

ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE AGUACATE Y CUANTIFICACIÓN DE LA GRASA EXTRAÍDA POR DIFERENTES TÉCNICAS

J.A. García-Fajardo; M. del R. Ramos-Godínez; J. Mora-Galindo

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800. 44270 Guadalajara, Jal., México. Tel. y Fax: (3) 824 11 30, 824 00 34. E-mail: jgarcia@ciatej.net.mx

²Centro de Investigación Biomédica de Occidente - IMSS. Apdo. Postal 1-3838. Guadalajara, Jal., México.

RESUMEN

El fruto del aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) es una baya con mesocarpio y endocarpio carnosos que contiene una sola semilla. En nuestro estudio, esta semilla representó del 15.0 al 16.0% del peso en relación al fruto. Para las observaciones microscópicas de la semilla se utilizó tinción con azul de toluidina y se encontró que las células del parénquima de cotiledones almacenan la mayor cantidad de almidón (presencia de gránulos de color violeta); mientras que en el eje embrionario se almacena la mayor parte de la grasa; ésta se observó como gotas refringentes color ámbar. En la cubierta seminal se observaron, además, el esclerénquima perfectamente definido y sacos de taninos que aparecieron de color café a rojo. Respecto a las extracciones de la grasa de la semilla de aguacate, se encontró que con hexano y CO₂ supercrítico se extrajo aproximadamente la misma cantidad de grasa, 3.08 y 3.07%, respectivamente, mientras que con etanol se extrajo el 0.79%. Estos resultados concuerdan con las observaciones al microscopio, donde se encontraron células sin o con poca grasa después de las extracciones con hexano y CO₂ supercrítico; además, en la cubierta seminal extraída con CO₂ supercrítico se observó destrucción de las paredes celulares.

PALABRAS CLAVE: *Persea americana* Mill., microscopía, extracción, CO₂ supercrítico, solventes.

AVOCADO SEED STRUCTURE AND QUATIFICATION OF FAT EXTRACTION BY DIFFERENT THECHNIQUES

SUMMARY

The avocado fruit (cv. Hass) is a berry with mesocarp and endocarp that contain one seed. In our study, this seed represented 15.0 to 16.0% of the weight in relation to fruit. For microscopy observations, sections were stained with toluidin blue and was found that parenchima's cells of cotyledons had the major quantity of starch (blue to violet granules), while the embryo axis storage the major portion of fat which was observed as refringent ambar droplets. The coat seed was observed, perfectly defined in schlerenchima and tannins cells that were brown to red color. Concerning extraction of fat of avocado seed, was found that hexane and CO₂ supercritical treatment extracted approximately same quantity of fat, 3.08 and 3.07%, respectively, while ethanol extracted 0.79%. This results are according with microscopy observations where the cells without or poor in fat after CO₂ supercritical extraction was observed cell walls destruction.

KEY WORDS: *Persea americana* Mill., microscopy, extraction, CO₂ supercritical, solvents

INTRODUCCIÓN

El aguacate es un fruto de suma importancia comercial para México por los beneficios económicos que propicia ya que este país ocupa el primer lugar de la producción a nivel mundial con más de 700,000 t anuales (SAGAR, 1996). Aproximadamente el 3% de la producción de aguacate es industrializado para su exportación en forma de pasta o guacamole. Si la semilla representa aproximadamente el 15% en peso del fruto (Ramos, 1999), se tiene que de la industrialización actual resultan

más de 3,000 t de semilla anualmente, mismas que son desechadas sin aprovechamiento alguno.

A la semilla del aguacate se le atribuyen algunas propiedades de tipo farmacológicas debido a la presencia de ácidos grasos (Werman y Neeman, 1986), compuestos polifenólicos (Valeri y Gimeno, 1953) y esteroides (Werman y Neeman, 1987; Lozano *et al.*, 1993) y ha sido usada desde épocas precolombinas contra padecimientos tales como dolores musculares, parásitos y micosis (Cabrera, 1996; Argueta *et al.*, 1994; Atzin, 1990).

Por otra parte, en el tejido secretor de los vegetales se sintetizan sustancias tales como taninos, esencias, resinas, látex y glúcidos entre otros, los cuales pueden almacenarse ahí mismo o bien ser vaciados a cavidades; por lo mismo pueden existir células secretoras aisladas, epidermis secretora y canales excretores. En el caso de las epidermis secretoras, las células epidérmicas elaboran y acumulan esencias volátiles en su citoplasma. En los canales excretores se trata de cavidades situadas en los parénquimas, rodeados de células que excretan los productos elaborados (Camefort, 1977).

En el aguacate el pericarpio está formado de tres capas: exocarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpio junto a la cubierta seminal. El endocarpio se compone de pocas capas de parénquima de células aplanadas tangencialmente que a menudo se adhieren a la testa (Barrientos *et al.*, 1996).

Las células del parénquima, en las semillas, almacenan almidón (gránulos fundidos o agrietados en cotiledones y en el endospermo), proteínas (esferas o cuerpos pequeños e irregulares), o aceites (elaioplastos o en esferosomas) (Esau, 1977). El almidón después de tinción con yodo presenta una coloración azul a violeta (Miehe, 1928; Curtis, 1986), en cambio las proteínas se tiñen de color amarillo (Miehe, 1928). Los lípidos se tiñen de rojo con el Sudán III y el Sudán IV (Mauseth, 1988) y se ennegrecen con el ácido ósmico y la intensa osmiofilidad indica alto grado de instauración (Camefort, 1977; Esau, 1977). Cuando hay taninos, éstos se tiñen de color amarillo, rojo o café con safranina (Mauseth, 1988), es típico encontrarlos en color fuerte y en gran cantidad y pueden estar localizados en células alargadas llamadas sacos de taninos (Esau, 1977).

La testa madura consiste de epidermis externa, células de taninos y remanentes del xilema cuyos elementos conductores, las traqueidas, pueden contener cantidades considerables de células ricas en azúcares, grasas o proteínas (Esau, 1977). El esclerénquima de la testa es abundante con esclérides (también llamadas células pétreas) de varios tamaños (Mauseth, 1988), estas células son generalmente alargadas (Camefort, 1977), pueden formar masas continuas en pequeños grupos o solas alrededor de otras células, son de pared gruesa, secundaria y a menudo lignificada. Se distinguen dos formas principales, las esclérides (varían en forma) y las fibras (que son generalmente largas).

El embrión contiene nutrientes de reserva, orgánicos e inorgánicos, localizados alrededor del embrión o en sus mismos tejidos; contiene aproximadamente el 50% del aceite de la semilla y antes de germinar presenta una situación citológica que indica inactividad, esto es la pre-

sencia de proteínas y lípidos de reserva (Scagel *et al.*, 1987; Esau, 1977).

MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de llevar a cabo las extracciones con solventes, las semillas de aguacate fueron fragmentadas manualmente con un cuchillo y molidas hasta un diámetro medio de 0.356 mm en un molino de discos. Una de las técnicas usadas fue el método Soxhlet (AOAC, 1990) usando 10 g de muestra molida y como solventes hexano y etanol grado reactivo. Otra técnica empleada fue la extracción con CO₂ en condiciones supercríticas (27.58 MPa, 60°C) usando 350 g de muestra en un equipo con capacidad de extracción de 0.8 litro de la marca Newport Scientific, Inc., modelo 46-19345, USA. Al extracto obtenido con etanol se le extrajo la grasa con éter etílico (grado reactivo) y se cuantificó por gravimetría (AOAC, 1990). Posteriormente cada extracto graso se transformó a metilésteres de ácidos grasos (usando como catalizador BF₃) y analizádos por cromatografía de gases (HP Serie II 5890) acoplado a espectrometría de masas (HP Serie 5972), en una columna HP-5 (30 m x 0.32 mm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de película). Los metilésteres de ácidos grasos fueron cuantificados en base al área integrada en los cromatogramas.

Para el estudio microscópico, algunas semillas fueron separadas en sus tres principales componentes macroscópicos (cubiertas seminales, cotiledones y eje embrionario). Cada una de las partes fue extraída con hexano o con etanol por la técnica de Soxhlet y otras con CO₂ en condiciones supercríticas, dejando algunas partes sin extraer para servir como testigos. Las muestras fueron secadas al ambiente y cortadas en trozos de 1 mm y fueron fijados con glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y pH 7.4, a temperatura ambiente (TA). La posfijación se llevó a cabo con tetraóxido de osmio al 1% en cacodilato de sodio 0.1 M y pH 7 a TA. La deshidratación se hizo con soluciones de acetona a concentraciones de 50, 70, 90, 100, 100, 100 %. La infiltración se realizó con resina (Spurr de baja viscosidad Sigma Chemical Co., SPR-LV), acetona (1:1) y con agitación (Mezclador Pelco RE Modelo 1050). La inclusión se hizo con el mismo tipo de resina mencionado y la polimerización a 60°C. Los cortes se hicieron en un ultramicrotomo (C. Reichert, Austria Om U3) con 1 µm de espesor, la tinción con azul de toluidina y las observaciones se hicieron en un microscopio compuesto Olympus BH-2.

Para la microscopía electrónica de barrido las muestras fueron preparadas colocándolas en un recipiente con tela adhesiva para fijarlas. Se les dio un baño de oro ("sputtering") en un equipo evaporador Balzers SCD 004 por 5 min a 80 mAmp y las observaciones fueron realiza-

das en un equipo JEOL JSM-5400 LV Scanning Microscope al alto vacío a 20 Kv.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXTRACCIÓN DE GRASA

El resultado promedio de los extractos obtenidos en cuatro determinaciones fueron: con hexano $7.64 \pm 0.17\%$, con CO_2 supercrítico $5.33 \pm 0.09\%$ y con etanol fue de $30.44 \pm 1.08\%$.

La cuantificación de la grasa por gravimetría para los extractos provenientes de etanol resultó en 7.2% .

De los tres solventes empleados en las extracciones, la mayor cantidad de ácidos grasos se obtuvo mediante hexano y CO_2 supercrítico, 3.08 y $3.07 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de materia prima, respectivamente. Mientras que con etanol se extrajo solo $0.79 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de materia prima. Dichas proporciones corresponden al 40.3 , 57.6 y 2.5% , respectivamente, equivalentes al porcentaje del área total integrada en los cromatogramas del perfil de ácidos grasos.

OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS SIN TRATAMIENTO DE EXTRACCIÓN

Macroscopía

Macroscópicamente la semilla de aguacate está compuesta de tres capas (Figura. 1) correspondientes a cubiertas seminales (a), cotiledones (b) y eje embrionario (c).

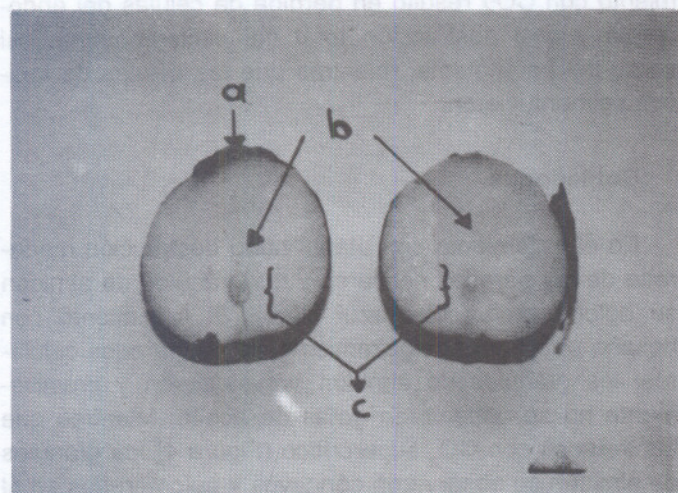


Figura 1. Semilla de aguacate (cv. Hass). (a) Cubierta seminal, (b) cotiledones, (c) eje embrionario. Barra = 1 cm.

Microscopía óptica

Cubierta seminal

En las observaciones bajo microscopio compuesto, de los tejidos testigo (sin tratamiento de extracción), se distinguió que las cubiertas seminales (Figura 2) consta de algunas células aplanadas tangencialmente que provienen probablemente del endocarpio (a); esclerénquima (b), bajo el cual existen sacos de taninos (c) y por último el parénquima (d).

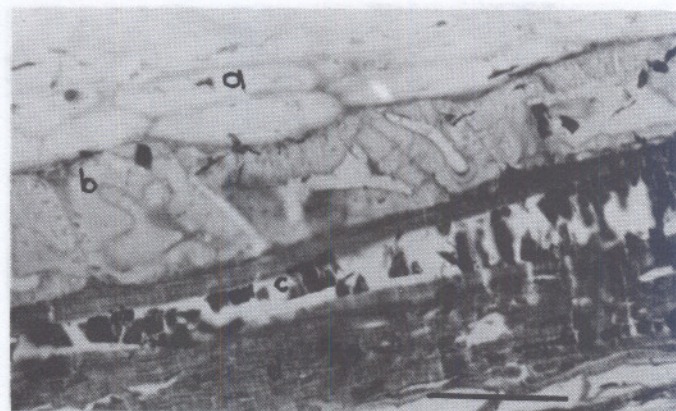


Figura 2. Microscopía óptica de la cubierta seminal de semilla de aguacate cv. Hass. sin extraer. (a) Células de endocarpio, (b) esclerénquima, (c) células de taninos (d) parénquima. Barra = 0.05 mm. Corte $1 \mu\text{m}$ de espesor, inclusión en resina Spurr y tinción con azul de toluidina.

Cotiledones

En relación a los cotiledones (Figura 3), las células del parénquima se observaron llenas de almidón (a) (gránulos de color azul violeta) y unas pocas gotas de grasa (b) (esferas de color ámbar) y probablemente proteínas (cuerpos irregulares de tamaño pequeño en color azul).

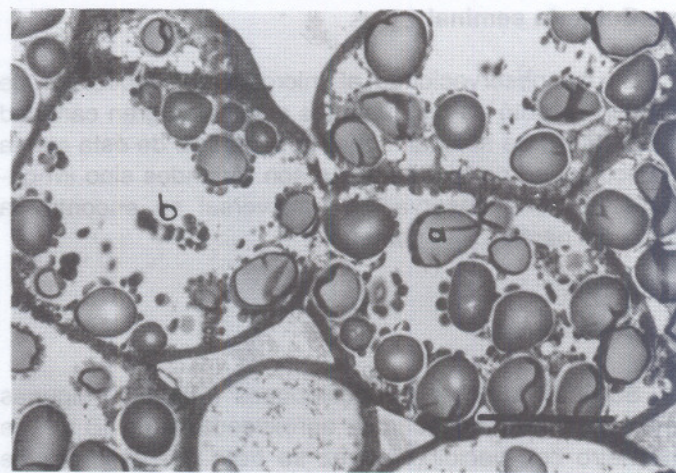


Figura 3. Microscopía óptica del cotiledón de semilla de aguacate cv. Hass sin extraer. (a) Gránulos de almidón, (b) glóbulos de grasa. Barra = $0.05 \mu\text{m}$ de espesor, inclusión en resina Spurr y tinción con azul de toluidina.

Eje embrionario

En el eje embrionario (Figura 5) los gránulos de almidón (a) fueron más pequeños (aproximadamente 3 veces) y en menor cantidad que en los cotiledones (gránulos de color azul) pero la grasa (b) (glóbulos de color ámbar) se observó en estructuras más grandes y en mayor cantidad.

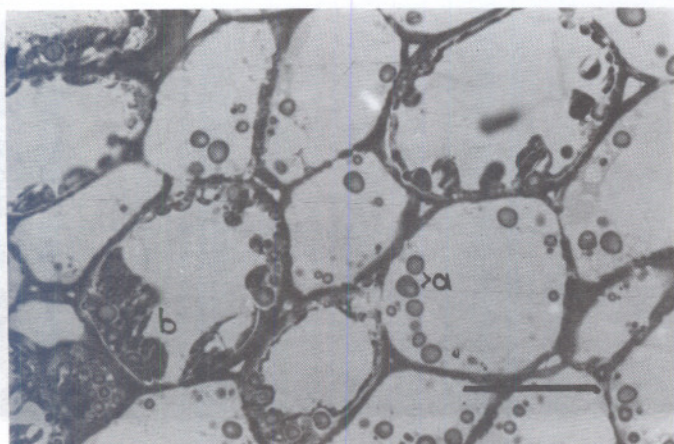


Figura 5. Microscopía óptica del eje embrionario de semilla de aguacate cv. Hass. Sin tratamiento de extracción. (a) Gránulos de almidón, (b) glóbulos de grasa. Barra = 0.05 mm. Corte 1 µm de espesor, inclusión en resina Spurr y tinción con azul de toluidina.

Microscopía electrónica de barrido

Cubierta seminal

En las observaciones al microscopio electrónico de barrido se notó en las cubiertas seminales gran cantidad de gránulos de almidón sobre la superficie de ésta con la particularidad de que estos no son redondos sino irregulares. En una observación transversal se encontró la capa del parénquima compacta.

Cotiledones.

Se observaron en los cotiledones (Figura 7) algunas estructuras redondeadas de aproximadamente 15 µm de diámetro con peciolo, tal vez se trata de glándulas de aceite. Otras estructuras de entre 5 y 15 µm presumiblemente gránulos de almidón.

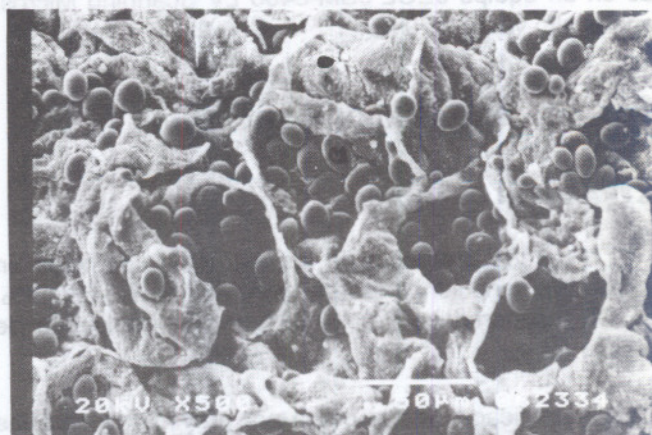


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido. Cotiledón de semilla de aguacate cv. Hass. Sin extraer. (a) Gránulos de almidón.

OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS CON TRATAMIENTO DE EXTRACCIÓN

Microscopía óptica

Cubierta seminal

Las semillas tratadas con etanol mostraron destrucción de sólo parte del parénquima, hubo pérdida de células de taninos y prácticamente no hubo cambios en el esclerénquima, ni en las células del endocarpio, sin embargo las estructuras se observaron laxas. Del tratamiento con hexano resultó con eliminación de las células del endocarpio, poco desgaste en el esclerénquima y en general la estructura se mantuvo compacta. El tratamiento con CO₂ resultó en pérdida de células del endocarpio y casi destrucción total del esclerénquima, así como del parénquima, mientras que las células de taninos se mantuvieron.

Cotiledones

En el tratamiento con etanol hubo destrucción moderada de las paredes celulares y los gránulos de almidón se aglomeraron (color azul claro). El tratamiento con hexano arrojó un adelgazamiento de las paredes celulares, los gránulos de almidón prevalecieron y prácticamente no se observaron gotas de aceite. Mientras que las tratadas con CO₂ supercrítico (Figura 4) los gránulos de almidón se observaron cóncavos y aglomerados en el centro de la célula.

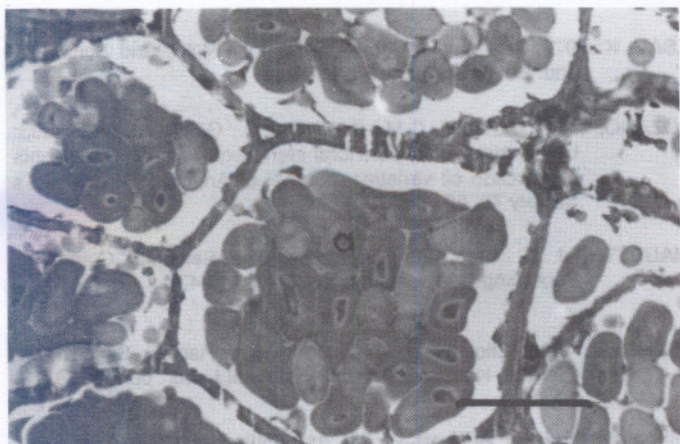


Figura 4. Microscopía óptica del cotiledón de semilla de aguacate cv. Hass. Tratada con CO_2 supercrítico. (a) Gránulos de almidón aglomerados. Barra = 0.05mm. Corte $1\mu\text{m}$ de espesor, inclusión en resina Spurr y tinción con azul de toluidina.

Tejido embrionario

Los tejidos tratados con etanol (Figura 6) mostraron paredes celulares laxas y los gránulos de almidón se mantuvieron presentes. El tratamiento con hexano resultó en una destrucción moderada de la pared celular, los almidones se mantuvieron en la célula. En el tratamiento con CO_2 supercrítico también se mantuvieron los almidones y las estructuras se observaron agrandadas. En ninguno de los tres tratamientos, en los tejidos, se encontraron ya glóbulos de grasa dentro de las células.

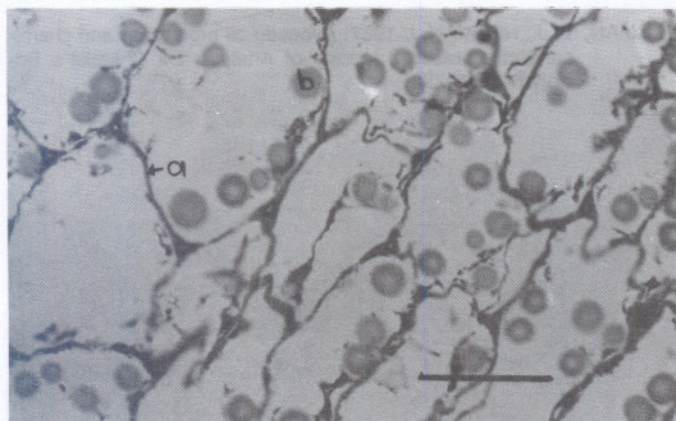


Figura 6. Microscopía óptica del eje embrionario de semilla de aguacate cv. Hass. Tratada con etanol. (a) Pared celular, (b) gránulos de almidón. Barra = 0.05mm. Corte $1\mu\text{m}$ de espesor, inclusión en resina Spurr y tinción con azul de toluidina.

Microscopía electrónica de barrido

Cubierta seminal

En el caso de la cubierta seminal tratada con etanol la superficie no mostró gránulos de almidón, tal vez se deba al arrastre del almidón por el solvente pero no a disolución del mismo en etanol. Una orientación transversal mostró parénquima laxo. En las tratadas con CO_2 supercrítico las estructuras se observaron totalmente destruidas principalmente el parénquima.

Cotiledones

Después de tratar las muestras de cotiledones con etanol se observó, en el microscopio de barrido, agrietamiento y perforación de la pared celular, mientras que con CO_2 supercrítico (Figura 8) se observó aglomeración de los almidones (a) y en esta figura se observa claramente lo que probablemente sea una glándula con su peciolo adherido a la pared celular (b).

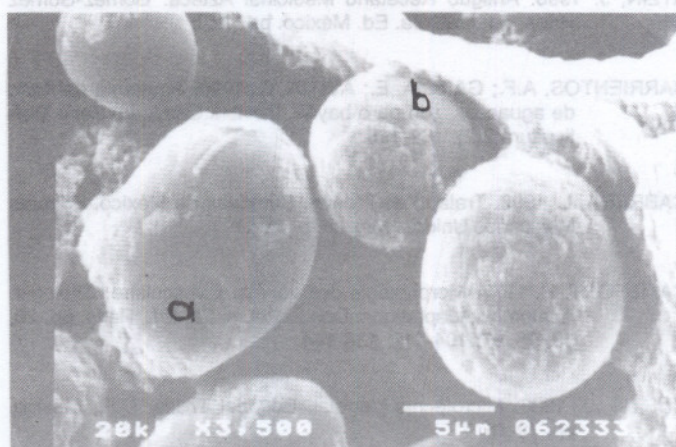


Figura 8. Micrografía electrónica de barrido del cotiledón de semilla de aguacate cv. Hass. Extraída con CO_2 supercrítico. (a) Gránulos de almidón, (b) glándula de aceite. Barra = $5\mu\text{m}$.

CONCLUSIONES

Con los tres tratamientos de extracción usados se extrajo grasa en diferente proporción y hubo destrucción de la pared celular, ésta fue mayor en el tratamiento con etanol. Los gránulos de almidón se encontraron presentes en mayor cantidad en el parénquima de los cotiledones que en el eje embrionario, sin embargo en este último se encontró mayor cantidad de grasa que de almidón. Otra estructura donde se almacena grasa es en el esclerénquima de la cubierta seminal, lo cual se demuestra porque en las semillas tratadas con hexano y CO_2 supercrítico hubo desgaste o destrucción total de dicha estructura, así como la mayor concentración de grasa en

los extractos. Respecto a las observaciones realizadas al microscopio electrónico de barrido se encontraron en los cotiledones algunas estructuras muy similares a los granulos de almidón que probablemente se trate de glándulas de aceite adheridas a la pared interna del tejido.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del Centro de Microscopía Electrónica del C.U.C.E.I. de la Universidad de Guadalajara por el apoyo técnico brindado en el desarrollo de éste trabajo.

LITERATURA CITADA

- ARGUETA, A.; CANO, L.; RODARTE, M. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. 1. Instituto Nacional Indigenista. México. pp. 55-57.
- ATZIN, J. 1990. Antiguo Recetario Medicinal Azteca. Gómez-Gómez Hnos. Editores. 4a. Ed. México. pp. 12.
- BARRIENTOS, A.F.; GARCÍA, E.; AVITIA, E. 1996. Anatomía del fruto de aguacate, ¿drupa o baya?. Revista Chapingo Serie Horticultura 2(2): 189-198.
- CABRERA, L. 1996. Tratado de Plantas Curativas de México. Editores Mexicanos Unidos. México. p. 16-17.
- CAMEFORT, H. 1977. Morphologie des végétaux vasculaire. Citologie. Anatomie. Adaptations. Don Éditeurs. 2a. Ed., Paris. pp. 20, 58, 96, 97, 104-117, 136-144.
- CURTIS, J. 1986. Microtécnica Vegetal. Editorial Trillas. D.F., México. pp. 70-75.
- ESAU, K. 1977. Anatomy of Seed Plants. John Wiley and Sons, Inc. 2nd. Ed. pp. 4, 5, 35, 36, 199-208.
- LOZANO, Y.F.; DHUIQUE, C.M.; BANNON, C.; GAYDOU, E.M. 1993. Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties. Journal of Analysis Oil Chemist's Society 70: 561-565.
- MAUSETH, J. D. 1988. Plant Anatomy. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. pp. 3-47, 415-437.
- MIEHE, H. 1928. Citología y Anatomía de las Plantas. Sección XII. Ciencias Naturales No. 183. Editorial Labor. pp. 23, 26, 28, 30, 31.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Kenneth Helrich. 15th Ed. pp. 69, 74, 79, 519, 951, 953-965.
- RAMOS, M. del R. 1999. Estudio Comparativo de la Obtención de Oleorresina de Semilla de Aguacate (cv. Hass) Por Diferentes Técnicas Extractivas. Tesis de Maestría. CUCEI. Universidad de Guadalajara, México.
- SAGAR. 1996. El Aguacate Mexicano. Morelia, Michoacán, México. pp. 3-23.
- SCAGEL, R.E.; BANDONI, R.J.; ROUSE, G.E.; SCHOFIELD, W.B.; STEIN, J.R.; TAYLOR, T. M. C. 1987. El Reino Vegetal. Editorial Omega. Traducción de Joan Ayala. Barcelona., España. pp. 297, 516, 661, 662.
- VALERI, H.; GIMENO, F. N. 1953. Estudio fitoquímico toxicológico de los frutos de aguacate (*Persea americana*-C. Bauhin, Pinax 441, 1623). Revista Médica de Veterinaria y Parasitología. XII(1-4): 130-165.
- WERMAN, M. J.; NEEMAN, I. 1986. Effectiveness of antioxidants in refined, bleached avocado oil (a). Journal of Analysis Oil Chemist's Society 63: 352-355.
- WERMAN, M. J.; NEEMAN, I. 1987. Avocado oil production and chemical characteristics. Journal of Analysis Oil Chemist's Society 64: 229-232.

CONCLUSIONES

Con los tres tratamientos de extracción usados se extrajo grasa en diferentes proporciones y hubo destrucción de la pared celular, ésta fue mayor en el tratamiento con etanol. Los granulos de almidón se encontraron presentes en mayor cantidad en el tratamiento de los cotiledones que en el eje embriónico. Sin embargo en este último se encontró mayor cantidad de grasa que de almidón. Esta estructura donde se almacena grasa es en el tejido endosperma de la cubierta seminal lo cual se demuestra porque en las semillas tratadas con hexano y CO₂ se partieron hubo desgase o destrucción total de dicha estructura, así como la mayor concentración de grasa en