



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y
TECNOLOGIA QUIMICA

Patrocinante:

Prof. Jaime Ortíz Viedma.

Directores:

Prof. Lilia Masson Salaué.

Prof. Nalda Romero Palacios.

ESTUDIO DE COMPONENTES PRESENTES EN SEMILLAS DE
PIÑÓN (*Pinus pinea*) Y MICHAY (*Berberis darwinii hook*),
FACTIBLES DE UTILIZAR EN EL DESARROLLO DE ALIMENTOS
FUNCIONALES.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

ALVARO ESTEBAN ESCALONA BUSTOS

SANTIAGO 2005

DEDICATORIA

*A mis padres
y hermanos.*

AGRADECIMIENTOS

- A la profesora Nalda Romero y al profesor Jaime Ortíz por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo y su corrección final.
- A las profesoras Irma Pennacchiotti y Lilia Masson y al profesor Eduardo Castro, por la formación entregada a mi desarrollo personal y profesional.
- A las profesoras Rosita Negrete, Nadine Backhouse y al profesor Ronny Bocic, por su colaboración y excelente disposición para la determinación de alcaloides.
- A mis amigos María Elena Aravena, Conrado Camilo, Julio Angulo y Marcos Flores por el apoyo y amistad.
- A Vanessa por acompañarme y dar un nuevo impulso en mi vida.
- A Alejandra G., Alvaro A., Beatriz G., Carola A., César M., Claudia V., Cristian E., Fernando M., Iván G., Jenny L., Juvenal L., Luis S., Luz Marcela E., Neuza J., Ricardo C., Silvana S., Ximena L., y Yolanda R. por su amistad y por los gratos e inolvidables momentos vividos.
- A Graciela Cáceres y Juan Carlos Moreno, por su excelente disposición y colaboración.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
TABLA DE CONTENIDOS	iii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
CAPITULO I	INTRODUCCION
	1
1.1	Antecedentes generales
	12
1.2	Objetivos
	15
1.2.1	Objetivo general.
	15
1.2.2	Objetivos específicos.
	15
CAPITULO II	MATERIALES Y METODOS
	16
2.1	Materiales
	16
2.1.1	Muestras.
	16
2.1.2	Reactivos químicos.
	16
2.1.3	Materiales y equipos.
	16
2.2	Métodos
	17
2.2.1	Análisis proximal.
	17
2.2.1.1	Determinación del contenido humedad.
	17
2.2.1.2	Determinación del contenido de materia grasa total.
	17
2.2.1.3	Determinación del contenido de proteínas.
	17
2.2.1.4	Determinación del contenido de cenizas. Método gravimétrico.
	17
2.2.1.5	Determinación de fibra cruda.
	18
2.2.2	Métodos analíticos aplicados al aceite extraído de ambas semillas.
	18
2.2.2.1	Cromatografía gas-líquido.
	18
2.2.2.2	Tocoferoles.
	19

2.2.2.3	Tiempo de Inducción.	19
2.2.2.4	Determinación de fitosteroles.	19
2.2.3	Determinación de aminoácidos.	20
2.2.3.1	Determinación de alcaloides.	20
CAPITULO III	RESULTADOS Y DISCUSION	21
3.1	Análisis proximal de las semillas estudiadas.	21
3.2	Caracterización del aceite extraído de Piñón y Michay.	25
3.2.1	Composición en ácidos grasos.	25
3.2.2	Contenido de Tocoferoles.	30
3.2.3	Tiempo de Inducción para los aceites de ambas semillas estudiadas.	33
3.2.4	Contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Piñón y Michay.	33
3.3	Contenido de Aminoácidos.	37
CAPITULO IV	CONCLUSIONES	41
CAPITULO V	REFERENCIAS	42
CAPITULO VI	ANEXOS	46

INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	Pág.
1	Análisis proximal de semilla de Piñón.	21
2	Análisis proximal de semilla de Michay.	22
3	Perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Piñón (porcentaje de esteres metílicos).	25
4	Principales ácidos grasos presentes en aceite de Piñón comparado con aceites de Avellana Chilena, Maní, Nuez, Almendra (porcentaje de ésteres metílicos).	26
5	Perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Michay (porcentaje de esteres metílicos).	27
6	Comparación entre los principales ácidos grasos presentes en aceites de semillas de Michay y Rosa Mosqueta (porcentaje de esteres metílicos).	28
7	Contenido de tocoferoles en aceite de semilla de Piñón.	30
8	Comparación de tocoferoles presentes en aceites de Piñón, Avellana Europea, Maní, Nuez y Almendra.	30
9	Contenido de tocoferoles de aceite semilla de Michay.	31
10	Comparación del contenido de tocoferoles de aceite de semilla Michay y Basil.	31
11	Tiempo de Inducción de aceite de semilla de Piñón y Michay.	33
12	Contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Piñón.	33
13	Comparación de fitosteroles presentes en aceites de Piñón, Avellana Europea, Maní, Nuez, Almendra.	34
14	Contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Michay.	35
15	Contenido de aminoácidos de semilla de Piñón, muestra fresca. Comparado con valores publicados por Agriculture Handbook (1975, Number 8-12).	37

16	Contenido de aminoácidos de semilla de Michay, muestra fresca.	38
17	Alcaloides presentes en semilla de Michay.	52

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	Pág.
1	Estructuras de Tocoferol y Tocotrienol.	3
2	<i>Pinus pinea</i> , en estado adulto y conos en maduración.	12
3	Cono maduro con semillas en su interior y piñón con cáscara o testa gruesa (1), con cáscara partida en dos (2), sin cáscara y listo para ser tratado o consumido (3).	13
4	<i>Berberis darwinii hook</i> en estado natural, arbusto (1), ramas con semillas en estado de maduración (2) y hojas con subdivisiones y espinas (3).	13
5	Racimos de Michay en maduración (4) y semilla madura (5).	14
6	Análisis proximal de ambas semillas con su respectivo aporte de macronutrientes.	24
7	Aporte de kilocalorías por 100g de semillas de Piñón y Michay.	24
8	Distribución porcentual de los grupos de ácidos grasos en aceites de semillas de Piñón y Michay (expresado en ésteres metílicos).	29
9	Porcentaje de ácidos linolénico y linoleico en aceites de Piñón y Michay (expresado en esteres metílicos).	29
10	Tocoferoles presentes en aceites de semillas de Piñón y Michay (ppm).	32
11	Composición porcentual de fitosteroles presentes en aceite de semilla de Piñón (mg/100g de aceite).	34
12	Composición porcentual de fitosteroles presentes en aceite de semilla de Michay (mg/100g de aceite).	36
13	Composición porcentual con respecto al total de aminoácidos de semillas de Piñón y Michay.	40
14	Estructura de alcaloide Dihidrorugosinona.	52

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	TITULO	Pág.
1	Cromatograma obtenido para la determinación del perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Piñón (porcentaje de esteres metílicos).	46
2	Cromatograma obtenido para la determinación del perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Michay (porcentaje de esteres metílicos).	47
3	Cromatograma obtenido para la determinación de fitosteroles en semilla de Piñón.	48
4	Cromatograma obtenido para la determinación de fitosteroles en semilla de Michay.	49
5	Cromatograma obtenido para la determinación de aminoácidos de semilla de Piñón.	50
6	Cromatograma obtenido para la determinación de aminoácidos de semilla de Michay.	51
7	Estructura de alcaloide Dihidrorugosinona y alcaloides presentes en semilla de Berberis Darwinii hook.	52

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización de componentes de interés para el desarrollo de alimentos funcionales, de las semillas de Piñón (*Pinus pinea*), y Michay (*Berberis darwinii hook*).

A partir del análisis proximal, se determinó que el Piñón contenía 47,7% de materia grasa y el Michay 4,6%. El análisis de ácidos grasos realizado por cromatografía gas-líquido, dió como resultado para el Piñón 10,6% de ácidos grasos saturados, 40,1% de ácidos grasos monoinsaturados, donde el 37,4% es aportado por el ácido oleico y 45,9% de ácidos grasos poliinsaturados donde el 43,8% correspondió al ácido linoleico y el 0,8 al ácido linolénico. Para el Michay se obtuvo 12,2% de ácidos grasos saturados, 20,4% de ácidos grasos monoinsaturados con un 19,1% de ácido oleico, 65% de poliinsaturados con un 36,7% de ácido linoleico y 28,2% de ácido linolénico.

En la determinación de tocoferoles se obtuvo un contenido de 1409 ppm de alfa tocoferol para el Piñón y para el Michay 880 ppm de gamma tocoferol.

El Tiempo de Inducción determinado mediante el equipo Rancimat, para el aceite de Piñón fue de 9,5 horas y para el aceite de Michay de 19,1 horas.

El análisis de fitosteroles para el Michay, dio como resultado un contenido de cinco fitosteroles dentro de los cuales resalta el β -Sitoesterol con 4460 mg/100g, en tanto que para el Piñón fue de seis fitosteroles dentro de los cuales destaca el β - Sitoesterol con 662 mg/100g de aceite.

En tanto que el análisis realizado sobre el contenido de aminoácidos indicó que el Piñón contenía 24,0%, de los cuales el 50% correspondió a aminoácidos esenciales, por otra parte, el Michay presentó 3,28% de aminoácidos de los cuales aproximadamente el 50% también correspondió a aminoácidos esenciales. Además la semilla de Michay presentó 4,7% de alcaloides expresado como Dihidrorugosinona.

SUMMARY

The objective of this study was the characterization of components present in the seeds of *Pinus pinea*, Piñón and *Berberis darwinii hook*, Michay, for the development of functional food.

The fat content of Pine kernel (Piñón) and Michay was 47,7% and 4,6% respectively. The analysis of fatty acid by gas-liquid chromatography, showed for Piñón seed oil 10,6% of saturated fatty acids, 40,1% monounsaturated fatty acids, where 37,4 % is oleic acid, and 45,9% of polyunsaturated fatty acids, where 43,8% corresponded to linoleic acid and 0,8% linolenic acid. For the Michay 12,2% were saturated fatty acids, 20,4% monounsaturated fatty acids with 19,1% of oleic acid, 65% of polyunsaturated with 36,7% of linoleic acid and 28,2% of linolenic acid.

The tocopherols content in the seeds oils was 1409 ppm of alfa tocopherol for Piñón and 880 ppm of gamma tocopherol for Michay

Induction time determined by Rancimat instrument gave 9,5 hours for Piñón and 19,1 hours for Michay.

The analysis of phytosterols for Michay seed oil, gave a content of five phytosterols, the most important was β - Sitosterol with 4460 mg/100g, Piñón seed oil contained six phytosterols where the most important was β - Sitoesterol with 662mg/100g.

The aminoacids content indicated that the Piñón contained 24,0%, the half corresponded to essentials aminoacids, by the other hand, Michay presented 3,28% of aminoacids of approximately one half also corresponded to essentials aminoacids. The Michay presented 4,7% of alkaloids expressed as Dihidrorugosinone.

CAPITULO I. INTRODUCCION

La alimentación ha ido evolucionando en el tiempo, porque mientras que para el hombre primitivo era esencial para la supervivencia y la “satisfacción del hambre”, hoy se busca en los alimentos la ausencia de efectos adversos en el organismo así como la promoción de la salud y el bienestar y la reducción del riesgo de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y la obesidad (Rivero, 2004).

El interés en la relación entre alimentación y salud, va más allá de la acción preventiva de los nutrientes en los déficit nutricionales, y se explica por las asociaciones que se han evidenciado entre el consumo de alimentos de origen vegetal esencialmente frutas, verduras, cereales integrales, leguminosas y sus efectos preventivos sobre el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. En efecto, estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre la prevalencia de estas enfermedades y el consumo de frutas y verduras. Estos alimentos son excelentes fuentes de antioxidantes, tales como la vitamina C, E y A y beta caroteno, utilizados por la planta para protegerse de la oxidación, especialmente en aquellas partes expuestas a las radiaciones luminosas (Araya y Lutz, 2003)

Por esta razón, cada día adquieren mayor importancia los denominados alimentos funcionales. Para que un alimento se considere funcional pueden darse dos casos: que contenga un componente (nutriente o no) que afecte una o más funciones del organismo de forma positiva o que algún componente potencialmente peligroso haya sido eliminado (Rivero, 2004).

Estos productos funcionales, todavía sin legislación definida en muchos países, además de promover el crecimiento y la mantención del organismo, tienen el papel adicional de reducir el riesgo de enfermedades, por la presencia de determinados compuestos bioactivos. Pueden ser compuestos antioxidantes, flavonoides, glucosinolatos, saponinas, fitosteroles, oligosacáridos, ácidos grasos, polipéptidos y otros, presentes en los alimentos comunes o como suplementos, que consiguen

modular funciones del organismo y así intervenir en la reducción del riesgo de enfermedades degenerativas (Dragone, 2004).

Aún no existe una definición universal para los alimentos funcionales pero el Consejo Internacional de Información de Alimentos los define como aquéllos que tienen beneficios para la salud que van más allá de la nutrición básica. Esta definición, que es la más extendida en Europa, es muy similar a la que le otorgó el Instituto de Ciencias de la Vida de Norteamérica. Según este organismo, los alimentos funcionales son aquéllos que gracias a sus componentes fisiológicamente activos, suponen beneficios para la salud (Arenzana, 2004).

De acuerdo a estas definiciones, los alimentos sin modificar, como pueden ser las frutas o las verduras, son ejemplos simples de alimentos funcionales. Así, los tomates, por ejemplo se considerarían un alimento funcional porque contiene esos mencionados componentes fisiológicamente activos, como es el licopeno. Por su parte, los alimentos modificados, como los que han sido enriquecidos, fortificados o realzados con fitoquímicos, también forman parte de la definición de alimentos funcionales (Arenzana, 2004).

Los efectos demostrados más importantes de los alimentos funcionales son:

1.-La disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares gracias a los ácidos grasos omega 3- en pescados grasos- y los antioxidantes naturales como los carotenoides, las vitaminas C y E o el zinc- en verdura hortalizas y frutas.

2.-La disminución del riesgo de ciertos tumores gracias a sustancias antioxidantes.

3.-La regulación de funciones intestinales, del nivel de glucosa y colesterol en sangre mediante la fibra soluble.

4.-La mejora del equilibrio de la flora intestinal y del estado inmunológico por las bacterias lácticas.

Los principales componentes capaces de proporcionar beneficios a la salud encontrados en los alimentos funcionales, son denominados sustancias o compuestos bioactivos o ingredientes funcionales. Entre ellos, se destacan los ácidos grasos omega 3, las fibras de vegetales, proteína e isoflavonas de soja y el licopeno (Dragone, 2004).

- Antioxidantes (tocoferoles)

Los Tocoles (Vitamina E) están presentes en al menos ocho formas naturales como son, α , β , γ y δ tocoferol y α , β , γ y δ tocotrienol. Estos tocoles son fisiológicamente activos en mejorar síntomas de deficiencia de vitamina E. La vitamina E es un importante antioxidante y atrapador de radicales libres, y su presencia ha sido relacionada con la prevención de enfermedades crónicas, envejecimiento prematuro, cáncer, enfermedades cardiovasculares. Varios informes han relacionado a los tocotrienoles como inhibidores de la síntesis de colesterol (Peterson, 1995.)

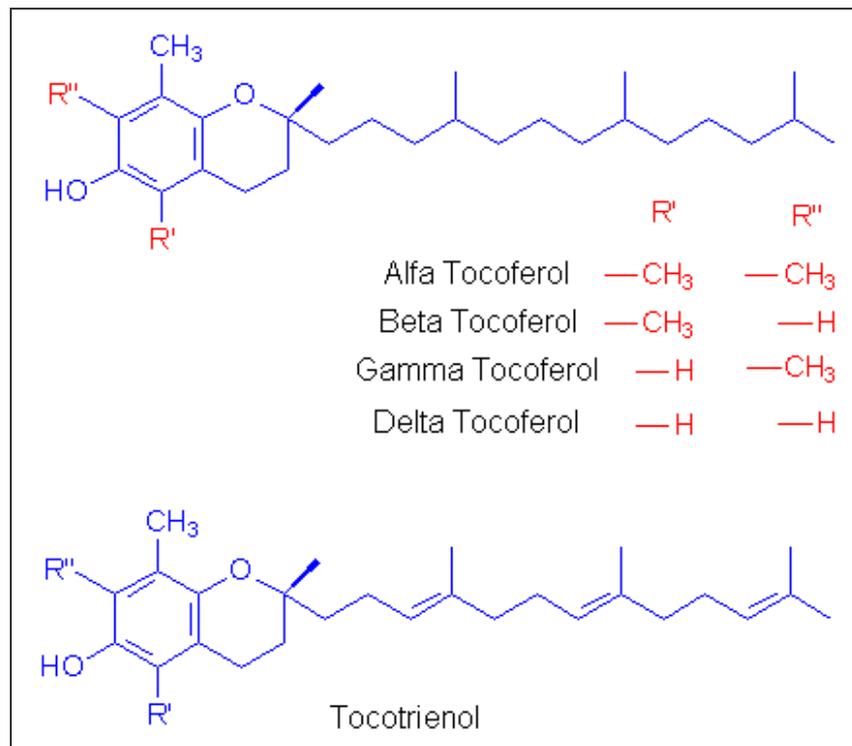


Figura 1: Estructuras de Tocoferol y Tocotrienol.

Estos se diferencian en el número y la posición de grupos metilo sobre el anillo de cromano. Los tocotrienoles tienen una estructura similar a la de los tocoferoles,

excepto que la cadena del fitilo lateral contienen tres dobles enlaces, en las posiciones 3, 7 y 11 (Kuang, 2004).

Alrededor del 60-70% de los Tocoferoles en semillas oleaginosas se retienen durante la extracción de aceite y proceso de refinación. Algunos aceites con muy similar composición de ácidos grasos pueden ser diferenciados por su distinto contenido de Tocoferoles (Belitz y cols., 1993).

- Ácidos grasos.

Dos grandes grupos de ácidos grasos se pueden definir como principales constituyentes de las materias grasas:

- Ácidos grasos saturados

Generalmente son de cadena recta, principalmente con número par de átomos de carbono, aunque también se han detectado impares en materias grasas comestibles de origen animal y marino y algunos ramificados, en general en proporciones pequeñas, del orden del 1 %. El largo de cadena se encuentra entre cuatro y veinticuatro átomos de carbono para las materias grasas de consumo habitual (Masson y Mella, 1985).

Este tipo de ácidos grasos forma parte importante de las materias grasas sólidas, debido a sus elevados puntos de fusión, relacionados con su estructura en el espacio. Sólo los primeros términos entre el ácido butírico C4:0 y el ácido caprílico C8:0 son líquidos; los demás ácidos grasos son sólidos. Cabe destacar por ejemplo que el ácido cáprico con 10 átomos de carbono tiene un punto de fusión de 31,6°C y el del ácido esteárico C18:0 se eleva prácticamente a 70°C. De los ácidos grasos saturados, el ácido palmítico C16:0 es uno de los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que se ha encontrado presente prácticamente en todas las materias grasas analizadas (Masson y Mella, 1985).

- Ácidos grasos insaturados

Se caracterizan porque en la cadena hidrocarbonada aparece una o más doble unión $C = C$, lo cual, fuera de introducir una rigidez en la molécula, hace más compleja la química de los ácidos grasos al aparecer dos tipos de isomerismo: de posición y geométrico cis, trans que confieren a su vez propiedades diferentes a

los ácidos grasos y mayor susceptibilidad a la oxidación. La presencia del doble enlace y su configuración en el espacio tiene un efecto notable en el punto de fusión de los ácidos grasos. La mayoría en forma natural presenta la configuración cis y ésto los hace ser líquidos a temperatura ambiente, ejemplo: ácido oleico C18:1, n-9 (cis) tiene un punto de fusión de 14°C; en cambio, el paso a la configuración trans lleva a un notable aumento del punto de fusión, ya que en el espacio la estructura se asemeja a la de un ácido graso saturado, ejemplo: el ácido elaídico C 18:1.n-9 (trans), isómero geométrico del ácido oleico es sólido a temperatura ambiente con un punto de fusión de aproximadamente 44°C (Masson y Mella, 1985).

- Ácidos grasos esenciales

Bajo este nombre se puede considerar a dos ácidos grasos: el linoleico C18:2, n-6, y al alfa linolénico C18:3, n-3. Esta designación se debe a que su ausencia produce un síndrome de deficiencia, ya que el organismo animal no puede introducir dobles enlaces entre el grupo metilo terminal y el primer doble enlace que aparece en la cadena hidrocarbonada del respectivo ácido graso. Lo que sólo puede hacer el organismo animal es elongar la cadena e introducir nuevos dobles enlaces a continuación de los originales y en dirección del grupo carboxílico de la molécula (Masson y Mella, 1985).

De aquí se deduce la importancia de las familias de ácidos grasos ya nombrados, ya que por una parte la estructura terminal permanece inalterable y, por otra, no es posible el paso de un ácido graso de una familia a otra (Masson y Mella, 1985).

Teniendo esta estructura básica terminal, el organismo animal sintetiza los ácidos grasos de cadena larga de 20 a 22 átomos de carbono con tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces pertenecientes a las familias n-3 y n-6 que les son indispensables para la formación de estructuras celulares, funciones normales de todos los tejidos, síntesis de eicosanoides, etc. Se puede considerar como los más importantes el ácido araquidónico, el eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico (Masson y Mella, 1985).

De aquí se desprende la importancia que los ácidos grasos precursores linoleico y linolénico sean aportados por la dieta y define su carácter de esenciales (Masson y Mella, 1985).

Si esto no sucede, el organismo animal de todas formas tiene que sintetizar ácidos grasos de cadena larga, y recurre para ello al ácido esteárico C18:0, procediendo a insaturarlo originando el ácido oleico C18:1, n-9, luego alarga la cadena, la vuelve a insaturar formando el ácido eicosatrienoico C20:3, n-9, que por supuesto dado su origen pertenece a la familia del ácido oleico C18:1, n-9 (Masson y Mella, 1985).

- Fibra cruda.

La fibra está constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales, entre los que destacan la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas; también se incluye en éstos a la lignina, aún cuando ésta no es un hidrato de carbono, sino más bien una cadena de compuestos fenólicos como la vainillina, el aldehído siríngico y los alcoholes coniferílico, sinapílico y cumarílico. Estos polímeros no se encuentran de manera natural en los alimentos de origen animal y son exclusivos de los vegetales. La composición de la fibra es muy variada en los distintos alimentos y depende de muchos factores, entre los que destaca la madurez del producto (Badui, 1993).

Los animales herbívoros, a diferencia de los monogástricos como el hombre, son los únicos capaces de aprovechar la celulosa para su metabolismo pues cuentan con las correspondientes enzimas celulasas en el tracto gastrointestinal. Para el organismo humano la celulosa es parte de la fibra cruda y consecuentemente se elimina en las heces sin haber sido aprovechada (Badui, 1993).

Es necesario hacer una clara distinción entre la fibra cruda y la fibra dietética. La primera es la que se consigna generalmente en las tablas de composición de los alimentos y que se determina analíticamente sometiendo los productos a un tratamiento en caliente con ácido clorhídrico y posteriormente con hidróxido de sodio; en estas condiciones se pierde una fracción importante de polisacáridos

que son parte de la fibra dietética; es decir, la fibra cruda normalmente es menor a la fibra dietética, ya que esta última representa el contenido total de polímeros antes indicados. En términos generales, el procedimiento de determinación de la fibra cruda provoca la pérdida de 70% a 80% de la hemicelulosa, de 30% a 50% de la celulosa y hasta 90% de la lignina; algunos autores consideran que es hasta de seis veces la subestimación de la fibra dietética cuando se determina fibra cruda (Badui, 1993).

La importancia de la fibra en la dieta fue puesta de manifiesto en la década de los sesenta, a raíz de esto, se han efectuado muchos estudios que relacionan la ausencia de fibra con diversos problemas a la salud tales como la constipación, la diverticulosis, colitis, hemorroides, cáncer de colon, cáncer de recto, diabetes mellitus, aterosclerosis y otros. Su función principal es que tienen la capacidad de hincharse al absorber agua y por lo tanto aumentar el volumen de la materia fecal; esto provoca un incremento en los movimientos peristálticos del intestino, facilita el tránsito, la distensión intestinal y consecuentemente la defecación; es decir, su acción primaria se lleva a cabo precisamente en el colon del hombre (Badui, 1993).

Esta situación provoca que se incremente la viscosidad, se reduzca el tiempo de residencia de los constituyentes del alimento en el intestino y que sólo las moléculas fácilmente absorbibles atraviesen la pared intestinal; aquellas sustancias irritantes, dañinas y tóxicas, que generalmente requieren de más tiempo para entrar al sistema linfático, no tienen oportunidad de hacerlo y se eliminan en las heces (Badui, 1993).

En un trabajo realizado en 1996, por Larrauri y cols., se propuso por primera vez la medida de la capacidad antioxidante para evaluar los efectos potenciales en la salud a través de la fibra, junto con otros parámetros nutricionales tales como fermentabilidad e índice de retardo en la absorción de glucosa. Una línea de trabajo abierta en este campo es la investigación de materias primas fuente de fibra que tengan una alta capacidad antioxidante (Lajolo y cols., 2001).

Los concentrados de fibra obtenidos a partir de piel de mango (*Mangifera indica* L.) fueron los primeros materiales donde se encontró una alta actividad antioxidante, siendo próxima a la correspondiente al antioxidante sintético BHA y

muy superior a la del antioxidante natural Vitamina E (delta tocoferol) a concentración similar 0,05%. También se han obtenido valores apreciables de actividad antioxidante en concentrados de lima, naranja, pomelo y piña (Lajolo y cols., 2001).

En estos casos, la actividad antioxidante es presumiblemente debida a los polifenoles de distinto tipo (flavonoides, ácidos, antocianinas, etc.), constituyentes bioactivos principales en estos materiales. No obstante la influencia de otros componentes minoritarios (carotenoides, fitosteroles, vitaminas, minerales, etc.) en esa capacidad antioxidante no debe descartarse pues frecuentemente son muy importantes los efectos sinérgicos (Lajolo y cols., 2001).

- Fitosteroles.

Los fitosteroles se encuentran en plantas alimenticias y son estructural y funcionalmente análogos al colesterol de los animales vertebrados. Los fitosteroles comúnmente presentes son el β -Sitoesterol, Campesterol y Estigmaesterol, que constituyen el 95% del total de los fitosteroles de la dieta (Maguire y cols., 2004).

Los fitosteroles comparten con el colesterol el núcleo central de la molécula, esto es el ciclopentano perhidrofenantreno. La diferencia fundamental con el colesterol y entre los diferentes fitosteroles radica en la cadena hidrocarbonada lateral. En el colesterol esta cadena está formada por ocho carbonos y es saturada. En los fitosteroles está formada por 9 o 10 carbonos y en algunos de ellos presenta un doble enlace (Estigmaesterol). Se ha propuesto que esta diferencia estructural es responsable de los particulares efectos hipocolesterolémicos atribuidos a los fitosteroles y también de la baja absorción a nivel del tracto intestinal que se ha observado para estos fitosteroles (Valenzuela y Garrido, 2000).

El perfil de los fitosteroles es característico de las especies botánicas desde las cuales se obtiene el aceite (Thomas y cols., 2002).

Los fitosteroles están entre los componentes más importantes en los insaponificables de aceites vegetales y son asociados en conferir actividad biológica a los aceites (Thomas y cols., 2002). Estudios clínicos repetidamente han mostrado que los fitosteroles que han sido utilizados como suplementos dietarios, o

como ingredientes suplementos en alimentos, han disminuido los niveles de colesterol sérico, el colesterol lipídico de baja-densidad y medianamente la hipercolesterolemia. Este complicado mecanismo puede relacionarse con la inhibición de la absorción del colesterol biliar desde el lumen intestinal en la dieta. Además del efecto de la disminución del colesterol, se sugiere que los fitosteroles poseen actividad anti-inflamatoria, anti-bacterial, anti-fúngica, anti-ulcerativa y tumorigénica (Thomas y cols., 2002).

El consumo de fitosteroles varía entre sociedades y poblaciones. Asiáticos y vegetarianos consumen 345-400 mg/día comparado con los 80mg/día de las sociedades occidentales. Las enfermedades al colon, los infartos y el cáncer a la próstata también varían entre sociedades, éstas se presentan en gran número en sociedades occidentales y en menor cantidad en países Asiáticos y vegetarianos (Atif y cols., 2000).

Hay un aumento en el interés por el aislamiento de estos componentes de actividad biológica para aplicaciones nutraceuticas y como ingredientes para alimentos funcionales (Holser y cols., 2004).

- Aminoácidos esenciales.

Los aminoácidos son los monómeros de la molécula proteica. Cada uno de ellos contiene una cadena lateral (R) que influencia sus propiedades físicas y químicas y por lo tanto las propiedades físicas y químicas de las proteínas que las contienen (Pennacchiotti, 1998).

Según la polaridad de esta cadena lateral, es posible clasificar los aminoácidos en dos grupos:

- Los aminoácidos con cadenas laterales sin carga (no polares) como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano y metionina.
- Los aminoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente, como lisina, arginina e histidina.
- Los aminoácidos con cadena lateral cargada negativamente, como los ácidos aspártico y glutámico.

- Los aminoácidos con cadenas laterales sin carga, que tienen grupos funcionales neutros y polares como serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragenina y glutamina.

Desde el punto de vista de la fisiología y la nutrición, los aminoácidos se clasifican en dos grupos:

- Aminoácidos esenciales: valina, leucina, isoleucina, triptofano, fenilalanina, treonina, histidina (esencial para lactantes), lisina, arginina, metionina, cisteína que el organismo no sintetiza en cantidad suficiente.
 - Aminoácidos no esenciales: glicina, alanina, cisteína, tirosina, serina, glutamina y ácidos glutámico y aspártico (Belitz y Grosch, 1985).
- Alcaloides.

El término alcaloide se aplica a compuestos nitrogenados básicos de origen vegetal, que son fisiológicamente activos. Realmente no existe una definición sencilla de alcaloides, ya que en ella es difícil tener en cuenta las diferencias en cuanto a las estructuras y propiedades de cerca de 600 compuestos descritos en este grupo. Contienen generalmente un átomo de nitrógeno que forma parte del heterociclo, aunque se pueden encontrar compuestos hasta con cinco átomos. Biogénicamente proceden de aminoácidos (Backhouse y Negrete, 2005).

Sus acciones fisiológicas son muy variadas y sus efectos a dosis terapéutica y a dosis tóxicas son a menudo muy distintas (Backhouse y Negrete, 2005).

Muchos alcaloides actúan como depresores del S.N.C., otros actúan sobre el S.N. autónomo como excitantes del sistema simpático, pero otros actúan como depresores de este sistema. Así también hay alcaloides excitantes del sistema parasimpático y otros depresores del mismo (Backhouse y Negrete, 2005).

En general las especies del género *Berberis* (Berberidaceae), son conocidas por producir un ordenamiento muy especial de alcaloides isoquinolínicos, todos los cuales derivan biogénicamente del aminoácido tirosina. Los ordenamientos que se mencionan se pueden clasificar en berbina, aporfina, bencilquinolina, proaporfina, protopina, pavina, dímeros proaporfínicos-bencilisoquinolínicos, entre otros (Muñoz, 1992).

La gran mayoría de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos BBI's que han sido estudiados en modelos biológicos presentan actividad asociada a una enorme variedad de efectos como hipotensivos, antiinflamatorios, antiarrítmicos, bactericidas y relajantes musculares (Buck, 1987).

1.1 Antecedentes generales.

Pinus pinea, llamado comúnmente Pino piñonero, pertenece a la división de las Gimnospermas, clase Coniferopsida, orden Coniferales, familia Pinaceae y género *Pinus* (Montoya, 1990).

Los conos son ovoides, globulares de 12 a 25 cm de longitud y 7 a 10 cm de diámetro, de color pardo brillante, con escamas de consistencia leñosa. Sus semillas son leñosas, ovaladas de color pardo claro, 17 a 18 mm de largo, 8 a 10 mm de ancho y 8 mm de espesor (Serra, 1987). Poseen una testa gruesa, color pardo con largo de alas variable (3-20 mm) (Crawford, 1995). En su interior se encuentra el piñón, de 15 a 16 mm de largo 5 mm de espesor, de forma alargada, color blanco amarillento y de consistencia harinosa (Loewe, 1998).

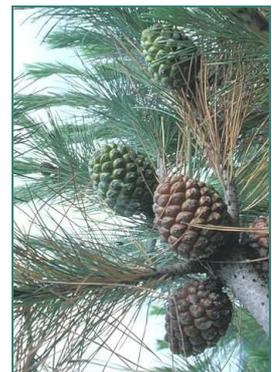
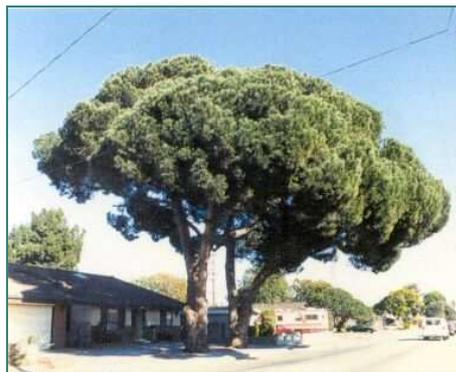


Figura 2: *Pinus pinea*, en estado adulto y conos en maduración.

Es un fruto comestible de sabor agradable (Carnevale, 1955), que lo hace muy apreciado como alimento en forma directa o para confitería; por este motivo en algunos países posee un alto valor comercial (Serra, 1987).

En Chile, actualmente se conserva un bosque en la Reserva Forestal Federico Albert (VII Región) con más de 700 individuos, sus características no son buenas en la producción de frutos, principalmente debido al escaso espaciamiento y a falta de manejo adecuado. También se encuentran pequeños bosques en la Reserva Nacional Peñuelas (V Región), en Pichilemu (VI Región), Cauquenes (VII Región), Angol y Lautaro (IX Región). Se han encontrado árboles aislados en

Santiago, Melipilla, Lolol y Quirihue (VIII Región), y en 1994 se plantaron algunos individuos en Illapel como cortina cortaviento (Loewe, 1998).



Figura 3: Cono maduro con semillas en su interior y piñón con cáscara o testa gruesa (1), con cáscara partida en dos (2), sin cáscara y listo para ser tratado o consumido (3).

El Michay, *Berberis darwinii hook*, perteneciente a la familia de las Berberidáceas, es un arbusto de 1 a 3 metros de altura, el cual se distribuye desde Ñuble (VIII Región) hasta la Patagonia occidental (XII Región), siendo originaria de Chile y muy frecuente de encontrar (Hoffmann, 1991; Donoso y Ramírez, 1994).

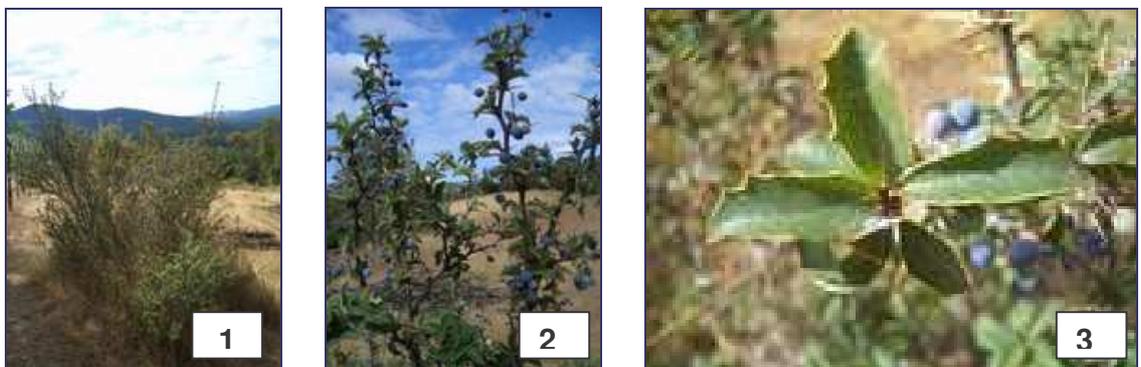


Figura 4: *Berberis darwinii hook* en estado natural, arbusto (1), ramas con semillas en estado de maduración (2) y hojas con subdivisiones y espinas (3).

Los tallos del Michay son de color pardo oscuro y provistos de numerosas hojas. Estas se diferencian en dos tipos, unas poseen aspecto de hojas comunes

mientras que las otras (estípulas) forman cortas espinas pardas con 5 a 8 subdivisiones (Urban, 1934).



Figura 5: Racimos de Michay en maduración (4) y semilla madura (5).

La semilla es una baya esférica de 5 a 7 mm de largo, verde al principio, después rojiza y por último negro azulada, coronada por el estilo de 3-4 mm de largo y el estigma, conteniendo 4 a 6 semillas ásperas, pardo-negrucacas (Urban, 1934; Muñoz, 1990).

El Piñón en la actualidad es utilizado para producir aceites de alto valor culinario en algunos países de Europa, así también en repostería. En tanto el Michay sólo tiene uso en la cultura Mapuche y además de investigaciones en la factibilidad de producción de néctar, cuando se encuentra en estado de flor.

1.2 Objetivos.

1.2.1 Objetivo general.

Caracterización de componentes de interés para el desarrollo de alimentos funcionales, de las semillas de *Pinus pinea*, Piñón y *Berberis darwinii hook*, Michay.

1.2.2 Objetivos específicos.

Estudio de componentes de interés presentes en semillas de *Pinus pinea* y *Berberis darwinii hook*. Esto se efectuó mediante los siguientes análisis realizados a ambas semillas:

- Determinar el aporte de los principales macronutrientes que aporta la semilla de *Pinus pinea* y *Berberis darwinii hook*.
- Estudiar la calidad del aceite obtenido de ambas semillas en cuanto a su aporte de ácidos grasos esenciales y componentes bioactivos como tocoferoles y fitosteroles.
- Estudiar la calidad de la proteína de ambas semillas mediante su perfil de aminoácidos.

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Muestras

Se utilizaron semillas de Piñón y Michay en estado silvestre, recolectadas en los veranos de los años 2003 y 2004, debido a que en esta época se produce su maduración. La recolección se realizó en las cercanías de la comuna de Quirihue, provincia de Ñuble, Región del Bío-Bío, ubicada a 59 Kms al noroeste de Chillán.

Ambos tipos de semillas se almacenaron a temperatura ambiente y a la oscuridad hasta el momento de su análisis.

2.1.2 Reactivos químicos.

- Acetato de sodio
- Acido clorhídrico
- Acido sulfúrico
- Alcohol amílico
- Azida sódica
- Eter de petróleo
- Hidróxido de sodio
- Sulfato de cobre
- Sulfato de sodio anhidro
- Material de vidrio

2.1.3 Materiales y equipos

- Balanza analítica modelo 125 A, Oerlikon Ag, Precisa, Zurich, Suiza.
- Baño termoregulado, Haake, modelo FE, Saddle Brook, Jarlsruhe, Germany.
- Cromatógrafo de gases HP 5890, Integrador HP 3395, Hewlett Packard Corp., U.S.A. con detector FID.
- Cromatógrafo HPLC Merck Hitachi L-6200 A con detector de fluorescencia con integrador Hitachi D-2500 Merck, Hitachi Ltd., Tokio, Japón.
- Estufa modelo TU60/60, W.C. Heraeus GMBH Hanau, Germany.

- Equipo Soxhlet.
- Mufla. Wild Barfield. Wild-Barfield Electric Furnaces Ltd. Made in England.
- Rancimat 679, Metrohm, Herisau, Switzerland.
- Rotavapor R-205 Büchi, VWR Scientific, Inc, Atlanta, GA.
- Tela filtrante de Lino.
- Termómetro.

2.2. Métodos.

2.2.1 Análisis Proximal. Se efectuó sobre ambas semillas frescas.

2.2.1.1 Determinación del contenido de humedad.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Ab 2-49 (1993) se determinó el contenido de humedad presente. Se procedió a realizar el secado de las semillas molidas en estufa a 105°C, hasta que la muestra presentó peso constante.

2.2.1.2 Determinación del contenido de materia grasa total.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Ab 3-49 (1993) se realizó mediante método de Soxhlet, en el que se determina la cantidad de materia grasa por extracción con éter de petróleo, evaporación de éste y la determinación gravimétrica del aceite extraído.

2.2.1.3 Determinación del contenido de proteínas.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Ab 2-49 (1993) se realizó mediante el método Kjeldahl que mide el nitrógeno total el cual multiplicado por el factor 5,3 entrega el equivalente en proteínas.

2.2.1.4 Determinación del contenido de cenizas. Método gravimétrico.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Bc 5-49 (1993). Se procedió a realizar la calcinación en mufla, a temperatura de 550°C, previa calcinación con mechero.

2.2.1.5 Determinación de fibra cruda.

Se determinó conforme el método A.O.A.C. (1964), el cual consiste en una hidrólisis ácida y luego en una hidrólisis alcalina, sobre la muestra seca y desgrasada.

2.2.2 Métodos analíticos aplicados al aceite extraído de ambas semillas.

2.2.2.1 Cromatografía gas-líquido.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Ce 1-62 (1993). Este método es aplicable a ésteres metílicos de ácidos grasos que contienen 8 a 24 átomos de carbono, en muestras grasas animales, en aceites vegetales y en general a cualquier mezcla de ácidos grasos después de su conversión a ésteres metílicos. Para la determinación del perfil de ácidos grasos de la muestra de aceite, éstos se derivatizaron mediante la aplicación de un proceso de metilación alcalina y posteriormente una metilación ácida de acuerdo a UNE 55-037-737311. La metilación alcalina consiste en la utilización de metilato de sodio y la metilación ácida en la utilización de ácido sulfúrico en metanol. Luego se extrajeron los ésteres metílicos de ácidos grasos con hexano p.a. y se inyectó al cromatógrafo de gases. También se inyectaron los patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos (Sigma) los cuales sirvieron para identificar los ácidos grasos de las muestras por comparación de sus tiempos de retención.

Para realizar la cromatografía gaseosa se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5860 serie 2, con detector de ionización de llama, usando H₂ como gas portador, unido a un integrador Hewlett-Packard 3395. La columna capilar utilizada fue de sílica fundida BPX-70 de 50 mm de largo y 0,25 mm de diámetro interno, con espesor de película de 0,2 µm. La temperatura del horno fue programada entre 160°C a 230°C, con una velocidad de calentamiento de 2°C/min. las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 240°C.

2.2.2.2 Tocoferoles.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Ce 8-89 (1993) se determinó el contenido de tocoferoles expresados en ppm, presente en los aceites extraídos de ambas semillas mediante HPLC.

Se utilizó un cromatógrafo HPLC Merck Hitachi L-6200 A con detector de fluorescencia, unido a un integrador Merck Hitachi 2500. La columna utilizada fue Superspher Si 60 de 25 cm de largo, Merck. La fase móvil utilizada fue Hexano:Isopropanol 99,5:0,5, con flujo de 1,0 ml/min.

2.2.2.3 Tiempo de Inducción.

De acuerdo al método oficial A.O.C.S. Cd 12b-92 (1993) se determinó, en el aceite extraído de ambas semillas, el tiempo en horas correspondiente al punto de inflexión de la curva, llamado tiempo de inducción.

Se utilizó el equipo Rancimat Metrhom, con detector 679. Las condiciones de operación fueron: flujo de aire 20 l/h y una temperatura de 110°C durante el tiempo de ensayo.

2.2.2.4 Determinación de fitosteroles.

Para la determinación de fitosteroles, primero se obtuvo la materia insaponificable del aceite extraído, según el Método Oficial AOCS Ca 6b-53 (1993) y luego por cromatografía gas-líquido (GLC) se determinó los fitosteroles presentes, siguiendo el Método de la Norma Española UNE 55-019-84. Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II equipado con detector de ionización de llama, sistema de inyección split y columna capilar HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Silicone) de 30 m de largo, 0,25 µm de espesor de film y 0,32 mm de diámetro interno.

La temperatura del horno fue de 270°C, isoterma. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 300°C. El gas portador fue hidrógeno.

La identificación y cuantificación de los fitosteroles presentes en el aceite extraído de las semillas se realizó por comparación de los tiempos de retención y concentraciones, respectivamente, con los estándares de fitosteroles y con la

utilización del estándar interno 5 α Colestano. El resultado se expresó en mg de esteroles por 100 g de aceite.

2.2.3 Determinación de aminoácidos.

De acuerdo al método de Alaiz y cols., 1992, que es aplicable para muestras secas y desgrasadas. El tratamiento a la muestra consiste en una hidrólisis y una derivatización. Para la hidrólisis a la muestra se agregó 200 μ l de estándar interno (D.L. α -ácido aminobutírico) en 4ml de HCl 6N, esta mezcla se sometió a 120°C por 24 horas, el filtrado se llevó a rotavapor a 60°C, a sequedad, el residuo se aforó a 25ml con tampón borato. Para la derivatización, a 5ml del hidrolizado disuelto en tampón borato se agregó 4 μ l de reactivo derivatizante (etoximetileno-malonato de dietilo), finalmente se llevó a baño maría a 50°C por 50 min con vigorosa agitación. Se utilizó un cromatógrafo HPLC Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump con columna Nova-Pack RP18 de 4 μ m de 300x3,9mm de d.i., con Detector Merck Hitachi L-4250 UV-VIS e Integrador Merck Hitachi D-2500, con fase de tampón acetato de sodio (A) y acetonitrilo (B) calidad HPLC, el cual es un sistema de gradiente de composición binaria, bajo las siguientes condiciones. Tiempo 0.0-3.0 min gradiente lineal desde A-B (91:9) a A-B (86:14): 3.0-13.0 min elusión con A-B (86:14):13.0-30.0 min gradiente lineal desde A-B (86:14) a A-B (69:31): 30.0-35.0 min elusión con A-B (69:31). Con flujo 0,9 ml/min.

2.2.3.1 Determinación de alcaloides.

Debido a que en las especies del género *Berberis* se encuentran presentes alcaloides, se realizó como prueba cualitativa una extracción ácida de la semilla y el empleo de reactivo revelador de Dragendorff. Posteriormente para cuantificar los alcaloides presentes se realizó una alcalimetría básica en medio anhidro (Higuchi y Brochmann-Hanssen, 1961). El resultado se expresó en el alcaloide Dihidrorugosinona.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Análisis proximal de las semillas estudiadas.

En la Tabla 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos por el análisis proximal de semilla de Piñón y Michay, respectivamente.

Tabla 1. Análisis proximal de semilla de Piñón.

Parámetro	g/100g
Humedad	5,2 ± 0,08
Proteínas (N x 5,3)	29,0 ± 0,0
Materia Grasa	47,7 ± 0,3
Fibra Cruda	1,8 ± 0,1
E.N.N.* (por diferencia)	12,0 ± 0,0
Cenizas	4,3 ± 0,0

E.N.N.*= Extractivo No Nitrogenado.

La humedad de 5,2% es comparable al 5,1% señalado por Nergiz y cols., 2004.

El contenido promedio de proteínas fue 29%. Valor levemente inferior al 31,6% encontrado por otros autores (Nergiz y cols., 2004).

El contenido de materia grasa, es el mayoritario con 47,7%. Este valor es algo superior de 44,9% indicado por otros autores (Nergiz y cols., 2004). Según lo señalado por este autor, las semillas de pino son ricas en aceite cuyo contenido es variable debido a diferencias en especie y factores medioambientales. Wolff y cols. (1995), confirmaron que sus contenidos varían desde 31 a 68%.

Al comparar el contenido de materia grasa de la semilla de Piñón con el de algunas nueces (Schmidt-Hebbel y cols., 1992), como Avellana Chilena 49,3%, Maní 39,8%, Nuez 50,1% y Almendra 43,3%, la semilla de Piñón es levemente inferior a Nuez y Avellana Chilena.

El contenido de fibra cruda fue de 1,8%. Valor mayor al 0,8% informado en Agriculture Handbook (1975, Number 8-12).

El E.N.N. obtenido por diferencia fue 12,0%, valor comparable al 13,9% encontrado por otros autores (Nergiz y cols., 2004).

La cantidad de cenizas fue de 4,3%, por lo que se podría considerar que ésta semilla es un buen aporte en minerales. Este valor coincide prácticamente con el 4,5% encontrado por otros autores (Nergiz y cols., 2004).

Se determinó que el valor calórico aportado por 100 g de esta semilla fue de 593,3 Kcal, lo cual es alto si se considera que el valor calórico de algunas nueces como, Almendra, Avellana Chilena y Nuez, es de 534, 555, 498 Kcal respectivamente.

Tabla 2. Análisis proximal de semilla de Michay.

Parámetro	g/100g
Humedad	9,8 ± 0,2
Aminoácidos	3,3 ± 0,2
Alcaloides	4,7 ± 0,2
Materia Grasa	4,6 ± 0,0
Fibra Cruda	36,2 ± 0,1
E.N.N.* (por diferencia)	34,7 ± 0,0
Cenizas	6,7 ± 0,1

E.N.N.*= Extractivo No Nitrogenado.

No se encontró en la literatura datos sobre esta semilla, por lo cual los valores encontrados en el análisis proximal se compararon con los obtenidos en análisis realizados en otra semilla de composición similar como Rosa mosqueta, recolectada en el verano de 2005 en la misma zona que la semilla de Michay.

Se encontró que el contenido de humedad en la semilla de Michay fue de 9,8%. Este valor es menor, comparado con semilla de Rosa Mosqueta, donde la humedad es 12,9%. En general, el contenido de humedad es variable y en semillas debe ser inferior al 10%.

El contenido promedio de aminoácidos (proteínas) en la semilla de Michay fue de 3,3%. Este valor es menor comparado con semilla de Rosa Mosqueta, de 6,9%.

En la determinación de proteínas se utilizó el método Kjeldahl, que según Badui (1999), es el que más se utiliza e incluso se toma como referencia o comparación cuando se usan otras técnicas; con este procedimiento se mide el nitrógeno total de un alimento sin hacer distinción entre aquél que proviene de las proteínas y el no proteínico.

Dentro de los componentes nitrogenados no proteicos se encuentran los alcaloides

Se encontró que el contenido de materia grasa en la semilla de Michay fue de 4,6%, valor menor al de semilla de Rosa Mosqueta de 5,7%.

En relación al aporte de fibra cruda, la semilla de Michay presentó 36,2%, inferior al encontrado para la semilla de Rosa Mosqueta de 54,2%.

El E.N.N. obtenido por diferencia fue 34%, valor mayor comparado con el 18,7% obtenido para la semilla de Rosa Mosqueta.

El contenido de cenizas en la semilla de Michay fue de 6,7%, superior al encontrado en semilla de Rosa Mosqueta de 1,5%, lo que estaría indicando un buen aporte de minerales.

Se determinó que el valor calórico aportado por 100 g de esta semilla fue de 193,4 Kcal, cantidad mayor si es comparado con los 153,7 Kcal aportado por la semilla de Rosa Mosqueta.

De estos resultados se desprende que el principal componente en semilla de Piñón es la materia grasa con un promedio de 47,7% y en semilla de Michay lo es la fibra cruda con 36,2%.

En la Figura 6 se compara la composición centesimal de las dos semillas en estudio.

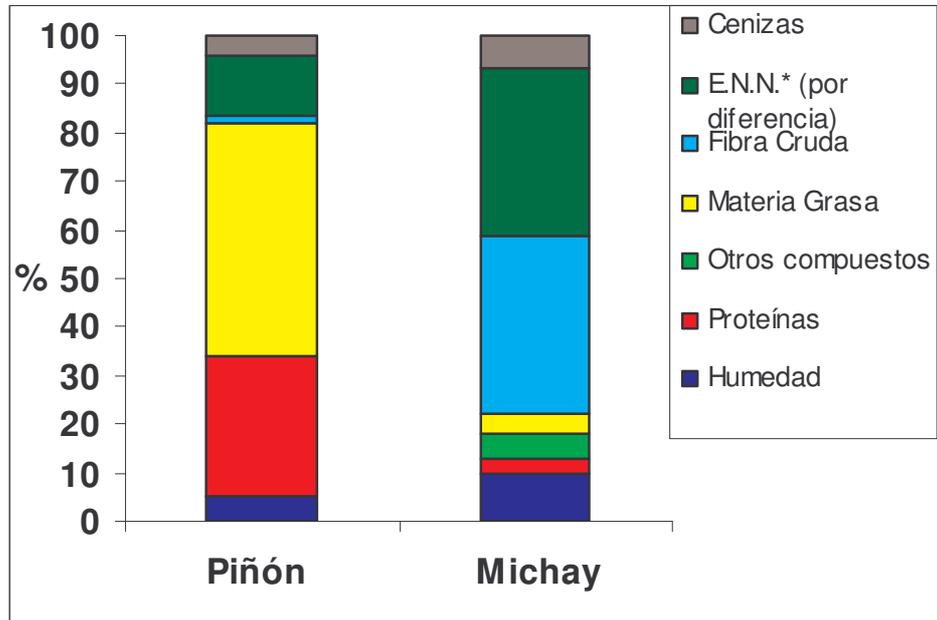


Figura 6: Análisis proximal de ambas semillas con su respectivo aporte en macronutrientes.

En la Figura 7 se compara el aporte calórico de semillas de Piñón y Michay.

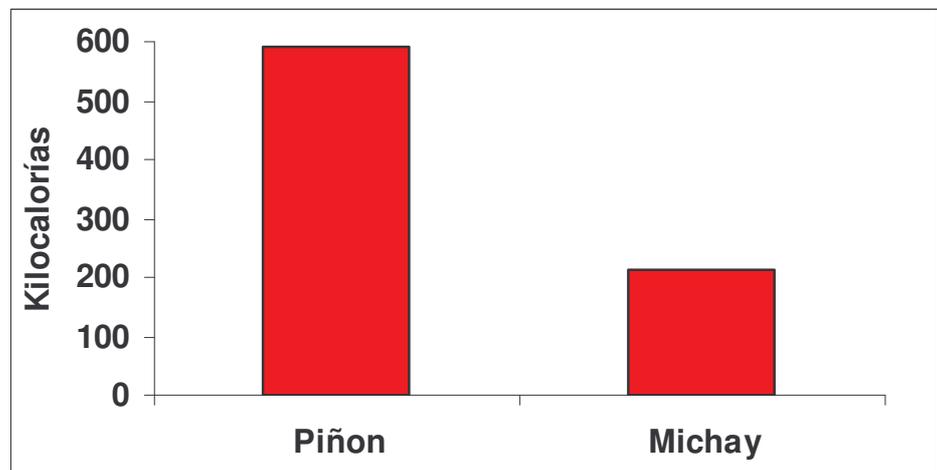


Figura 7: Aporte de kilocalorías por 100g de semillas de Piñón y Michay.

3.2. Caracterización del aceite extraído de Piñón y Michay.

3.2.1. Composición en ácidos grasos.

La composición porcentual de ácidos grasos para aceite de semilla de Piñón se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Piñón (porcentaje de ésteres metílicos).

Acidos Grasos	% Esteres Metílicos	
Ac. Palmítico	C16:0	5,58 ± 0,02
Ac. Estearico	C18:0	4,36 ± 0,01
Ac. Eicosanoico	C20:0	0,57 ± 0,02
Ac. Docosanoico	C22:0	0,11 ± 0,01
Total Saturados		10,6
Ac. Palmitoleico	C16:1 ω7	0,21 ± 0,01
Ac. Hexadecaenoico	C16:1 isom	0,09 ± 0,01
Ac. Oleico	C18:1 ω9cis	37,4 ± 0,01
Ac. Octadecaenoico	C18:1 ω7cis	0,45 ± 0,01
Ac. Octadecaenoico	C18:1 isom	0,10 ± 0,01
Ac. Octadecaenoico	C18:1 isom	0,83 ± 0,02
Ac. Eicosaenoico	C20:1	1,05 ± 0,01
Total Monoinsaturados		40,1
Ac. Linoleico	C18:2 ω6	43,77 ± 0,02
Ac. Octadecaenoico	C18:2 isom	0,28 ± 0,01
Ac. Pinolénico	C18:3 isom	1,03 ± 0,01
Ac. Linolénico	C18:3 ω3	0,8 ± 0,01
Total Poliinsaturados		45,9
Relación Saturados:		
Monoinsaturados:Poliinsaturados		1 : 3,8 : 4,3
Indice de Poliinsaturación		4,3

El porcentaje de ácidos grasos saturados fue de 10,6%, monoinsaturados de 40,1%, donde predominó el ácido oleico (18:1 ω-9) con 37,4%, valor cercano al 38,6% informado por Nergiz y cols., (2004). Los ácidos grasos poliinsaturados representaron el 45,9% donde mayoritariamente se encontró ácido linoleico (18:2

ω -6) con 43,8%, este valor es algo inferior al informado por Nergiz y cols., (2004), de 47,6%.

La composición de ácidos grasos demostró que los ácidos oleico y linoleico sumaron más del 80% del total. Según la literatura es común que las semillas de pino contengan ácidos oleico y linoleico en gran abundancia (Wolff y cols., 1995).

El ácido graso propio del aceite obtenido de este tipo de especie es el ácido pinolénico (18:3, cis 5, 9, 12) y se obtuvo un 1,03% valor superior comparado con el 0,35% reportado por Wolff y cols. (1995). Otros autores (Sharashkin y Gold, 2004) informaron que este tipo de ácidos grasos es un medio para estimular la proliferación celular, prevenir la hipertensión, disminuir los niveles de lípido y azúcar en la sangre e inhibir reacciones alérgicas.

El cromatograma de la determinación de ácidos grasos presentes en semilla de Piñón, se encuentra en el Anexo 1.

En la tabla 4 se compara la composición de los principales ácidos grasos del aceite de Piñón con los de aceite de Avellana Chilena, Maní, Nuez y Almendra.

Tabla 4. Principales ácidos grasos presentes en aceite de Piñón comparado con aceites de Avellana Chilena, Maní, Nuez, Almendra (porcentaje de ésteres metílicos).

A. Grasos	Piñón	Avellana Chilena	Maní	Nuez	Almendra
Ac. Palmítico C16:0	5,58	1,8	12,0	8,0	6,8
Ac. Estearico C18:0	4,36	0,8	4,5	3,4	1,6
Ac. Oleico C18:1 ω-9	37,4	40,0	41,0	17,3	66,2
Ac. Linoleico C18:2 ω-6	43,77	8,5	35,0	60,0	25,4
Ac. Linolénico C18:3 ω-3	0,8	2,6	-	11,3	-

Al realizar una comparación entre los porcentajes de los principales ácidos grasos en aceite de Piñón, con los presentes en aceite de otras semillas como Avellana Chilena, Maní, Nuez y Almendra, según los datos publicados por Masson y Mella (1985), se observa que la cantidad presente de ácido palmítico en el aceite de Piñón es similar al de aceite de Almendra, y que para los ácidos grasos estearico, oleico, linoleico y linolénico los valores son similares al aceite de Maní.

La composición en ácidos grasos de los aceites, especialmente el nivel de insaturación, puede influir en la estabilidad oxidativa de éstos. La estabilidad oxidativa es un importante parámetro de calidad de los aceites por su potencial aplicación comercial y utilización en alimentos y otros productos comerciales.

En la Tabla 5, se indica la composición en ácidos grasos del aceite de semilla de Michay.

Tabla 5. Perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Michay (porcentaje de esteres metílicos).

Acidos Grasos		% Esteres Metílicos
Ac. Octanoico	C8:0	1,1 ± 0,06
Ac. Laurico	C12:0	Trazas
Ac. Mirístico	C14:0	0,2 ± 0,03
Ac. Palmítico	C16:0	6,6 ± 0,01
Ac. Heptadecanoico	C17:0	0,1 ± 0,01
Ac. Esteárico	C18:0	3,3 ± 0,01
Ac. Eicosanoico	C20:0	0,3 ± 0,02
Ac. Docosanoico	C22:0	0,3 ± 0,05
Ac. Tetracosanoico	C24:0	1,4 ± 0,02
Total Saturados		12,2
Ac. Hexadecaenoico	C16:1	0,2 ± 0,01
Ac. Oleico	C18:1 ω9cis	19,1 ± 0,06
Ac. Octadecaenoico	C18:1 ω7cis	0,9 ± 0,01
Ac Eicosaenoico	C20:1	0,3 ± 0,01
Total Monoinsaturados		20,4
Ac. Linoleico	C18:2 ω6	36,7 ± 0,02
Ac. Octadecatrienoico	C18:3 isom	0,1 ± 0,01
Ac. Linolénico	C18:3 ω3	28,2 ± 0,09
Total Poliinsaturados		65
Relación Saturados:		
Monoinsaturados:Poliinsaturados		1 : 1,6 : 5,3
Indice de Poliinsaturación		5,3

En el aceite de semilla de Michay, el grupo predominante fue el de los ácidos grasos poliinsaturados que corresponden a un 65% representado por el ácido

linoleico con un 36,7% y al ácido linolénico con un 28,2%. Lo sigue el grupo de los ácidos grasos monoinsaturados con 20,4%, siendo el ácido oleico el mayoritario con 19,1%. Estos dos grupos representan el 80% del total. El alto porcentaje de ácido linolénico le confiere una mayor inestabilidad, que se traduce en una mayor susceptibilidad a desarrollar rancidez oxidativa.

El cromatograma se encuentra en el Anexo 2.

En la Tabla 6 se compara la composición en ácidos grasos de aceite de semilla de Michay con semilla de Rosa Mosqueta.

Tabla 6. Comparación entre los principales ácidos grasos presentes en aceites de semillas de Michay y Rosa Mosqueta (porcentaje de esteres metílicos).

Acidos Grasos	Michay	Rosa Mosqueta
Ac. Palmítico C16:0	6,6	4,5
Ac. Esteárico C18:0	3,3	1,6
Ac. Oleico C18:1 ω-9	19,1	16,3
Ac. Linoleico C18:2 ω-6	36,7	43,2
Ac. Linolénico C18:3 ω-3	28,2	34,4

Al comparar las cantidades de los principales ácidos grasos presentes en aceite de Michay con los informados por Masson y Mella (1995) en aceite de Rosa Mosqueta se aprecia, en general, cierta similitud.

De los datos obtenidos para los aceites extraídos de semilla de Piñón y semilla de Michay se desprende que ambos tienen un bajo aporte de ácidos grasos saturados del orden del 12%. El aceite de Piñón prácticamente dobla el % de ácidos grasos monoinsaturados comparado con el aceite de semilla Michay. En cambio el aceite de semilla de Michay se presenta como una excelente fuente de los ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico en una relación 1,3:1,0, respectivamente, lo que no es habitual y que coincide prácticamente con la relación en que ambos ácidos grasos se encuentran en el aceite de Rosa Mosqueta.

El aceite de semilla de Michay se puede considerar como una potencial fuente de ácidos grasos omega 6 y omega 3 de aplicación en alimentos funcionales.

En cuanto al aceite de semilla de Piñón su aporte de ácido linoleico está dentro del porcentaje habitual de algunos aceites de semillas, sin desmerecer que la presencia de ácido pinolénico ($\omega 3$) es interesante para futuros alimentos funcionales.

En la Figura 8 y Figura 9, se comparan los porcentajes de ácidos grasos y ácidos linoleico y linolénico, respectivamente, para el aceite de las semillas en estudio.

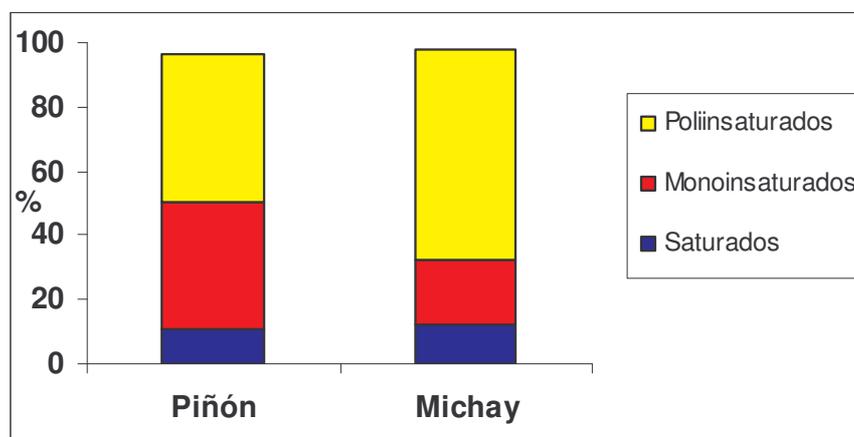


Figura 8: Distribución porcentual de los grupos de ácidos grasos en aceites de semillas de Piñón y Michay (expresado en ésteres metílicos).

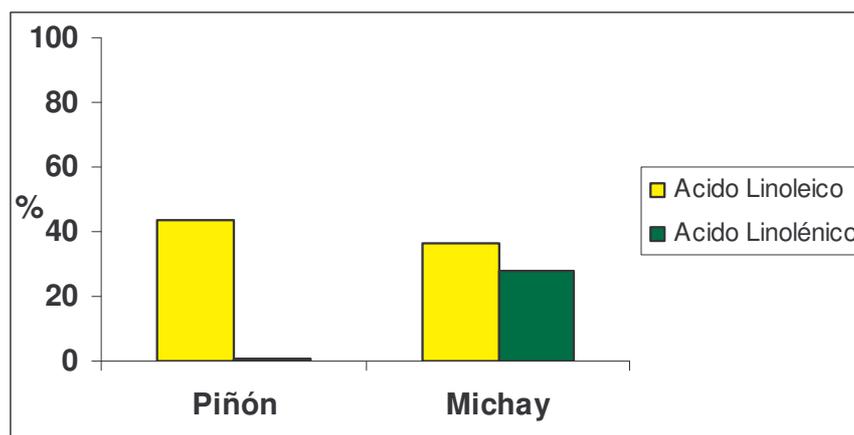


Figura 9: Porcentaje de ácidos linolénico y linoleico en aceites de Piñón y Michay (expresado en esteres metílicos).

3.2.2. Contenido de Tocoferoles.

Los resultados del contenido de tocoferoles presentes en aceite de semilla de Piñón se muestran en la Tabla 7 y en aceite de semilla de Michay en la Tabla 9.

Tabla 7. Contenido de tocoferoles en aceite de semilla de Piñón.

Tocoferol	mg/kg de aceite (ppm)
Alfa	1409 \pm 43,3
Beta	29 \pm 1,6
Gamma	54 \pm 2,5
Delta	9 \pm 2,1
Total	1501

El aceite de semilla de Piñón presentó una alta cantidad de alfa tocoferol con 1409 ppm y baja para beta con 29 ppm, gamma con 54 ppm, y delta tocoferol con 9 ppm. dando un total de 1501 ppm.

La comparación con el contenido de tocoferoles presentes en aceites de Avellana Europea, Maní, Nuez, Almendra y Piñón de acuerdo a los datos de Maguire y cols. (2004) se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Comparación de tocoferoles presentes en aceites de Piñón, Avellana Europea, Maní, Nuez y Almendra.

Tocoferol (ppm)	Piñón	Avellana Europea	Maní	Nuez	Almendra
Alfa	1409	310	88	21	440
Beta	29	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
Gamma	54	61	60	301	13
Delta	9	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
Total	1501	371	148	322	453

Al comparar el resultado obtenido del total de tocoferoles presentes en aceite de semilla de Piñón, con el resultado publicado del total de tocoferoles presentes en aceites de otras semillas como son Avellana Europea, Maní, Nuez y Almendra, según datos obtenidos por Maguire y cols. (2004), se observa que el aceite de semilla de Piñón triplicó al valor más cercano que corresponde al total de tocoferoles presentes en aceite de Almendra, considerando eso si que el que el

alfa tocoferol es el mayoritario, a excepción de la Nuez donde predomina el gamma tocoferol.

Tabla 9. Contenido de tocoferoles de aceite de semilla de Michay.

Tocoferol	mg/kg de aceite (ppm)
Alfa	51 ± 4,0
Gamma	880 ± 20,6
Total	931

Se encontró un alto contenido de gamma tocoferol de 880 ppm, bajo contenido de alfa tocoferol de 51 ppm y ausencia de beta y delta tocoferol, con un total de 931 ppm. La gran cantidad de gamma tocoferol, implica una protección natural del aceite dado su alto porcentaje de ácido linolénico.

En la Tabla 10 y Figura 10 se compara el contenido de tocoferoles de las semillas en estudio.

Tabla 10. Comparación del contenido de tocoferoles de aceite de semilla Michay y Basil.

Tocoferol (ppm)	Michay	Basil
Alfa	51	52
Gamma	880	828
Delta	0	47
Total	931	927

Comparando la cantidad de tocoferoles presentes en aceite de Michay con aceite de semilla de Basil (*Ocimum basilicum*), según datos publicados por Matthaus y cols.(2003), se aprecia que el alfa tocoferol gamma tocoferol y tocoferoles totales se encuentran prácticamente en idénticas cantidades en ambos aceites.

Normalmente los aceites con porcentaje importante de ácido linolénico presentan un contenido alto en gamma tocoferol el cual es más activo como antioxidante que el alfa tocoferol, ejemplo de ello son los aceites de nuez y linaza, esta situación se observa en el aceite de Michay.

En general, los tocoferoles con alta actividad de vitamina E son menos efectivos como antioxidantes que aquellos con menor actividad de vitamina E. El orden de actividad antioxidante es: delta>gamma>beta>alfa. Sin embargo, la actividad relativa de estos compuestos es significativamente influenciada por la temperatura y la luz. Aunque biológicamente el alfa tocoferol es el que tiene mayor importancia (Fennema, 1985)

Este interesante aporte de alfa tocoferol del aceite de semilla de Piñón y de gamma tocoferol del aceite de semilla de Michay junto a su especial composición de ácidos grasos, los hace potencialmente excelentes ingredientes de alimentos funcionales. Esta diferente composición debe reflejarse en la estabilidad oxidativa de ambos aceites, lo cual se demuestra en la Tabla 11.

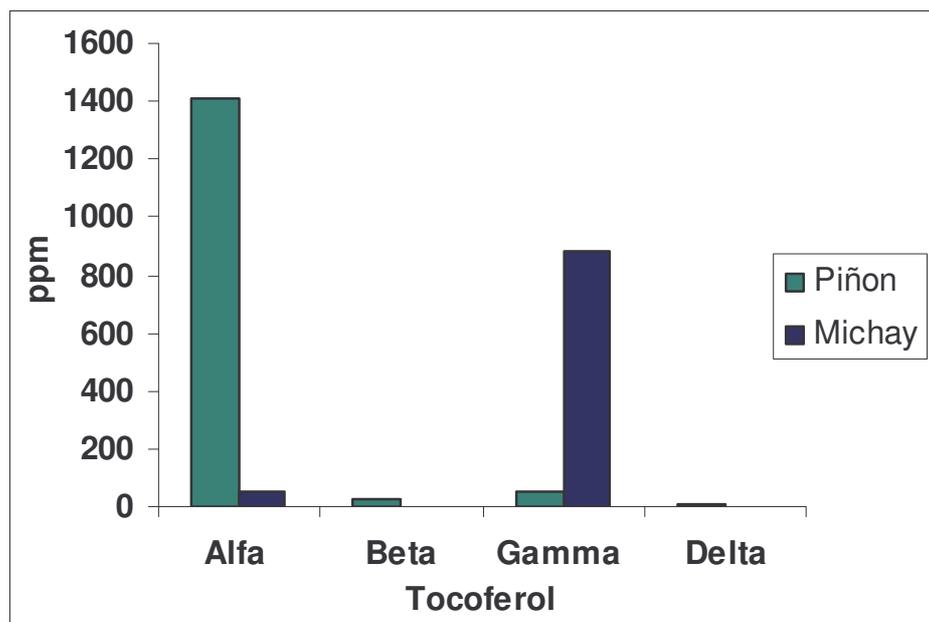


Figura 10: Contenido de tocoferoles en aceites de semillas de Piñón y Michay (ppm).

3.2.3. Tiempo de Inducción para los aceites de ambas semillas estudiadas.

El resultado del Tiempo de Inducción para el aceite de semilla de Piñón y Michay se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Tiempo de Inducción de aceite de semilla de Piñón y Michay.

Muestra	Tiempo de Inducción (horas)
Piñón	9,5 ± 0,7
Michay	19,1 ± 0,3

El Tiempo de Inducción dió un valor de 9,5 h para el aceite de semilla de Piñón y en el caso del aceite de semilla de Michay se obtuvo un tiempo de inducción de 19,1 h. Llama la atención la alta estabilidad de este último aceite dada su alta poliinsaturación (65%) y alto porcentaje de ácido linolénico (28.2%), aún más, si se toma como referencia el aceite de rosa mosqueta que posee una composición en ácidos grasos similar y un tiempo de inducción de sólo 1,54 hora (Masson y cols., 2005).

3.2.4. Contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Piñón y Michay.

El contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Piñón se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Piñón.

Esterol	mg/100g de aceite
Campesterol	117 ± 0,8
β-Sitoesterol	662 ± 11,7
Sitostanol	95 ± 2,3
Δ5 Avenasterol	4,0 ± 0
Δ5, 24 Estigmastenol (probable)	7,0 ± 0,1
Estigmasterol	Trazas
Total	885

La materia insaponificable determinada en este aceite fue de 4,31%

Se encontró en el aceite de semilla de Piñón la presencia de seis fitosteroles con un total de 884 mg/100g de aceite, dentro de los cuales el mayoritario fue el

β -Sitoesterol con 662 mg/100g de aceite, representando el 75%, lo que es común en aceites de semillas (Figura 11).

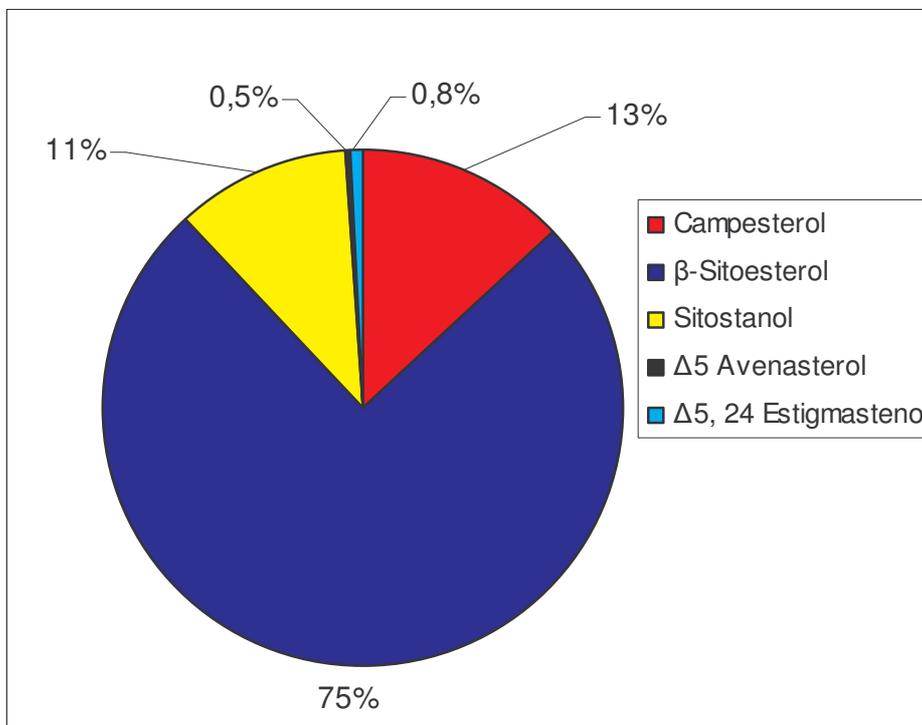


Figura 11: Composición porcentual de fitosteroles presentes en aceite de semilla de Piñón (mg/100g de aceite).

El cromatograma de la determinación de fitosteroles presentes en semilla de Piñón, se encuentra en el Anexo 3.

La comparación de fitosteroles presentes en aceites de Avellana Europea, Maní, Nuez, Almendra y Piñón se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Comparación de fitosteroles presentes en aceites de Piñón, Avellana Europea, Maní, Nuez y Almendra.

Esterol (ppm)	Piñón	Avellana Europea	Maní	Nuez	Almendra
Campesterol	1170	67	198	51	55
β -Sitoesterol	6620	991	1363	1130	2071

Al comparar los valores de fitosteroles obtenidos en la semilla de Piñón con valores publicados por Maguire y cols., (2004), para otras nueces, se observa que ninguno de ellos es comparable a los valores encontrados para la semilla de Piñón.

El resultado de la determinación de fitosteroles en aceite de semilla de Michay se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Contenido de fitosteroles en aceite de semilla de Michay.

Esterol	mg/100g de aceite
Campesterol	124 ± 0,1
β-Sitoesterol	4460 ± 0,9
Sitostanol	238 ± 10,8
Δ 7 Estigmastenol	183 ± 6,7
Δ 7 Avenasterol	329 ± 7,5
No identificado	5200 ± 15,2
Total	10534

En el caso del aceite de semilla de Michay la materia insaponificable dió un valor de 6,52%. En el aceite de semilla de Michay, se encontraron presentes cinco fitosteroles de los cuales sólo cuatro fueron identificados y cuantificados (Figura 12). El esteroles no identificado presentó un tiempo de retención muy cercano al colesterol y un área de aproximadamente 40% y no fue posible identificar, debido a que presentaba un tiempo de retención distinto a los estándares utilizados.

Para confirmar si se trataba de un esteroles y debido a su gran área, se siguió el Método de la Norma UNE 55-019-84, para lo cual se realizó una cromatografía de capa fina. El resultado de este análisis demostró, que se trataba de un esteroles, no identificado, comparado con el tiempo de retención de los patrones de que se dispone.

El cromatograma de la determinación de fitosteroles presentes en semilla de Michay, se encuentra en el Anexo 4.

Al comparar, la presencia de fitosteroles entre aceites de semilla de Michay con semilla de Hibiscus según datos de Holser y cols., (2004) y semilla de Ginseng Americano según datos de Beveridge y cols., (2002), la semilla de Hibiscus presenta 5 fitosteroles que sumados dan un total de 780mg/100g, dentro de los

cuales el componente mayoritario es el β -Sitoesterol aportando aproximadamente el 77,8% del total con 606,84mg/100g, cantidad que es 6 veces menor que el presentado en aceite de semilla de Michay para el mismo esterol. En tanto que para la semilla de Ginseng Americano presenta 14 fitosteroles que sumados dan un total de 404,2mg/100g, dentro de los cuales el componente mayoritario es el β -Sitoesterol aporta el 46,1% del total con 186,42mg/100g cantidad 22 veces menor que la presente en aceite de semilla de Michay.

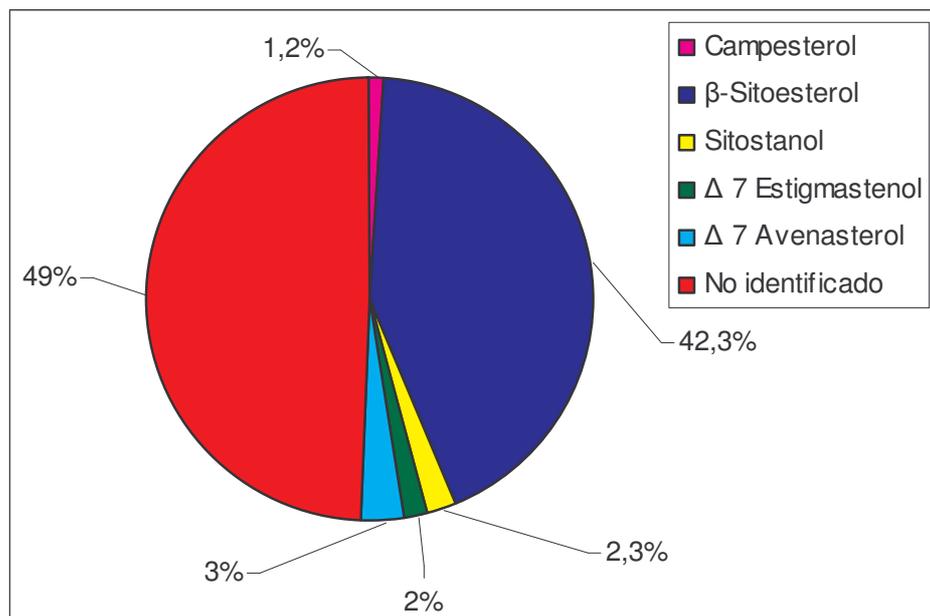


Figura 12: Composición porcentual de fitosteroles presentes en aceite de semilla de Michay (mg/100g de aceite).

3.3. Contenido de aminoácidos.

Los aminoácidos presentes en semilla de Piñón se muestran en la Tabla 15, expresados en base húmeda y se han comparado con los valores publicados en el Agriculture Handbook (1975, Number 8-12), los aminoácidos presentes en asemilla de Michay se presentan en la Tabla 16.

Tabla 15. Contenido de aminoácidos de semilla de Piñón, muestra fresca. Comparado con valores publicados por Agriculture Handbook (1975, Number 8-12).

Aminoácidos	Muestra	A. Handbook
Ac. Aspártico	2,41 ± 0,01	2,18
Ac. Glutámico	6,28 ± 0,01	4,08
Serina	1,66 ± 0,02	1,01
Histidina	0,43 ± 0,00	0,57
Glicina	1,49 ± 0,01	1,22
Treonina	0,95 ± 0,00	0,76
Arginina	5,94 ± 0,02	4,66
Alanina	1,28 ± 0,00	1,25
Tirosina	1,03 ± 0,02	0,87
Valina	1,57 ± 0,00	1,24
Metionina	0,41 ± 0,00	0,43
Isoleucina	0,96 ± 0,00	0,93
Leucina	2,01 ± 0,00	1,73
Fenilalanina	0,95 ± 0,01	0,91
Lisina	0,79 ± 0,00	0,90
Total	28,2	22,74

En la semilla de Piñón se encontró 28,2g de aminoácidos por 100g de muestra fresca lo cual corresponde a un 97,3% de recuperación en relación al contenido de proteínas de 29%. El 50% correspondió a aminoácidos esenciales, siendo los principales la arginina y leucina, entre los no esenciales el mayoritario fue el ácido glutámico.

El cromatograma de la determinación de aminoácidos presentes en semilla de Piñón se encuentra en el Anexo 5.

Comparando los valores obtenidos son muy similares a los publicados en Agriculture Handbook (1975, Number 8-12) para semilla de *Pinus pinea*.

Los aminoácidos presentes en la semilla de Michay se muestran en la Tabla 16 y el cromatograma se encuentra en el Anexo 6.

Tabla 16. Contenido de aminoácidos de semilla de Michay, muestra fresca.

Aminoácidos	g/100g muestra fresca
Ac. Aspártico	0,36 ± 0,05
Ac. Glutámico	0,53 ± 0,17
Serina	0,20 ± 0,02
Histidina	0,05 ± 0,02
Glicina	0,27 ± 0,04
Treonina	0,21 ± 0,05
Arginina	0,22 ± 0,01
Alanina	0,21 ± 0,05
Tirosina	0,14 ± 0,07
Valina	0,23 ± 0,03
Metionina	0,01 ± 0,00
Isoleucina	0,16 ± 0,01
Leucina	0,27 ± 0,03
Fenilalanina	0,19 ± 0,01
Lisina	0,16 ± 0,03
Total	3,28

Para la semilla de Michay se encontró 3,28 g de aminoácidos por 100 g de muestra fresca, donde el 47,2% fue aportado por aminoácidos esenciales.

En general las especies del género *Berberis* (Berberidaceae), son conocidas por producir un ordenamiento muy especial de alcaloides, todos los cuales derivan biogénicamente del aminoácido tirosina (Muñoz, 1992).

La gran mayoría de los alcaloides bisbencilisoquinolínicos BBI's que han sido estudiados en modelos biológicos presentan actividad asociada a una enorme variedad de efectos como hipotensivos, antiinflamatorios, antiarrítmicos, bactericidas y relajantes musculares (Buck, 1987).

Para confirmar la presencia de alcaloides se realizó una extracción ácida de la semilla. En el extracto se aplicó el reactivo revelador de Dragendorff como prueba

cualitativa, la cual dio positiva. Este reactivo corresponde a Ioduro Bismutato de Potasio (KBiI₄), el cual reacciona con el alcaloide formando un precipitado de color anaranjado, en donde el Potasio es reemplazado por el alcaloide (Moffat, 1986). Posteriormente, para cuantificar la presencia de alcaloides, se realizó una alcalimetría básica, este método consistió en obtener un extracto de alcaloides a partir de una determinada cantidad de semilla seca. El extracto se obtuvo al dejar una noche la semilla seca y molida en agua clorhídrica, luego de filtrado se alcalinizó y se lavó con cloroformo que posteriormente fue evaporado. El residuo en medio acético y con indicador cristal violeta fue titulado con ácido perclórico 0,1 N para finalmente obtener los mg de alcaloide. Como resultado se obtuvo 4,7 g de alcaloide por cada 100 g de muestra fresca, expresados como el alcaloide Dihidrorugosinona. La estructura de este alcaloide y los alcaloides presentes en la semilla de Michay, se muestran en el Anexo 7.

Del perfil de aminoácidos encontrado se puede decir que el ácido aspártico y el ácido glutámico se presentaron en mayor concentración.

En la Figura 13 se muestra la composición porcentual con respecto al total de aminoácidos de semillas de Piñón y Michay.

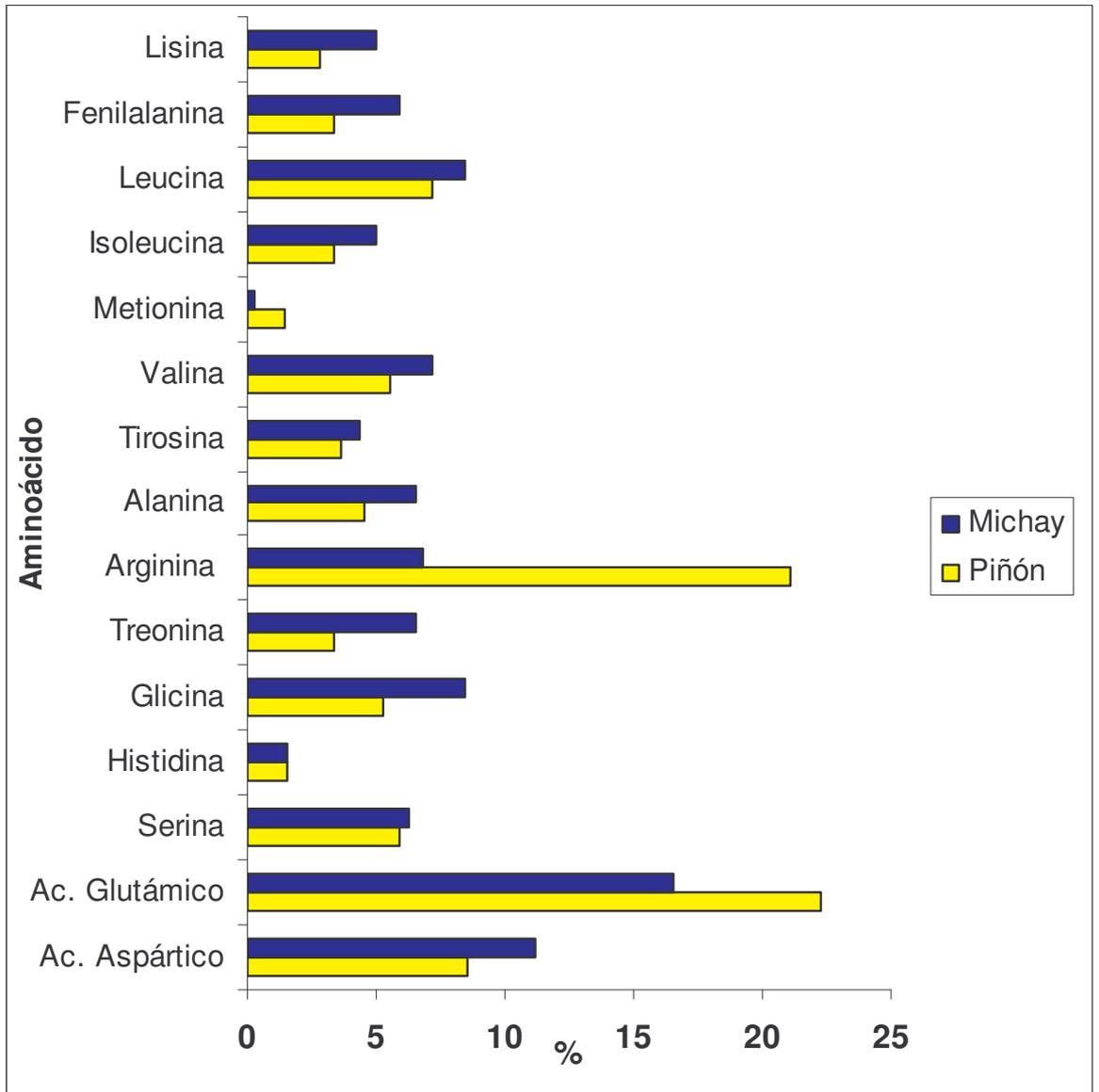


Figura 13: Composición porcentual con respecto al total de aminoácidos de semillas de Piñón y Michay.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES

- La semilla de Piñón, *Pinus pinea*, se presenta como una fuente importante de materia grasa la cual representa el 48%.
- La calidad nutricional de la materia grasa extraída, está dada por un 86% de ácidos grasos insaturados que se desglosan en un 40% en monoinsaturados (oleico 37%) y 46% poliinsaturados representado por un 44% de ácido linoleico, que es esencial.
- En cuanto a los componentes bioactivos presentes en el aceite destaca de un total de 1500 ppm su alto aporte de α -tocoferol (1400 ppm), importante antioxidante natural y la presencia mayoritaria de beta β -Sitoesterol, 662 mg/100g de aceite, de un total de 885 mg/100g de aceite.
- La composición aminoacídica de su proteína 29%, está expresada por un 50% de aminoácidos esenciales, siendo una excelente fuente de Arginina (6g en 100g de semilla fresca). Propiedades que lo hacen ser factible de utilizar en el desarrollo de alimentos funcionales.
- En tanto, la semilla de Michay, *Berberis darwinii hook*, presenta como principales aportes, fibra cruda 36%, Hidratos de Carbono 35%, ambos representan el 71%.
- Se detectó un porcentaje importante de Alcaloides (nitrógeno no proteico) 4,7%, mayor que aminoácidos (proteico) 3,3%, esto correspondió a alcaloides propios de esta especie, lo que impide su incorporación en alimentos funcionales.
- Su aporte lipídico es bajo 4,6%. Sin embargo la composición de ácidos grasos es interesante, 65% de ácidos grasos poliinsaturados representados por 37% de ácido linoleico y 28% de ácido linolénico ambos esenciales.
- De los componentes bioactivos el más importante es el γ -tocoferol 880 ppm, de un total de 931 ppm y el β -Sitoesterol es el que predomina entre los fitosteroles como es habitual, 4460 mg/100g de aceite de un total de 10534 mg/100g de aceite.

CAPITULO V. REFERENCIAS

- Agriculture Handbook. Human Nutrition Information Service. Composition of food. Nut and Seed Products. Raw, Processed, Prepared. United States Department of Agriculture. 1975. Number 8-12.
- Alaiz, M., Navarro, J., Girón J. y Vioque E. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. 591: 181-186. 1992.
- A.O.A.C. Methods of Association of Official Agricultural Chemists. 1964.
- A.O.C.S. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists´. Fourth Edition. 1993.
- Araya, H. Lutz, M. Alimentos Funcionales y Saludables. Revista Chilena de Nutrición. 30 (1), Abril 2003.
- Arenzana, N. Alimentos Funcionales. Regulación en la Unión Europea. Revista Industria de Alimentos. Chile. 6 (28):30-31, 2004.
- Atif B. Awad, Karen C. Chan, Arthur C. Downie, and Carol S. Fink. Peanuts as a source of β -Sitoesterol, a sterol with anticancer properties. Nutrition and Cancer. 36 (2): 238-241, 2000.
- Backhouse N. y Negrete R. Botánica y Farmacognosia II. Apuntes y Guía de Laboratorio. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2005.
- Badui, S. Química de los Alimentos. 3º Ed. México. 1993.648p.
- Belitz, H. D., Grosch, W. Química de los alimentos, 2º Ed. Zaragoza, España. 1993. 1087p.
- Beveridge, T., Li, T. y Drover, J. Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 4744-750. 2002.
- Buck K.T. The Alkaloids. Vol. 30, Cap.1, Academic Press, New York. 1987.
- Carnevale, J. Arboles forestales, descripción, cultivo y utilización. Buenos Aires. Argentina. 1955. 689p.

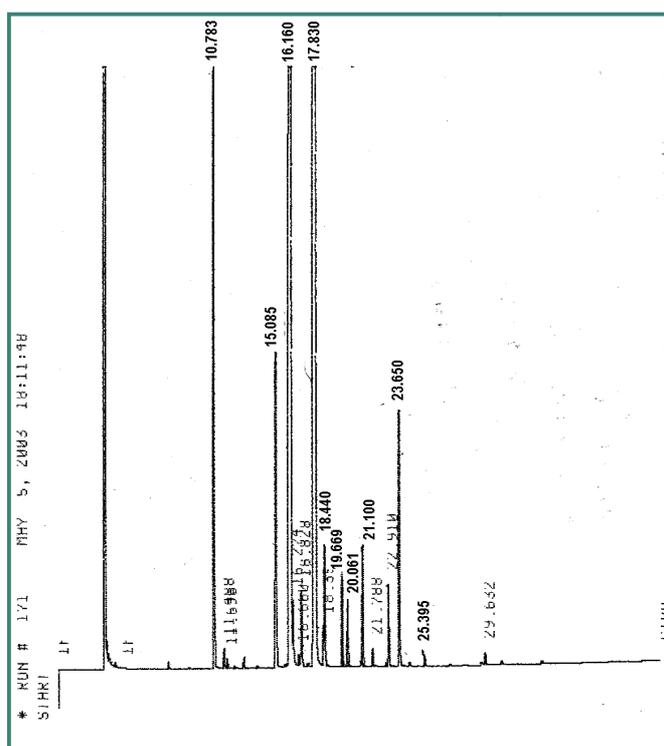
- Crawford, M. Nut Pines Yearbook. West Australian Nut and Tree Crops Association. 1995.
- Donoso, C. y Ramírez, C. Arbustos Nativos de Chile, Guía de reconocimiento. Marisa Cúneo Ediciones. Valdivia, Chile. 1994. 119p.
- Dragone, G. Alimentos Funcionales en Brasil. Recientes avances y perspectivas científicas. Revista Indústria de Alimentos. 6 (28): 32-34, Chile 2004.
- Fennema, O. Food Chemistry. Second Edition. Revised and Expanded. United States of America. 1985.
- Higuchi, T. y Brochmann-Hanssen E. Pharmaceutical Analysis. Interscience Publishers. New York-London. 1961.
- Hoffmann, A. Flora Silvestre de Chile, Zona Araucana. 2ed. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 1991. 257p.
- Holser, R. Bost, G. and Van Boven, M. Phytosterol Composition of Hybrid Hibiscus Seed Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 2546-2548. 2004.
- Kuang C. Biological Functions and Metabolic Fate of Vitamin E Revisited. Journal of Biomedical Science. 11:295–302. 2004.
- Lajolo F., Saura-Calixto F., Wittig de Penna E., Wenzel de Mezenas E. CYTED XI. 6. Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en alimentos para regímenes especiales. Sao Paulo. 2001.
- Lehninger A. L. Bioquímica. 10º Ed. Barcelona, España. 1977. 887p.
- Loewe, V. Monografía Pino Piñonero. Pinus Pinea. Potencialidad de Especies y Sitios para una Diversificación Silvícola Nacional. Infor, Conaf. Santiago, Chile. 1998. 81p.
- Maguire L. S., O'Sullivan S. M., Galvin K., O'Connor T. P. y O'Brien N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene y phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts, and the macadamia nut. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 55 (3): 171-178, May 2004.

- Masson L. y cols. Comunicación personal. Proyecto de semillas no comunes. Estudio en desarrollo. Laboratorio de Química de Alimentos y Materias Grasas. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2005.
- Masson L. y Mella M. Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile: Composición de Ácidos Grasos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 1985. 31p.
- Matthaus B., Vosmann K., Quoc Pham, L. y Aitzetmüller K. FA and Tocopherol Composition of Vietnamese Oilseeds. Journal of the American Chemists' Society. 80:1013-1020. October 2003.
- Metrohm. Instructions for use 679 Rancimat. Measurement in Chemistry. Metrohm Ltd. CH- 9101 Herisau. Switzerland. 1988. 74p.
- Moffat, A. Clarke's. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. The Pharmaceutical Press. London. 1986.
- Montoya, J. M. El Pino Piñonero. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 1990. 98p.
- Muñoz, M. Flora de Parque Nacional Puyehue. Santiago. Universitaria. Santiago, Chile. 1990. 557p.
- Muñoz, O. Química de la flora de Chile. Departamento Técnico de Investigación. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 1992.
- Nergiz, C., Dönmez, I. Chemical Composition and Nutritive Value of *Pinus pinea* L. seeds. Food Chemistry.86: 365-368, 2004.
- Pennacchiotti I. Las proteínas: generalidades y su importancia en nutrición y en la industria de alimentos. Santiago. Chile. 1998. 69p.
- Peterson D. Oat Tocols: Concentration and Stability in Oat Products and Distribution Within The Kernel. American Association of Cereal Chemists 72 (1): 21-24, 1995.
- Rivero, M. CYTED. Proyecto XI. 19: Aplicación de Ingredientes Funcionales en Alimentación Infantil y para Adultos. Resultados y Conclusiones. Laboratorios Ordesa. Barcelona. España. 2004. 422p.

- Schmidt-Hebbel H., Pennacchiotti I., Masson L., Mella M. Tabla de Composición Química de Alimentos Chilenos. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 1992.
- Sharashkin L., Gold M. Pine Nuts (Pignolia): Species, Products, Markets, and Potential for U.S. Production. University of Missouri. Northern Nut Growers Association 95th Annual Report. Proceeding for the 95th annual meeting, Columbia, Missouri, August 16-19, 2004.
- Serra, M. T. Dendrología de Coníferas y otras Gimnospermas. Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Apuntes docentes nº2. 1987.
- Thomas H. J. Beveridge, Thomas S. C. Li, and John C. G. Drover. Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 744-750, 2002.
- UNE. Instituto Español de Normalización.
- Urban, O. Botánica de las Plantas Endémicas de Chile. Soc. Imp. Y Lit. Concepción. Concepción. Chile. 1934. 291 p.
- Valenzuela A., y Garrido A. Los fitosteroles: agentes hipocolesterolémicos naturales de índole no farmacológico. *Revista Chilena de Nutrición*. 27:220-225, 2000.
- Wolff, R., Corinne, B. Fatty Acid Composition of Some Pine Seed Oils. *Journal of the American Chemists' Society*. 72 (9): 1043-1046, 1995.

ANEXO 1

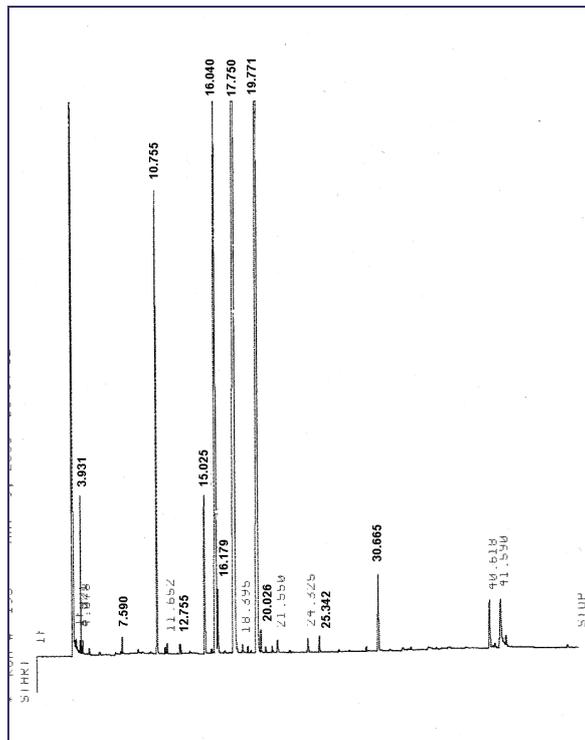
Cromatograma obtenido para la determinación del perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Piñón (porcentaje de esteres metílicos).



Tiempo de Retención (min)	Acido Graso	% Area
10.783	Ac. Palmítico	5.55029
15.085	Ac. Estearico	4.35984
16.160	Ac. Oleico	37.38584
17.830	Ac. Linoleico	43.79958
18.440	Ac. Pinolénico	1.02371
19.669	Ac. Linolénico	0.79761
20.061	Ac. Eicosanoico	0.56404
21.100	Ac. Eicosaenoico	1.05408
23.650	No identificado	2.38845
25.395	Ac. Docosanoico	0.11042

ANEXO 2

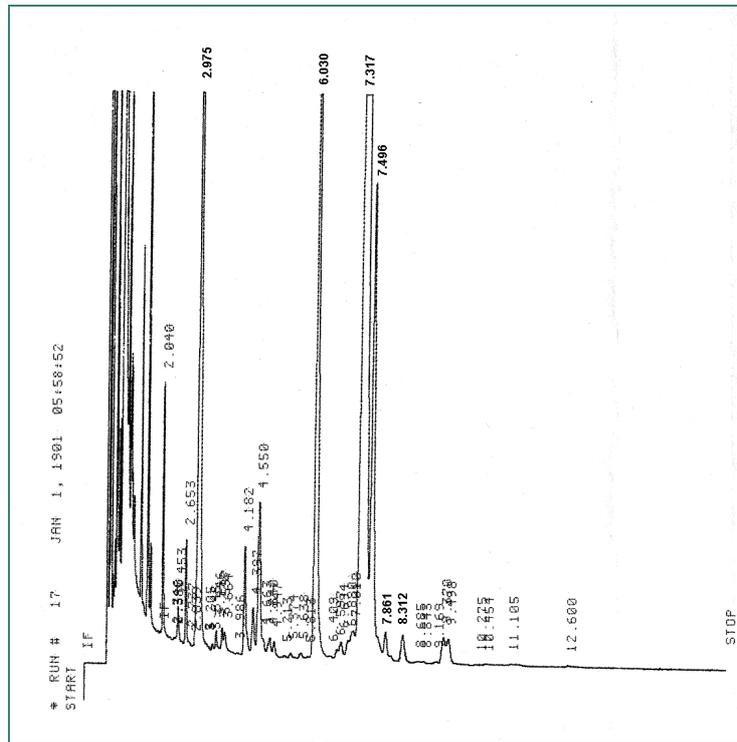
Cromatograma obtenido para la determinación del perfil porcentual de los ácidos grasos del aceite de semilla de Michay (porcentaje de esteres metílicos).



Tiempo de Retención (min)	Acido Graso	% Area
3.931	Ac. Octanoico	1.08479
7.590	Ac. Mirístico	0.17241
10.755	Ac. Palmítico	6.54759
12.755	Ac. Heptadecanoico	0.14626
15.025	Ac. Esteárico	3.29461
16.040	Ac. Oleico	18.69367
16.179	Ac. Octadecaenoico	0.82678
17.750	Ac. Linoleico	35.88944
19.771	Ac. Linolénico	27.52231
20.026	Ac. Eicosanoico	0.34506
25.342	Ac. Docosanoico	0.30391
30.665	Ac. Tetracosanoico	1.46583

ANEXO 3

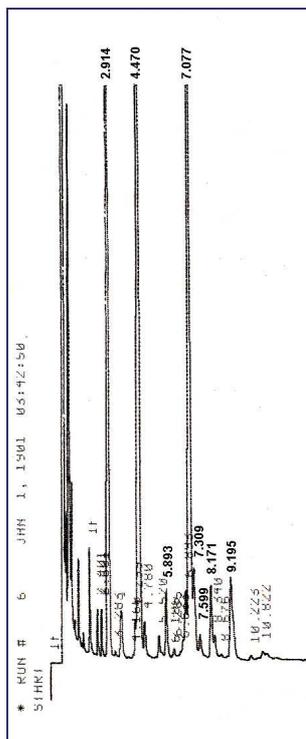
Cromatograma obtenido para la determinación de fitosteroles en semilla de Piñón.



Tiempo de Retención (min)	Esterol	% Area
2.975	5 α -Colestano	19.22290
6.030	Campesterol	10.27293
7.317	β -Sitoesterol	51.95614
7.496	Sitostanol	7.48226
7.861	Δ 5 Avenasterol	0.32112
8.312	Δ 5,24 Stigmastenol(probable)	0.53822

ANEXO 4

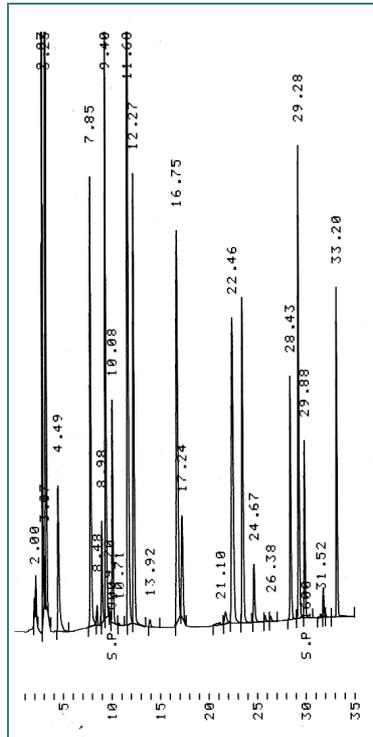
Cromatograma obtenido para la determinación de fitosteroles en semilla de Michay.



Tiempo de Retención (min.)	Esterol	% Area
2.914	5 α -Colestano	28.68179
4.470	No identificado	40.42958
5.893	Campesterol	1.18102
7.077	β -Sitoesterol	21.20072
7.309	Sitostanol	1.85614
7.599	Δ 5 Avenasterol	Trazas
8.171	Δ 7 Stigmastenol	1.42400
9.195	Δ 7 Avenasterol	2.56274

ANEXO 5

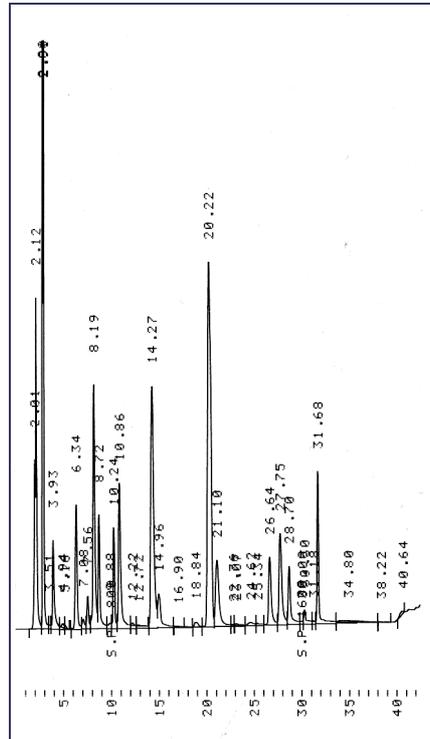
Cromatograma obtenido para la determinación de aminoácidos de semilla de Piñón.



Tiempo de Retención (min)	Aminoácido	%Area
2.87	Ac. Aspártico	567059
3.23	Ac. Glutámico	1141724
7.85	Serina	436873
8.98	Histidina	86856
9.40	Glicina	547934
10.08	Treonina	186934
11.68	Arginina	984064
12.27	Alanina	443928
16.75	Est . Interno	433224
17.24	Tirosina	107912
23.50	Valina	304119
24.67	Metionina	50946
28.43	Isoleucina	226753
29.28	Leucina	419085
29.88	Fenilalanina	152594
33.20	Lisina	290191

ANEXO 6

Cromatograma obtenido para la determinación de aminoácidos de semilla de Michay.



Tiempo de Retención (min)	Aminoácido	%Area
2.12	Ac. Aspártico	273634
2.80	Ac. Glutámico	311093
6.34	Serina	183022
7.56	Histidina	46057
8.19	Glicina	349620
8.72	Treonina	156218
10.24	Arginina	123960
10.86	Alanina	285495
14.27	Est . Interno	532953
14.96	Tirosina	97138
21.10	Valina	193427
25.34	Isoleucina	139832
27.75	Leucina	199256
28.70	Fenilalanina	113175
31.68	Lisina	240178

ANEXO 7

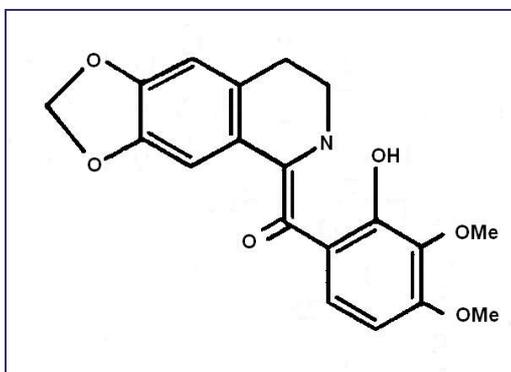


Figura 13: Estructura de alcaloide Dihidrorugosinona.

Tabla 17. Alcaloides presentes en semilla de Michay.

Ordenamiento	Alcaloide
Pseudobencilisoquinolinas	Dihidrorugosinona
	Rugosinona
	Berberina
Isoindolobenzacepinicos	Chilenina
	13-Desoxchilenina
	Pictonamina
	Chileninona
	Palmanina
	Protoberberinas
	O-Metilprechilenina
Prespseudopalmanina	
Isoindolobenzazocinico	Mallaganesica
Isoindoloisoquinolinico	Nuevamina
Bisbensilisoquinolinicos	(+) Berbamunina
	(+) Temuconina
	(+) Berbamina
	(+) Isotetrandrina
	(+) Oxiacantina

Fuente: Muñoz, 1992.