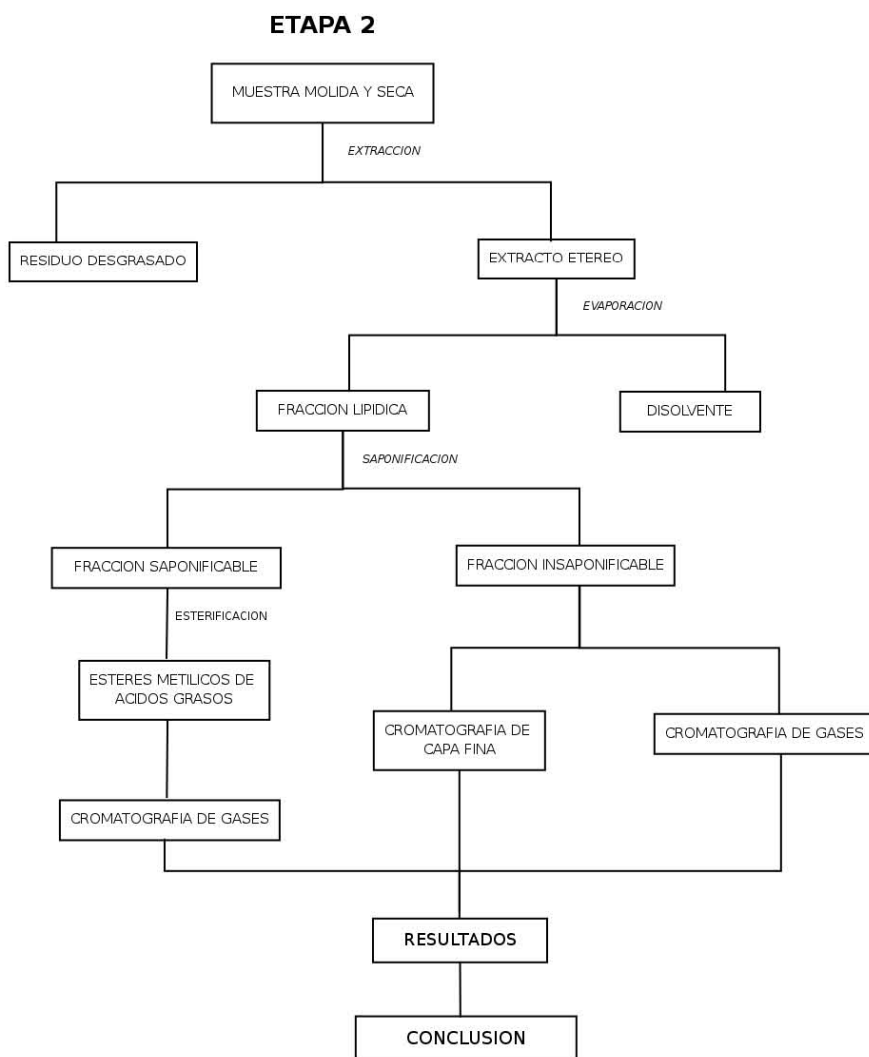


Figura 4.2: Extracción y Cuantificación de Compuestos Nutraceuticos

4.3. Descripción de Etapa 1

Acondicionamiento de la muestra

En el Anexo I, se encuentran las tablas 1 y 2, donde se recopila la información sobre el equipo y reactivos de laboratorio empleados en el desarrollo del presente trabajo.

Para el desarrollo de la metodología planteada, se utilizaron muestras de aguacate provenientes de los estados de Michoacán, Morelos, México, Puebla y Central de Abastos del D.F.

Inspección Visual

En cada muestra se llevó a cabo una inspección visual, para establecer las características generales del fruto (peso, tamaño, color, etc.). Por medio de lavado superficial se removió el material extraño. Se pesó cada fruto y se separaron las secciones que lo conforman, cáscara, pulpa y hueso. Cada fracción fue pesada en una balanza digital, para determinar la relación con respecto al peso total del fruto.

Determinación de Humedad

En cada muestra se evaluó el porcentaje de humedad. Se transfirió un gramo de muestra en cápsulas de aluminio a peso constante, colocándolas en estufa a 105 °C durante 5 horas.

El contenido de humedad se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \left(\frac{W_{ms} - W_{av}}{P_m} \right) * 100$$

donde:

- W_{ms} = Masa cápsula de aluminio con muestra seca
- W_{av} = Masa cápsula de aluminio vacía
- P_m = Peso de la muestra

Liofilización

Las fracciones obtenidas, pulpa y hueso, se colocaron en vasos para liofilizar y se almacenaron durante 24 horas en el ultracongelador a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después del tiempo de congelación, las muestras fueron liofilizadas. Las muestras secas se molieron en mortero y posteriormente fueron pesadas en una balanza digital y se transfirieron a frascos de vidrio opacos y secos con tapa, etiquetados con claridad y almacenados en refrigerador a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

4.4. Descripción de Etapa 2**Obtención y cuantificación del extracto etéreo**

Para contar con datos estadísticamente representativos, el procedimiento se realizó por cuadruplicado en cada muestra. La extracción de la fracción lipídica en cada muestra se utilizó el método de extracción por agitación durante 24 horas. Se llevó a cabo pesando 250 gramos de muestra molida y seca. Se transfirió a un matraz erlenmeyer con capacidad de 500 mL. Se adicionaron 400 mL de éter de petróleo, manteniendo en agitación constante la mezcla durante 24 horas, empleando una parrilla de agitación. Se aisló de la luz y en atmósfera inerte.

Por filtración se separaron el éter de petróleo y la muestra desgrasada. El filtrado obtenido fue transferido a un matraz de bola a peso constante. En seguida fue colocado en el rotavapor para remover el disolvente y concentrar a sequedad, utilizando un baño a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. El matraz de bola con el residuo se puso en la estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un par de minutos para eliminar cualquier residuo de disolvente. El aceite obtenido se pesó y por diferencia de peso se determinó el porcentaje de grasa de la muestra. Una vez pesado, se transfirió a viales ambar, en atmósfera inerte de nitrógeno, etiquetado y sellado con parafilm. Se almacenó a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la saponificación.

Para determinar el contenido de grasa en cada muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{Grasa} = \left(\frac{W_{mg} - W_v}{P_m} \right) * 100$$

donde:

- W_{mg} = Masa del matraz con grasa
- W_v = Masa del matraz vacío
- P_m = Peso de la muestra molida y seca

Obtención de la fracción insaponificable

La saponificación del aceite o extracto graso se realizó de acuerdo al método oficial establecido por la A.O.A.C. Ref 920.160, 1995. Se colocaron 2 gramos de grasa en un matraz de bola, se agregaron 50 mL de solución etanólica de KOH (0.5 M en etanol al 95 %), colocándolo a ebullición suave y reflujo durante 0.5 horas.

A la mezcla de reacción, resultado de la saponificación, se le adicionaron 50 mL de hexano y 30 mL de agua destilada. Se agitó durante 20 segundos para romper la emulsión y lograr la separación de las fases. El contenido del matraz se vertió en un embudo de separación, se agitó, se separó y se colectó la fase orgánica. Este procedimiento se llevó a cabo 2 veces más, reuniendo las fracciones hexánicas obtenidas en cada paso.

Las fracciones hexánicas colectadas se pasaron por un embudo de filtración que contenía sulfato de sodio anhidro para remover el agua presente. El extracto deshidratado se transfirió a un matraz de bola a peso constante, y se evaporó el disolvente hasta llevarlo a sequedad. Se determinó el porcentaje de la fracción insaponificable por diferencia de peso.

El cálculo del porcentaje de la fracción saponificable e insaponificable se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Fraccion} = \left(\frac{W_{mf} - W_v}{P_g} \right) * 100$$

donde:

- Wmf = Masa del matraz con fracción
- Wv = Masa del matraz vacío
- Pg = Peso de la muestra

La fracción insaponificable se colocó en frascos viales ámbar, en atmósfera de nitrógeno y se selló con parafilm. En seguida se almacenó a -4 °C hasta el momento de su análisis.

Análisis cualitativo de esteroides

El análisis cualitativo para determinar esteroides consistió en diluir una porción pequeña de la fracción insaponificable en hexano y se realizó una cromatografía de capa fina, Ver Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Condiciones de Cromatografía en Capa Fina

Elemento	Descripción
Fase Estacionaria	Placas de gel de sílice
Fase Móvil	Mezclas de Hexano, Acetato de Etilo Proporción 70:30 y 90:10
Control C	Mezcla de sitoesterol y estigmasterol
Revelador	Sulfato cérico Radical DPPH

Para éste fin, se llevó a cabo la comparación del Rf estándar contra el Rf experimental. El cálculo del Rf se realizó de acuerdo a:

$$Rf = \frac{D_s}{D_d * F_d}$$

donde:

- D_s = Distancia recorrida por la sustancia.
- W_v = Distancia recorrida por el disolvente.
- F_d = Frente del solvente

Fracción de Ácidos Grasos

La fase acuosa obtenida de la extracción del material insaponificable, se neutralizó con 15 mL de HCl 6 M, se agitó durante 5 minutos y enseguida se le adicionaron 30 mL de Hexano. El contenido del matraz se vertió en un embudo de separación, para realizar la extracción de la fracción hexánica. Dicha fracción se pasó sobre un embudo utilizando como filtro sulfato de sodio anhidro. El filtrado se transfirió en un matraz de bola a peso constante y se evaporó a sequedad. El porcentaje de la fracción se determinó por diferencia de peso. Finalmente, los ácidos grasos obtenidos se vertieron en viales ámbar, en atmósfera de nitrógeno y se selló con parafilm, almacenándolos a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

Preparación de ésteres metílicos

De acuerdo a lo establecido en el Método Oficial del A.O.A.C. Ref. 969.33, se colocaron 400 mg de la fracción de ácidos grasos en un matraz de bola conectado a un condensador, se le adicionaron 7 mL de BF_3 y se llevó a ebullición durante 2 minutos. Se agregaron 5 mL de hexano a través del condensador y se dejó ebullición un minuto más. Se removió del calentamiento y segundos después se retiró el condensador. Se le agregaron 15 mL de solución saturada de NaCl. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos. La fracción hexánica se hizo pasar por un embudo con filtro de sulfato de sodio

anhídrido, se colocó la fracción obtenida en viales ambar, con posterior evaporación del disolvente. Los ésteres metílicos se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno y se sellaron con parafilm. Se almacenaron a -4°C hasta el momento de su análisis.

4.4.1. Análisis Cromatográfico

Fitoesteroles

De acuerdo al resultado del análisis cualitativo, la fracción insaponificable se diluyó aproximadamente a 1 mg/mL en diclorometano grado HPLC. Se inyectó 1 μL en el Cromatógrafo de Gases (CG) con dispositivo de inyección automático, utilizando una columna DB-5MS, la cual cuenta con un diámetro interno de 0.25 mm, 30 m de longitud y una película de 0.25 μm . Las condiciones del método se establecen en Tabla 4.2.

Ácidos Grasos Insaturados

El perfil de ácidos grasos se determinó mediante la inyección de 1 μL de los ésteres metílicos diluídos en diclorometano grado HPLC aproximadamente a 1 mg/mL. Fueron analizados en CG Agilent 6890N y detector FID. Se empleó una columna HP-INNOWAX con diámetro interno de 0.25 mm, 30 m de longitud y 0.25 μm de película. Las condiciones del método se mencionan en Tabla 4.2.

Método de Patrón Interno

Para determinar la concentración de los esteroides y ácidos grasos, es necesario emplear patrones de área para cada curva con respecto a su concentración.

Tabla 4.2: Condiciones Cromatográficas empleadas en el análisis

Descripción	Fitoesteroles	Acidos Grasos Insaturados
Inyector	290 °C 7.96 psi Total Flow: 3.9 mL/min	220 °C 10.70 psi Total Flow: 23.3 mL/min
Programa de T	R_1 : 290 °C/min por 5 min R_2 : 3 °C/min hasta 300 °C por 17 min.	R_1 : 150 °C por 1 min R_2 : 15 °C/min hasta 225 °C por 1 min R_3 : 5 °C/min hasta 260 °C
Detector FID	325 °C H_2 : 45 mL/min N_2 : 5 mL/min Aire: 400 mL/min	275 °C H_2 : 40 mL/min N_2 : 20 mL/min Aire: 450 mL/min

Con los valores de área de picos característicos obtenidos para cada muestra y los factores de respuesta (Fr), se calcula:

$$Fr = \left(\frac{A_{ref}}{C_{ref}} \right)$$

donde:

- A : Área del compuesto
- C : Concentración del compuesto
- Fr: Factor de respuesta

La concentración problema estará dada en función del factor de respuesta correspondiente al compuesto en estudio.

Análisis Estadístico

Con los resultados obtenidos en las diferentes evaluaciones se aplicó el análisis estadístico correspondiente. En primer lugar se calcularon los valores promedios y su desviación estándar.

Se establecen las hipótesis:

Ho: No existe diferencia significativa entre las muestras de aguacate en estudio.

Hi: Si existe diferencia significativa entre las muestras de aguacate en estudio.

Para generar la información que permitiera aceptar o rechazar las hipótesis, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en Anexo II.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1. Etapa I

Inspección Visual

En México se encuentra una gran cantidad de tipos criollos de aguacate, los que aquí se evaluaron provienen de las regiones de los estados de Michoacán, Morelos, Puebla y Estado de México. Se consideraron éstas regiones debido a que son entidades que concentran aproximadamente el 92 % del total de la superficie cosechada a nivel nacional.

El aguacate Hass se toma como referencia para establecer diferencias en las características de la variedad criolla, debido a que es la variedad de mayor consumo, con rendimientos, características agronómicas, condiciones de post-cosecha y comercialización ya establecidos.

De acuerdo a Razeto y Roldán (1999), el aguacate Hass tiene gran demanda en el mercado nacional e internacional por ser la principal variedad cultivada en los centros de producción de mayor importancia, pero sobretodo porque cuenta con características que lo hacen atractivo al consumidor, ésto es, grosor y color de la cáscara (media rugosa y tono negro opaco), su forma característica (ovoide-piriforme) y un peso promedio de 198 gramos.

En las Tabla 5.1 se encuentran los resultados de la evaluación a las muestras de estudio. Se confirma la diferencia en gramaje entre las variedades, (Ver Figura 5.1), destacando el Hass con 200 g. El gramaje del fruto de la variedad criolla se reporta en literatura en el intervalo de 47.2 a 273 gramaje. Los valores obtenidos en las muestras de la variedad criolla presentan un rango de 104 a 112 gramos, aunque se aprecia, se encuentran en la media del intervalo reportado, mencionado, los pesos de éstos frutos representan apenas el 46 % del peso del aguacate Hass (198 a 200 gramos). Entre las variedades se evalúa que estadísticamente son diferentes significativamente.

Muestra	Forma	Peso (g)	Diámetro (cm)	Longitud (cm)	diam/long
Hass	Piriforme	200.0 ± 11.23	9.52 ± 0.47	13.78 ± 0.62	0.69
Edo. de México	Piriforme	104.17 ± 9.2	7.56 ± 0.62	9.54 ± 0.54	0.79
Michoacán	Piriforme	112.01 ± 9.42	8.55 ± 0.83	10.85 ± 0.48	0.78
Morelos	Piriforme	106.4 ± 6.7	7.04 ± 0.4	8.8 ± 0.57	0.8
Puebla	Obovata	110.65 ± 12.25	6.54 ± 0.55	9.64 ± 0.3	0.68

Tabla 5.1: Características morfológicas

Mediante el análisis estadístico se aprecia que existe diferencia significativa entre las variedades en el gramaje, pero no existe diferencia entre las muestras criolla (Ver Anexo III).

La relación diámetro-longitud, reportada en la Tabla 5.1 ayuda a observar que a pesar de contar con valores diferentes en gramaje, existe una proporcionalidad en las características. Se puede estimar que el diámetro del fruto se mantiene en proporción a la longitud, el comportamiento es similar entre las muestras, a pesar de ser tratarse de dos variedades.

Las muestras de aguacate criollo de las regiones de los estados de México, Michoacán y

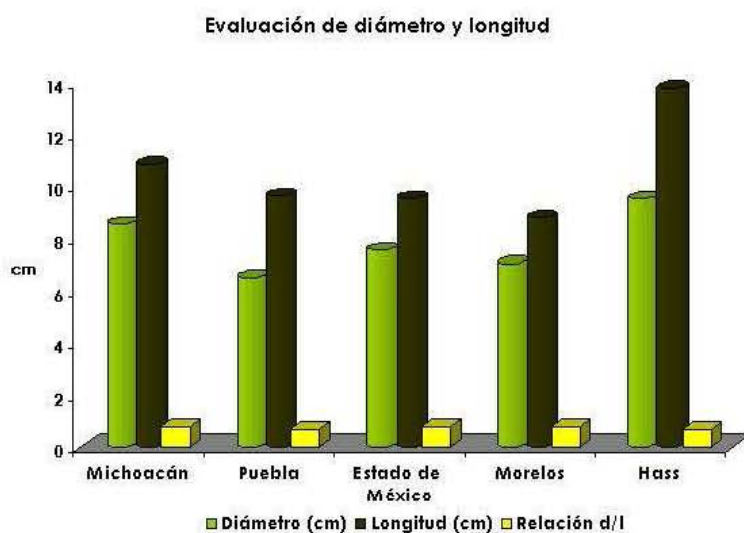
Figura 5.1: Gramaje de muestras de aguacate



Morelos presentan valores de relación diámetro-longitud en el intervalo de 0.79 a 0.8, se observa similitud en éstas muestras, a pesar de provenir de diferentes regiones. Para la variedad Hass el comportamiento fue similar al aguacate criollo de Puebla (0.69 y 0.68 respectivamente), lo cual implica que aunque la variedad Hass es la muestra con mayor gramaje, la relación de sus características es similar a la variedad criolla, pues difiere en 0.1, por lo que tanto en diámetro como en longitud para ambas variedades, se mantiene una relación proporcional. De ésta relación, notamos que a medida que el valor de la relación disminuye, la diferencia en centímetros entre las características aumenta.

La variación en las dimensiones entre muestras, puede deberse a que cada región donde es cultivado presenta peculiaridades típicas, relacionadas con el medio ecológico en el que se desarrollan. Por análisis de varianza podemos confirmar éste hecho, dado que el tipo criollo con respecto al aguacate Hass, se presenta una diferencia promedio de 3 a 4 cm.

Figura 5.2: Características del aguacate



En lo que se refiere a la variedad criollo, puede presentarse al fruto que proviene del estado de Michoacán, como el de características más atractivas, puesto que cuenta con mayor gramaje, diámetro y longitud. Aunque se trata de la misma variedad, podemos estimar que una de las posibles causas de variación en los frutos es la región en la que son cultivados e influencia sobre sus características.

Si se enlista en orden de importancia a los frutos criollos, podemos mencionar que el gramaje del ejemplar de estado de Michoacán representa aproximadamente el 53 % del peso de la variedad Hass. En seguida se encuentran las muestras de los estados de Puebla, Morelos y finalmente del Estado de México. A pesar de ello, es preciso mencionar que el aguacate de la región del estado de México presenta los valores más bajos en gramaje, pero mantiene una relación de longitud y diámetro promedio.

En cuanto a la morfología de los frutos, observamos que las diferentes regiones del país albergan una diversidad genética en aguacate, resultado de la variabilidad de la raza e inclusive del hábitat en el que se desarrollan (Sánchez, 1999).

De acuerdo a Roldán (1999), en Michoacán, se tiene un marco geográfico altamente variado que da origen a varios microclimas que coadyuvan al desarrollo de una alta variabilidad genética natural, lo que puede generar un gran impacto sobre las características organolépticas y bioquímicas del tipo criollo y Hass.

Componentes del Fruto

La Figura 5.3 y la Tabla 5.2, muestran los porcentajes de pulpa y semilla obtenidos del proceso de separación. El aguacate Hass presentó para la porción comestible (pulpa) el 75 %, en tanto que para semilla el 12.2 %. Lo anterior confirma lo establecido por García y Ramos (1999) ya que destacan que la pulpa puede representar del 75 al 80 % del fruto y la semilla aproximadamente del 12.1 al 15 %.

El comportamiento de la variedad criolla es muy similar a lo reportado en literatura, pues se establece que los tipos criollos cuentan con menor espesor y peso en pulpa, ésta fracción representa aproximadamente el 65 % del peso total, mientras que la semilla es más grande y globulosa, que la variedad Hass. En el aguacate criollo, encontramos un intervalo del 64 al 70 % en pulpa y 21 al 28.87 % en semilla, Ver Tabla 5.2.

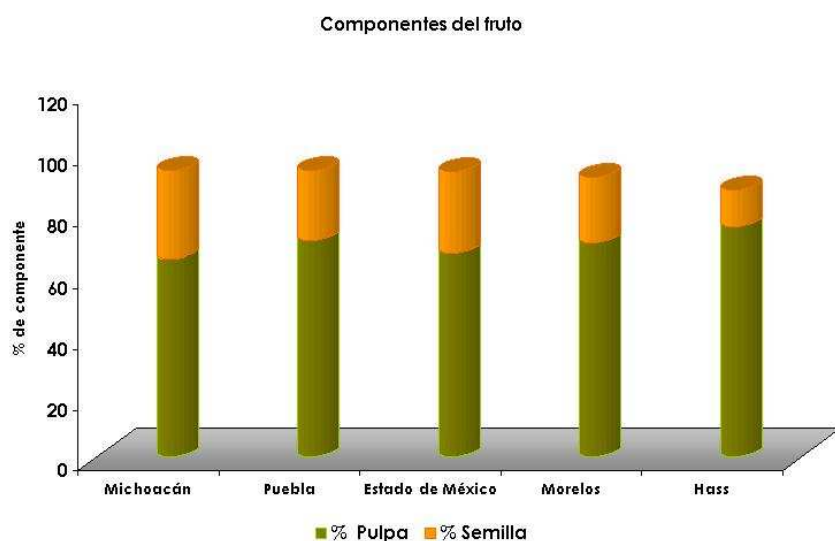


Figura 5.3: Porcentajes de pulpa y semilla en el aguacate criollo

Tabla 5.2: Porcentajes de componentes del aguacate criollo

Muestra	% Pulpa	% Semilla
Hass	75.08 ± 2.06	12.27 ± 1.91
Edo. de México	66.55 ± 3.89	26.87 ± 2.88
Michoacán	64.76 ± 1.65	28.87 ± 0.89
Morelos	69.89 ± 0.86	21.6 ± 1.55
Puebla	70.75 ± 3.40	22.93 ± 3.91

Entre las muestras de la variedad criolla se observa que el aguacate de la región de Puebla presenta un mayor porcentaje de pulpa (70.75 %), con un valor bajo de semilla (22.93 %). Seguido del aguacate del estado de Morelos con 69.89 %-21.6 % (pulpa-semilla). Estas dos muestras destacan por la porción comestible y valores bajos en semilla, contrastan con las muestras del Estado de Michoacán y México, las cuales presentan un porcentaje de pulpa bajo (64 a 66 % respectivamente) y un elevado porcentaje de semilla (28.87 y 26.87 % respectivamente).

Si se considera que el porcentaje promedio de la semilla es de 15 %, en los valores de las regiones de Michoacán y Estado de México se cuenta con un porcentaje elevado de ésta fracción, por lo que pueden ser consideradas para aprovechar la , ya que semilla según García (1999) son de gran importancia por contar con propiedades farmacológicas.

Determinación de Humedad

En la Tabla 5.3 se enlistan los valores del contenido de humedad evaluados en la pulpa del aguacate (Ver Figura 5.4).

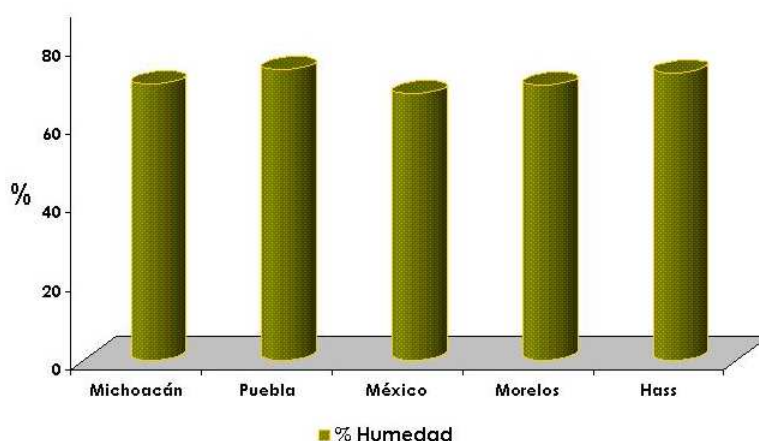


Figura 5.4: Porcentaje de Humedad en la pulpa del aguacate criollo

Tabla 5.3: Porcentaje de Humedad en pulpa de aguacate

Muestra	% Humedad
Hass	73.05±2.16
Edo. de México	67.74±3.27
Michoacán	70.21±2.92
Morelos	69.92±2.19
Puebla	73.91 ±1.87

Olaeta (1999) reporta que la humedad del fruto está relacionada con el contenido de aceite, ya que en el desarrollo de éste, a medida que la humedad decrece, existe un incremento en el contenido de aceite. Lo que puede ser utilizado como un índice de madurez y donde la palatabilidad pueda ser controlada o bien afectada. De acuerdo a lo evaluado, el porcentaje de humedad osciló entre los 64.74 % a 73.91 %, valores que se encuentran dentro del rango reportado por Sinyinda (1998) para éste fruto.

Las muestras del estado de Puebla y el aguacate Hass tienen los valores más elevados (73.91 y 73.05 % respectivamente). La muestra del Estado de México registró el valor más bajo con 67.74 %. Debido a que en valor no se aprecia si existe diferencia entre las muestras, se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente, en el cual se obtiene que Hass, Puebla, Michoacán y Morelos son diferentes estadísticamente a la muestra del Estado de México.

5.2. Etapa 2

Obtención y cuantificación del extracto etéreo

Según Duchateau (2004), el método más empleado para aislar el material lipídico, que contiene los compuestos de interés (esteroles y ácidos grasos), es la extracción con solventes, empleando la extracción húmeda, tomando en cuenta la polaridad de los compuestos y su solubilidad relativa con el solvente orgánico, por ello, en el presente estudio, se utilizó ésta técnica.

El resultado promedio de los extractos obtenidos se muestra en la Figura 5.5 y se recopila en la Tabla 5.4, se aprecia que el contenido de aceite en la pulpa es mayor que el obtenido en la semilla. Se confirma lo reportado en literatura, 18 y 20 % de aceite en pulpa y en promedio 3 % en semilla. Aunque son datos promedio reportados para el aguacate Hass, la variedad criolla se comporta de forma similar.

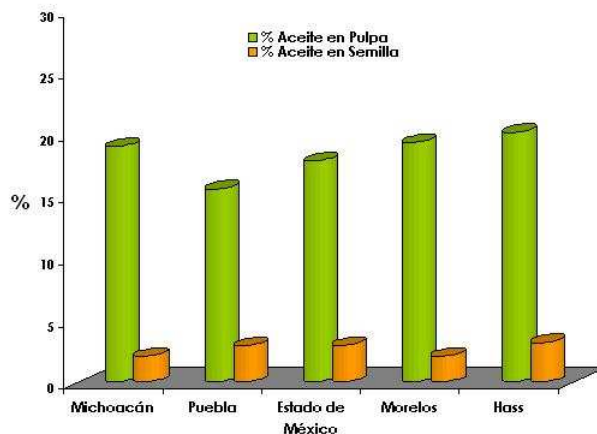


Figura 5.5: Porcentaje de aceite en pulpa y semilla del aguacate

Tabla 5.4: Porcentajes de aceite en la pulpa y semilla del aguacate

Muestra	% Aceite en Pulpa	% Aceite en Semilla
Hass	20.18 ± 0.09	3.21 ± 0.28
Edo. de México	17.85 ± 0.97	2.9 ± 0.15
Michoacán	19.03 ± 0.58	2.10 ± 0.38
Morelos	19.36 ± 0.22	2.1 ± 0.17
Puebla	15.58 ± 0.24	2.95 ± 0.06

Como anteriormente se mencionó, Oleata (1999) señala que en el umbral de la fase de desarrollo del fruto se obtiene el mayor contenido de aceite, afirma que existe una estrecha relación entre el porcentaje de humedad y el contenido de aceite, por lo que a valores elevados de humedad, menor concentración de aceite.

De la extracción a las fracciones del fruto, notamos el comportamiento mencionado por Olaeta en la relación humedad- % aceite aplica para la muestra del estado de Puebla,

donde el porcentaje de aceite es de 15 % (el menor obtenido para la variedad criolla) y 73 % en humedad (el mayor porcentaje evaluado en éste estudio).

La discrepancia notable con respecto a lo reportado por Olaeta se tiene para la muestra del Estado de México, la cual, a pesar de contar con el valor más bajo en humedad, 67 %, presenta un porcentaje de aceite muy bajo, 17 %. Esto puede ser resultado del momento de recolección, puesto que si se colecta después de tiempo, ya maduro, la humedad se vería afectada y por ende, el contenido de aceite. Varios autores señalan que la variación en ésta relación depende de factores como zona geográfica de cultivo, época y cosecha del fruto, temperatura y tratamiento post-cosecha, entre otros.

Es importante considerar que la relación, humedad- % aceite, influye en la composición del fruto y el contenido de lípidos, pero que además proporciona información sobre la calidad del fruto.

En la pulpa, el aguacate, variedad Hass y de los estados de Michoacán y Morelos presentaron un comportamiento apegado a literatura, con un porcentaje de aceite (cerca a 20 %) y un bajo porcentaje de humedad (aproximadamente 19 % aceite y 70 % de humedad). Lo anterior da indicios de que éstas muestras cuentan con madurez similar, a pesar de las condiciones post-cosecha y la selección aplicada.

Del análisis estadístico aplicado al contenido de aceite de pulpa se obtiene, que el aguacate Hass es diferente significativamente a las muestras de la variedad criollo. Entre los tipos criollo, las muestras de los estados de Morelos y Michoacán no presentan diferencia significativa entre ellas, pues el porcentaje de aceite en pulpa es similar, aproximadamente del 19 %, en cambio las muestras del Estado de México y Puebla cuentan con los porcentajes de aceite bajos, 17.8 y 15.5 % respectivamente.

Con respecto a otros frutos, podemos mencionar que el aguacate cuenta con una concen-

tración aceptable de grasa. En la Tabla 5.5 se encuentra un comparativo del contenido de grasa de diversos frutos, enlista frutos tropicales que destacan por pertenecer al grupo de frutas exóticas, que han empezado a proliferar en los mercados occidentales debido a que cuentan con sabores, colores, aromas y formas característicos, pero sobretodo, por su composición, ricas en general en vitaminas y minerales, con bajos valores en grasa y aportación calórica.

Tabla 5.5: Porcentajes de aceite en diversos frutos

Muestra	% aceite
Aguacate Hass	20.18
Aguacate Criollo	19.03
Almendra	54
Manzana	0.6
Plátano	1.4 a 0.2
Kiwi	0.6
Melón	0.1

En semilla, se puede apreciar que las muestras provenientes del Estado de México, Puebla y la variedad Hass presentan el porcentaje de aceite en el intervalo del 3.2 a 2.9 % y estadísticamente, no presentan diferencia significativa, pero sí presentan diferencia significativa con respecto a las muestras de Michoacán y Morelos que reportan valores de 2.1 %. En éste punto podemos apreciar que las muestras provenientes de éstas regiones se comportan de manera similar en el porcentaje de aceite en pulpa y humedad.

Lo anterior se presenta de acuerdo a García (1999), quien establece que una de las razones por las que el contenido de aceite en semilla es bajo, es debido a que almacena una gran cantidad de gránulos de almidón en las células de parénquima y apenas unas cuantas gotas de grasa.

Obtención de las fracciones insaponificable y de ácidos grasos

Tanto en la porción comestible (pulpa) como en semilla se observa que la fracción de predominio en el proceso de saponificación es la fracción que contiene ácidos grasos -mayor al 85 %-, en tanto que la fracción insaponificable representa apenas del 1 al 9 %.

De acuerdo a Paresh (2004), la saponificación es la reacción más frecuentemente empleada en aceites para lograr la conversión de los ésteres (disociación) a ácidos libres y alcoholes. En la fracción que contiene ácidos grasos encontraremos los ácidos libres y en la insaponificable estarán presentes esteroides, probablemente libres o como mezclas complejas.

Pulpa

La fracción de ácidos grasos en pulpa presentó un rango amplio de valores (86.7 a 96.3 %). En la Figura 5.6 y en la Tabla 5.6 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación. Se encontró que el aceite de la pulpa del aguacate del estado de Michoacán cuenta con el mayor porcentaje, 96.3 % en la fracción de ácidos grasos y Puebla con el menor, 86.7 %. El análisis de varianza reporta que las cantidades obtenidas en cada muestra, presentan diferencia significativa.

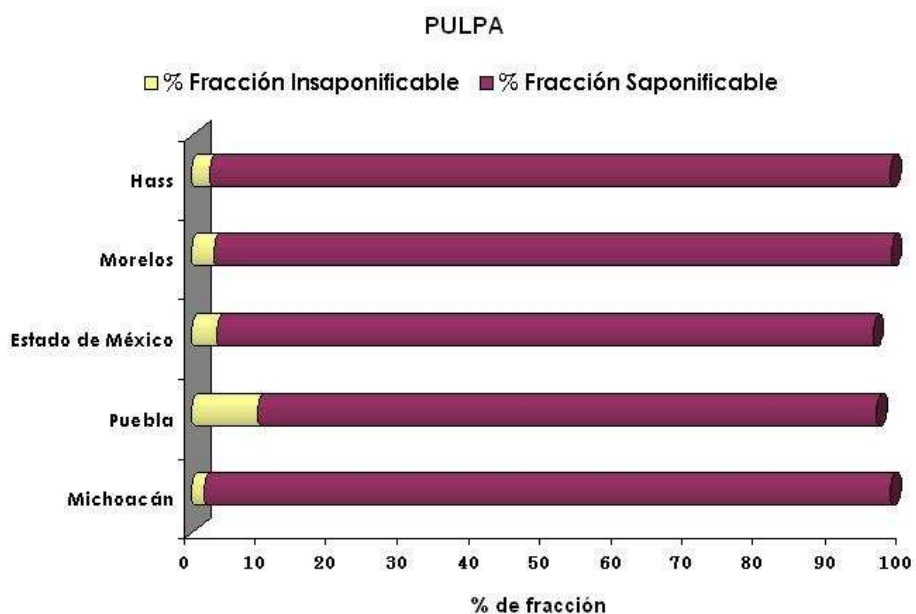


Figura 5.6: Fracción insaponificable y de ácidos grasos en pulpa de aguacate

Tabla 5.6: Fracciones insaponificable y de ácidos grasos en aceite de la pulpa de aguacate

Muestra	% f. insaponificable	%f. ácidos grasos
Hass	2.6±0.12	95.5±1.68
Edo. de México	3.45±0.29	92.11±1.68
Michoacán	1.78±0.35	96.3±0.63
Morelos	3.18±0.17	94.96±1.58
Puebla	9.25±0.36	86.75±5.43

En la fracción insaponificable presente en el aceite de pulpa se observa un intervalo de 1.78 a 9.25 %, Para la muestra del estado de Puebla se obtuvo el 9.25 %, mientras que el aceite de la pulpa de aguacate del estado de Michoacán cuenta con 1.78 %, el menor porcentaje en ésta fracción. Del análisis estadístico, se observó existe diferencia significativa entre variedades y entre las muestras de aguacate criollo.

Semilla

El contenido de la fracción de ácidos grasos del aceite de semilla tiene un intervalo de 80 a 92 %, en tanto que la fracción insaponificable presentó valores de 2.9 a 12.9 %. Con diferencia significativa entre las variedades y las muestras de aguacate criollo.

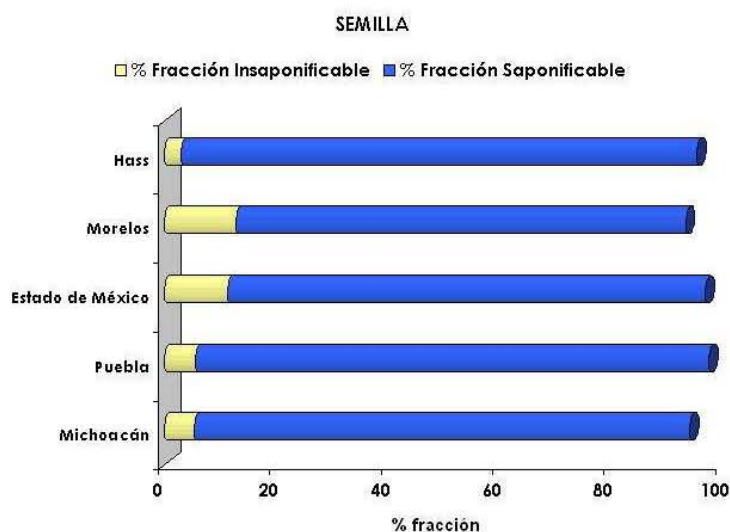


Figura 5.7: Fracciones presentes en el aceite de semilla del aguacate.

En la Figura 5.7 y Tabla 5.7 observamos que a diferencia de la pulpa, la semilla cuenta con valores apreciables en la fracción insaponificable, sobretodo, las muestras provenientes de los estados de Morelos (12.9 %) y Michoacán (11.24 %). Por reportes de García (1999), se sabe que éste incremento se debe a la presencia de gran cantidad de compuestos polifenólicos y esteroides, aunque represente apenas el 15 a 25 % del peso

total del fruto, la semilla puede ser propuesta como materia prima rentable para la extracción de ésta fracción y sus componentes. Las muestras de los estados de Puebla y Michoacán presentan valores menores, con 5.6 y 5.2 % respectivamente. Es importante señalar que a pesar de considerarla muestra referencia, la variedad Hass, cuenta con una fracción insaponificable pobre (2.97 %).

Tabla 5.7: Fracciones presentes en el aceite de semilla de aguacate

Muestra	% f. ácidos grasos	% f. insaponificable
Hass	92.3 ± 0.93	2.97 ± 0.6
México	85.7 ± 1.11	11.24 ± 0.55
Michoacán	88.93 ± 0.8	5.2 ± 0.35
Morelos	80.42 ± 1.51	12.9 ± 0.6
Puebla	91.93 ± 1.41	5.61 ± 0.22

Identificación y cuantificación de Fitoesteroles

Las placas cromatográficas se consideran una herramienta útil para el análisis preliminar de la fracción insaponificable, la cual será sometida a un proceso de separación más específico al ser empleada, como la cromatografía de gases (CG). Debido a que se trata de un método clásico de separación, la fase estacionaria (sílica) y la fase móvil (mezclas de Hexano-Acetato de Etilo) tienen una función muy importante, ya que la separación de la fracción insaponificable va a depender de la polaridad de cada uno de los compuestos presentes en dicha fracción, pero sobretodo de su afinidad e interacción entre fases.

De acuerdo a Duchateau (2004), el orden de elución en éste tipo de sistemas es, con un mayor r_f los alcanos, seguidos de los ésteres de esteroles, triacilglicéridos y los esteroides libres. En la Figura 5.8 se observa que en la fracción insaponificable del aceite de pulpa

de aguacate criollo existe una gran variedad de compuestos. Para observar el recorrido de las muestras se empleó una fase móvil de Hexano:Acetato de Etilo, en proporción 90:10, para elución. En la placa se aprecia como referencia una línea, punto de partida o de aplicación, donde se identifican en orden las muestras a separar, por ejemplo, el punto C (Control: Mezcla de esteroides).

Las muestras fueron aplicadas en las placas cromatográficas en el siguiente orden:

- C: Control (mezcla de sitoesterol y estigmasterol)
- H: Aguacate Hass
- M: Michoacán
- m: Morelos
- P: Puebla
- E: Edo. de México

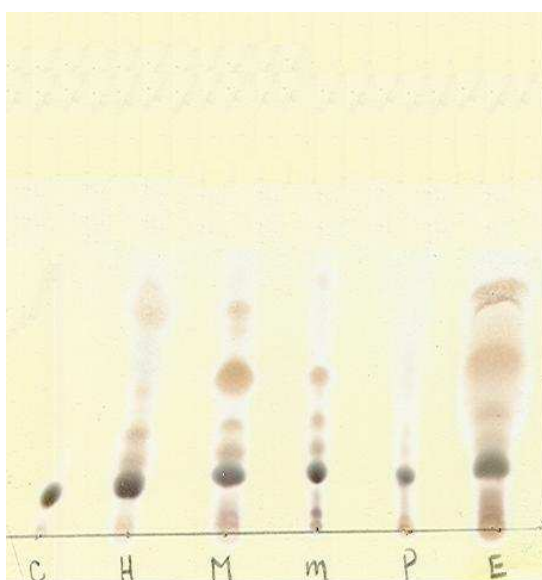


Figura 5.8: Cromatoplaqueta de la fracción insaponificable del aceite de pulpa de aguacate criollo

En la Tabla 5.8, se registran los valores de Rf de la fracción insaponificable para el aceite de pulpa de aguacate. El Rf del control (C: mezcla de esteroides) tiene un valor de 0.17 y presenta un color gris característico al mezclarse. A ésta misma altura se manifiestan compuestos de comportamiento similar a esteroides, presentes en las muestras de estudio, por lo que al realizar el cálculo de Rf observamos que las muestras de la fracción insaponificable cuentan con un Rf experimental similar al obtenido para el aguacate variedad Hass y que muy probablemente sean los compuestos de interés.

Tabla 5.8: Rf de compuestos del insaponificable del aceite de pulpa

Muestra	Rf experimental
Estándar (C)	0.17
Hass	0.17
Michoacán	0.17
Morelos	0.17
Puebla	0.17
Edo. de México	0.16

En las cromatoplasmas de las fracciones insaponificables de las semillas de aguacate, Figura 5.9, marcadas como A y B, se aprecian claramente compuestos con un Rf semejante al estándar (C). Así mismo se observa el movimiento de los compuestos (no polares, afines hexano:acetato de etilo). La distancia recorrida por la muestra fue la misma que la mezcla del estándar recorrió por lo que nos dió pauta para estimar preliminarmente la presencia de esteroides y continuar con el análisis y confirmar la concentración de éstos en cada muestra, usando la cromatografía de gases.

En la placa A (Ver Figura 5.9) se empleó como revelador, sulfato cérico, con esto podemos observar el movimiento de los compuestos obteniendo una pequeña fase de color gris oscuro sobre la fase estacionaria. Notamos que la muestra del material insaponificable del aceite de aguacate del estado de Morelos presenta gran diversidad de com-

puestos, los cuales se marcan con diferente coloración al reaccionar con el revelador. En la placa B se reveló con radical DPPH, empleado en la identificación de compuestos antioxidantes. En la parte superior, notamos una fase de color amarillo, característico de los compuestos con actividad antioxidante, además de encontrarse a mayor distancia de los compuestos de interés, es decir cuentan con un patrón de elución poco polar.

En éstas placas se trabajó con un sistema en proporción 70:30 de Hexano:Acetato de Etilo, para lograr una mejor separación de los compuestos presentes en la fracción.

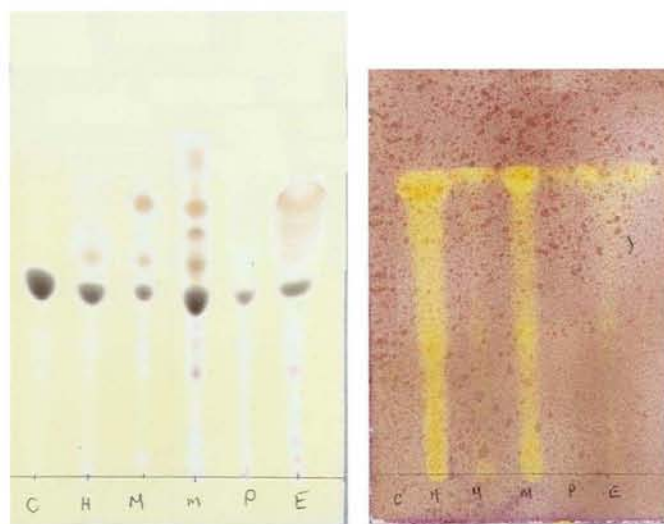


Figura 5.9: Cromatoplasmas de fracciones insaponificables del aceite de semilla de aguacate criollo

Cuantificación de esteroides

Debido a que la Cromatografía de Gases es un método útil y eficiente para la caracterización de lípidos y específico para muestras que contienen esteroides (Duchateau, 2004), fue empleado en éste ensayo.

El análisis cromatográfico de la fracción insaponificable se realizó comparando los tiempos de retención con los estándares inyectados previamente y a través de las curvas patrón de los compuestos de interés, se logró su cuantificación. De acuerdo a Duchateau et al. (2004) la identificación de los esteroides depende de la separación de éstos de acuerdo a su punto de ebullición.

En la Tabla 5.9 se presentan las concentraciones de fitosteroides en las diferentes muestras de aguacate. Las concentraciones se obtuvieron al cuantificar las áreas de los picos generados en los tiempos de retención característicos para los compuestos presentes en la fracción insaponificable, interpolando en las curvas estándar de cada esteroide.

Tabla 5.9: Contenido de fitosteroides presentes en las fracciones insaponificable del aceite de pulpa y semilla del aguacate

Muestra	PULPA		SEMILLA	
	β -sitosterol (mg/100 g muestra)	estigmasterol (mg/100 g muestra)	β -sitosterol (mg/100 g muestra)	estigmasterol (mg/100 g muestra)
Hass	92.4±1.45	46.5±0.89	58.5 ±0.69	26.7 ±0.78
Michoacán	87.68±	32.40±3.09	51.60 ±0.22	20.15 ±0.45
Morelos	79.80±6.78	47.8 ±1.08	47.2 ±1.87	29.45 ±1.33
Puebla	94.60±3.76	38.2 ±0.50	49.25 ±0.87	23.9 ±0.46
Edo. de México	76.30±4.61	44.1 ±0.66	41.5 ±1.49	18.6 ±2.32

Mediante el análisis estadístico se determinó que las muestras son diferentes entre sí, en particular encontramos que el aguacate Hass presenta los valores de mayor concentración, tanto en la fracción insaponificable de la pulpa como de la semilla.

Si se toma como referencia al aguacate Hass presenta valores de esteroides de 92 mg de sitoesterol/100 g de muestra y 46 mg de estigmasterol/100 g de muestra en pulpa, muy similar a lo reportado por Pacetti (2006). De los tipos criollos el valor más alto en concentración de sitoesterol, lo presenta el aceite de pulpa del aguacate del estado de Puebla con 94.6 mg/100 g , el resultado obtenido es importante, ya que contiene una fracción insaponificable, elevada, 9.25 %, lo que nos permite predecir que a mayor porción insaponificable, la concentración de los compuestos de interés será proporcional. Le sigue el aceite de la pulpa del estado de Michoacán con 87.68 mg de sitoesterol, con un fracción insaponificable intermedia, 3.18 % (Ver Figura 5.10).

En cuanto al estigmasterol, observamos que el aceite de aguacate del estado de Morelos es la muestra que presenta mayor concentración, con 47 mg/100 g de muestra, e incluso supera la reportada para aguacate Hass (46 mg/100 g de muestra), ambos con una fracción insaponificable intermedia (3.18 y 2.6 %, respectivamente).

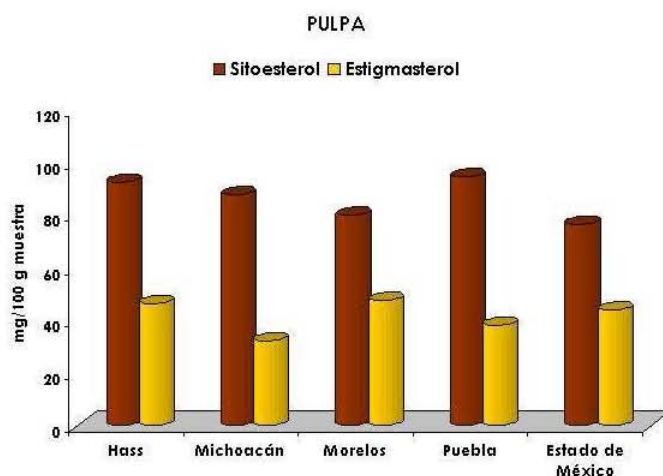


Figura 5.10: Concentración de esteroides en la pulpa del aguacate criollo

En la semilla de la variedad criollo, fue el eceite de aguacate del estado de Michoacán el que destacó en el contenido de sitoesterol, con 51.6 mg/100 g, para el aguacate Hass, se presenta 58 mg de sitoesterol/100 g, Ver Figura 5.11.

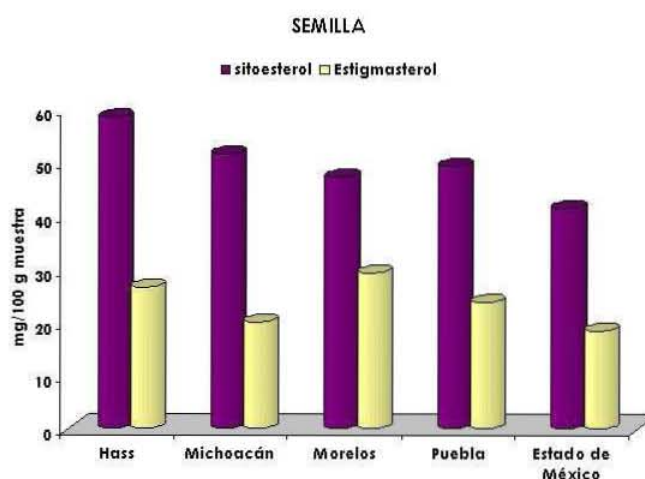


Figura 5.11: Concentración de esteroides en la semilla del aguacate

En particular, la semilla del estado de Morelos se caracterizó por su alto contenido en material insaponificable, pero baja concentración de sitoesterol o compuestos de nuestro interés, sin embargo, la placa cromatográfica donde se empleó DPPH indica la presencia de otro tipo de compuestos, como polifenoles y tocoferoles, según se reporta por García (1999), (Ver Figura 5.9), por lo que pueden considerarse materia prima importante para la extracción de éste tipo de compuestos.

La concentración de estigmasterol en la fracción insaponificable del aceite de semilla destacó en el Estado de Morelos con 29.45 mg, pero en general se observa que éste compuesto presenta contenido bajo.

En la Figura 5.10 se presenta el contenido de esteroides, se encontró que el estigmasterol está presente en menor concentración, tanto en el aceite de pulpa como en el aceite de semilla. Se estima que el sitoesterol se encuentra aproximadamente en el 42 % en la fracción insaponificable, en tanto que el estigmasterol representa el 20 % de ésta. Confiando así que el compuesto que predomina es el sitoesterol.

Aunque sabemos que teóricamente la principal fuente de esteroides son los aceites vegetales, en especial, la madera. Moreau (2002) indica que aceites comerciales como el de maíz y aguacate, contienen los más altos niveles de esteroides (1 a 2 %). En la variedad criolla, podemos estimar se obtendrían 0.76 a 0.94 gramos de sitoesterol y 0.32 a 0.47 gramos de estigmasterol/100 g de muestra, cantidades significativas, que representarían una muy buena contribución al mercado de los alimentos funcionales. Si se realiza una comparación con otras fuentes que destacan por su concentración en esteroides, encontramos que el aguacate criollo, supera a otros frutos, Ver Tablas 5.10 y 5.11.

Tabla 5.10: *Contenido de sitoesterol en diferentes frutos*

FRUTO	Sitoesterol (mg/100 g muestra)
Aguacate Hass	920
Aguacate Criollo	940
Manzana	130
Plátano	84-120
Naranja	170-200

La fracción insaponificable del aceite de aguacate criollo cuenta con un valor cercano al que se reporta para el aceite de oliva (1.3 g de sitoesterol y 0.014 g de estigmasterol), (Weber, 2006). Si se considera que la ingesta recomendada es de 200 a 400 mg de esteroides por día, podemos decir que 100 gramos de aguacate proveerían aproximadamente 6.13 % de lo requerido para poder actuar en la reducción de la absorción de colesterol.

Tabla 5.11: Contenido de fitoesteroles en aceites

FRUTO	Sitoesterol (g)	Estigmasterol (g)
Aguacate Hass	0.92	0.46
Aguacate Criollo	0.94	0.38
Aceite de Maíz	1 a 2	-
Aceite de Oliva	1.3	0.014

El sitoesterol y estigmasterol son considerados desmetilesteroles, que es la clase más abundante de esteroides en plantas, pues constituyen más del 85 % de los esteroides totales en aceites crudos vegetales. En éste estudio confirmamos su presencia. En la Figura 5.12 se encuentra un ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis por Cromatografía de Gases, en éste se aprecian los picos característicos para los esteroides.

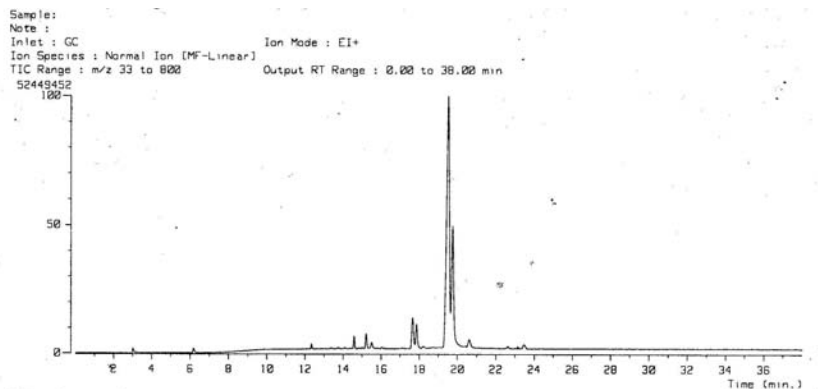


Figura 5.12: Cromatograma de esteroides obtenido mediante Cromatografía de Gases

Identificación y cuantificación de ácidos grasos

Pulpa

En la Tabla 5.12 se recopilaron las concentraciones de los ácidos grasos en ésta fracción. El perfil lipídico del aguacate Hass fue: C 16:0, C 18:0 y C 20:0 (ácidos grasos saturados); C 16:1, C 18:1 y C 18:2 (ácidos grasos insaturados).

Se nota diferencia con respecto a la variedad criolla, tanto en concentración como en composición, y estadísticamente, se confirmó la diferencia significativa entre muestras (Ver Anexo II).

Tabla 5.12: Ácidos grasos presentes en el aceite de pulpa del aguacate

Componente (g/kg)	Hass	Michoacán	Morelos	Puebla	México
C 12:0	-	-	-	1.78 ± 0.07	-
C 14:0	-	0.606 ± 0.12	0.61 ± 0.16	1.46 ± 0.12	-
C 16:0	157.37 ± 0.15	123.45 ± 0.11	75.72 ± 0.31	59.12 ± 1.35	43.46 ± 0.07
C 16:1 n-7	224.63 ± 0.25	285.29 ± 0.13	151.73 ± 0.24	173.35 ± 0.41	120.76 ± 0.11
C 18:0	77.91 ± 1.98	49.26 ± 0.16	46.61 ± 0.96	43.17 ± 2.21	19.09 ± 0.13
C 18:1	721.06 ± 0.22	726.13 ± 0.17	741.81 ± 0.56	700.91 ± 0.6	203.3 ± 1.26
C 18:2	147.56 ± 0.21	90.55 ± 0.26	64.33 ± 1.21	142.16 ± 0.29	40.33 ± 2.11
C 20:0	10.21 ± 1.04	9.23 ± 0.21	1.59 ± 0.29	17.13 ± 0.06	-

La muestra que al ser comparada con la variedad Hass presenta ventajas en éste parámetro, es la proveniente del estado de Puebla, pues presenta en su composición, ácidos grasos saturados como C 12:0, C 14:0, C 16:0, C 18:0 y C 20:0 y ácidos grasos insaturados como palmitoléico (C 16:1), oléico (C 18:1) y linoléico (C 18:2). Se aprecia que contiene una mayor concentración para C 18:2 (linoléico), con 142.16 g/Kg aceite, valor que supera a las otras muestras de estudio y que inclusive es muy similar al valor encontrado en el aguacate variedad Hass (147.56 g/Kg aceite).

La muestra del estado de Morelos presentó la mayor concentración de C 18:1, con 741.81 g/Kg aceite, en tanto que el aguacate variedad Hass contiene 721.06 g de ácido oleico/Kg aceite. De acuerdo a lo reportado por Olaeta (1999), se confirma que el ácido

graso insaturado mayoritario en el aceite extraído de la pulpa es el ácido oléico (C18:1) y el de menor concentración es el ácido linoleico (C 18:2).

De acuerdo a la Figura 5.13, se observa que el contenido de ácidos grasos insaturados en el aceite de pulpa de aguacate es de alrededor de 85 % y que de éstos, el de mayor presencia en la fracción de ácidos grasos es el ácido oléico, el cual constituye aproximadamente el 65 %, seguido del ácido linoléico y palmitoléico con 21 y 12 %, respectivamente. Estos valores son aceptables si se comparan a lo reportado para el aceite de oliva, ya que presenta 75.5 % de ácido oléico, 11.5 % de ácido palmítico y un 7.5 % de ácido linoléico. Lo anterior es un indicio de las ventajas que puede presentar el aceite de aguacate de la variedad Hass, pero sobretudo el aceite proveniente del aguacate variedad criolla, ya que presenta resultados de relevancia. Si el aceite de oliva con ésta composición manifiesta beneficios al consumirlo, es muy probable que el aceite de aguacate tenga los mismos efectos.

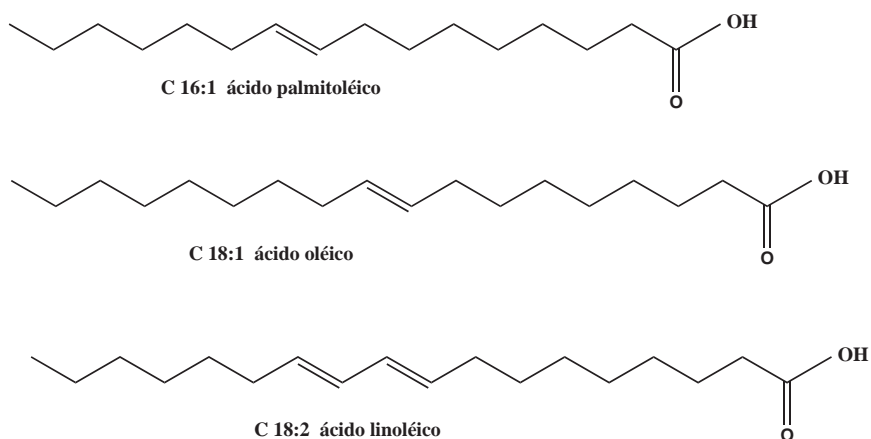


Figura 5.13: Ácidos grasos presentes en aceite de pulpa del aguacate

En la variedad criolla, si se toma como valor promedio 720 gramos de ácido oléico por kilogramo de aceite, considerando que por un kilogramo de fruto tendríamos en promedio 180 gramos de aceite, entonces por kilogramo de fruta obtendríamos 129.6 gramos de ácido oléico, valor significativo y de interés comercial, pues representa una fuente de

éste compuesto con actividad sobre enfermedades cardiovasculares.

En contraste, la muestra proveniente de la región del Estado de México presentó los valores más bajos, lo que nos hace estimar deficiencias en su composición, ya que no se detectaron C 12:0, C 14:0 ni C 20:0, pero además la concentración de ácido oleico, representa apenas un tercio de lo encontrado para las otras muestras.

Semilla

En la Tabla 5.13, se muestra el contenido de ácidos grasos obtenidos en el aceite de semilla de aguacate. Estadísticamente el aguacate Hass es diferente, pues presenta valores que lo hacen destacar sobre las muestras de la variedad criollo.

Los ácidos grasos insaturados de mayor presencia en la semilla fueron C 18:1 y C 18:2, con claro dominio del C 18:1. Aunque es notorio que la concentración de éste ácido es menor en Hass con respecto al criollo (190.7 g/Kg aceite contra 218 g/Kg aceite). Entre variedades hay diferencia significativa en el contenido de éste ácido. Entre las muestras de la variedad criollo, las provenientes de los estados de Michoacán, Morelos y Puebla no presentan diferencia estadística entre ellas, no así para la muestra del Estado de México, que tiene un valor bajo de éste ácido (110.95 g C 18:1/Kg aceite), además de presentar diferencia con respecto a las muestras evaluadas.

Para el ácido linoléico, la variedad Hass obtuvo 133.56 g ácido/Kg aceite, en tanto no se detectaron ácidos grasos saturados como C 12:0 y C 14:0.

Tabla 5.13: *Acidos grasos presentes en la semilla del aguacate*

Componente (g/kg)	Hass	Michoacán	Morelos	Puebla	México
C 12:0	-	7.42 ± 0.93	-	0.31 ± 1.39	-
C 14:0	-	5.86 ± 0.06	4.52 ± 0.23	0.84 ± 0.06	-
C 16:0	13.25 ± 0.08	6.56 ± 1.12	5.70 ± 0.13	9.55 ± 2.03	10.42 ± 0.27
C 16:1 n-7	80.77 ± 1.28	68.10 ± 2.03	62.47 ± 1.39	59.44 ± 2.95	60.05 ± 1.14
C 18:0	30.50 ± 0.5	32.98 ± 0.24	29.71 ± 1.24	35.74 ± 1.78	11.19 ± 0.32
C 18:1	190.72 ± 0.78	245.18 ± 0.56	201.44 ± 2.08	218.75 ± 4.11	110.95 ± 0.33
C 18:2	133.56 ± 0.57	131.62 ± 1.89	138.65 ± 4.58	75.34 ± 1.55	90.61 ± 0.17
C 20:0	-	-	41.63 ± 2.54	1.21 ± 1.06	-

La fracción que contiene ácidos grasos, proveniente del aceite de aguacate del estado de Michoacán destacó en la concentración de ácidos grasos saturados de cadena corta -C 12:0 y C 14:0- y en ácidos grasos insaturados, C 16:1 (68.1 g/Kg) y C 18:1 (245.18 g/Kg), Ver Figura 5.14.

La cantidad de aceite y fracción saponificable en las muestras de los estados de Michoacán y Morelos presentan valores bajos, pero a pesar de ello, ambas muestras destacaron en la concentración de ácidos grasos insaturados, C 16:1 y C 18:1.

La muestra que presentó un alto contenido de aceite y fracción saponificable elevada fue proveniente del estado de Puebla, en éste punto destaca en la mayor concentración de C 18:2 y de ácidos grasos saturados como C 14:0 y C 20:0.

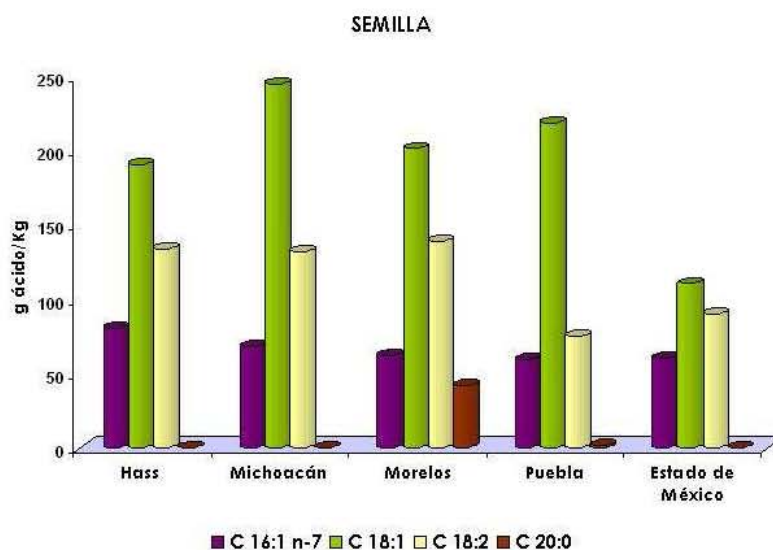


Figura 5.14: Concentración de ácidos grasos insaturados en aceite de semilla de aguacate

El aguacate cuyo origen es el estado de México, presenta los valores más bajos, tanto en pulpa como en semilla, lo que implica que, de las cuatro muestras en estudio, ésta es la de composición más pobre.

Capítulo 6

Conclusiones

- El aguacate, variedad criolla proveniente de las diferentes regiones del país es diferente en morfología (peso, diámetro y longitud) al aguacate Hass. Estas diferencias son resultado de las condiciones ecológicas (suelo, clima) y de la zona geográfica en las que se cultivan, por lo que cada muestra cuenta con características típicas.
- La variedad criolla presentó un intervalo en peso de 104 a 112 gramos, aproximadamente representan el 46 % del peso del aguacate Hass (200 gramos en promedio).
- La relación pulpa-semilla en la variedad criolla fue de aproximadamente 65 % en pulpa, con menor espesor y peso de pulpa, que contrasta con la semilla grande y globulosa (25 %).
- El contenido de aceite en pulpa es mayor al obtenido en la semilla. Tanto la variedad Hass como la criolla cumplen con lo reportado en la literatura, obteniendo intervalos de 15 a 20 % de aceite de pulpa y de 2.1 a 3.2 % en aceite de semilla.
- De la variedad criolla, las muestras de aguacate que destacan estadísticamente en porcentaje de aceite fueron los del Estado de Morelos y Michoacán, con 19.3 y 19.03 % respectivamente.
- El proceso de saponificación permitió saber que tanto en pulpa como en semilla,

predomina el contenido de ácidos grasos, posiblemente proveniente de la fracción saponificable -mayor al 85 %-, y que la fracción insaponificable representa el 15 % o menos.

- Se logró identificar y cuantificar en la fracción insaponificable del aceite de aguacate criollo a los compuestos de interés, sitoesterol y estigmasterol. Destacando la muestra del estado de Puebla con 94.6 mg/100 g en el aceite de la pulpa y Michoacán con 51.6 mg/100 g en el aceite de la pulpa.
- El estigmasterol está presente en menor concentración que el sitoesterol, ya que representó aproximadamente el 20 % de la fracción insaponificable, con predominio del sitoesterol con el 42 %.
- La fracción lipídica del aguacate criollo está constituida en orden de importancia por los ácidos oléico (C 18:1), palmitoléico (C 16:1), linoléico (C 18:2), palmítico (C 16:1), y esteárico (C 18:0), en tanto que en trazas se encuentran los ácidos laúrico (C 12:0) y mirístico (C 14:0) e incluso erúcico (C 20:0).
- Dado que se obtuvo una mayor concentración de ácido oléico, el aguacate criollo puede ser considerado una fuente importante de ácidos grasos monoinsaturados.
- El aguacate proveniente del Estado de México, presentó la composición más deficiente en cuanto a ácidos grasos se refiere.
- Los aceites de los estados de Michoacán y Morelos destacaron en la concentración de ácidos grasos insaturados, C 16:1 y C18:1.
- La muestra con mayor contenido de aceite y fracción de ácidos grasos fue la proveniente de Puebla, destacó con una concentración de C 18:2, C 14:0 y C 20:0, con 142, 1.46 y 17.13 g/Kg de aceite de pulpa, respectivamente.
- El aguacate variedad criollo es un fruto que podemos encontrar en muchas regiones del país durante las diferentes épocas del año. A lo largo del análisis aplicado

a su fracción lipídica, se puede estimar que de los aguacateros criollos existentes en México, se obtendrían compuestos con actividad biológica importante para contrarestar y prevenir enfermedades crónico degenerativas, ésto, si se realiza un consumo frecuente de éste, o bien ser estimado como materia prima disponible para la extracción de los compuestos bioactivos presentes en concentraciones destacadas, que pueden representar de interés nutracéutico.

Anexo I

Material y Equipo de Laboratorio

Tabla 1: Descripción del Equipo de Laboratorio

Equipo	Especificaciones
Estufa	MAPSA HDT-27
Ultracongelador	Marca HARRIS, Modelo Ultralow
Liofilizadora	Marca LABCONCO, Modelo 7522900 Freezone 6
Balanza Digital	Marca OHAUS
Balanza Analítica	Marca OHAUS, Modelo AP1105 (110x0.1g)
Agitador de Matraces	Marca LAB-LINE Analytical Plus
Parrilla de Agitación Magnética	Marca Thermolyne
Rotavapor	Marca BUCHI
Bomba de Alto Vacío	Marca POLYSCIENCE
Placas de Gel de Sílice	Marca MACHERET-NAGEL ALUGRAM
Cámara de Revelado UV	CAMAG 254 a 366 nm
Cromatógrafo de Gases	Marca Agilent Modelo 6890N Software ChemAgilent

Tabla 2: Reactivos de grado analítico

Reactivos y Disolventes	Marca
Éter de Petróleo	High Purity
Hexano	High Purity
Diclorometano	High Purity
Ácido Clorhídrico (HCl)	Técnica Química
Cloruro de Sodio (NaCl)	
Alcohol Etilico	Técnica Química
Solución de Trifluoruro de Boro (BF_3) en metanol 14 %	SIGMA
Diclorometano HPLC	Allied Signal
Hexano HPLC	Allied Signal
Agua Destilada	
Hidróxido de Potasio (KOH)	SIGMA Aldrich
Sulfato de Sodio anhidro (Na_2SO_4)	High Purity
Estigmasterol	(S2424) SIGMA Aldrich
Sitoesterol	(S 91794) SIGMA Aldrich
Patrones de Esteres metílicos	(SUPELCO) FAME MIXGLC 50
	(SUPELCO) FAME MIXGLC 30
Sulfato Cérico	Merck

Anexo II

Tabla 3: Análisis de Varianza (ANOVA) para características evaluadas en el aguacate criollo

PESO					
FV	SC	GL	PC	F	Valor C
Características	762.5879	4	190.6469	2.510721	3.01
Muestras	33833.64056	4	8458.9446	111.398	3.01
Error	1214.93	16	75.9331		
Total	35811.159	24			
DIAMETRO					
FV	SC	GL	PC	F	Valor C
Características	2.1004	4	0.5251	1.68247	3.01
Muestras	28.6744	4	7.1686	22.96892	3.01
Error	4.9936	16	0.3121		
Total	35.7684	24			
LONGITUD					
FV	SC	GL	PC	F	Valor C
Características	0.3744	4	0.0936	0.307667	3.01
Muestras	77.1484	4	19.2871	63.39749	3.01
Error	4.8676	16	0.304225		
Total	82.3904	24			

Tabla 4: Análisis de varianza para componentes del aguacate

PULPA					
FV	SC	GL	PC	F	Valor C
Componente	17.6703	4	4.41175	0.58816	3.01
Muestras	320.1707	4	80.04268	10.6569	3.01
Error	120.1736	16	7.510851		
Total	458.0147	24			
SEMILLA					
FV	SC	GL	PC	F	Valor C
Componente	27.6886	4	6.9221	1.75103	3.01
Muestras	826.8512	4	206.7128	35.0915	3.01
Error	94.2508	16	5.890		
Total	948.7906	24			
HUMEDAD					
FV	SC	GL	PC	F	Valor C
Componentes	16.2864	4	4.0716	0.4487	3.01
Muestras	128.8059	4	32.2014	3.549	3.01
Error	145.16	16	9.0725		
Total	290.2524	24			

Anexo III

Curvas Patrón empleadas en Método de Patrón Interno

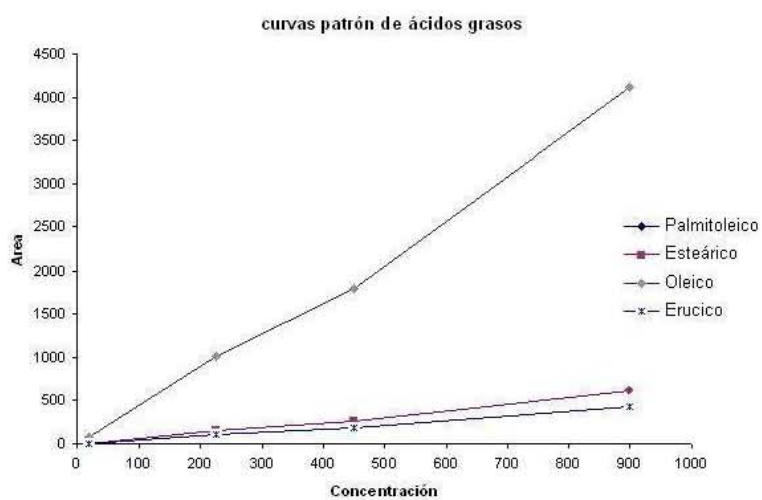


Figura 1: Curva Patrón de Ácidos Grasos

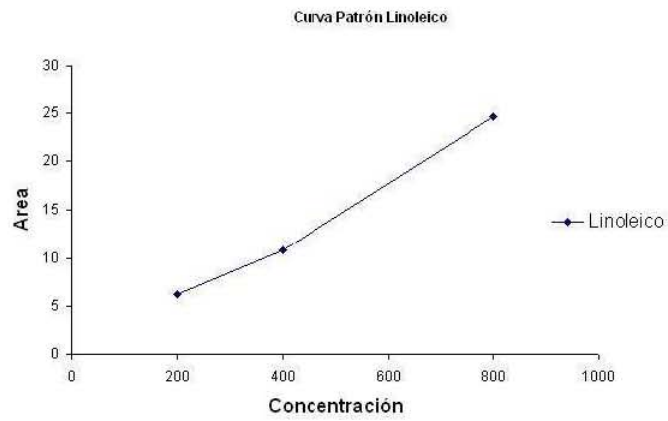


Figura 2: Curva Patrón de Ácido Linoléico

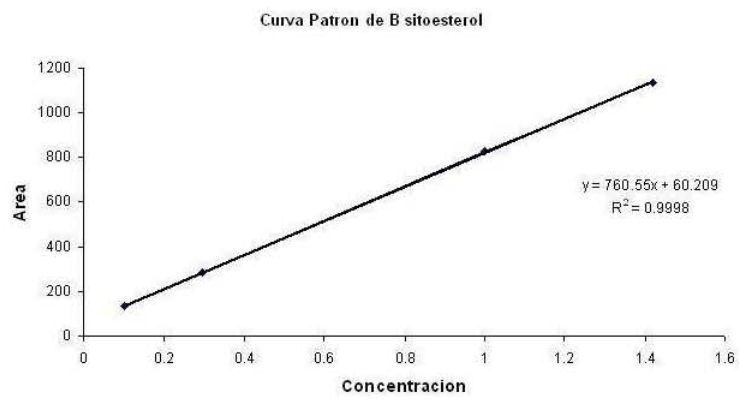


Figura 3: Curva Patrón de β -Sitoesterol

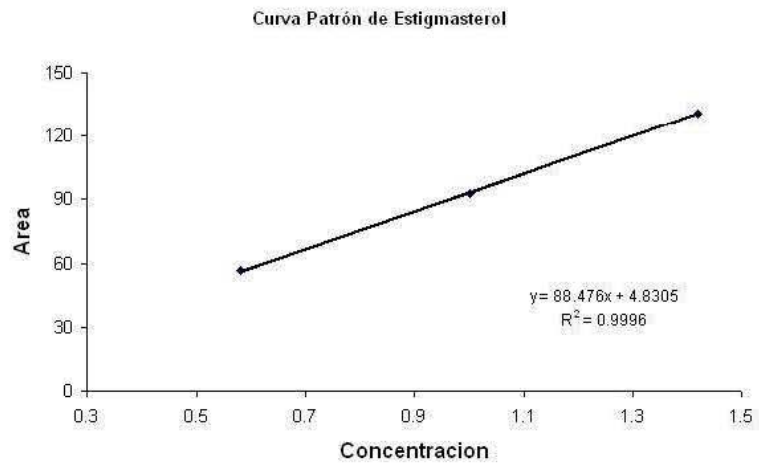


Figura 4: Curva Patrón de Estigmasterol

Bibliografía

- [1] Abidi S.L., *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils*, Journal of Chromatography, 935, (2001), 173-201.
- [2] Alzamora S., *Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds*, Journal of Food Engineering, 67, (2005), 201-214.
- [3] Andlauer W., *Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook*, Food Research International, 35 (2002), 171-176.
- [4] Argueta A., *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, INI, 55-57.
- [5] Astiasarán I., Martínez J., *Alimentos. Composición y Propiedades*, McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1999.
- [6] Badui S., *Química de los Alimentos*, Alhambra Mexicana, México, 1995.
- [7] Belitz H.D., *Química de los Alimentos*, Editorial Acribia, España, 1997.
- [8] Berger A., *Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients*, Lipids in Health and Disease, (2004), 1-19.
- [9] Biesalski H., *Nutraceuticals: The link between nutrition and medicine*, Journal of Toxicology, 21, (2002).
- [10] Casanueva E., *Nutriología Médica*, Editorial Panamericana, México, (2000)
- [11] Chasquibol N., *Alimentos Funcionales o Fitoquímicos, Clasificación e Importancia*, Revista Peruana de Química Inorgánica, 5, (2003), 9-20.

- [12] Revista Claridades, InfoAserca, SAGARPA, 2002.
- [13] Cozzolino V., *Alimentos Funcionales, Fármacos y Medicamentos*, Año 1, 5 , (2000).
- [14] De Felici S., *Nutraceuticals -opportunities in an emerging market*, Scrip Magazine, (1992).
- [15] Dias A., *Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes*, Biosource Technology, 82, (2002), 253-260.
- [16] Dillard C., German B., *Phytochemicals: nutraceuticals and human health*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, (2000), 1744-1756.
- [17] Farines M., *Influence of avocado oil processing on the nature of some unsaponifiable constituents*, Journal of American Oil Chemistry Society, Vol. 72 (4), (1995), 473-476.
- [18] Gamma C., Gómez P., *An ethnological approach for the study of Persea: A case study in the maya area*, Second World Avocado, (1992), 11-17.
- [19] García J., Ramos M., *Estructura de la semilla de aguacate y cuantificación de la grasa extraída por diferentes técnicas*, Revista Chapingo Serie Horticultura 5, (1999), 123-128.
- [20] Hasler C., *Functional Foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion*, Food Technology 52(2), (1998),57-62.
- [21] Hasler C., *The Changing Face of Functional Foods*, Journal of American College of Nutrition 19 (5), (2000), 4998-5068.
- [22] Hicks K., Moreau R, *Phytosterols and Phytostanols: Functional Food Cholesterol Busters*, Food Technology, Vol. 55, No.1, (2001), 63-67
- [23] Jong A., *Metabolics effects of plant sterols and stanols*, Journal of Nutritional Biochemistry, 14, (2003), 362-369.

- [24] Kashman Y., Néeman I., *New compounds from avocado pear*, Tetrahedron, Vol. 25, (1969), 4617-4631.
- [25] López R., *Aislamiento de esteroides, bases de amonio y saponinas de Amaranthus muricatus (Moquin) Gillies ex Hicken Amaranthaceae*, Acta Farmacéutica Bonariense, 22, (2003), 101-104.
- [26] Lozano Y., *Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties*, Journal of American Oil Chemistry Society, Vol. 70, No. 6, (1993), 561-565.
- [27] Moreau R., Whitaker B., *Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses*, Progress in Lipid Research, (2002), 1-44.
- [28] Olaeta J., *Determinación de la evolución y caracterización de los aceites en paltas (Persea americana Mill.) cvs. Fuerte y Hass cultivadas en Chile*, Revista Chapingo Serie Horticultura 5, (1999), 117-122.
- [29] Pacetti D., *Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado* Journal of Food Composition and Analysis, (2006).
- [30] Phillips, K., *Free and Sterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats*, Journal of Food Composition and Analysis, 15,(2002), 123-142.
- [31] Piironen V., Toivo J., *Plant sterols in vegetables, fruits and berries*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, (2003), 330-337.
- [32] Pszczola D., *The nutraceutical initiative: a proposal for economic and regulatory reform*, Food Biotechnology, 46, (1992), 77-79.
- [33] Ramos M., Jerz G., et.al., *Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (Persea americana Mill. Lauraceae cv. Hass)*, Phytochemistry 65, (2004), 955-962.

- [34] Roldán A., Aguirre S., *Rescate de los ecotipos criollos y silvestres de Aguacate (Persea americana Mill.) en Tacámbaro Michoacán, México*, Revista Chapingo Serie Horticultura 5, (1999), 69-71.
- [35] Sánchez J., *Recursos genéticos de aguacate (Persea americana Mill.) y especies afines en México*, Revista Chapingo Serie Horticultura 5, (1999), 7-18.
- [36] Sinyinda S., *Volatiles of avocado fruit*, Food Chemistry, Vol. 62 (4), (1998), 483-487.
- [37] Sloan E., *The top 10 functional food trends. The next generation*, Food Technology, 56, (2002), 32-57.
- [38] Verhagen H., Coolen S., et.al., *Assessment of the efficacy of functional food ingredients, introducing the concept "kinetics of biomarkers"*, Mutation Research 551, (2004), 65-78.