

Análisis de Pulpa y Aceite de Aguacate con Espectroscopia Infrarroja

Investigación

Dr. J.H. Castorena-García¹, Dr. M. Rojas-López², Dr. R. Delgado-Macuil², Dr. R. R. Robles de la Torre²

¹ Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, Xocoyucan, Tlaxcala, México.

² Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Unidad Tlaxcala, IPN.

Teléfono: (248) 4842819 e-mail.- casmin@prodigy.net.mx

Resumen

La espectroscopia infrarroja con reflectancia total atenuada ha revolucionado los análisis instrumentales en diversos tipos de materiales, incluyendo los de origen biológico. Las aplicaciones se enfocan a identificación, cuantificación de compuestos químicos, detección de cambios a nivel molecular y contrastar la autenticidad de un producto. El objetivo de esta investigación fue analizar la pulpa y aceite de aguacate por medio de la espectroscopia infrarroja. Para la pulpa se observaron varias bandas de absorción centradas en 1653 cm^{-1} , asignada a la vibración de tipo extensiva C=O (amida I de las proteínas), 1547 cm^{-1} (N-H flexión, amida II), y 1237 cm^{-1} (N-H flexión, amida III). El espectro del aceite de aguacate extraído muestra los grupos C-H, en el rango 3000 a 2800 cm^{-1} , y una banda intensa en 1744 cm^{-1} atribuida al enlace C=O, vibraciones de extensión del grupo éster carbonilo. Del último grupo de frecuencias, la relación de intensidades entre la absorbancia en 3007 cm^{-1} (banda extensiva insaturada =C-H) y la absorbancia en 2924 cm^{-1} (banda extensiva -C-H), fue utilizada para estimar el valor del índice de yodo del aceite, éste fue 74.8, valor dentro del rango de 69 a 95, obtenido mediante pruebas químicas.

Palabras clave: Espectroscopia infrarroja, pulpa aguacate, aceite aguacate, índice de yodo

Abstract

Attenuated total reflectance with infrared spectroscopy has revolutionized the instrumental analysis for a variety of materials, including those of biological origin. Applications are focused to identification and quantification of chemical compounds, detection of changes at molecular level and evaluate the authenticity of a product. The objective of this research was to analyze pulp and oil from avocado by infrared spectroscopy. The pulp showed several absorption bands centered at 1653 cm^{-1} assigned to the vibration of extensive type C=O (amide I in proteins), 1547 cm^{-1} (N-H bending, amide II), and 1237 cm^{-1} (N-H bending, amide III). The spectrum of avocado oil showed C-H

groups in the range at 3000 to 2800 cm^{-1} , and an intense band at 1744 cm^{-1} attributed to C=O, extensive vibrations of carbonyl group in esters. From the latter group of frequency, the ratio of absorbance intensities between 3007 cm^{-1} (band extended unsaturated =C-H) and absorbance at 2924 cm^{-1} (extended-band C-H), was used to estimate the iodine value of oil, it was 74.8 within the range of 69 to 95, obtained by chemical tests.

Key words: Infrared spectroscopy, avocado pulp, avocado oil, iodine value

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill) de origen mexicano es uno de los alimentos más valiosos que la naturaleza ha dado al hombre. Es una fruta rica en aceite que varía entre 15% a 30%, comparativamente tiene contenidos más altos que otros frutos [1]. La firmeza y el color de piel del fruto de aguacate son fuertemente determinados por el proceso de maduración, es muy conocido que estos cambios son desencadenados por reacciones enzimáticas [2].

El fruto del aguacate es altamente susceptible al oscurecimiento enzimático consecuencia de la alta actividad de polifenoloxidasas. Cuando el fruto es cortado la polifenoloxidasa actúa en los sustratos fenólicos hidroxilándolos y luego oxidándolos para formar quinonas de color café, que subsecuentemente se polimerizan [3,4]. Por otro lado, los cambios en la fracción lipídica son consecuencia de la auto-oxidación. Además de esto, similarmente a como ocurre en otros aceites vegetales, el aceite de aguacate es sensible a los procesos de oxidación, generando rancidez y la subsecuente obtención de sabores indeseables y pérdida de calidad durante el almacenamiento [5].

El análisis de los componentes químicos del aguacate como de otros alimentos se realiza usando cromatografía de gases y líquidos. Sin embargo esta técnica requiere una preparación de la muestra que resulta laboriosa y costosa, además se requieren columnas especiales. El empleo de la espectroscopia infrarroja tiene varias ventajas: i) no se requiere preparación de la muestra, ii) la muestra puede ser

sólida, líquida, pastosa, suspensión, y gaseosa, además la muestra no se modifica ni se destruye después del análisis, iii) el análisis puede ser aislado o en línea a un proceso dinámico, es además rápido y económico y no utiliza disolventes contaminantes, iv) el análisis puede ser cualitativo y cuantitativo. En los últimos años se ha desarrollado la espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier, (FT-IR), lo que le da a la técnica un gran poder y rapidez en el análisis. Esta técnica analítica tiene sus bases físicas en la vibración molecular y esto ofrece muchas posibilidades en el análisis de compuestos de origen biológico.

El objetivo de este trabajo fue analizar la pulpa de aguacate con la finalidad de identificar los enlaces químicos asociados a las estructuras secundarias de proteínas (Amida I y II) y evaluar el índice de yodo en aceite de aguacate utilizando como técnica analítica la espectroscopia infrarroja.

Materiales y métodos

Frutos de aguacate (*Persea americana*, var. "Hass") fueron adquiridos en un centro comercial local, madurados a temperatura ambiente (25 °C) hasta alcanzar la madurez comestible, después fueron refrigerados a 4 °C por 24 horas. La pulpa consiste en mesocarpio puro de aguacates previamente refrigerados, lavados, cortados, pelados y homogenizado con licuadora de aspas metálicas.

Posteriormente, la pulpa de aguacate fue liofilizada en un sistema LABCONCO Dry System/Freezone 4.5 bajo las siguientes condiciones: 50-60 x10⁻³ mBar, entre -28 a -49 °C en condensador. Después de esto, se extrajo el aceite usando el método Soxhlet (AOAC, 960.39, 1990) aprobado. En este método, se colocan 5 g de muestra de pulpa homogénea y seca en un cartucho de celulosa; mientras que se calienta hexano en un matraz hasta su punto de ebullición. La condensación del hexano arrastra el aceite de la muestra y finalmente este aceite se separa del hexano por calentamiento.

La pulpa y aceite de aguacate fueron analizadas con la técnica de muestreo por Reflectancia Total Atenuada (ATR) en el rango Mediano Infrarrojo (MIR): 400 - 4000 cm⁻¹. El espectro obtenido posee una resolución de 4 cm⁻¹ y consta de aproximadamente 3500 puntos, se utilizaron tiempos de integración de 60 segundos (1 segundo por barrido) realizándose automáticamente el promedio de las señales. El equipo utilizado fue un espectrómetro infrarrojo de transformada rápida de Fourier (FTIR), marca Bruker, modelo Vertex 70, Ettlingen, Germany, equipado con el programa OPUS para la adquisición de los datos.

La evaluación de los espectros FTIR consiste en identificar los picos principales de cada espectro

obtenido, y con una base de datos previamente creada se asignan los principales grupos funcionales, la cual puede ser confirmada con estándares comerciales de alta pureza. Cuando se observan dos o más picos que contribuyen a formar una misma área del espectro se aplica el proceso de deconvolución con el software Origin® 6.1 que permite separar las áreas para cada pico con una probabilidad por arriba del 98%. El cálculo del índice de yodo se realizó aplicando la regresión lineal simple con mínimo cuadrados, los valores espectrales asignados a las bandas del aceite son correlacionados para obtener el índice de yodo [6].

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los espectros ATR-FTIR de la pulpa y del aceite de aguacate, donde la figura del recuadro es parte complementaria de los espectros en el intervalo de 2800 a 3800 cm⁻¹. Se observan bandas de absorción comunes en ambas curvas, las cuales están asociadas principalmente a los aceites.

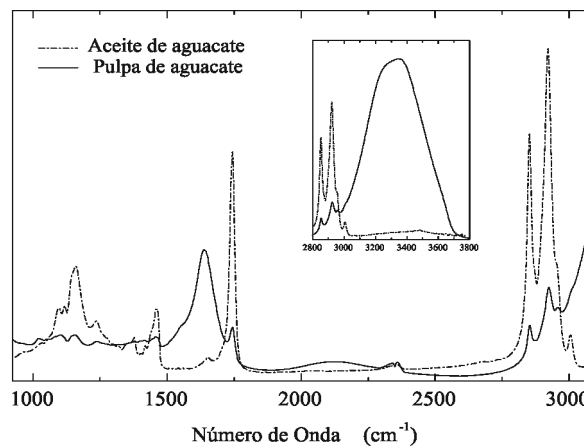


Figura 1. Espectro ATR-FTIR de pulpa de aguacate (línea continua), y de aceite (línea discontinua).

En el Cuadro 1 se muestran todas las frecuencias y sus asignaciones correspondientes al espectro ATR-FTIR de la pulpa del aguacate. Las vibraciones de extensión simétricas y asimétricas de los enlaces H-O-H se localizan en el intervalo 3490-3280 cm⁻¹, mientras que las bandas de absorción en ~3300 y en ~3080 cm⁻¹, asignadas a las vibraciones de extensión N-H (amida A y B de las proteínas respectivamente) podrían estar incluidas en la misma banda ancha [7,8,9]. La banda centrada en 3007 cm⁻¹ está asignada a vibraciones simétricas de extensión =C-H de los alquenos presentes en las cadenas grandes del aceite [10]. Por otro lado, las bandas centradas en 2957, 2922, 2873 y 2852 cm⁻¹ se asignan a las vibraciones asimétricas y simétricas de extensión C-H de los lípidos [11,12].

Cuadro 1. Asignación de las frecuencias del espectro FTIR en pulpa del aguacate.

Frecuencia FTIR (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3490–3280	H–O–H extensión
3300	Amida A, N–H extensión
3080	Amida B, N–H extensión
3007	Simétrico =C–H extensión enlace olefinico
2957	Asimétrico CH ₃ extensión
2922	Asimétrico CH ₂ extensión
2873	Simétrico CH ₃ extensión
2852	Simétrico CH ₂ extensión
1744	Carbonil ester C=O extensión
1653	Amida I, C=O extensión
1547	Amida II, N–H en el plano flexión, C–N Extensión
1456	CH ₂ deformación flexión
1416	Simétrico CH ₃ flexión
1377	Simétrico CH ₃ flexión
1314	Amida III, C–N extensión, N–H en el plano flexión
1237	Amida III, Asimétrico PO ₂ extensión
1154	Asimétrico C–O extensión
1097	Simétrico C–O extensión
1080	Amida III, Simétrico PO ₂ Extensión

La banda centrada en 1744 cm⁻¹ refleja la absorbancia del grupo éster carbonilo C=O de los triglicéridos o fosfolípidos [9,12]. Además, se observa una banda intensa en 1638 cm⁻¹ asociada al agua que contiene la pulpa, que enmascara las características espectrales de las vibraciones del aguacate localizadas alrededor de esta banda ancha

La Figura 2 muestra una amplificación del espectro infrarrojo de la pulpa de aguacate mostrado en la Figura 1 para el intervalo 1900–900 cm⁻¹.

Esta curva se obtuvo tomando como línea base el espectro del agua para eliminar la presencia de la banda ancha e intensa centrada en 1638 cm⁻¹, permitiendo observar características espectrales más detalladas en esta región. Las bandas de absorción observadas en 1653 y 1547 cm⁻¹, pueden ser asignadas a los grupos amida I y amida II, los cuales son típicos de todas las proteínas [8,9,13]. La banda amida I se debe esencialmente a extensiones C=O. La banda amida II aparece para la mayor parte de las deformaciones de NH₂ en amidas primarias y, en un menor grado, por vibraciones mixtas de flexiones N-H y extensiones C–H en el caso de amidas secundarias.

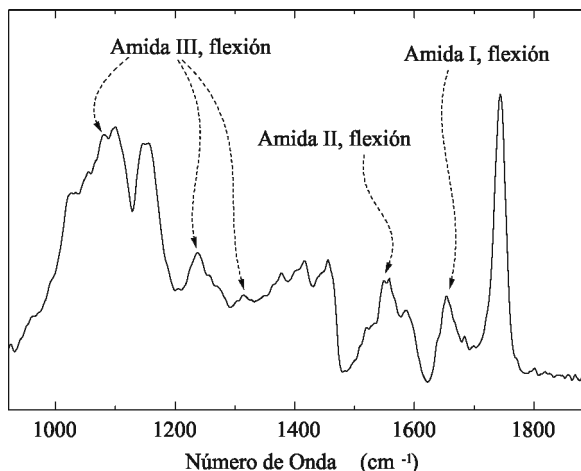


Figura 2. Espectro ATR-FTIR de la pulpa de aguacate sustraído el espectro de agua

El grupo amina se caracteriza por bandas de absorción debidas a vibraciones de extensión N–H y C=O, así como a vibraciones de flexión N–H. Además de poseer una banda cuyo máximo está en 1547 cm⁻¹, el grupo amida II exhibe un hombro en ~1520 cm⁻¹. Estas bandas son muy sensibles a las interacciones con enlaces de hidrógeno, y por lo tanto a las interacciones con moléculas de agua [14]. El espectro del grupo amida es de particular importancia debido a su relación con las proteínas. La presencia de bandas intensas cuyas frecuencias en 1653 cm⁻¹ (C=O, amida I) y 1547 cm⁻¹ (N–H flexión en plano, C–N extensión, amida II), indican la presencia de proteína en la pulpa del aguacate. Además de las bandas asociadas a los grupos amida I y amida II, otras bandas características del grupo amida fueron identificadas.

En particular la región espectral de la huella digital, comprendida entre 1400 a 1000 cm⁻¹ se origina de las vibraciones características C–O–P, C–O–C y C–C de los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Vibraciones de extensión en fosfatos de ADN/ARN y fosfolípidos se encuentran en este rango espectral [15]. En particular, las principales componentes en esta región surgen del grupo amida III, el cual incluye extensiones C–N y flexiones en plano N–H (~1300 cm⁻¹), además de las extensiones asimétricas (1237 cm⁻¹) y simétricas (1080 cm⁻¹) del grupo fosfato (PO₂). La observación de bandas del grupo fosfato se debe a la presencia de ácidos nucleicos, así como a sales inorgánicas de fosfatos, comúnmente presentes en tejidos biológicos.

Las frecuencias de absorción infrarroja del espectro de aceite de aguacate, así como sus asignaciones se resumen en el Cuadro 2. Mientras que en la Figura 3 se muestra la región de las vibraciones de extensión C–H comprendidas en el intervalo 3050–2785 cm⁻¹. La línea continua representa el espectro experimental, mientras

que las curvas punteadas representan la descomposición de dicho espectro en cinco bandas de absorción.

Cuadro 2. Frecuencias y asignación para el espectro FTIR del aceite de aguacate.

Frecuencia FTIR (cm ⁻¹)	Asignación
3007	Simétrico =C-H extensión enlace olefinico
2957	Asimétrico CH ₃ extensión
2922	Asimétrico CH ₂ extensión
2898	?
2873	Simétrico CH ₃ extensión
2852	Simétrico CH ₂ extensión
1744	Ester carbonilo C=O extensión
1651	Insaturación C=C extensión
1460	Asimétrico C-H flexión
1418	Simétrico CH ₃ flexión
1377	Simétrico CH ₃ flexión
1234	C-O extensión
1159	C-O extensión, CH ₂ en el plano flexión
1117	C-O extensión
1095	C-O extensión

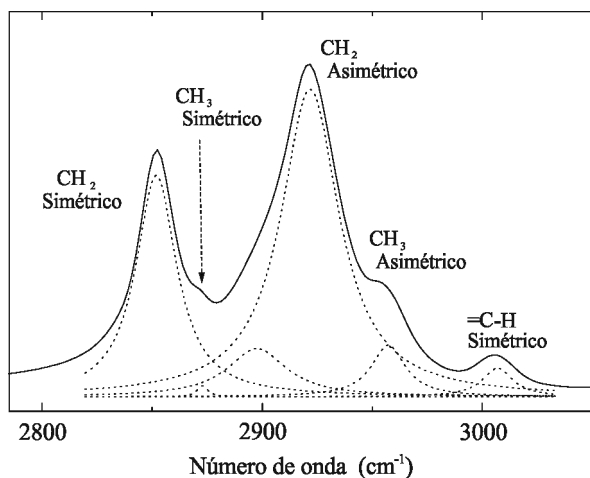


Figura 3. Espectro ATR-FTIR de aceite de aguacate región C-H

Los ajustes matemáticos de esta deconvolución se muestran en el Cuadro 3. La banda a 3007 cm⁻¹ es asignada a la extensión simétrica =C-H de los alquenos (enlace olefinico), mientras que las bandas a 2957 y a 2922 cm⁻¹ son asignadas a extensión asimétrica CH₃ y CH₂ respectivamente. Una banda a 2898 cm⁻¹ no tiene una asignación clara. De forma similar a las vibraciones simétricas, las bandas centradas en 2873 y 2852 cm⁻¹ están asignadas a la extensión simétrica CH₃ y CH₂ respectivamente. La Figura 4 muestra una banda

intensa centrada en 1744 cm⁻¹ asociada a la presencia del grupo funcional C=O éster carbonilo de los triglicéridos o fosfolípidos. Esta banda es característica de los aceites y en particular del de aguacate, aunque es también observable en el espectro de la pulpa (que incluye aceite).

Cuadro 3. Ajuste de parámetros por deconvolución de la información obtenida en el espectro ATR-FTIR de aceite de aguacate.

Posición de banda (cm ⁻¹)	Intensidad	Área	Amplitud de banda
3007	0.0598	1.55	16.57
2957	0.1072	3.16	18.77
2922	0.6393	32.23	32.09
2898	0.1003	5.11	32.44
2873	0.0238	0.20	5.59
2852	0.4602	16.27	22.50
1744	0.4877	15.90	19.82

La banda a 1651 cm⁻¹ se asocia a la extensión C=C, y ha sido utilizada por algunos autores para determinar el grado de insaturación [16]. El resto de las bandas en el espectro ATR-FTIR del aceite de aguacate se muestra en la Figura 4. Estas se localizan en 1460, 1418 y 1377 cm⁻¹, y se atribuyen a flexiones C-H y CH₃ del grupo metileno, mientras que las bandas localizadas en 1234, 1159, 1117 y 1095 cm⁻¹ se atribuyen a la extensión C-O del grupo éster presente en la molécula de los triglicéridos.

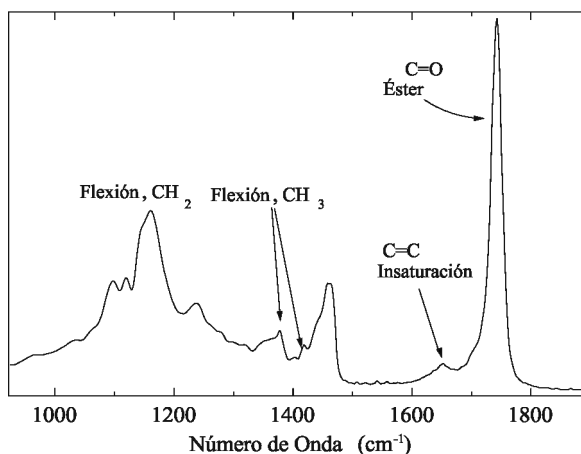


Figura 4. Espectro ATR-FTIR de aceite de aguacate en la región de los grupos metileno y éster.

El grado de insaturación es un indicador importante de la rancidez en alimentos preparados y envasados. Durante muchos años, tecnólogos en alimentos han usado el término índice de yodo para expresar el nivel de insaturación en una muestra bajo análisis. Este

término se deriva de la técnica de agregar yodo a un compuesto insaturado o mezcla de compuestos para reaccionar cuantitativamente con los enlaces dobles. Sin embargo este procedimiento involucra varios pasos, durante los cuales pueden producirse errores experimentales, además de que el tiempo necesario para este tipo de análisis requiere de al menos 30-45 min. Debido a estas razones, un método simple y eficiente basado en la absorción infrarroja resulta ser muy útil en diversas aplicaciones de control de procesos y control de calidad. Este método involucra el cociente obtenido de la relación entre absorbancias de bandas de vibración olefinicas/alifáticas y el grado de instauración tal y como se estima mediante el índice de yodo, este análisis lleva a un coeficiente de correlación de (0.9974).

Guillen y Cabo (1988) reportaron que la relación de intensidad de absorbancia en la banda de extensión =C-H a 3007 cm⁻¹ (banda insaturada) y la de extensión -C-H a 2924 cm⁻¹ correlacionada a los valores experimentales del índice de yodo para varias clases de aceites comestibles y grasas determina el grado de instauración. En su estudio emplearon 16 clases de aceites comestibles y grasas, y mediante la metodología mencionada, encontraron la ecuación (1):

$$IY = a + bX, R = 0,99 \quad (1)$$

En esta ecuación lineal, IY es el índice de yodo, y X es la relación de las intensidades de absorbancia a frecuencias de 3007 y 2924 cm⁻¹ (A_{3007}/A_{2924}), respectivamente, R es coeficiente de determinación. Los parámetros de ajuste estimados por regresión lineal simple en dicha referencia fueron: a=4.5 y b=751.4.

Usando la ecuación (1) y los parámetros del ajuste a y b en el espectro típico de aceite de aguacate obtenido en este trabajo, se estimó un valor para el índice de yodo de 74.8. Para realizar esta estimación, se emplearon los datos de la deconvolución del espectro ATR-FTIR mostrados en el Cuadro 3. Se utilizó la intensidad de la banda centrada en 2922 cm⁻¹, que es muy cercana a la de 2924 cm⁻¹ reportada en [6]. El valor del índice de yodo obtenido está en el intervalo reportado que es de 69-95, obtenido por prueba química, la cual está asociada a la reactividad del enlace doble [17].

En el cuadro 4 se muestran los valores de índice de yodo y razones de absorbancias A(3007)/A(2924), A(3007)/A(2852) y A(3007)/A(1744) en aguacate (obtenidas en este trabajo); así como para algunos otros aceites comestibles como olivo, maíz, girasol y soya [6]. Además, se muestran comparaciones entre el grado de instauración (índice de yodo) para algunos aceites disponibles en (g de yodo /100 g de aceite). Claramente se observa que el IY estimado indica un grado de

instauración menor al de los aceites mencionados, lo cual muestra que el aceite de aguacate posee propiedades alimenticias atractivas. De esta forma la espectroscopia FTIR en su modalidad de muestreo por ATR mostró ser una herramienta importante para la investigación de algunas de las principales características de la pasta y del aceite de aguacate.

Cuadro 4. Valores de índice y relaciones de absorbancia

Aceite	Índice de yodo	A(3007)/A(2924) ^(b)	A(3007)/A(2854) ^(b)	A(3007)/A(1744) ^(b)
Aguacate ^(†)	74.8	0.0935	0.1299	0.1226
Oliva ^(¶)	84.6	0.1039	0.1744	0.1583
Maíz ^(¶)	130.0	0.1681	0.2801	0.2147
Girasol ^(¶)	131.6	0.1693	0.2871	0.2164
Soya ^(¶)	131.9	0.1720	0.2906	0.2123

(†) Elaboración propia.

(¶) Referencia [6].

(b) Relación de intensidad de algunas bandas importantes.

Conclusiones

Se identificaron los componentes de la pulpa y del aceite de aguacate mediante la espectroscopia infrarroja, se resalta el potencial de la técnica en el análisis cuantitativo a través de la identificación de la amida I, II y III, y de enlaces asociados al contenido del aceites. Además, la espectroscopia infrarroja es una alternativa a las pruebas químicas tradicionales para evaluar el índice de yodo en aceites vegetales.

Referencias

- [1] Werman M.J. y Neeman I. (1987). Avocado oil production and chemical characteristics. *J. Am Oil Chem Soc* 64: 229-232.
- [2] Kahn V. (1977). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. *J. Food Sci.* 42: 38-43.
- [3] Van-Lelyveld L.J., Gerrish C. y Dixon R.A. (1984). Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discolouration of avocado fruit. *Phytochemistry* 23: 1531-1534.
- [4] Soliva-Fortuny R.C., Elez-Martínez P., Sebastián-Calderó M. y Martín-Belloso O. (2002). Kinetics of polyphenol oxidase activity inhibition and browning of avocado puree preserved by

- combined methods. *Journal of Food Engineering* 55: 131-137
- [5] Gunstone F.D. y Norris F.A. (1982). *Lipids in food chemistry, biochemistry and technology*. Oxford, U.K: Pergamon Press.
- [6] Guillen M.D. y Cabo N. (1988). Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier transform infrared spectra. Role of some bands of the fingerprint region. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1788-1793.
- [7] Krimm S. y Bandekar J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins, *Adv. Protein Chem.* 38: 181-364.
- [8] Mendelsohn R. y Mantsch H.H. (1986). in *Protein-Lipid Interactions*, ed. A. Watts and J.J. H.H.M. De Pont, Elsevier Amsterdam. p.103.
- [9] Tamm L.K. y Tatulian S.A. (1997). Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Q. Rev. Biophys* 30: 365-429.
- [10] Muniategui S., Paseiro P. y Simal J. (1992). Medida del grado de instauración de aceites y grasas comestibles por espectroscopia infrarroja y su relación con el índice de yodo. *Grasas y Aceites* 3: 1-5.
- [11] Rerek M. E., Chen H.C., Markovic B., Van Wyck D., Garidel P., Mendelsohn R., Moore D.J. (2001). Phytosphingosine and Sphingosine Ceramide Headgroup Hydrogen Bonding: Structural Insights through Thermotropic Hydrogen/Deuterium Exchange. *J. Phys. Chem. B* 105: 9355.
- [12] Garidel P. (2002). The thermotropic phase behaviour of phyto-ceramide 1 as investigated by ATR-FTIR and DSC. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4: 2714.
- [13] Arrondo J.L.R. y Goñi F.M. (1999). Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72: 367-405.
- [14] Brandenburg K. y Seydel U. (1998). Infrared spectroscopy of glycolipids. *Chem. Phys. Lipids* 96: 23-40.
- [15] Bernard J.L. y Sims. (1980). IR spectroscopy for determination of total unsaturation. *Ind. Res. Dev* 8: 81-83.
- [16] Mantsch H.H. y Chapman D. (1995). *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, New York, Singapore
- [17] Bora P. S., Marcal-Queiroz P., Rosalynd V.M. y Narain N. (2001). Caracterización de los aceites de la pulpa y semillas de aguacate (cultivar: Fuerte), *Grasas y Aceites* 52: 171-174
- Artículo recibido:** 6 de junio de 2011
Aceptado para publicación: 12 de noviembre de 2011