

17
24-



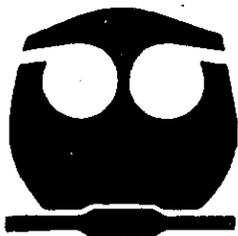
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CARACTERIZACION DEL ACEITE Y RESIDUOS
DE EXTRACCION DEL FRUTO DE
SCHEELEA LIEBMANNII"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARIA DE LOURDES GARCIA AVILA



MEXICO, D. F.



1998

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264468



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

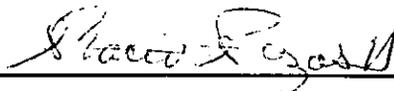
Jurado asignado:

Presidente	Prof. POZAS HORCASITAS ROCIO
Vocal	Prof. ITURBE CHINAS FRANCISCA
Secretario	Prof. PEÑA ALVAREZ ARACELI PATRICIA
1er. Suplente	Prof. ELIZALDE TORRES JOSEFINA
2o. Suplente	Prof. TORRES AVILA CARLOS A.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO 208 DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EDIFICIO B, Y EN EL LABORATORIO 4A DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS, EDIFICIO A DE LA FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

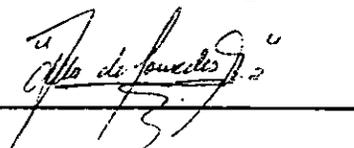
ASESOR:

Dra. POZAS HORCASITAS ROCIO



SUSTENTANTE:

MARIA DE LOURDES GARCIA AVILA



AGRADECIMIENTOS

Antes que ha nadie agradezco a Dios por darme la oportunidad de vivir y de ser muy feliz hasta ahora.

Agradezco a mis padres: Ismael García Rodríguez y Teodora Avila de García por todo el amor y cariño que me han dado siempre ya que sin su estímulo jamás hubiera logrado ser lo que soy. A ti mamá por ser mi apoyo, mi ejemplo y por toda esa confianza que me das y que nunca voy a defraudar, por enseñarme a ser mujer y por ser tan buena y linda conmigo siempre; a tí papá por ser mi mejor amigo y confidente, el único que jamás me defraudará gracias de que siempre estás conmigo en las buenas y en las malas.

A mis hermanos Juan Salvador y Alejandro por ser mi ejemplo, tanto en lo profesional como en lo humano, por ayudarme siempre cada uno a su manera y por todo su amor y cariño que siempre me han demostrado.

A mis cuñadas Catalina y Margarita, por que también me han apoyado en su momento y sobretodo por que sé que aman a mis hermanos y a mí con eso me basta, gracias por aceptar formar parte de mi familia.

A mis sobrinos Jorge Alberto, Viridiana Alejandra y Carlos Eduardo, por ser la alegría de la casa, por ser tan buenos y tiernos conmigo.

A mis familiares más cercanos que sé que me quieren y si me hacen una crítica siempre es constructiva, no los nombro, pero no los olvido a cada uno de ellos.

A todos mis amigos que me han apoyado, con los que he pasado mis mejores ratos dentro de la escuela y que aún mejor han compartido conmigo buenos y malos momentos.

A mi amigo el Sr. Arturo, por todo su amor y apoyo que siempre me dio.

A mis compañeros del laboratorio 208, al Profesor Lino Reyes T, Paty, Javier, Cuauhtémoc, Karina, Margarita gracias por hacer amena mi estancia.

Agradezco a la Dra. Rocío Pozas Horcasitas, por asesorarme en este tema, por todo el apoyo que siempre me dió durante la realización de este trabajo y toda la confianza que depositó en mí siempre.

A la Dra. Araceli Patricia Peña Alvarez, por apoyarnos durante la realización del análisis cromatográfico de la muestra de aceite.

Al Dr. Hermilo J. Quero Rico agradecemos su intervención durante la identificación de la planta en el Jardín Botánico de la UNAM.

A la profesora Lucía Cornejo B., por el apoyo que nos dió al facilitarnos los laboratorios y material del Departamento de Alimentos.

INDICE

Pag.

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Scheelea liebmanni</i>	3
2.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS DE <i>Scheelea liebmanni</i> Beccari	4
2.2.1 Características físicas del Coyal Real (<i>Scheelea liebmanni</i>)	5
2.2.2 Utilización del Coyal Real	5
2.3 <i>Cocos nucifera</i> (Coco comercial)	7
2.4 AMARILLAMIENTO LETAL	8
2.5 ANTECEDENTES DEL ANALISIS PROXIMAL	10
2.5.1 Conceptos generales de las determinaciones en el análisis proximal	11
2.6 OBTENCION DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES	21
2.6.1 Método por presión	22
2.6.2 Método por disolventes	24
2.6.3 Método enzimático	25
2.7 CONTROL DE CALIDAD EN GRASAS Y ACEITES	26
2.7.1 Métodos de análisis para grasas y aceites	26
2.7.1.1 Métodos para determinar características de identidad de un aceite	27
2.7.1.2 Métodos para determinar características de calidad de un aceite	30
2.7.2 Identificación de ácidos grasos por cromatografía de gases	34
3. OBJETIVOS	37
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	38
4.1 IDENTIFICACION DE LA MUESTRA	39
4.1.1 Reconocimiento físico del fruto	39
4.2 REALIZACION DEL ANALISIS PROXIMAL	39
4.2.1 Humedad	39
4.2.2 Cenizas	39
4.2.3 Grasa cruda	39
4.2.4 Proteína cruda	39
4.2.5 Fibra cruda	39
4.2.6 Carbohidratos asimilables	40
4.3 EXTRACCION DEL ACEITE DE <i>Scheelea liebmanni</i> POR TRES METODOS DIFERENTES	40

4.3.1 Método por prensado	40
4.3.2 Método por disolventes	41
4.3.3 Método enzimático	41
4.3.1.1 Análisis fisicoquímico del aceite extraído	42
4.3.1.2 Identificación de ácidos grasos por cromatografía de gases	43
4.3.2 Identificación y cuantificación de aminoácidos esenciales y no esenciales	44
5. RESULTADOS	45
5.1 RECONOCIMIENTO FISICO DEL FRUTO DE LA PALMA <i>Scheelea liebmannii</i>	45
5.2 RESULTADOS DEL ANALISIS PROXIMAL REALIZADO AL FRUTO DE LA PALMA DE <i>Scheelea liebmannii</i>	47
5.2.1 Discusión de resultados de los componentes principales de la muestra	48
5.3 RESULTADOS DE LOS TRES METODOS DE EXTRACCION	50
5.4 FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICION Y CALIDAD PARA EL ACEITE DE COCO COMESTIBLE	51
5.5 RESULTADOS DEL ANALISIS FISICOQUIMICO AL ACEITE EXTRAIDO DEL FRUTO DE <i>Scheelea liebmannii</i>	56
5.5.1 Discusión de resultados	57
Densidad	57
Indice de refracción	58
Punto de solidificación	59
Indice de saponificación	61
Materia Insaponificable	64
Indice de yodo	65
Indice de Reichert-Meissl y Polenske	67
Color, olor y sabor	69
Indice de peróxidos y rancidez	70
Indice de acidez	72
5.6 RESULTADOS DE IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION ACIDOS GRASOS EN EL ACEITE DEL FRUTO DE LA PALMA <i>Scheelea liebmannii</i> POR CROMATOGRAFIA DE GASES	74
5.6.1 Análisis integral del aceite del fruto de <i>Scheelea liebmannii</i>	77
5.7 RESULTADOS DE IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS	80
5.8 COMPARACION ENTRE SEMILLAS OLEAGINOSAS	83
6. CONCLUSIONES	85
7. BIBLIOGRAFIA	88

ANEXO 1 METODOS OFICIALES DEL AOAC PARA LA REALIZACION DEL ANALISIS PROXIMAL	94
ANEXO 2 METODOS FISICOQUIMICOS OFICIALES PARA EL ANALISIS DE ACEITES Y GRASAS	101
ANEXO 3 IDENTIFICACION DE ACIDOS GRASOS POR CGC	116
ANEXO 4 IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS	117

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Este proyecto tiene la finalidad de estudiar las características de los frutos de las *palmas silvestres* que abundan en costas mexicanas, con el propósito de que su explotación sea de mayor eficiencia que el que actualmente se esta realizando. Se cuentan con pocas referencias bibliográficas sobre estas palmas y muy poco se menciona de su calidad nutricional y de aplicaciones específicas, por lo cual no se cuenta con un conocimiento completo de su utilidad, siendo que han crecido, como su nombre lo indica, de una forma silvestre y se han manejado de una forma artesanal por campesinos encargados de recolectar los frutos de dichas palmas, quienes reciben bajos ingresos por su venta a acaparadores. En la búsqueda por resolver este problema social y ayudar a elevar las condiciones de vida de campesinos recolectores, así como conocer nuevas alternativas de aplicación de estos frutos tropicales, se ha comenzado con la caracterización de frutos de palmas silvestres tropicales.

Cabe mencionar que en México la producción de *Cocos nucifera* es de gran importancia, debido a que es fuente de ácidos grasos, principalmente de cadena corta, y en consecuencia el aceite de coco posee una alta demanda en la industria; sin embargo, esta especie está siendo gravemente amenazada por el "*Amarillamiento letal*", que es una enfermedad que ataca a las plantaciones exterminándolas, por lo que es necesario encontrar nuevas

Debido a la diversidad de palmas silvestres que habitan en México, parece interesante considerarlas como alternativas de fuentes de aceite vegetal, ya que los aceites se consumen en todo el mundo debido a que se usan para la fabricación de una gran variedad de productos industriales y alimenticios. Con este fin se ha caracterizado el fruto de la palma *Scheelea liebmanni*. Partiendo del análisis proximal realizado se encontró que los componentes principales son: grasa (65%), proteína cruda (18%) y fibra cruda (13%). Para completar su caracterización se han determinado parámetros fisicoquímicos a la grasa y por cromatografía de gases se han identificado y cuantificado a los ácidos grasos presentes, así como también se determinó un perfil de aminoácidos para la proteína, de donde se encontró un contenido total de aminoácidos esenciales de 36.54 g/100g de proteína y de aminoácidos no esenciales 58.57 g/100g de proteína.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1. *Scheelea liebmannii*

La palma *Scheelea liebmannii* es conocida en la Azueta de Veracruz con el nombre de "coyal real"¹. Se a reportado su existencia en la Península de Yucatán, encontrándose específicamente esta palma en Campeche,^{2,3} además se sabe de su presencia en el estado de Tabasco.⁴

Como sucede con otros géneros de palmas, pocos son los datos disponibles reportados para *Scheelea*, básicamente los pocos datos bibliográficos han sido tomados de Hernández-Xolocotzi^{3,5}, quien se refiere a esta como "coyal real" (*Scheelea liebmannii*) de México.

Todas las características observadas en el "coyal real" coinciden con las que se mencionan en las descripciones de *Scheelea liebmannii* Beccari.

El género *Scheelea* se distingue de otros géneros afines, como *Orbignya* y *Attalea*, de aspecto general muy semejante, por sus flores masculinas, cuyos pétalos son carnosos y más o menos cilíndrico subulados, no planos, y cuyos seis estambres tienen anteras rectas o casi rectas, no retorcidas en espiral.

El *Coyal real* fue descrito por primera vez por F.M.Liebmann en 1845, el cual lo había colectado hacia los años de 1841 a 1843 en los alrededores de la antigua Veracruz: Tolome, San Carlos y Colipa. Liebmann dio a la palma el nombre científico de *Cocos regia*, a causa probablemente de su nombre vernáculo, pues en diversas localidades del estado de Veracruz al coyal real también se le llama "*Palma real*". En 1916, O.Beccari, con motivo

del estudio de las flores, trasladó *Cocos regia Liebm.* al género *Scheelea*, establecido por Karsten en 1856. Sin embargo no pudiendo utilizar el nombre de *Scheelea regia*, pues este había sido usado por Karsten para una especie colombiana, le dedicó la especie a Liebmann. Con lo cual *Cocos regia Liebm.* paso a ser un sinónimo de *Scheelea liebmanni Becc.*^{1.}

2.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS DE *Scheelea liebmanni* Beccari.^{6.}

Su nombre común en regiones de Veracruz y Tabasco: Palma real, coyol real o corozo.

Son palmas hasta de 20 m de alto y 60 cm de diámetro, tronco marcado con las cicatrices de las hojas en forma de anillos, hojas numerosas de hasta 7 m de largo, pinnas numerosas lineares, hasta 1.5 m de largo y de 6 a 7 cm de ancho; pecíolo grueso hasta 1 m de largo, inflorescencia hasta 1.5 m de largo, que en ocasiones presenta casi exclusivamente flores masculinas y unas pocas flores femeninas en la base. En otros casos la inflorescencia presenta en su mayor parte flores femeninas con una cuantas masculinas en los extremos de las raquillas y otras veces tiene flores masculinas y femeninas en todas las raquillas, pero las femeninas situadas hacia la base y las masculinas de la mitad hacia el ápice. Flores masculinas aromáticas; sépalos lanceolados de 4 a 6 mm de largo; pétalos lineares de 10 a 14 mm de largo, seis estambres, de 1/3 de la longitud de la corola, sin pistilodio. Flores femeninas más grandes que las masculinas; sépalos hasta 2 cm de largo; pétalos del mismo tamaño que los sépalos o más pequeños; estaminodios presentes formando un tubo alrededor del ovario; ovario trilocular, estilo corto y grueso, tres estigmas. Fruto ovoide, de 5 a 7 cm de largo y de 3 a 4 cm de diámetro con el perianto acrescente en su base. Semillas: generalmente una y ocasionalmente dos o hasta tres, de alrededor de 4 cm de largo por 2 cm de diámetro, embrión basal.^{2.}

2.2.1 Características físicas del Coyol real (*Scheelea liebmannii*).¹

Número medio de frutos por inflorescencia, 3500. Tamaño medio del fruto con periantio, 5 x 2.7 cm. Peso medio del fruto con periantio, 14 gr. Rostro delgado, de 2 a 3 mm de grosor. Semilla o almendra alargada, cilíndrico-elíptica. Semilla de 2.2-2.5 x 0.9-1.2. Peso promedio de la semilla, 1.6 gr. Número de semillas, generalmente una y ocasionalmente dos y hasta tres.

Distribución general en México: de Tamaulipas hasta Campeche, principalmente en la Azueta de Veracruz.

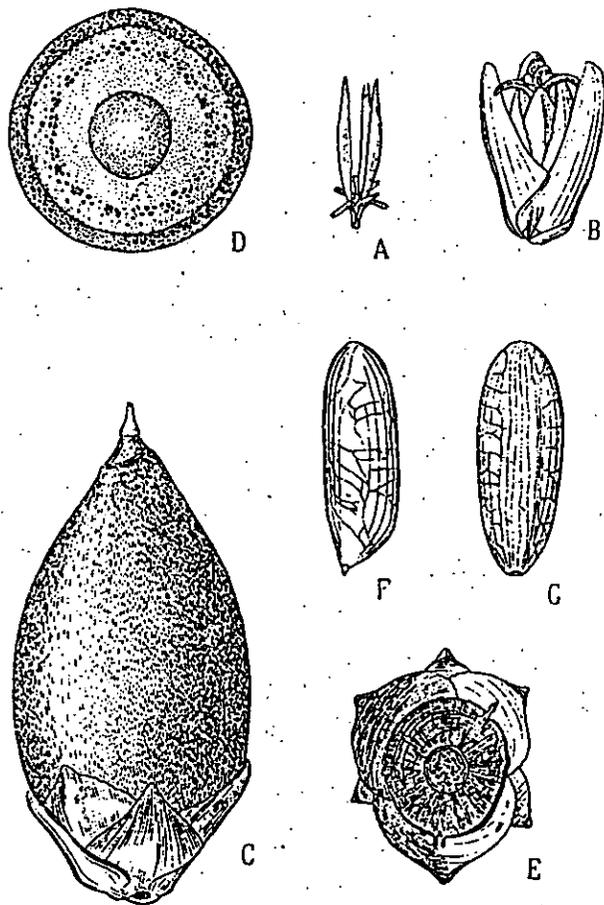
Distribución en la Península de Yucatán: Esta especie se localiza en el estado de Campeche, sólo en su región suroccidental, al Sur de la Isla del Carmen y en pequeñas áreas cercanas al estado de Tabasco.

2.2.2 Utilización del Coyol real.

Actualmente las hojas de la palmera son usadas en el techado de casas rústicas y los frutos son recolectados por campesinos de la región, quienes los utilizan en la preparación de atole y también adicionándolos a la masa de maíz para la elaboración de tostadas.

Los ejemplares seleccionados para el fin de éste proyecto son originarios de Tuxtepec Veracruz. La identificación de la palmera estuvo a cargo del Dr. Hermilo Quero Rico, del Jardín Botánico, quien conserva un respaldo de la misma.

Fig 2.1 CARACTERISTICAS FISICAS DEL FRUTO DE *Scheelea liebmannii*



Flores, fruto y semillas del coyol real. A. Flor masculina; B. Flor femenina; C. Fruto; D. Sección transversal del fruto; E. Periantio fructífero; F y G. Semillas en dos distintas posiciones.



2.3 Cocos nucífera (Coco comercial)

Dado que se propone el aprovechamiento del fruto de la palma Scheelea liebmannii como una alternativa para sustituir, en parte, al Cocos nucífera, que esta amenazado por el Amarillamiento letal, es conveniente presentar algunos datos de Cocos nucífera.

En las zonas tropicales de México se explotan más de 170 500 hectáreas de cocotero, que producen más de 182 600 toneladas de copra por año, pero existe una marcada tendencia al decremento, originada por los altos costos de producción y la presencia de la enfermedad conocida como amarillamiento letal del cocotero.⁷ Se sabe también que una tonelada de copra resulta de seis mil cocos y éstos de cien palmas.

Al fruto del cocotero se le conoce tanto en la costa del Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas, como en el Golfo de México, desde Veracruz hasta Yucatán; del total anual de aceite de coco obtenido, aproximadamente el 90% se destina a fabricación de jabón y el 9.5% a la producción de aceites refinados. Además, del cocotero se obtienen subproductos como madera, golosinas, agua refrescante, pasta para alimentación animal y otros subproductos, entre los que destacan productos de belleza y repostería. La pasta para alimentación animal es la pasta de coco resultante de la extracción del aceite. El aceite de coco también tiene una alta demanda en la industria alimenticia debido a que posee un elevado punto de ebullición, sabor suave y carencia de olor, estabilidad y resistencia a la oxidación y por lo tanto a la rancidez, por lo cual puede ser empleado como aceite para freír, en fabricación de galletas, margarinas, productos lácteos simulados y en la producción de chocolates y coberturas.

El aceite de coco es de gran importancia en el mercado como fuente de ácidos grasos de cadena corta. Por otra parte este aceite posee un

elevado contenido de ácido laurico, aproximadamente un 48%, que tiene gran demanda para producción de jabones de alta calidad.

Las fibras del mesocarpo, delgadas y pardo-amarillentas, son útiles para fabricar cuerdas, coberturas, tapetes, hamacas, escobas y cepillos. Cien cocos producen 15 Kg de fibras.

Las hojas secas sirven para techar y para hacer petates, las fibras oscuras de la base de la hoja para producción de textiles.

Cabe señalar que la palma de coco es fuente de trabajo en México, entre pequeños propietarios, ejidatarios, obreros, jornaleros, transportistas entre otros.⁸

2.4 AMARILLAMIENTO LETAL

El *Amarillamiento Letal* es una enfermedad devastadora que ataca las plantaciones de la palma de coco (*Cocos nucifera L*). La enfermedad es producida por un organismo de tipo micoplasmático (OMP), transmitido por el insecto *Myndus crudus*, cuando éste se alimenta chupando del floema de las palmeras. Los primeros síntomas se observan en los primordios foliares en donde aparecen estrías irregulares de color pardo. Casi simultáneamente ocurre el amarillamiento del cogoyo y de las hojas maduras, acompañada por la caída de los frutos. Posteriormente las hojas caen verticalmente, aunque aún suspendidas del ápice, pero luego el cogoyo se pudre y se rompe, quedando únicamente un tronco torcido. Aparte del insecto transmisor *Myndus crudus* no se descarta del todo la posibilidad de que en México existan otros insectos transmisores.

El período de incubación del micoplasma puede ser de siete a quince meses, pero desde la aparición de los primeros síntomas hasta la muerte de la palma, transcurren solamente de tres a seis meses.

La estrategia contra esta enfermedad involucra la aplicación de insecticidas; para el control de los síntomas se aplican antibióticos como la *oxitetraciclina*, que sin embargo no ayuda para la curación. Generalmente es necesario la sustitución de las poblaciones por variedades tolerantes o resistentes, que son el producto de largos programas de mejoramiento genético.

El Amarillamiento Letal fue reportado por primera vez en las islas Caimán, en el Caribe a finales del siglo pasado. El primer brote epidémico devastador de esta enfermedad se produjo en la isla de Jamaica después de la Segunda Guerra Mundial y de ahí se extendió a Cuba, las Bahamas, Haití, la República Dominicana y posteriormente la Florida, en donde tardó 4 años en destruir el 90% de los cocoteros de Miami. La enfermedad fue considerada un problema tan grave, que en 1973 se creó el Consejo Internacional sobre el Amarillamiento Letal (ICLY), mismo que se reunía para discutir los resultados de las investigaciones y decidir sobre las prioridades correspondientes.

La presencia del Amarillamiento Letal en México fue confirmada por Mc Coy en 1982 en Cancún e Isla Mujeres, de donde se ha esparcido hacia el Sur por la costa del Caribe Mexicano y hacia el oeste entrando a Yucatán por El Cuyo, Chichén Itza y Telchac.

Se ha calculado que la enfermedad avanza a una velocidad de aproximadamente 50 Km por año, lo cual pone en peligro a las plantaciones de Campeche, Tabasco y Veracruz. El peligro para las plantaciones de palmas en la costa del Pacífico, principalmente Guerrero, Colima y Sinaloa es menor, no solo por la distancia sino también por la posibilidad de que las palmas del Pacífico presenten un cierto grado de resistencia, lo que no significa que las pérdidas puedan ser cuantiosas de llegar la enfermedad al Pacífico.

El Amarillamiento Letal puede tener enormes consecuencias económicas y sociales para México, por lo que se requiere un análisis de los principales aspectos técnicos en la lucha contra la enfermedad, evaluándose la factibilidad de opciones técnicas como es la producción de nuevas variedades, tomándose en cuenta la estimación del tiempo necesario en las que estas podrán impactar a la producción.⁸

Una de las actividades que podría ayudar a contrarrestar los problemas socioeconómicos que se originan con el avance del Amarillamiento letal en *Cocos nucifera*, es el uso de variedades de palmeras resistentes a dicha enfermedad y que además proporcionen calidad y rendimiento en cada uno de sus nutrientes, para que puedan ser explotados con la misma eficiencia que el coco comercial.

Las palmas silvestres podrían ser una alternativa de producción de aceite de coco vegetal y a su vez se contribuye al aprovechamiento de los recursos disponibles del país, ayudando a la conservación del equilibrio ecológico.

Esta alternativa podría ser aplicada mientras se llevan a cabo reforestaciones en zonas afectadas con materiales resistentes a la enfermedad, sin embargo estas reforestaciones son de elevado costo y además se requiere de mucho tiempo de espera.

2.5 ANTECEDENTES DEL ANALISIS PROXIMAL

Cabe señalar que para poder aprovechar los frutos que ofrecen las palmas silvestres es necesario realizar un análisis detallado de estos, para saber en que proporción están presentes cada uno de los elementos que los constituyen y cuales de ellos son susceptibles de aprovecharse; es decir, realizando como mínimo un análisis proximal a una especie silvestre, se puede conocer de una manera general, en que proporción se encuentran

cada uno de sus nutrientes, y sí vale la pena que en verdad dicha especie sea debidamente explotada para que en un momento dado se pueda hacer un buen uso de esta.

Un análisis proximal de los productos vegetales naturales comprende la determinación de humedad, ceniza, grasa, proteína y fibra. Todos los resultados que se obtienen se interpretan como brutos debido a que el análisis que se realiza a cada componente es, en realidad, una determinación realizada a un grupo de componentes similares y no una determinación específica.

Cada grupo está formado por sustancias que presentan una o más propiedades en común. Así, la proteína comprende, además de las proteínas verdaderas, otras sustancias nitrogenadas tales como aminoácidos y alcaloides. La grasa no solamente es una mezcla de glicéridos, sino que incluye esteroides, lecitinas y otras sustancias de solubilidad análoga. La fibra, en parte, está constituida por celulosa y en parte por sustancias lignificadas.

La ceniza es una mezcla de elementos inorgánicos comunes. Los carbohidratos distintos de la celulosa se calculan a partir de la diferencia entre el cien por ciento de la muestra y la suma de los porcentajes de humedad, grasa, proteína, fibra y ceniza e incluyen además, la suma de todos los errores en los cuales se incurriera al hacer las determinaciones de todos los otros constituyentes.⁹

2.5.1. Conceptos generales de las determinaciones en el análisis proximal

Humedad.- El contenido de humedad es una de las más importantes determinaciones usadas en el control de alimentos, debido a que permite conocer la cantidad real de los otros componentes presentes en la misma

muestra, ya que al eliminar agua por calentamiento se produce pérdida de peso, concentrando así a los demás nutrientes. Debe cuidarse que no exista la posibilidad de descomposición térmica o pérdida de volátiles de la muestra distintos de agua durante el calentamiento.¹⁰

Cenizas.- Es el nombre que se da al residuo inorgánico que procede de la incineración de la materia orgánica. El contenido y la composición de las cenizas en un alimento depende del mismo y del método de incineración. En la ceniza se incluyen todos los componentes inorgánicos, tanto los originales de la misma muestra, como los procedentes de contaminación. Los componentes inorgánicos naturales que pueden estar presentes en las cenizas son: Calcio, Fósforo, Hierro, Potasio, Magnesio, Manganeso, Cobre, Cobalto y Zinc. El Sodio encontrado normalmente procede del Cloruro de Sodio adicionado a los alimentos. Para la determinación de cloruros presentes en la muestra se debe tener un buen control de la temperatura de incineración de la muestra, ya que un calentamiento excesivo puede causar volatilización de los cloruros.

Aun después de un buen refinamiento, las grasas y los aceites comerciales contienen trazas de fósforo procedentes de fosfatos residuales y trazas de sodio debidas a una refinación alcalina. El análisis de aceites y grasas para determinar el contenido de metales pesados en alimentos, puede realizarse mediante la técnica de absorción atómica, entre otras técnicas que existen para éste análisis. El desarrollo de este tipo de técnicas ha sido necesario por que es importante detectar una contaminación de metales pesados en los alimentos. Estos metales pueden ser: mercurio, plomo, cadmio y cromo entre otros.¹¹

La espectrometría de absorción atómica es una rama del análisis instrumental, en la cual un elemento es atomizado en forma tal que permite la observación, selección y medida de su espectro de absorción.

Lípidos.- Generalmente hacen referencia a un conjunto heterogéneo de sustancias asociadas a los sistemas vivos que presentan en común la propiedad de ser insolubles en el agua, pero solubles en disolventes orgánicos no polares como podrían ser algunos hidrocarburos o en alcoholes que contengan más de cuatro carbonos en su estructura y que no se encuentren en forma compacta. Se incluyen dentro de este grupo los aceites y las grasas comunes en nuestra dieta, así como los denominados fosfolípidos asociados, que se encuentran principalmente en las membranas celulares. Las sustancias mencionadas presentan en común el hecho de ser ésteres de ácidos grasos de cadena larga, pero existen otros muchos lípidos que no presentan esta característica estructural. Entre estos últimos se incluyen los esteroides, los terpenos, el colesterol y sus ésteres.¹²

Los ácidos grasos, ácidos alifáticos monocarboxílicos, son componentes estructurales comunes a la mayoría de los lípidos, por lo que muchas propiedades de los lípidos de los alimentos se explican en función de los ácidos grasos que los componen. Casi sin excepción, los ácidos grasos que se encuentran en los alimentos poseen un número par de átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.¹²

Antes de entrar al comercio, la mayor parte de los aceites y grasas son sometidas a un proceso de refinamiento, después del cual quedan constituidos fundamentalmente por: triglicéridos de ácidos grasos alifáticos de cadena recta saturados y no saturados e insolubles en agua y una pequeña cantidad de otras sustancias como son los fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, carotenoides, vitaminas y pigmentos liposolubles. Sí a temperatura ambiente

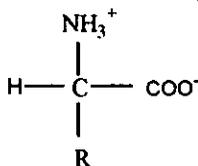
son líquidos se le llaman aceites y si son sólidos son grasas. Pueden ser de origen animal o vegetal. Los ácidos grasos de los aceites y las grasas son fundamentalmente alifáticos de 6 a 24 átomos de carbono.¹³

Los aceites y las grasas son importantes en la dieta humana, sirven como fuente rica de energía, se utilizan como alimento o como ingrediente en los alimentos y sus características funcionales y de textura contribuye al sabor y a la aceptabilidad de muchos alimentos naturales y preparados.¹⁴ La mayoría de las grasas, que generalmente son digeridas hasta en un 95%, dan al hombre 9 Cal/g, a diferencia de las proteínas, que debido a su digestión y a su oxidación incompletas, dan generalmente una cantidad de energía equivalente a 4 Cal/g y los carbohidratos como azúcares y almidones, que generalmente son digeridos en un 98% y plenamente oxidados por el hombre, proporcionan, al igual que las proteínas, unas 4 Cal/g.¹⁷

El método a utilizar en la determinación del contenido de grasa depende del tipo de lípido presente y de los restantes componentes de los alimentos con que está mezclado. Si se desea conocer el contenido graso total de un alimento, que en su mayoría esta compuesto de triglicéridos, probablemente se encontrará satisfactoria la extracción continua en un aparato Soxhlet con éter o éter de petróleo, de aquí se toma también el nombre de extracto etéreo. Si el total de lípidos se encuentra ligado con las proteínas, es necesario un tratamiento previo con amoníaco para romper las interacciones proteína-grasa sin destruir a los carbohidratos, para posteriormente hacer la extracción con el disolvente. Existen diversos métodos para determinar el contenido de grasa, los cuales han sido desarrollados para adaptarse a aplicaciones particulares.¹⁰

Proteínas.- Son el tercer grupo de los macrocomponentes de los alimentos. Las proteínas son polímeros y las unidades monoméricas que las componen

son los aminoácidos, unidos por un enlace peptídico. La cadena polipeptídica de las proteínas no es ramificada. Existe una diversidad de proteínas tanto de estructura como de función. Cada proteína presenta una secuencia única de aminoácidos en una cadena de longitud definida. Algunas proteínas constan de dos o más cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas por enlaces no covalentes. Excepto la prolina y la hidroxiprolina, todos los aminoácidos que constituyen las proteínas tienen la fórmula general:



El carbono α es asimétrico (excepto en el caso de la glicina, donde R es un H). Los aminoácidos libres contribuyen al aroma y sabor de algunos alimentos. Los grupos amino y carboxilo se representan en forma ionizada, conocida como ion híbrido, que es la que predomina a valores neutros de pH. La ionización de las cadenas laterales depende del pH del medio que rodea las proteínas. Así que valores extremos de pH y elevadas temperaturas pueden llegar a romper el plegamiento del esqueleto de la cadena proteica, conduciendo así a la “desnaturalización” de la proteína. Es probable que las proteínas desplegadas interaccionen unas con otras, lo que conduce a la precipitación, solidificación o formación de geles.

Las proteínas desempeñan diversas funciones. Un ejemplo son las enzimas, catalizadores de los que dependen reacciones químicas que tienen lugar en el proceso de la vida. La hemoglobina, es una proteína que transporta el oxígeno en la sangre, las permeasas que controlan el transporte de sustancias a través de las membranas celulares contra gradiente de concentración, las inmunoglobulinas son otro tipo de proteínas, que

constituyen los anticuerpos que proporcionan las defensas de los animales frente a microorganismos invasores. Estas proteínas se caracterizan por su capacidad para unirse específicamente a otras moléculas como parte de su función fisiológica.¹⁵

Las proteínas vegetales son diferentes a las proteínas animales, ya que carecen de ciertos aminoácidos esenciales. Sin embargo, al complementar las proteínas vegetales incompletas, con los aminoácidos esenciales que les faltan (los cuales a menudo son lisina y metionina), estas proteínas pueden resultar totalmente adecuadas para la alimentación humana.¹⁷

Las proteínas de nuestra dieta aportan los aminoácidos a partir de los cuales nuestro organismo sintetiza sus propias proteínas. Los *aminoácidos no esenciales*, pueden ser sintetizados por los mamíferos, siempre que se disponga de suficiente aporte de nitrógeno amínico y de carbohidratos. Los *aminoácidos esenciales* no pueden ser sintetizados por los mamíferos, por lo que deben ser aportados por la dieta. Los excedentes de un determinado aminoácido se degradan por oxidación del esqueleto carbonado para aportar energía. El nitrógeno es utilizado para la síntesis de cualquier otro aminoácido no esencial que no sea ingerido en cantidad suficiente, o bien excretado en forma de urea.¹⁵ Un α -aminoácido o cualquier otro constituyente de la dieta es esencial para los animales, en primer lugar, cuando estos no lo pueden sintetizar y, en segundo lugar, cuando un componente de la dieta por sí mismo o uno de sus derivados metabólicos es necesario para llevar a cabo las funciones bioquímicas y un crecimiento normal.

Existen ocho aminoácidos estrictamente esenciales para la nutrición adecuada de los adultos, algunos de ellos, por ejemplo, el triptófano, se

necesitan directamente para la biosíntesis de las hormonas. Sin embargo, la fenilalanina aunque es un aminoácido esencial, acumulada en grandes concentraciones puede llevar a la provocación de *fenilcetonuria*, esta enfermedad aparece en las primeras semanas después del nacimiento y puede provocar un retraso mental grave.

TABLA 2.1 AMINOACIDOS:

AMINOACIDOS ESENCIALES		AMINOACIDOS NO ESENCIALES	
NOMBRE		NOMBRE	
FENILALANIN A	Phe	AC.ASPÁRTICO	asp
LEUCINA	Leu	AC.GLUTÁMICO	glu
ISOLEUCINA	Ile	ALANINA	ala
LISINA	Lys	ARGININA	arg
METIONINA	Met	CISTEINA/CISTINA	cys
TREONINA	Thr	GLICINA	gly
TRIPTOFANO	Trp	HIDROXIPROLINA	hyp
VALINA	Val	PROLINA	pro
HISTIDINA (para niños)	His	SERINA	ser
		TIROSINA	tyr

Sin embargo, de los ocho aminoácidos esenciales como se puede observar en la tabla 2.1, sólo cinco limitan la calidad de las proteínas en la dieta del hombre: lisina, aminoácidos azufrados (cisteína y cistina), la treonina y el triptófano. La tirosina y la cisteína también son clasificados como aminoácidos esenciales, puesto que no pueden ser sintetizadas en

cantidades adecuadas cuando la dieta es deficiente en fenilalanina o metionina, respectivamente. Las necesidades de triptofano y fenilalanina, y en consecuencia, de tirosina, se deben a la incapacidad de los animales para sintetizar anillos aromáticos.¹⁶

El método más comúnmente utilizado para la determinación de proteína, es el método *Kjeldahl*. Al aplicar este método se supone que la proporción de nitrógeno no proteico de un alimento es suficientemente pequeña para ser considerada no significativa, por lo que la determinación de nitrógeno total es un reflejo preciso del contenido proteico total. La proporción de nitrógeno en la mayoría de las proteínas es de aproximadamente un 16% en peso, por lo que normalmente se utiliza un factor de conversión estándar de 6.25, factor que resulta de $100/16$, es decir si de un alimento se extrajera pura proteína y se determinará la cantidad de nitrógeno para esa proteína se obtendría para 100% de proteína pura, un 16% de nitrógeno. Para convertir el contenido de nitrógeno en contenido de proteína, por el método de Kjeldahl, se plantearía el siguiente razonamiento:

$$100\% \text{ de proteína pura} - 16\%N_2$$

$$y \text{ \% proteína} - x \text{ \% } N_2$$

Por lo tanto se tendría para: $y \text{ \% proteína} = x \text{ \% } N_2 \cdot 6.25$

Las variaciones en la composición de aminoácidos en diferentes alimentos, hacen necesario el uso de factores de conversión ligeramente diferentes al factor estándar para una mayor precisión durante la determinación. Las proteínas de los cereales tienen una proporción elevada de glutamina, lo que determina un contenido en nitrógeno más alto de lo normal y, por lo tanto, la necesidad de utilizar un factor de conversión más bajo, en este caso de 5.70. Aproximadamente la tercera parte de los aminoácidos de la gelatina son glicina, por lo que tiene un mayor contenido

en nitrógeno, siendo preciso un factor de conversión de 5.55. La carne precisa el factor estándar de 6.25; para la leche y huevos se aplican factores de conversión más altos, de 6.38 y 6.6, respectivamente. El AOAC (Association of Official Analytical Chemist) en su método oficial para proteínas en granos, indica que el factor que se debe usar en el cálculo es de 5.7 para trigo y sus derivados, 5.18 para almendras, 5.46 para nueces y 5.30 para coco.

En el método *Kjeldahl*, la muestra del alimento completo se digiere a altas temperaturas en ácido sulfúrico concentrado, hirviendo a reflujo y en presencia de una sal de metal pesado, como puede ser el sulfato de cobre, como catalizador. También se añade una cierta cantidad de sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición. Bajo estas condiciones la materia orgánica se oxida, con lo que todo el nitrógeno orgánico queda retenido en disolución en forma de iones amonio. Una vez finalizada la digestión se toma una alícuota y se transfiere a un destilador, en el que se lleva a condiciones alcalinas, liberándose el amoniaco, que es destilado y arrastrado a una alícuota de ácido bórico. La cantidad de amoniaco liberado se determina por titulación.¹⁵

Fibra.- La fibra esta formada principalmente de polisacáridos provenientes de las paredes celulares de las plantas como es la celulosa , que sirve como principal componente estructural de los tejidos vegetales y la lignina, que no es un carbohidrato propiamente dicho, sino que está formada por fenoles poliméricos y que contribuyen a la rigidez estructural de la planta.⁵⁶ Estos polisacáridos junto con la lignina se consideran como "no utilizables" debido a que no pueden ser hidrolizados por enzimas a monosacáridos en el cuerpo humano. Todos los polisacáridos que no son digeridos en el cuerpo humano, forman parte de la fibra en la dieta¹⁰. La fibra cruda es la fracción orgánica

de la muestra que resiste un tratamiento alternado de ácido sulfúrico y sosa hirviendo.

Una pequeña proporción de los carbohidratos la constituyen los polisacáridos no amiláceos o también llamados polisacáridos diferentes del almidón (NSP; Non-starch polysaccharides) a los cuales se les puede referir como "fibra dietética o dietética". La importancia médica de este componente de la dieta es que tiene efectos fisiológicos particulares en el ser humano ya que previene el desarrollo de padecimientos tales como cáncer de colón y en menor grado en cánceres del estómago y del recto y enfermedades cardiovasculares^{18,19}.

La celulosa es considerada como "no utilizable", a diferencia del almidón, que si es degradado en la boca y en el intestino delgado por enzimas, que rompen los enlaces glicosídicos α -(1—4) liberando repetidamente unidades de disacárido (maltosa). La celulosa junto con otros carbohidratos no utilizables como la hemicelulosa y materiales indigeribles como son gomas y pectinas, naturalmente presentes, así como la lignina, que conjuntamente se denominan "fibra dietética", pasan a través del cuerpo inalterados aportando un voluminoso material de relleno esencial para el funcionamiento normal del tracto intestinal inferior.¹⁰

Carbohidratos.- Los carbohidratos totales en un alimento es el conjunto de todos los carbohidratos presentes, sean o no asimilables nutricionalmente.

Los carbohidratos asimilables son aquellos que sí son útiles nutricionalmente, debido a que pueden ser digeridos, metabolizados y ayudan a proporcionar parte de la energía en el cuerpo humano. En general, los carbohidratos se encuentran en pequeñas cantidades en los alimentos, como es el caso de los monosacáridos y disacáridos, ya sea que estén presentes en forma natural o adicionada. Se pueden encontrar como dextrinas,

formadas por degradación parcial de polisacáridos o como polisacáridos, como es el caso del almidón y el glucógeno.¹⁰ Estos carbohidratos que han sido señalados, se consideran libres de nitrógeno, por lo cual también pueden recibir el nombre de Extracto Libre de Nitrógeno. (NIFEXT; Nitrogen Free Extract).

Los carbohidratos no asimilables son aquellos que el cuerpo humano no puede metabolizar, ni degradar en el tracto intestinal, como es el caso de la celulosa, hemicelulosa, y gomas que se encuentran presentes de forma natural en un alimento además de la existencia de polímeros fenólicos como es el caso de la lignina; éstos se cuantifican junto con los carbohidratos no asimilables en la determinación de fibra cruda.

El procedimiento más común para determinar el contenido de carbohidratos presentes en un alimento es por "diferencia", es decir, restando del peso total de la muestra, la suma de: humedad, ceniza, proteína, grasa y fibra, determinadas experimentalmente. Sin embargo, existen objeciones como es, en primer lugar, las posibles inexactitudes en la determinación de los componentes mencionados en la suma.¹⁰ Es decir, que los errores experimentales cometidos en las determinaciones de los elementos como humedad, proteína, etc., se ven reflejados en el cálculo de la proporción de carbohidratos asimilables aunque no es posible determinarlos con precisión por lo que el cálculo final de carbohidratos puede ser erróneo.

2.6. OBTENCIÓN DE ACEITES Y GRASAS VEGETALES.

Los aceites y grasas vegetales se obtienen de frutos y semillas, mediante presión o mediante extracción por disolventes. En el procedimiento por presión, quedan retenidos aproximadamente del 4 al 12 % de residuos en el aceite. Es necesario una trituration previa de la masa para desgarrar las células, durante la cual la semilla sufre un calentamiento, que facilita la

separación del aceite. En la obtención de aceites por el método de extracción por disolventes se puede realizar mediante diversos disolventes volátiles.²⁰

2.6.1 Método por presión.

Desde los tiempos más antiguos era ya conocido el método de extracción de aceite por presión de las semillas, y hasta la mitad del siglo XIX fue el único procedimiento industrial usado para obtener los aceites y aún en nuestros días sigue siendo uno de los métodos principales para la obtención de este producto. Los cuerpos sólidos o líquidos, al ser sometidos a una presión, sufren una disminución de volumen, oponiendo una resistencia igual a esta presión, y si es posible, ceden a esta. Las gotas de aceite y los granos de grasa que no quedaron libres por la trituración previa, desgarran las paredes de la célula durante el prensado y se separan de la masa, pasando a través de los canales propios de la célula. Las grasas sólidas y líquidas se extraerán con mucha mayor facilidad si previamente se lleva a cabo un calentamiento, ya que con la elevación de temperatura se pueden coagular cuerpos albuminoides proteicos y precipitan los mucilaginosos, que están en las células vegetales formándose una especie de emulsión con el aceite. Por otro lado, dicho calentamiento favorece la separación de otros materiales indeseables, lo que mejora la calidad del aceite. Sin embargo, un exceso de calentamiento aumenta el poder disolvente del aceite para ciertos elementos contenidos en la semilla, que le dan olor, sabor y color, en algunos casos indeseables. Por esta causa, los aceites serán tanto más impuros cuanto más se haya calentado la materia prensada. Si se quiere obtener un buen aceite, y al mismo tiempo un máximo rendimiento, se hace un doble prensado, el primero en frío y el segundo en caliente, algunas veces se aconseja hasta un tercer prensado.

Junto con el calentamiento de la semilla, se regula el grado de humedad, para una buena extracción del aceite. El agua atraviesa y ablanda el tejido celular, lo que facilita los cambios de forma debidos a la presión. Sin embargo, se evitan excesos de agua que tendrían por consecuencia la expulsión de la materia a pensar, de donde en "prensas abiertas" se acarrearía la rasgadura de los paños y en "prensas cerradas" la obstrucción de los tamices.

La prensa por sí misma no altera en ningún modo la calidad del aceite sí se tiene cuidado y limpieza para evitar impurificaciones del producto. Es importante la elección del sistema de prensado para un buen rendimiento del aceite con la calidad deseada. Hoy en día las prensas más utilizadas son las hidráulicas para la producción del aceite en gran escala. Para pequeñas explotaciones aún son utilizadas prensas del tipo de palanca, cuña, husillo, y de ballestas articuladas.

Al principio, cuando la prensa es puesta en funcionamiento, casi no hay resistencia en el pistón y la plataforma, ya que solamente se produce una aproximación y una ligera compresión de las tortas. Esto se debe realizar rápidamente ya que luego que comienza la salida del aceite. "la prensa entra en presión" y debe corresponder el avance del pistón al aceite extraído. Cuando se ha alcanzado la presión final, se mantiene constante por largo tiempo. En este período, el volumen de la materia ha disminuido ha causa del aceite expulsado. La presión no debe aflojarse, de lo contrario el aceite sería reabsorbido por las tortas. Mediante el prensado no es posible extraer todo el aceite contenido en el material oleaginoso. Las tortas prensadas contienen todavía del 4 al 12% de aceite que representa una pérdida del 10 al 25% del aceite total contenido al principio.²⁰

2.6.2 Método por disolventes.

El primer disolvente empleado para la extracción del aceite, fue el sulfuro de carbono, introducido en la industria de aceites por Deiss en 1856. Como disolventes de importancia industrial, se usó tetracloruro de carbono y posteriormente con buenos resultados, el tricloroetileno.

Ninguno de los disolventes para la extracción de las grasas reúnen las características deseables que debería reunir un disolvente: 1) No ser inflamable ni explosivo, 2) que el propio disolvente y sus vapores no sean nocivos para la salud, 3) que sus propiedades químicas permitan mezclarlo con el aceite, 4) que sea posible eliminarlo completamente, tanto del aceite extraído como de los residuos, 5) que no ataquen a los aparatos de extracción, 6) que el consumo del disolvente resulte económico. Si se combina el procedimiento por presión con el de extracción se tiene como resultado final un buen rendimiento de aceite, quedando en los residuos de 0.5 a 2% de aceite. La calidad del aceite de extracción es muy diferente de la de presión, esto puede ser a causa de que el mismo aceite extraído durante la presión arrastra consigo otras impurezas no grasas como colorantes naturales, materiales mucilaginosos y albuminoideas entre otros, de los cuales queda liberado en la posterior refinación. Los aceites extraídos con disolventes contienen menos materias mucilaginosas y albuminoideas. Además, con el empleo de disolventes puros, es posible eliminarlos totalmente del aceite extraído; sin embargo, para eliminar el disolvente, es indispensable el empleo del calor, lo que causa alteraciones que bajan la calidad de dicho aceite, sobre todo si es para fines alimenticios, de tal manera que siempre será de mejor calidad un aceite extraído en frío.²¹ Cabe mencionar que la obtención del aceite de coco a nivel industrial se hace por

extracción con hexano como disolvente, el cual posteriormente se debe recuperar para su reutilización.

2.6.3 Método enzimático.

Hasta ahora se han utilizado ampliamente, a nivel industrial, dos métodos para la extracción de aceite de origen vegetal: los métodos de prensado de semillas oleaginosas y mediante el uso de disolventes orgánicos. También se puede realizar una combinación de ambos métodos para lograr un mejor rendimiento. Sin embargo, existe una tercera alternativa, utilizable a nivel laboratorio, que involucra la presencia de enzimas específicas en un medio acuoso, que facilitan la liberación del aceite vegetal.²¹

La idea original proviene de observaciones de fermentaciones lácticas de la carnaza de coco en un medio acuoso, en los cuales se presentaban problemas de estabilidad por la formación de dos fases después de la fermentación. El aceite que se encuentra dentro de las células vegetales, unido a macromoléculas como proteínas y carbohidratos, se libera durante la fermentación lo que da lugar a la formación de dos capas. Con ésta técnica, lo que se pretende es modificar el tejido celular con enzimas hidrolíticas con el objeto de extraer o liberar de la célula el aceite contenido.

La ventaja al usar éste método de extracción, es que en los procesos habituales para la extracción del aceite de coco, se necesita un secado previo del coco, y que especialmente en México se realiza mediante un secado solar. Este proceso de secado toma un tiempo de casi tres días, lo que provoca una contaminación microbiana, con un alto riesgo de producción de aflatoxinas y además se producen reacciones de oxidación, por lo que se tiene una reducción de la calidad del aceite y se provoca un déficit en el rendimiento.^{21,22,23}

2.7 CONTROL DE CALIDAD EN GRASAS Y ACEITES.

El control de calidad debe comenzar desde la materia prima, siendo que todas las materias primas deben de ser analizadas y antes de su procesamiento, se verifica que las semillas no vengán contaminadas por hongos, que tengan un grado de humedad aceptable, sin rupturas que puedan dañarlas en todos los aspectos y debidamente empacadas para evitar este tipo de problemas, esto se hace con el fin de obtener un producto de buena calidad, partiendo de un buen fruto. Para el caso de aceites existen normas internacionales como es el Codex Alimentario con recomendaciones para conocer la calidad de aceites y grasas. En México existen normas oficiales que son legislaciones y que también contribuyen al control de la calidad de aceites y grasas. Los avances modernos en la tecnología de aceites y grasas han ayudado a dar un mayor conocimiento de la composición y estructura de los lípidos. Es necesario describir los métodos generales que se usan en el análisis de aceites y los criterios analíticos fundamentales empleados.¹⁴

2.7.1. Métodos de análisis para grasas y aceites.

Se describen los fundamentos de los análisis que se usan comúnmente en un análisis de rutina para la identificación y determinación de la calidad de una muestra de aceite.

La Norma del Codex Alimentario sugiere para el aceite de coco comestible las siguientes determinaciones:

Para características de identidad: densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de iodo, materia insaponificable, índice de Reichert, índice de Polenske e identificación y cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

Para características de calidad menciona: color, olor y sabor, índice de acidez e índice de peróxido.

2.7.1.1. Métodos para determinar características de identidad de un aceite.

Densidad.- Es la relación entre la masa del lípido y la masa de igual volumen de agua, a cierta temperatura. Esta constante varía en razón directa con el estado de insaturación de los ácidos constituyentes y en razón inversa con su peso molecular. Se determina en los aceites por medio del picnómetro, expresando los resultados con cuatro decimales.

La densidad se reporta a 20°C. Si se ha determinado a una temperatura diferente sumar o restar el factor 0.00064 por cada grado sobre o abajo de 20°C respectivamente.²⁴.

Índice de Refracción.- El Índice de refracción es la relación que existe entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción, ángulos que se forman al pasar un rayo de luz del aire a otro medio, en que la luz se propaga con diferente velocidad.³⁵ El índice de refracción de una sustancia dada varía con la longitud de onda de la luz y con su temperatura. Generalmente la velocidad de la luz en el aire es tomada como la velocidad en el vacío y, a menos que de otro modo se especifique, la longitud de onda seleccionada es la longitud de onda ordinaria de la línea-D de la fuente de luz de sodio (589.6 nm). En este caso se anota como: n_D^t a $t^\circ\text{C}$.³⁶.

El Índice de Refracción de un aceite se lee a 20°C a los cuales los aceites son líquidos y a 40°C para grasas, las cuales son sólidas a la temperatura de 20°C.³⁶ Estas lecturas se determinan en un refractómetro el cual puede utilizar una fuente de luz artificial como es una lámpara de sodio; se hace circular un flujo de agua a temperatura constante hasta el final de los

prismas. Para las correcciones de temperatura se puede utilizar la siguiente fórmula: $R = R' + K(T' - T)$. De donde: ³⁷.

R= lectura reducida para una temperatura estándar.

R'= lectura obtenida hasta una temperatura T'.

T= temperatura estándar.

K= 0.55 para grasas y 0.58 para aceites.

Índice de Saponificación.- El fundamento del método es la reacción química de los triglicéridos con un álcali (KOH), formándose, en esta reacción de saponificación la sal del ácido (jabón).³⁹ La muestra se hierva bajo reflujo con solución de hidróxido de potasio alcohólica y se titula el exceso de hidróxido de potasio con ácido clorhídrico, en presencia de un indicador.³⁸

Los ésteres de los ácidos grasos de masa molecular baja requieren mayor cantidad de álcali para saponificarse ya que en la reacción de saponificación implica que una mol de triglicérido consume tres moles de álcali, si se usan los pesos moleculares en esta relación entonces será que el índice de saponificación es inversamente proporcional al promedio de los pesos moleculares de los triglicéridos. De modo que el índice de saponificación es inversamente proporcional al promedio de las masas moleculares de los ácidos grasos de los glicéridos presentes. Como muchos aceites tienen índices de saponificación parecidos, el índice de saponificación en general no es útil para la identificación de aceites y grasas.¹⁴

Este índice se puede determinar por el método Koettstorfer³⁸ como lo menciona la Norma Oficial Mexicana, en los aceites y grasas vegetales o animales. El índice de saponificación de un aceite o de una grasa es la cantidad de hidróxido de potasio, expresada en miligramos, necesaria, para neutralizar los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis completa de un gramo de aceite.^{38, 39, 13 y 14}.

Materia Insaponificable. - Se define como el material que existe en aceites y grasas, el cual después de la saponificación del aceite o de la grasa con un álcali se extrae con un disolvente orgánico apropiado, el cual permanece después del evaporar a sequedad el disolvente a 80°C. El material insaponificable comprende hidrocarburos, alcoholes superiores y esteroides (por ejemplo, colesterol, fitoesterol). La mayor parte de los aceites y grasas de pureza normal contienen menos de 2% de material insaponificable. La adulteración de los aceites y grasas con hidrocarburos parafínicos aparece en el materia insaponificable.¹⁴

Índice de Yodo. - Se define como el peso de yodo absorbido por cien partes en peso de la muestra. Este índice es una medida de la proporción de ácidos grasos insaturados que están presentes ya sea en estado libre, o bien combinados en forma de ésteres. Los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite, se unen con una cantidad definida de halógeno por lo que el índice de yodo es una medida del grado de insaturación. Este valor es constante para un aceite o una grasa en particular, pero el valor exacto obtenido depende de la técnica particular que se emplee.¹⁴ Para su determinación suelen usarse dos métodos, el de Hanus y el Wijs,¹³ siendo este último el más usual.

El índice de yodo no ofrece ninguna información concerniente a la distribución y localización de las dobles ligaduras en los diferentes ácidos grasos, por lo que no se puede utilizar para determinar la naturaleza y composición de la grasa, sin embargo ya que muestra un valor constante para cada grasa o aceite en particular puede ayudar a la identificación de éstos.

Índice de Reichert-Meissl. - Expresa los mililitros de álcali 0.1 N necesarios para neutralizar los ácidos grasos volátiles solubles en agua, provenientes de 5 g de lípido, en condiciones específicas.⁴¹ Fundamentalmente los ácidos

grasos volátiles solubles en agua son: butírico y caproico.¹³ Por lo tanto este índice es una medida empírica de los ácidos grasos volátiles solubles en agua presentes en un aceite o una grasa, este proceso no determina la cantidad total de los ácidos grasos volátiles presentes, sin embargo puede proporcionar la información de la presencia o ausencia de ácidos grasos volátiles solubles en agua de una mezcla o en una muestra de aceite. En el aceite de coco se determina a pesar de que este no posee ácido butírico⁵⁷.

Índice de Polenske.- Expresa los mililitros de álcali 0.1 N necesarios para neutralizar los ácidos grasos volátiles insolubles en agua, provenientes de 5g de aceite en determinadas condiciones.⁴¹ Fundamentalmente los ácidos grasos volátiles insolubles son: caprílico, cáprico y laúrico.¹³ por lo tanto este método es una medida empírica de los ácidos grasos insolubles en agua presentes en una muestra de aceite. El aceite de coco es rico en ácidos grasos volátiles insolubles en agua, por lo tanto este valor es más alto que la determinación anterior, sin embargo tampoco proporciona una información cuantitativa.

2.7.1.2. Métodos para determinar características de calidad de un aceite.

Color.- Se ha definido por color en grasas y aceites al color propio del producto crudo o al que adquiere después de ser sometido a procesos de refinación.⁴² El color en aceites es proporcionado por la interacción que hay entre los ácidos grasos y los carotenoides presentes en forma natural y la intensidad de este depende según de la manera en que interaccionen entre sí obteniéndose una buena estabilidad.⁵⁸

El color de las grasas y aceites se mide usualmente por comparación con vidrios coloridos estándar en un tintómetro de Lovibond o un colorímetro de Wesson, usando celdas de 12.7mm, 25.4mm y 133.4mm. Este método no es satisfactorio para aceite que tienen una coloración verde o morena. Un

procedimiento basado en los colores estándar se puede usar para las grasas animales y para todas las grasas y aceites demasiado oscuras para ser leídas en el tintómetro de Lovibond. Industrialmente se usa un método fotométrico en las operaciones de refinado y decoloración. Se mide el porcentaje de transmitancia contra el tetracloruro de carbono en una celda adecuada (5 - 50 mm) a longitudes de onda de absorbancias máxima y mínima.

Las grasas deben de ser fundidas a una temperatura no superior a 60°C. Durante la comparación del color o la medición fotométrica, la muestra debe de estar a temperatura ambiente para los aceites y no superior en 10°C arriba del punto de fusión para las grasas.¹⁴

Olor.- Es la característica organoléptica perceptible cuando el aceite o la grasa se calienta a una temperatura de 210°C aproximadamente a ésta temperatura surgen desprendimientos de sustancias volátiles que son evaluadas organolépticamente, y que son diferentes a los olores peculiares característicos de las semillas de donde procede el aceite.

La respuesta de un individuo frente a un estímulo determinado, es una medida subjetiva; así, la mayoría de las veces, esta medida es cualitativa y el aspecto cuantitativo siempre estará sujeto al criterio del analista. El olor, por lo tanto, es una cuestión difícil de medir con instrumentación de medición.

La concentración de sustancias odoríferas en un aceite es generalmente muy baja; sin embargo; el número de constituyentes puede ser muy alto. Estos pueden ser eficientemente eliminados a través de cada uno de los pasos de refinación y principalmente en la deodorización.

Una eventual desviación durante el proceso de refinación o un inadecuado almacenamiento de los aceites refinados puede dar origen a la aparición de olores indeseables.⁴³

Índice de peróxidos.- El índice de peróxido es una medida de los peróxidos contenidos en los aceites o grasas que pueden formarse durante el almacenamiento debido a la interacción que pueden llegar a tener con oxígeno molecular, produciéndose la oxidación de los lípidos o bien una "autooxidación". Los peróxidos son los productos iniciales mayoritarios de la autooxidación aunque esta es lenta al principio, se debe tener en mente al interpretar los resultados obtenidos. Aunque el índice de peróxido es aplicable para el seguimiento de la formación de peróxidos a lo largo de las primeras etapas de oxidación, es sin embargo, muy empírico, además esta técnica de análisis es extremadamente sensible a los cambios de temperatura, a lo largo de la oxidación el índice de peróxido se eleva hasta un máximo y después se disminuye.⁵⁹

El método del índice de peróxido se basa en una determinación de la cantidad de peróxidos contenidos en la muestra por medio de la reacción entre los peróxidos presentes con yoduro de potasio en solución ácida, seguida de la titulación del yodo liberado con tiosulfato de sodio. Usualmente se utiliza cloroformo como disolvente y ácido acético para la acidificación del medio. El índice de peróxido se indica como los miliequivalentes de oxígeno en forma de peróxidos por kilogramo de grasa o aceite.^{14,44,59}

Se ha intentado correlacionar el índice de peróxido con el desarrollo de aromas y sabores rancios, obteniéndose a veces valores aceptables, sin embargo los resultados no son siempre consistentes. La cantidad de oxígeno que debe de absorberse o los peróxidos que deben formarse para producirse el enranciamiento varían con la composición del aceite, la presencia de antioxidantes y trazas de metales, y las condiciones de oxidación.⁵⁹

La rancidez es el grado de descomposición común de las grasas, el cual se debe al ataque del oxígeno a los centros insaturados y se observa

cuando los comestibles grasientos adquieren con el tiempo olor y sabor más fuertes.⁵⁰

Índice de Acidez. - El índice de acidez es una medida del grado al cual se han hidrolizado los glicéridos del aceite por acción de las lipasas o por alguna otra causa. La reacción es acelerada por el calor y la luz. Como la rancidez se acompaña usualmente de formación de ácidos grasos libres, la determinación es, con frecuencia, usada como una indicación general de la condición y comestibilidad de los aceites.

Con la mayor parte de los aceites, la rancidez hidrolítica empieza a ser notable al paladar cuando los ácidos grasos libres, calculados como ácido oleico son alrededor de 0.5 - 1.5 %, sin embargo, se recomienda que los ácidos grasos libres sean calculados en los aceites, como el ácido que más propiamente este presente, así en el aceite de nuez de palma, de coco y de aceites semejantes como ácido láurico, donde un mililitro de hidróxido de sodio 0.1N es equivalente al factor de 0.02 gramos. Ocasionalmente sin embargo, algunos aceites marcadamente rancios por autooxidación, muestran una ligera acidez.¹⁴ Este método se basa en la titulación de los ácidos grasos libres con un álcali y es la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos grasos libres en un gramo de aceite o grasa.⁴⁵ A menudo el resultado se expresa como porcentaje de ácidos grasos libres (AGL).

Determinación del Punto de Solidificación. - Las grasas y aceites naturales, como mezclas de glicéridos y otras sustancias, no tiene punto de fusión exacto y definido. No presentan punto crítico de sólido a líquido; este paso lo realizan gradualmente a través de estados pastosos hasta el completamente líquido. Por esta razón, el punto de fusión de una grasa viene definido en este método por dos temperaturas: una, la inicial de ablandamiento deslizante y

otra final, de líquido perfectamente limpio.⁴⁹ Por lo cual se reporta como intervalo de punto de solidificación, los cuales pueden darnos idea de la pureza de la muestra.

Prueba del frío.- La prueba del frío mide la resistencia de los aceites a la cristalización, es aplicable a todos los aceites vegetales y animales refinados y secos⁴⁹ y se utiliza normalmente como un índice para evaluar la winterización y otros procesos similares. La winterización es un tratamiento donde se separan por filtración los glicéridos de alto punto de fusión, evitándose así fenómenos de turbidez y solidificación del aceite, cuando este se almacena a bajas temperaturas. La prueba consiste en poner la muestras en recipientes que se sumergen completamente en un baño de hielo y agua, la temperatura debe de permanecer a 0°C. Para pasar la prueba la muestra debe estar clara, límpida y brillante después de cinco horas y media de inmersión⁵².

Prueba caliente.- Esta prueba se puede realizar a la par de la prueba organoléptica de olor descrita anteriormente, ya que el aceite se calienta mínimo a 160°C y no se deben de percibir olores desagradables. En ocasiones al calentar a esta temperatura también se puede identificar que en la muestra a comenzado reacciones de oxidación.

14, 53 y 54.

2.7.2 Identificación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases es un método en el cual se separa una mezcla en sus constituyentes, distribuyéndose entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil. En la cromatografía de gases la fase móvil está integrada por un gas no retenible o inerte, que sirve para llevar la mezcla y empujar a los compuestos después de su separación. Este gas inerte recibe el nombre de gas acarreador. La fase estacionaria puede ser un sólido, en

cuyo caso la retención selectiva de los componentes de la mezcla a resolver se debe a fenómenos consecutivos de adsorción y desorción. El soporte sólido inerte puede ser un relleno de la columna o bien la pared interior del tubo que la forma. La fase estacionaria puede ser también un líquido de gran desarrollo superficial, dispuesto sobre un sólido que actúe como soporte, en cuyo caso los fenómenos son de absorción y desorción siendo esta la cromatografía gas-líquido (GLC), que proporciona una separación por partición entre una fase gaseosa móvil y un líquido estacionario fijo, sobre un soporte sólido.

Un cromatógrafo de gases, consiste de cinco partes principales: una fuente del gas acarreador (la fase móvil) con reguladores de presión y medidores de flujo, el sistema de inyección, la columna cromatográfica, un horno, el detector e integrador o graficador.

La cromatografía de gases es esencialmente una técnica de separación, pero la eficiencia de las columnas y de los detectores posibilita la medición precisa y exacta de la cantidad de constituyentes que se han separado de una mezcla. Si la respuesta del detector es lineal con respecto a la concentración de un constituyente, el área del pico (o su altura en el caso de picos agudos dados por sustancias eluidas rápidamente) es proporcional a la cantidad de sustancias en la solución de la muestra que se ha inyectado, permitiendo realizar análisis cuantitativos. La cromatografía de gases puede ser útil en la determinación de los componentes volátiles de los alimentos. Actualmente esta técnica es ampliamente usada para el análisis de la composición de diversos alimentos, por ejemplo, en la determinación de isómeros de ácidos grasos. Esta determinación implica la conversión total del aceite en sus ésteres metílicos, donde se inyecta un microlitro de muestra y se obtiene el cromatograma de estos, previamente se inyecta una solución de

estándares de los ácidos grasos que se desean identificar, cabe señalar que la técnica de cromatografía de gases es una técnica de separación de mezclas moleculares y sin una solución de estándares no es posible la identificación de los componentes de la mezcla en estudio.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar al aceite del fruto de la palma de *Scheelea liebmannii* y a los residuos de extracción, con el propósito de conocer los principales componentes que constituyen a dicho fruto y obtener un mejor aprovechamiento del mismo.

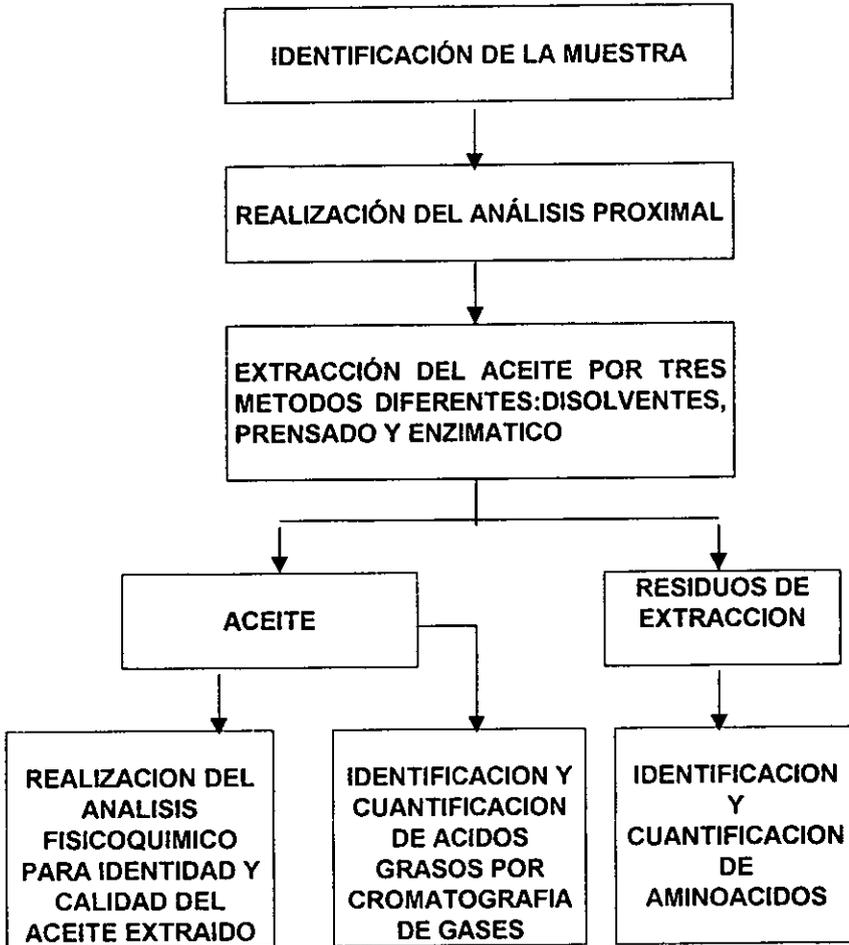
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Mediante pruebas fisicoquímicas realizar la caracterización del aceite de extracción del fruto de la palma *Scheelea liebmannii*.
- Realizar el análisis bromatológico al residuo de extracción del aceite del fruto de la palma de *Scheelea liebmannii*.
- Dar a conocer cuales son los nutrientes principales del fruto de la palma de *Scheelea liebmannii* después de la extracción del aceite y cuales son sus posibles alternativas de utilización de los mismos.
- Conocer que posibilidad ofrece el fruto de la palma *Scheelea liebmannii* como alternativa de extracción de aceite de calidad semejante al aceite de coco comercial.

CAPITULO 4

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Con la colaboración del Dr. Hermilo J. Quero R., nos fue posible identificar la palma "*Scheelea liebmannii*", guardándose un respaldo en el Jardín Botánico de la UNAM, reconociéndose ésta palma con respecto a las características botánicas que presenta su especie.

4.1.1. Reconocimiento físico del fruto

Posteriormente se realizó un muestreo al lote del fruto de la palma *Scheelea liebmannii*, traído de Tuxtepec, Veracruz, con el objeto de obtener las primeras características físicas del fruto a analizar.

4.2 REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS PROXIMAL.

Por medio del análisis proximal se determinaron los componentes principales de la muestra del fruto de la palma *Scheelea liebmannii*, para posteriormente hacer los análisis fisicoquímicos al aceite extraído del fruto.

Los métodos utilizados para el análisis proximal se hicieron con referencia de los oficiales del AOAC (los cuales se describen los procedimientos en el anexo 1), siendo estos los siguientes:

4.2.1. Humedad (a 130°C, durante 1 hora.)²⁸.

4.2.2 Cenizas (a 550°C, durante dos o tres horas).²⁹.

4.2.3. Grasa cruda (método de Soxhlet con éter etílico)^{30 y 31}.

4.2.4 Proteína cruda (método de Kjeldahl, catalizador Cu, se destila en HCl 0.1N

y se usa 5.3 como factor).^{32 y 33}.

4.2.5. Fibra cruda.³⁴.

4.2.6 Carbohidratos asimilables (cálculo por diferencia).

Encontrándose con el análisis proximal que los componentes principales en el fruto de *Scheelea liebmannii* son: grasa, proteína y fibra, se realizó una caracterización detallada tanto de la grasa como de la proteína.

Tomándose en cuenta también que el fruto a caracterizar es una semilla oleaginosa, y encontrándose con el análisis proximal que el componente en mayor proporción del total del fruto es el aceite, se extrajo el aceite por tres métodos diferentes para conocer eficiencia y calidad de cada método.

4.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE *Scheelea liebmannii* POR TRES MÉTODOS DIFERENTES.

4.3.1 Método por Prensado.

Procedimiento.- Se empleo una prensa hidráulica Carber modelo 2697 con 11 toneladas de capacidad. Dentro de la prensa se coloca, una muestra de coco previamente partida en trozos, la cantidad de la muestra puede ser cualquiera, sin embargo para nuestro interés se utilizaron casi 23 g de muestra: la muestra a su vez se colocó en charolas de aluminio para que al momento de presionar, el aceite extraído quedara contenido en las charolas. A la muestra se le aplicó una presión de 10 ton. durante un tiempo de 5 min. Se realizó una segunda extracción a las mismas condiciones para asegurar una extracción total.

Después de obtenido el aceite, se lavó con éter etílico a las partes que quedaron embarradas del aceite, con esto ayudando a disolver el

aceite en el éter y recoger los residuos del mismo, posteriormente se filtró a vacío para separar posibles impurezas sólidas contenidas en la misma semilla del coco. Se evaporó el disolvente quedando solo el aceite que se guardo en un vial para determinar posteriormente el rendimiento.

4.3.2 Método por Disolventes.

Procedimiento.- Para tal procedimiento se realizó el mismo método de Soxhlet que se utilizó para la extracción de grasa cruda; la cantidad de muestra utilizada fue la misma que en el método por prensa.

4.3.3 Método Enzimático.

Procedimiento.- Se pesaron aproximadamente 23 g de muestra y se molió en la licuadora con 100 ml de agua destilada durante 1 minuto, se vació en un vaso de precipitados de 1000 ml y con 100 ml de agua se lavaron los residuos de la licuadora. Adicionando los lavados al vaso. Se adicionaron las enzimas, es decir 1 ml de α -amilasa, 1 ml de pectinasa y 1 gr. de proteasa, al vaso que contenía la muestra y se dejó reaccionar, en una parrilla eléctrica a 50 °C y agitación constante durante 1 hora 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a separar el aceite. Se hace un filtrado y la fase líquida se centrifuga en varios tubos a una velocidad de 7000 r.p.m. durante 20 minutos. El aceite se vacía en un vaso de precipitados de 150 ml y se seca con sulfato de sodio anhidrido. Al final se pesa para conocer el rendimiento.

Las enzimas utilizadas fuerón:

- HT-Proteolitic 223 NU / g, NOVO
- Pectinex 3XL Batch A 047-90-5 Termamyl. 15 300 AJDU/ g.

- Alfa-amilasa (liquido) Tenasa 356 000 WNU/g

4.3.1.1 **Análisis fisicoquímico del aceite extraído.**

(Los procedimientos se describen en el anexo 2)

Densidad o Peso Específico (Método del picnómetro a 25°C).^{24,25 Y 26.}

Indice de Refracción (Refractómetro de Abbé a 40°C).^{35.}

Indice de Saponificación.^{39.}

Materia Insaponificable.^{13.}

Indice de Yodo.(Método de Wijs).^{14.}

Indice de Reichert-Meissl.^{13, 41.}

Indice de Polenske.^{13.}

Para determinar características de calidad:

Color. (Por comparación visual)

Olor.(Por percepción olfativa)^{43.}

Indice de Peróxido.^{44.}

Indice de Acidez.(Como % Ac. Láurico)^{47.}

Determinación del Punto de Solidificación.(Método de capilar)

Prueba del frío.^{49.}

Rancidez. (Prueba de Kreiss).^{50.}

IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Solución de estándares

Se hace la preparación de una solución de estándares de ésteres metílicos con las siguientes concentraciones:

ESTANDARES		PORCIENTO
Caprílico	C _{8:0}	1.01%
Capríco	C _{10:0}	0.15%
Laúrico	C _{12:0}	18.31%
Mirístico	C _{14:0}	30.04%
Palmitico	C _{16:0}	15.29%
Esteárico	C _{18:0}	5.96%
Oleico	C _{18:1}	23.60%
Linoléico	C _{18:2}	5.64%

PREPARACION DE LA MUESTRA:

Se pesan aproximadamente 10 mg de muestra en un vial para reflujo, se agrega 1 ml de hidróxido de potasio al 5% en metanol-agua (50:50) y se hierve a reflujo durante 20 min. Se enfría a temperatura ambiente y se adicionan 1.5 ml de ácido clorhídrico al 25% en metanol y 1 ml de trifloruro de boro, se hace un segundo reflujo por 20 min. Se extrae con 1 ml de hexano y se guarda en un vial. Se inyecta 1 µL de esta solución.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard serie 5890 A con inyección Split-Splitless, con un detector de ionización de flama e integrador Hewlett Packard 3396 A.

Columna: Columna capilar "Supelco" de sílica fundida: SP-1000,

Carbowax 20M, 15 m de longitud x 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de película. Gas acarreador: H₂ (2 ml/min).

Programa de temperatura:

- Temperatura inicial: 100°C con un aumento de 8°C/min, hasta llegar a 220°C.
- Temperatura del inyector: 220°C.
- Temperatura del detector (ionización de flama): 220°C.

4.3.2 Identificación y cuantificación de aminoácidos esenciales y no esenciales.⁵¹

APARATOS:

Analizador de aminoácidos **Beckman System 6300/7500**, con capacidad para mediciones precisas de aminoácidos individuales de bajas concentraciones (hasta de 20 nmolar). Usar estándares de aminoácidos cada 24 horas.

Tubos de vidrio para hidrólisis de 15 ml.

Baño de agua a 55°C con recirculación.

Previamente se descascarilla la muestra, se desengrasa y se pulveriza. Se hace una determinación de nitrógeno por método de Kjeldahl.

Hidrólisis de la muestra.

- (a) Hidrólisis ácida (a 110°C durante 24 horas)
- (b) Oxidación de ácido per fórmico seguido por hidrólisis ácida.
- (c) Hidrólisis alcalina (a 110°C durante 22 horas).

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 RECONOCIMIENTO FÍSICO DEL FRUTO *Scheelea liebmannii*.

Como se mencionó en los antecedentes *Scheelea liebmannii*, es una palma, que puede producir todos los años una o dos y a veces hasta tres inflorescencias. El número medio de frutos por inflorescencia son 3,500.¹

Durante la parte experimental se revizo un lote de semillas para observar las características físicas de la semilla del fruto de la palma de *Scheelea liebmannii* y se encontró que esta es relativamente pequeña aun con la cubierta que la protege. La semilla se encuentra envuelta por tres capas, la capa exterior se le llama epicarpio y es de una consistencia fibrosa, en su base se encuentra el periantio, las fibras que forman a esta capa son cada vez más gruesas hacia el interior, éstas fibras forman al mesocarpio, que es la segunda capa, constituido por la conglomeración de las fibras amarillas que en algunas ocasiones contienen un tipo de barniz. La tercera capa que recubre al fruto es el endocarpio o hueso que es compacto y difícil de romper, es la capa más gruesa del fruto ya que para sacar la semilla es necesario romper con un martillo o cortar con una segueta. En la parte central se encuentra la semilla y en algunas ocasiones se encuentran dos por cada fruto. Las semillas son alargadas casi cilíndricas, tienen una cubierta de color café con surcos transversales y longitudinales, al intentar partir la semilla de forma manual o con algún instrumento cortante se puede observar como el aceite de la nuez sale de su cuerpo, pudiéndose observar a simple vista que el aceite que lo compone se encuentra en una cantidad significativa. Se peso

a cada parte que compone a la semilla para sacar una proporción de las partes que forman el total del fruto con respecto al peso total del mismo, mostrándose en la tabla 5.1 los resultados obtenidos.

TABLA 5.1. Partes que componen al fruto

Proporción del fruto	%
Epicarpio y Mesocarpio	25.42
Endocarpio	66.05
Semilla del fruto	8.53
Peso Total del Fruto	100.00

*NOTA: Se mencionan los nombres botánicos que corresponden a cada capa de la semilla de *Scheelea liebmanni*, verificándose así las características botánicas reportadas en la bibliografía.(1, 2, 3).*

Para completar el muestreo que se hizo al lote del fruto de la palma *Scheelea liebmanni*, se midió y pesó a la semilla con cada una de sus capas, obteniéndose así de forma general las características físicas del fruto en estudio con esto se pudo comprobar las características físicas reportadas en la bibliografía.

Como se puede observar en la tabla 5.2. se obtienen 1.539 g de semilla sin capas que la cubran, se puede sacar un rendimiento teórico, como se dijo en un principio se obtienen 3 500 frutos por inflorescencia por lo cual serían 5 386.5 g de fruto que da una palma, si en algunas ocasiones se han reportado dos o tres inflorescencias por palma se está hablando de 10 773 a 16 159.5 g aproximadamente de fruto total que puede ofrecer una sola palmera.

TABLA 5.2. Características físicas generales de la semilla de *Scheelea liebmannii*.

	Peso (gr)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Angosto (cm)
<i>Fruto de Scheelea liebmannii</i> <i>Con tres capas y periantio</i>	18.050	6.21	3.235	8.93
<i>Fruto de Scheelea liebmannii</i> <i>Con endocarpio</i>	13.463	4.785	2.745	7.425
<i>Fruto de Scheelea liebmannii</i> (SEMILLA)	1.539	2.545	1.06	3.26

5.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS PROXIMAL REALIZADO AL FRUTO DE LA PALMA DE *Scheelea liebmannii*.

TABLA 5.3.

DETERMINACIÓN (% en peso)	BASE HUMEDA	BASE SECA	<i>Cocos nucifera</i> Seco (%) (REFERENCIA)
MATERIA SECA	93.3486	-	
HUMEDAD	6.6514	-	1.3-2.5
CENIZAS	1.8587	1.9911	2.7
GRASA CRUDA	61.2786	65.6449	68-72
PROTEINA CRUDA *	17.4352	18.6775	6-6.6
FIBRA CRUDA	12.4825	13.3719	4-6
CARBOHIDRATOS ASIMILABLES	0.2936	0.3145	18-20
CARBOHIDRATOS TOTALES**	12.7761	13.6865	22-26

* Se utilizó el factor de 5.3 para la determinación del contenido de proteína.

** No se toma en cuenta en la diferencia de 100 a fibra cruda para la realización del cálculo.

5.2.1 Discusión de resultados de los componentes principales de la muestra.

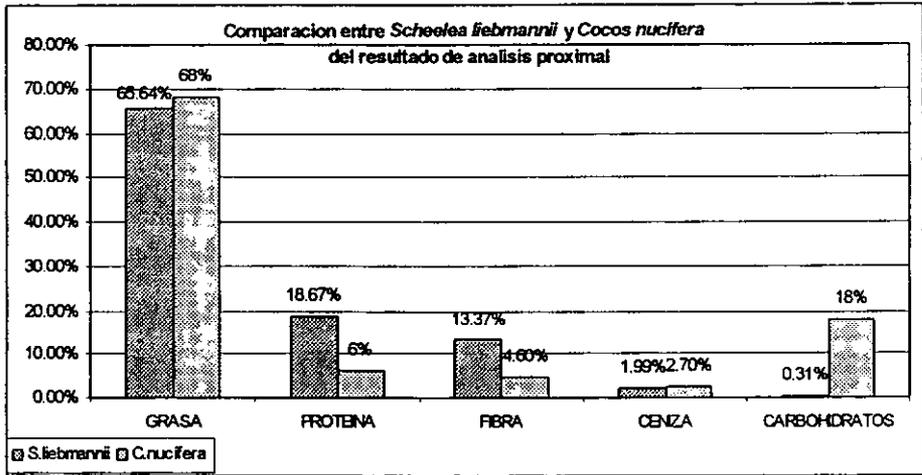
Con respecto a los datos obtenidos a partir del análisis proximal para el fruto de *Scheelea liebmannii*, y como se puede ver en la tabla 5.3, los componentes presentes en mayor cantidad en base seca son: grasa cruda con 65.6%, proteína con 18.67% y fibra cruda con 13.37%. En menor cantidad se encuentran las cenizas con un 1.99% y carbohidratos asimilables con 0.31%.

El alto porcentaje de materia seca (93.35 %) nos da la idea del poco contenido de humedad (6.65%) lo cual es una ventaja debido a que no es necesario un secado previo para la extracción del aceite, en el caso de ser extraído por el método de disolventes, también este bajo contenido de humedad ayuda a no tener problemas de contaminación microbiana, en el caso de que el fruto se dejara secar al rayo del sol como se hace con la copra de *Cocos nucifera*, este secado de la copra se hace a nivel industrial ya que la humedad de esta es muy alta (52 a 53 %) con respecto al peso total del fruto.

Se sabe que la composición de la copra de *Cocos nucifera* aun después de un secado se tiene una humedad del 1.3-2.5% y se concentran sus valores de fibra cruda de 4-6%, carbohidratos 18-20%, proteína de 6-6.6% y grasa de 68-72% y aproximadamente 2.7% de cenizas,⁵⁵. comparando estos datos con los resultados obtenidos de la semilla de *Scheelea liebmannii*, esta última contiene mayor contenido de fibra y proteína,

con respecto al valor de grasa cruda es muy parecido al valor reportado para el coco comercial.

Gráfica 5.1



Por lo cual se puede considerar al fruto de *Scheelea liebmannii* como fuente de grasa y proteína; siéndole así que en este trabajo, se realizó la caracterización de la grasa para identificación y calidad de la misma y a la proteína cruda se le realizó un estudio de aminoácidos. La fibra cruda también representa una cantidad considerable en el análisis proximal, sin embargo no se hizo un estudio profundo para esta, pudiendo ser estudiada más adelante y con detalle en futuros trabajos.

5.3 RESULTADOS DE LOS TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Se extrajo el aceite de la semilla de *Scheelea liebmanni* por tres métodos diferentes, los cuales fueron: el método por prensado, enzimático y por disolventes siendo este último a las mismas condiciones en que se realizó en el análisis proximal cuando se determinó grasa cruda, por lo tanto, en relación a la grasa que se cuantificó en el análisis proximal se obtuvo el 96.83% de grasa cruda por el método de disolventes, 42.84% por el método de prensado y 15.38% por el método enzimático. Por lo tanto el método de mayor eficiencia de extracción de aceite es por disolventes, lo cual representaría un 100% de eficiencia y por consiguiente se tendría un 44.24% de eficiencia por el método de prensado y 15.88% por el método enzimático, siendo este último el de menor eficiencia, y por lo cual no se considera un buen método para la extracción del aceite, sabiendo que el aceite es el componente mayoritario del fruto y se puede obtener un porcentaje mucho mayor con los otros dos métodos.

TABLA 5.4. Eficiencia de los métodos de extracción.

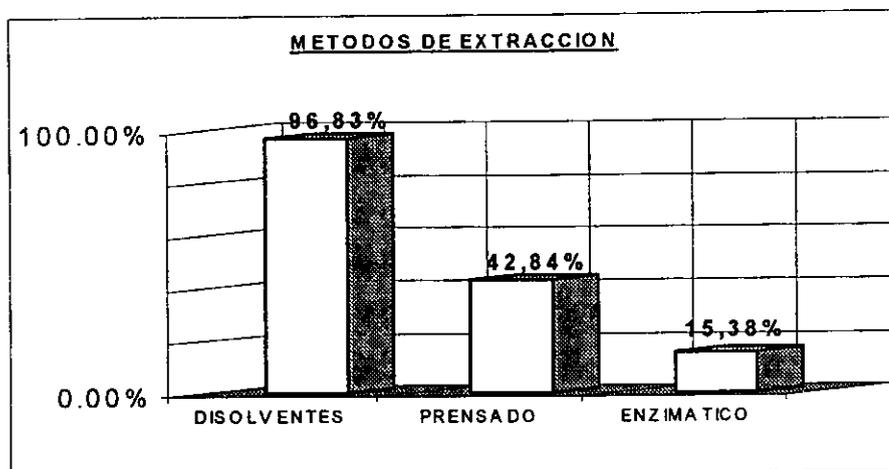
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	% DE EFICIENCIA
<i>Disolventes</i> *	100.00
<i>Prensado</i> **	44.24
<i>Enzimático</i> ***	15.88

* Se utilizó Eter etílico R.A.

** Se utilizó una prensa hidráulica con una presión de 10 Ton. durante 5 min.

*** Se utilizaron las enzimas: proteasa, pectinasa y α -amilasa.

Gráfica 5.2



Una alternativa para obtener un mayor rendimiento de extracción del aceite es hacer una combinación de los métodos de prensado y disolventes, obteniéndose como producto final un aceite que puede tener una buena calidad.

5.4 FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICION Y CALIDAD PARA EL ACEITE DE COCO COMESTIBLE

Para la caracterización del aceite del fruto de la palma de *Scheelea liebmanni* extraído por los métodos de prensado, enzimático y por disolventes, los resultados se compararon con la Norma Mundial del Codex Alimentario y la Norma Oficial Mexicana para el aceite de coco comercial (*Cocos nucifera*), para cada una de sus determinaciones fisicoquímicas y en la identificación por cromatografía de gases; esto se realizó con el fin de tener una referencia con alguna especie de fruto de palma que ya esté establecida comercialmente y esté debidamente legislada.

Es necesario aclarar que los resultados encontrados en el análisis fisicoquímico para *Scheelea liebmannii* no son los mismos que los datos reportados para el coco comercial, ya que se tratan de dos especies totalmente diferentes y que el aceite de *Scheelea liebmannii* es un aceite que no ha recibido ningún tratamiento de refinación a diferencia de las especificaciones reportadas para el aceite de *Cocos nucifera* sin embargo algunos valores encontrados para el aceite de *Scheelea* son parecidos y pueden entrar en los intervalos de las especificaciones.

Se hizo una revisión a las especificaciones que menciona el Codex Alimentario y la Norma Oficial Mexicana, en las cuales se encontraron algunos datos que no concuerdan entre sí, en la tabla 5.5 se pueden observar y comparar las especificaciones de ambas normas oficiales.

TABLA 5.5 Especificaciones legislativas para el aceite de *Cocos nucifera*

ESPECIFICACIONES	CODEX ALIMENTARIO	NOM-F-14-1985 (para aceite refinado)
Densidad relativa 40°C/20°C	0.908-0.921	
Peso Especifico 25/25°C		0.917-0.919
Indice de Refracción	1.448-1.450 (n_D40°C)	1.448-1.450 (25°C)
Indice de Saponificación (mg KOH/g de aceite)	248-265	251-264
Materia Insaponificable g/Kg	No más de 15	Máximo 10
Indice de Yodo (Wijs) (gr de yodo/gr de aceite)	6-11	7.5-13

Indice de Reichert-Meissl	6-8.5	Máximo 0.05%
Indice de Polenske	13-18	Máximo 0.05%
Color	Característico del producto designado	%R 20^a
Olor y sabor	Característico del producto exento de olores y sabores extraños o rancios	
Indice de Peróxidos Meq de O ₂ en forma de peróxido/Kg de aceite	No más de 10	No más de 2
Indice de Acidez	No más de 4 mg KOH/g.	Máximo 0.05% ó 0.0995 mg KOH / g.
Punto de Solidificación		Mín 20°C – Máx 24°C
Rancidez		Negativo.
Prueba Fría (0°C)		Sólido a temp. ambiente
Prueba Caliente		Sin olores desagradables a 160°C.

La Norma del Codex se aplica al aceite de coco comestible, pero no aclara de que se trate de un aceite refinado como lo menciona la Norma Oficial Mexicana.

La especificación para densidad relativa del Codex Alimentario lo reporta a 40°C, por medio de la bibliografía se sabe que esta temperatura es la adecuada para reportar la densidad de una grasa que a menos de 25°C o a temperatura ambiente es sólida; la Norma Oficial Mexicana reporta a la densidad como peso específico a 25°C y no a 40°C.

Para el Índice de refracción los valores son los mismos a pesar de que para el Codex la lectura de temperatura es para grasas a 40°C y la Norma Mexicana la reporta a 25°C que es una lectura para aceite.

En el Codex Alimentario el intervalo del índice de saponificación es más amplio que en la especificación de la Norma Oficial Mexicana, los valores se pueden observar en la tabla 5.5. y están dadas en las mismas unidades.

En la especificación de materia insaponificable el Codex acepta como máximo 15 g / Kg y la Norma Oficial acepta como máximo 10 g /Kg, por lo cual el Codex es más amplio en cuanto a su rango para materia insaponificable.

En el índice de yodo los valores varían muy poco ya que en este caso el intervalo más amplio es el de la Norma Oficial Mexicana, ya que el Codex Alimentario acepta como máximo 11 meq de O₂ en forma de peróxido /Kg de aceite y la especificación de la Norma Mexicana se amplía hasta 13 meq de O₂ en forma de peróxido /Kg de aceite, sin embargo el índice de yodo de un aceite permanece casi constante y para el caso del aceite del coco es de 7 a 10 meq de O₂ en forma de peróxido /Kg de aceite por lo cual este resultado entra dentro de los dos intervalos oficiales.

Con respecto a las especificaciones para el índice de Reichert-Meissl el Codex Alimentario no reporta unidades, sin embargo por definición este índice expresa los mililitros de hidróxido de sodio 0.1N necesarios para la neutralización de los ácidos grasos volátiles que son solubles en agua provenientes de 5 g de muestra y pueden ser de 6 a 11. La Norma Oficial ofrece un valor muy pequeño expresado en porciento ya que acepta como máximo el 0.05%. En el mismo caso se presenta para el índice de Polenske, el rango que propone es de 13 a 18 y por definición este índice también

expresa los mililitros de hidróxido de sodio 0.1N necesarios para neutralizar los ácidos grasos volátiles insolubles en agua, este valor es más amplio, tal vez por que se encuentra en mayor cantidad estos ácidos que en la determinación anterior. La Norma Oficial Mexicana reporta como máximo el 0.05%, lo cual vuelve a ser un valor muy pequeño y no toma en cuenta la diferencia cuantitativa entre los ácidos grasos volátiles solubles e insolubles en agua.

Para la técnica de color el Codex no es tan rígido y solo expresa que sea el característico del producto designado, en cambio la Norma Oficial Mexicana es más estricta y pide la lectura %R 20A de la escala de Lovibond.

El olor y el sabor se miden por percepción y ambas normas especifican que sean los característicos al aceite de coco exentos de olores y sabores extraños.

El Codex Alimentario acepta como máximo de índice de peróxidos 10 ppm, mientras que la Norma Mexicana no acepta más de 2 ppm. El Codex Alimentario reporta para índice de peróxido en unidades de concentración de miliequivalentes de oxígeno en forma de peróxido por Kg de aceite.

El índice de acidez lo reporta el Codex como aceite virgen y acepta un máximo de 4 mg de hidróxido de potasio por gramo de muestra, a diferencia de la Norma Oficial Mexicana que acepta como máximo 0.05% como ácido oleico, siendo que este tipo de aceite se reporta en por ciento de ácido láurico, y el 0.05% de ácido oleico equivale a 0.0995 mg de hidróxido de potasio por gramo de muestra.

Las pruebas de punto de solidificación, rancidez, prueba fría y prueba caliente no las reporta el Codex Alimentario, únicamente la Norma Oficial, pero en ninguno de los casos son valores que se salgan de la realidad como para tener otra referencia.

5.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO AL ACEITE EXTRAÍDO DEL FRUTO DE *Scheelea liebmannii*.

Como anteriormente ya se mencionó, las pruebas físicoquímicas realizadas al aceite extraído del fruto de *Scheelea liebmannii*, fueron las usuales durante un análisis de rutina para un aceite al que se desea identificar y conocer su calidad. Como apoyo para tal criterio, contamos con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana y el Codex Alimentario.

El resultado integral del análisis físicoquímico que se realizó al aceite de *Scheelea liebmannii* se resume en la siguiente tabla:

TABLA 5.6 Análisis físicoquímico de los tres métodos de extracción

ESPECIFICACIONES	Disolventes	Prensa	Enzimático
Densidad relativa 40°C/20°C	0.9134	0.9167	0.9176
Peso Específico 25/25°C	0.9102	0.9135	0.9144
Índice de Refracción (n _D 40°C)	1.4550	1.4560	1.4540
Índice de Saponificación (mg KOH/g de aceite)	251.29	251.09	251.06
Materia Insaponificable g/Kg	3.588	3.374	0.311
Índice de Yodo (Wijs)	6.9166	6.9319	6.9312
Índice de Reichert-Meissl	4.1433	4.0333	5.2066
Índice de Polenske	7.1333	4.9666	7.400

Color	El color del aceite es amarillo claro transparente característico del aceite.		
Olor y sabor	El olor y sabor del aceite fue el característico del producto exento de olores y sabores extraños		
Indice de Peróxidos	4.9545	4.9909	3.5301
Indice de Acidez mgKOH/g	1.2647	1.7388	0.5527
Indice de Acidez %	0.451×10^{-3}	0.6199×10^{-3}	0.1970×10^{-3}
Punto de Solidificación T°C	20-24	20-26	20-24
Rancidez	NEGATIVO EN TODOS LOS CASOS		
Prueba Fría (0°C)	SOLIDO A TEMPERATURA AMBIENTE		
Prueba Caliente	SIN OLORES DESAGRADABLES MINIMO A 160°C.		

5.5.1. Discusión de resultados:

Densidad

TABLA 5.7 Resultados de densidad para los tres métodos de extracción.

	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Densidad a 40°C	0.9134	0.9167	0.9176	0.908- 0.921	0.917- 0.919

Para aceites y grasas se expresa como gramos por mililitro; todas las determinaciones se hicieron a 25°C. se debe de tener en cuenta que el aceite del fruto de *Scheelea liebmannii* a temperatura ambiente es sólido y no líquido por lo cual se considera como una grasa, sin embargo se le ha dado el nombre de aceite por la comparación que se le ha hecho con el aceite de

Cocos nucifera. El Codex Alimentario reporta a este valor a 40°C y la Norma Oficial Mexicana a una temperatura de 25°C, que es la usual para un aceite, de donde se puede observar que los valores experimentales encontrados entran preferencialmente en el intervalo para densidad que propone el Codex Alimentario, sin presentarse diferencias importantes por el método de extracción.

Indice de refracción:

TABLA 5.8. Resultados de Índice de Refracción para los tres métodos de extracción.

	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
I. de refracción (nD 40°C)	1.4550	1.4560	1.4540	1.448- 1.450	1.448- 1.450

Las condiciones de lectura fueron a 40°C

El índice de refracción se reporta también a 40°C, por la misma razón que para densidad, ya que a temperatura ambiente el aceite extraído del fruto de *Scheelea liebmannii* es sólido. El Codex Alimentario también reporta a 40°C el índice de refracción para el aceite de coco comercial y la Norma Mexicana a 25°C, sin embargo para ambas normas la especificación de lectura es la misma aunque a diferente temperatura, los resultados de índice de refracción para el aceite de *Scheelea liebmannii* obtenido por los tres métodos diferentes, pueden entrar dentro de los dos rangos permitidos por las normas oficiales, sin encontrar diferencias importantes.

Se puede observar en los resultados obtenidos para los diferentes métodos de extracción comparados con las normas oficiales, sin embargo los

valores que reporta la Norma Oficial Mexicana para densidad e índice de refracción, no son del todo considerados debido a que utiliza la temperatura de 25°C en cada determinación. Observando en la misma gráfica las pruebas de densidad e índice de refracción, estas pruebas también ayudan a la identificación del aceite ya que la densidad varía muy poco entre los tres métodos y para el índice de refracción es casi insignificante la diferencia que hay entre ellos. Estas tres pruebas se reportan a una temperatura de 40°C.

Punto de solidificación

TABLA 5.9 Resultados de Punto de fusión de los tres métodos de extracción

	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Punto de fusión	20 a 24	20 a 26	20 a 24	-----	20 a 24

CODEX no reporta punto de fusión para aceite de Cocos nucifera.

Para el aceite de *Scheelea liebmanni* se puede observar en la tabla 5.9 que no tiene un punto de fusión definido, sino que existe un intervalo de temperatura en el que funda cada uno de los aceites extraídos por los tres métodos diferentes. La temperatura inicial del intervalo corresponde al ablandamiento del aceite y la temperatura final del intervalo corresponde al punto en el que el aceite es cristalino. No obstante que el punto de fusión sea un intervalo y no una temperatura puntual, el dato permite diferenciar este aceite de otros y darnos una idea de la pureza del aceite, si se compara el intervalo de fusión para el aceite obtenido por prensado (20 a 26°C), se ve que este último es mayor, esto pudo deberse a contaminaciones que hubiera arrastrado con el aceite durante el prensado.

Se cuenta además con la información de una curva de sólidos a diferentes temperaturas que es llamada "contenido de sólidos" (por medio del aparato de Rancimat) de donde se obtiene la siguiente información: los datos de la tabla 5.10 indican el porcentaje de sólidos presentes en el aceite de *Scheelea liebmannii* extraído por el método de disolventes a una temperatura dada, lo que nos da una idea de la consistencia del aceite; así a 30°C solo el 0.2% es sólido, es decir, el aceite es completamente líquido a esta temperatura, lo que lo hace ideal para usarse como aceite líquido en cualquier aplicación, que implique un tiempo largo y a una temperatura alta, de 100°C, sin que presente rancidez aun siendo este un aceite que no ha sido refinado.

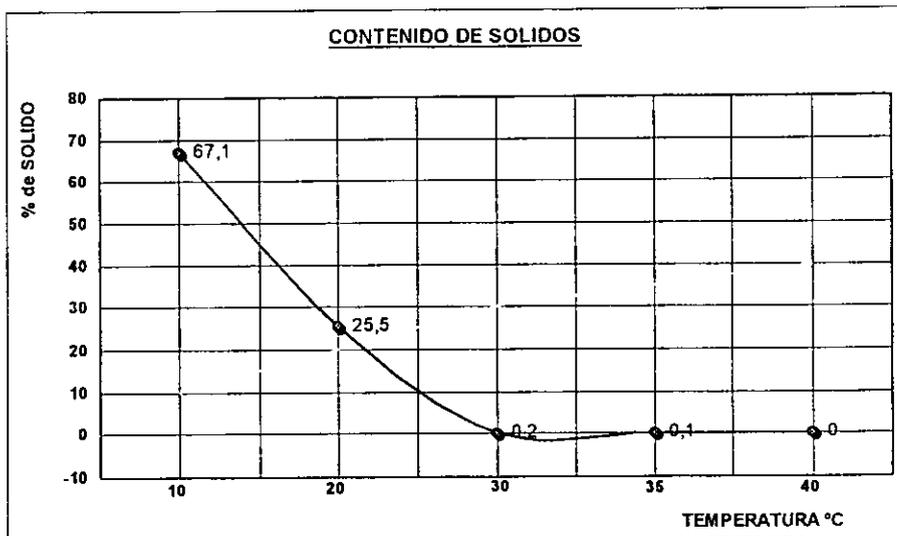
TABLA 5.10

°C	%
10	67.1
20	25.5
30	0.2
35	0.1
40	0.0

Se puede observar en la gráfica 5.4 los datos reportados en la tabla anterior.

El aceite de *Scheelea liebmannii* tiene una estabilidad de 64 horas a 100°C siendo de buena estabilidad a la oxidación, superando a algunos aceites comerciales aun sin haber recibido un tratamiento de refinación. Es necesario explicar que estos resultados se obtuvieron de "Aceites y grasas hidrogenadas Santa Lucía de Morelia Micoacán".

Gráfica 5.3



Índice de saponificación.

TABLA 5.11 Resultados de índice de saponificación

	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Índice de saponificación MgKOH/ g	251.29	251.09	251.06	248-265	251-264

Durante este método se lleva a cabo una saponificación de los triglicéridos con hidróxido de potasio y se cuantifica el álcali utilizado.

Para el aceite de *Scheelea liebmanni* se obtuvieron índices de saponificación parecidos entre sí para los aceite obtenidos por los tres métodos y dentro de los intervalos que especifican las normas oficiales. En algunas ocasiones el índice de saponificación es parecido entre aceites diferentes por lo cual este método en general no es del todo confiable para

identificar un aceite. Sin embargo, nos da una idea del promedio de las masas moleculares de los ácidos grasos del aceite, como para el caso del aceite de coco que su índice de saponificación por lo general es de 255.

En los tres resultados de índice de saponificación para los diferentes métodos de extracción entran dentro de los rangos que especifican las normas oficiales siendo para el Codex Alimentario de 248-265 mg de KOH/g de aceite y para la Norma Oficial Mexicana de 251-264 mg de KOH/g de aceite.

COMPARACION DEL INDICE DE SAPONIFICACION OBTENIDO PARA EL ACEITE DE *Scheelea liebmanni* OBTENIDO POR EL METODO DE DISOLVENTES ENTRE OTROS INDICES DE SAPONIFICACION DE DIFERENTES ACEITES.

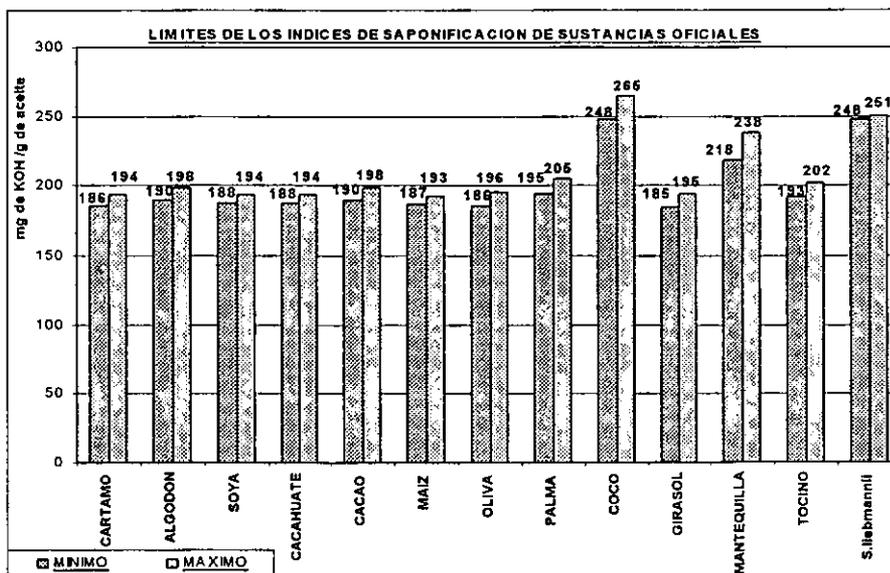
El índice de saponificación es el método más usado para detectar la presencia de coco, que generalmente tiene un índice de 255, la mantequilla tiene un índice de 225, ambos aceites tienen una elevada proporción de ácidos grasos de bajo peso molecular. La mayoría de los otros aceites tienen un índice de saponificación bajo y muy parecido entre ellos de tal manera que no permiten su pronta identificación, sobre todo cuando existen mezclas y no hay pureza total en un aceite. El parecido entre los índices de saponificación se puede apreciar en la gráfica 5.4 y ver los valores en la tabla 5.12.

TABLA 5.12

INDICE DE SAPONIFICACION	MINIMO	MAXIMO
CARTAMO	186	194
ALGODON	190	198
SOYA	188	194

CACAHUATE	188	194
CACAO	190	198
MAIZ	187	193
OLIVA	186	196
PALMA	195	205
COCO	248	265
GIRASOL	185	195
MANTEQUILLA	218	238
TOCINO	193	202
<i>S. liebmannii</i>	248	251

Gráfica 5.4



Con estos datos se pretende representar el parecido que existe entre el aceite de coco comercial y el aceite de *Scheelea liebmannii* y como

sobresalen estos valores de índice de saponificación entre otros aceites comerciales, por lo cual este método puede ayudar para relacionar que entre ambas especies existen similitudes en cuanto a su composición química, al menos en relación al peso molecular promedio de los ácidos grasos.

Materia insaponificable

TABLA 5.13 Resultados de materia insaponificable

	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Materia insaponificable g/Kg	3.59	3.37	0.31	No más de 15	Máx. 10

La materia insaponificable es el material sólido que queda después de la saponificación del aceite; para el aceite de *Scheelea liebmannii* se encontró menos de 10 gramos por kilogramo, valor que concuerda con la Norma Oficial Mexicana para aceite de coco refinado y menos de 15 gramos por kilogramo como lo expresa el Codex Alimentario.

En nuestro caso por ser el aceite del fruto de *Scheelea liebmannii* un aceite virgen, los valores de materia insaponificable son muy bajos, pueden indicar que se trata de un aceite con una calidad de pureza normal, siendo que en nuestro caso no existe adulteración de algún otro aceite.

Aunque existe variación entre sí de las tres formas de extracción del aceite del fruto de *Scheelea liebmannii*, ninguno sobrepasa a los límites permitidos establecidos para este técnica pero el aceite obtenido por el método enzimático es aun más bajo, indicando que el proceso es aún más específico para separar triglicéridos.

Índice de yodo

El índice de yodo es un método que nos da idea del grado de insaturación en una grasa pero no especifica distribución y localización de las dobles ligaduras sin embargo es un dato constante para la identificación de un aceite en un mezcla o para diferenciar entre un aceite y otro.

TABLA 5.14 Resultados de índice de iodo.

METODO	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMA-TICO	CODEX g/100g	NOM g/100g
Índice de yodo	6.9166	6.9319	6.9312	6-11	7.5-13

Este método permite obtener información acerca del grado de insaturación que existe en los ácidos grasos que forma el aceite de *Scheelea liebmannii*, se puede observar que en los tres métodos de extracción del aceite existe una similitud de índice de yodo. El índice encontrado para el aceite de *Scheelea liebmannii* queda dentro de las especificaciones permitidas para el aceite de cocos nucífera del Codex y es menor para el intervalo especificado para la Norma Oficial Mexicana. Se sabe que el aceite de coco, aun después de refinado, es rico en ácidos grasos saturados de bajo peso molecular y contiene pocos ácidos grasos insaturados. En el caso del aceite del fruto de *Scheelea liebmannii* no contamos con una información tan específica, pero su bajo índice de iodo nos permite pensar que también se trata de un aceite rico en ácidos grasos saturados de bajo peso molecular mezclados con ácidos grasos insaturados de cadena larga, además se sabe que tiene un alto índice de saponificación, lo que nos indica también que se tienen mayor cantidad de ácidos grasos de bajo peso, por lo tanto hasta

ahora sabemos que el aceite de *Scheelea liebmannii* tiene ácidos grasos de bajo peso molecular y que son saturados.

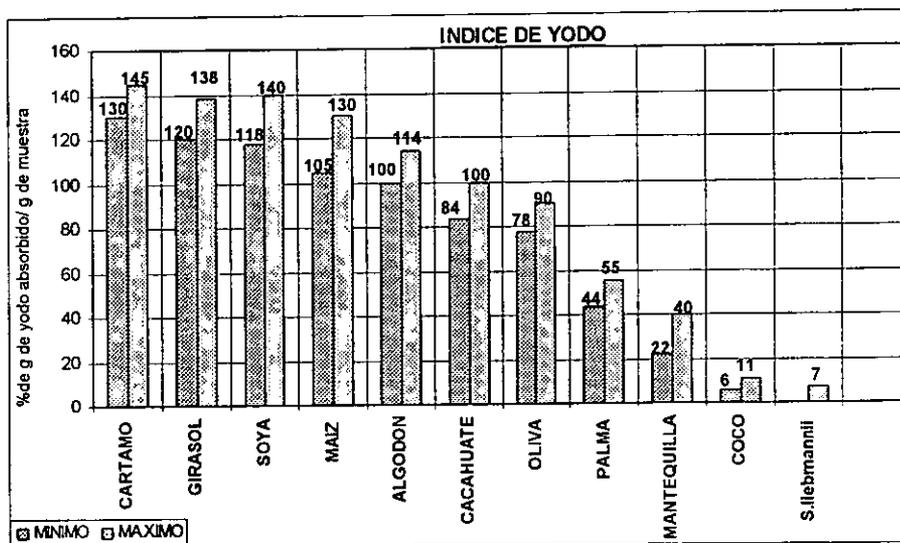
COMPARACION DEL INDICE DE YODO DEL ACEITE DE *Scheelea liebmannii* ENTRE OTROS INDICES DE YODO DE DIFERENTES ACEITES

En los datos para índice de yodo que aparecen en la tabla 5.15 se puede observar que el aceite de coco es el de menor valor debido a que este aceite es rico en ácidos grasos saturados con poca proporción de ácidos grasos insaturados, de donde se absorbe poca cantidad de yodo. Estas características lo diferencian de otros aceites de origen vegetal que son insaturados y sus índices de yodo son mucho más altos. Sin embargo, debido a que su grado de insaturación es bajo, el aceite de coco resiste mucho al enranciamiento y es poseedor de una buena estabilidad.

TABLA 5.15

INDICE DE YODO	MINIMO	MAXIMO
CARTAMO	130	145
GIRASOL	120	138
SOYA	118	140
MAIZ	105	130
ALGODON	100	114
CACAHUATE	84	100
OLIVA	78	90
PALMA	44	55
MANTEQUILLA	22	40
COCO	6	11
<i>S.liebmannii</i>		7

Gráfica 5.5



Indice de Reichert-Meissl y Polenske

Estos índices proporcionan información sobre la cantidad de ácidos grasos volátiles solubles e insolubles en agua. Específicamente el índice de Reichert-Meissl mide los ácidos butírico (C4:0) y caproico (C6:0) y el índice de Polenske mide la suma de los ácidos caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0).

TABLA 5.16 Resultados de índice de Reichert-Meissl

METODO	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Indice de Reichert-Meissl	4.1433	4.0333	5.2066	6-8.5	Max. 0.05%

TABLA 5.17 Resultados de índice de Polenske

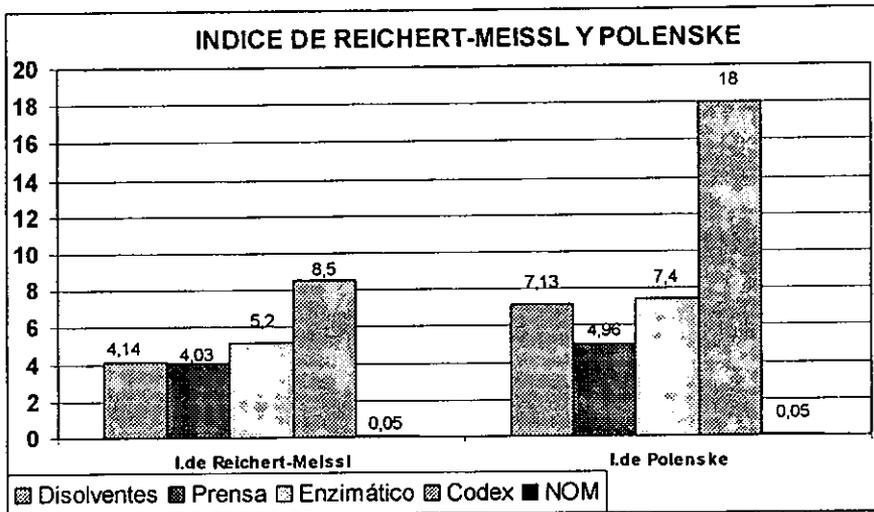
METODO	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Indice de Polenske	7.1333	4.9666	7.400	13-18	Max. 0.05%

Para el caso del aceite de *Scheelea liebmanni* extraído por los tres métodos, se encontró que no entran dentro del intervalo de especificación que indica el Codex Alimentario para el índice de Reichert-Meissl, que va de 6 a 8.5 y dividiendo los valores encontrados entre 100 como se supone que lo relaciona la Norma Oficial Mexicana no sobrepasan a la cantidad máxima permitida de 0.05%, lo cual nos da una idea con respecto a la poca cantidad encontrada se puede suponer que los ácidos grasos butírico y caproico están presentes en muy poca cantidad sí es que existen, es difícil interpretar los valores que indican las normas ya que el Codex expresa a estos valores como adimensionales y presenta valores para este tipo de ácidos grasos, sin embargo por bibliografía se sabe que en el aceite de coco el ácido graso más pequeño es el caprílico (C8:0) por lo cual se supone que sí en verdad se encuentra butírico y caproico es en condición de trazas. La Norma Oficial Mexicana reporta como máximo 0.05%, siendo éste valor una cantidad muy pequeña y no se sabe como esta expresado este porciento.

Para el índice de Polenske se encontró un valor mayor que para Reichert-Meissl en las tres muestras analizadas, saliéndose los valores del aceite de *Scheelea liebamnnii* extraídos por los tres métodos diferentes del intervalo que especifica el Codex Alimentario (13-18), siendo estos valores experimentales de menor cantidad al que indica este intervalo. Nuevamente, dividiendo los valores encontrados entre cien partes, para poder interpretar a la Norma Oficial Mexicana, resultan valores para el aceite extraído por

disolventes y por el método enzimático mayores de 0.05%, sin embargo estos valores en por ciento no marcan una diferencia considerable, tomando en cuenta que los tres métodos de extracción no superan estos límites, puede indicarnos que la presencia de caprílico y capríco no es muy alta, pero sí se encuentran presentes.

Gráfica 5.6



Color, olor y sabor

El resultado de color encontrado para el aceite de coco *Scheelea liebamnii* fue característico del producto, carente de colores extraños y partículas indeseables, en todos los casos se encontró un aceite amarillo claro transparente parecido al aceite de *Cocos nucifera*, que también es un aceite amarillo tenue claro transparente.

En los resultados reportados para el aceite de coco de *Scheelea liebmannii*, se encontró que en todos los casos el olor y sabor fueron los característicos del producto designado y exento de olores extraños o rancios

Los resultados de estas técnicas se hicieron por percepción y no por ningún método de instrumentación, como lo marca el Codex Alimentario.

Índice de peróxido y rancidez

TABLA 5.18 Resultados de índice de peróxidos.

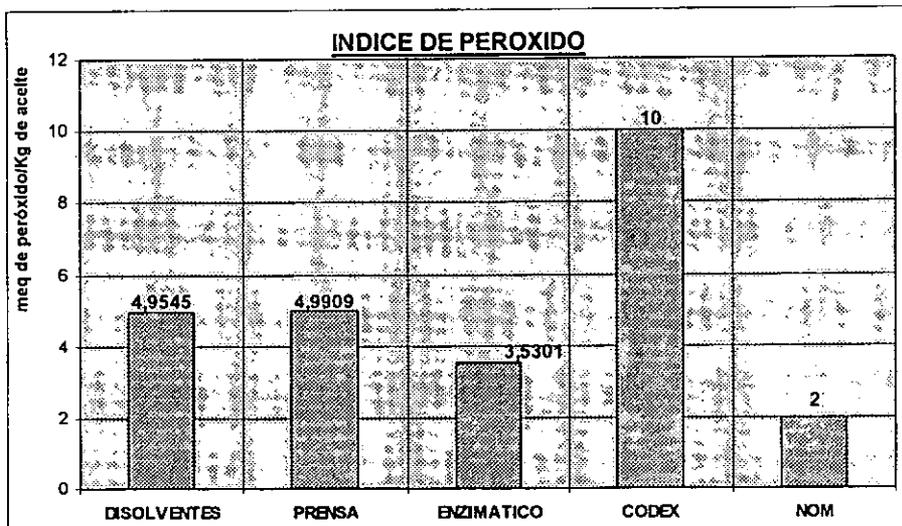
METODO	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Índice de Peróxidos	4.9545	4.9909	3.5301	Max. 10	Max 2

El cálculo de índice de peróxidos se expresa en miliequivalentes de peróxido contenidos en un kilogramo de grasa o aceite, en todos los casos de la tabla 5.18.

Para las características de calidad del aceite de *Scheelea liebmannii* de los tres métodos de extracción, se comparó el índice de peróxidos con la norma mundial del Codex Alimentario y la Norma Oficial Mexicana para el aceite de coco comercial (*Cocos nucífera*).

Como se puede observar en la gráfica 5.7, el índice de peróxidos de los aceites extraídos por los tres métodos de obtención, en ningún caso sobrepasó los límites permitidos de la norma del Codex Alimentario, aunque el aceite extraído por el método enzimático resultó de menor cantidad de peróxidos que el aceite obtenido por los otros dos métodos, esto pudo deberse a que el aceite obtenido por enzimas tiene menor interacción con el oxígeno, ya que este se obtiene en un medio acuoso.

Gráfica 5.7



Por definición el índice de peróxidos es una medida de los peróxidos contenidos en el aceite que pueden formarse durante el almacenamiento. En el caso del aceite de *Scheelea liebmanni* esta prueba se realizó casi al final de este trabajo para dar oportunidad al aceite de tener un tiempo dado de almacenamiento. No obstante que el aceite de *Scheelea liebmanni* no recibió tratamiento de refinación para ninguno de los tres métodos de extracción, los valores de índice de peróxido determinados quedarán dentro de los valores del Codex, aunque fueron mayores a las especificaciones de la Norma Mexicana debido, tal vez, a que estos valores se refieren a un aceite de coco refinado. La presencia de antioxidantes naturales como los tocoferoles y los tocotrienoles en el aceite probablemente contribuyen a la estabilidad del aceite virgen, en este caso. El índice de peróxidos está ligada a la prueba cualitativa que se hace para determinar rancidez, debido a que sí hay indicios

de altos peróxidos, estos también se verían reflejados en la rancidez dando una prueba positiva y dando a conocer que ya se han iniciado reacciones de una rancidez oxidativa.

TABLA 5.19 Resultados de índice de rancidez

RANCIDEZ	PRUEBA
DISOLVENTES	NEGATIVO
PRENSA	NEGATIVO
ENZIMATICO	NEGATIVO

Índice de áidez

En el aceite de coco de *Scheelea liebmanni*, el porcentaje de ácidos grasos libres, se expresa como ácido láurico, sin embargo, la áidez de los aceites suele expresarse en términos de su índice de áidez, este se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar un gramo de aceite.

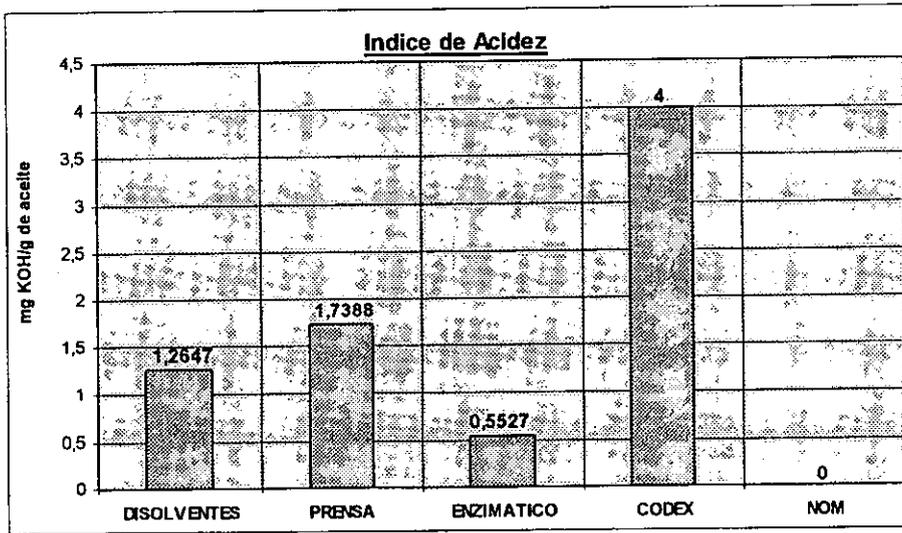
TABLA 5.20 Resultados de índice de áidez

METODO	DISOLVENTES	PRENSA	ENZIMATICO	CODEX	NOM
Índice de Acidez	1.2647	1.7388	0.5527	Max. 4	Max. 0.0995

El Codex reporta al índice de áidez como aceite virgen en mg de KOH/g de aceite, la NOM lo reporta para aceite de coco refinado en las mismas unidades.

El índice de áidez es uno de los métodos óptimos para determinar la calidad de un aceite, debido a que indica la cantidad de ácidos libres presentes en el aceite a consecuencia de que pudiera haber ocurrido una reacción de hidrólisis de los glicéridos, los tres aceites a prueba presentan un grado de índice de áidez bajo aun después de un tiempo de almacenados.

Gráfica 5.8



En la gráfica se puede observar que el aceite que presentó mayor índice de acidez fue el obtenido por prensado (1.7388 mg KOH/g de aceite), esto pudo deberse a que en este método el aceite está más expuesto a la acción del aire y al calor durante el prensado, además se pueden arrastrar materiales sólidos que puedan contaminar a las tortas y en consecuencia al aceite que se está extrayendo, dando lugar a una hidrólisis lenta, el aceite extraído por el método enzimático presenta un índice de acidez tres veces menor, lo que representa que se da una hidrólisis más lenta que en los otros dos métodos, debido a que se obtiene en un medio acuoso y el aceite liberado tiene menor susceptibilidad a una rancidez hidrolítica. Sin embargo ninguno de los tres aceites obtenidos por métodos diferentes presentó un alto índice de acidez que indicaran que estos estuvieran susceptibles a la rancidez.

5.6 RESULTADOS DE IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE ACIDOS GRASOS EN EL ACEITE DEL FRUTO DE LA PALMA *Scheelea liebmannii* POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

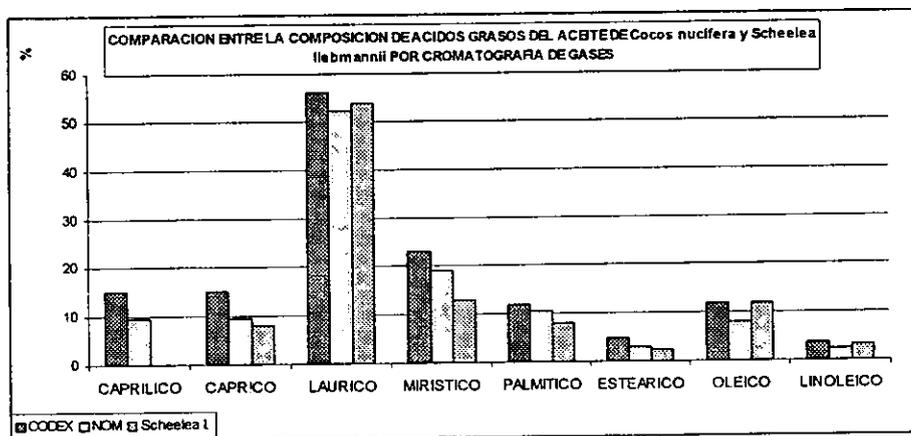
Por medio de la técnica de cromatografía de gases se pudo ampliar y completar la información que se obtuvo mediante el análisis fisicoquímico realizado anteriormente al aceite de *Scheelea liebmannii*, es decir, para detallar la caracterización del aceite, se obtuvo mediante la cromatografía de gases la identificación de los ácidos grasos saturados e insaturados presentes en el aceite extraído por los tres métodos diferentes, esto se logró con la ayuda de la presencia de estándares. También se tiene información de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases del aceite de coco comercial que está validada por las normas oficiales del Codex Alimentario y la Norma Oficial Mexicana, por lo cual estos valores sirven de referencia para interpretar los resultados obtenidos para el aceite de *Scheelea liebmannii*, a continuación se presentan los valores de ácidos grasos del coco comercial y con esto se podrá observar las diferencias y similitudes que existen entre la composición del aceite de *Cocos nucifera* y *Scheelea liebmannii*.

TABLA 5.21 COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS (%) PRESENTES EN EL ACEITE DE COCO (Cocos nucifera) Y EN EL ACEITE DEL FRUTO DE Scheelea liebmannii BASADAS EN CROMATOGRAFIA DE GASES.

NOMBRE TRIVIAL	NOMBRE CIENTIFICO	A.G	ACEITE DE Cocos nucifera		ACEITE DE Scheelea liebmannii		
			CODEX ALIMENTARIO	NOM	DISOLVENTES	PRESA	ENZIMATICO
Caprílico	Octanoico	C8:0	3.4-15	5.5-9.5	-----	-----	-----
Capríco	Decanoico	C10:0	3.2-15	4.5-9.5	6-8.5	7-8	7-9
Láurico	Dodecanoico	C12:0	41-56	44-52	53-58	52-54	53-58
Mirístico	Tetradecanoico	C14:0	13-23	13-19	14-17	12-13	13-14
Palmitico	Hexadecanoico	C16:0	4.2-12	7.5-10.5	6-8.5	7-8	6-8
Estearico	Octadecanoico	C18:0	1.0-4.7	1.0-3.0	1.9-2.8	1.8-2.8	1-3
Oleico	Octadeca-9-enoico	C18:1	3.4-12	5-8	8-10	11-12	8-10
Linoleico	Octadec-9'12-dienoico	C18:2	0.9-3.7	1.5-2.5	2.2-2.6	2.6-3.6	2.6-3.2

En los resultados encontrados para el aceite de *Scheelea liebmannii* extraído por tres metodos diferentes y analizado cada uno por cromatografía de gases, se encontro una gran similitud en la composición de ácidos grasos presentes en cada aceite de muestra, encontrándose en mayor catidad el ácido laúrico de los saturados de cadena corta, sin encontrarse octanoico (caprílico) en ninguno de los tres casos y los demás ácidos grasos en una proporción parecida a la composición del aceite de *Cocos nucifera*, por lo cual el aceite de *Scheelea*, se considera como cualquiera del que se haya obtenido de los tres diferentes métodos de extracción. Como se puede comparar al observar la tabla 5.21, el aceite de coco comercial posee una cantidad de caprílico (C8:0), el cual no contiene el aceite de coco de *Scheelea liebmannii*, sin embargo los ambos aceites son ricos en laúrico, mirístico y existe una buena cantidad de palmítico, el aceite de *Scheelea liebmannii* posee una menor cantidad en capríco y estéarico a diferencia del aceite del coco comercial y en cuanto a los insaturados esta en mayor proporción el ácido oleico que el linoleico en el aceite de *Scheelea l*.

GRAFICA 5.9



ANALISIS INTEGRAL DEL ACEITE DEL FRUTO DE *Scheelea liebmanni*.

Todos los resultados de las pruebas fisicoquímicas reportados hasta este momento pueden ayudarnos a la identificación del aceite de *Scheelea liebmanni*, sin embargo por medio de la técnica de cromatografía de gases la caracterización del aceite puede ser más completa, ya que por medio de estándares se pudieron identificar y cuantificar los principales ácidos grasos en el aceite. Como se pudo observar en los resultados para índice de yodo, el aceite del fruto de *Scheelea liebmanni*, presentó un índice de bajo valor, con lo que se sospecha que están presentes ácidos grasos saturados de bajo peso molecular en este aceite y que seguramente se encuentra mezclado con ácidos grasos insaturados aunque estos sean en baja proporción de donde se absorbe poca cantidad de yodo en dicha determinación, sin embargo nuevamente analizando este resultado, se puede corroborar que este tipo de análisis fisicoquímico, permite darnos una idea de el grado de insaturación que posee una grasa o aceite, y como ya se aclaró en su momento, no ayuda este a la localización o a la distribución de las dobles ligaduras existentes en una molécula de ácido graso, para determinar la composición final de una grasa, sin embargo teniendo estos antecedentes y con los resultados del cromatograma, donde anteriormente se localizaron los picos de diferentes ácidos grasos de estándares, se puede corroborar que efectivamente se encuentra presente el ácido láurico, que es el que se encuentra en mayor proporción, de 53 a 56%, en segundo lugar se encuentra el ácido mirístico en una proporción de 13 hasta 15%, estos dos son los ácidos grasos más representativos de los ácidos saturados y en proporción con respecto al aceite total el tercer lugar lo ocupa el oleico de 9 a 12% siendo este el ácido graso más representativo de los insaturados. De los demás ácidos grasos, el palmítico y capríco ocuparían un cuarto lugar con una proporción de 7 a 8%, estéarico y

linoléico de 2 a 3%, siendo el linoleico el segundo insaturado encontrado en el aceite.

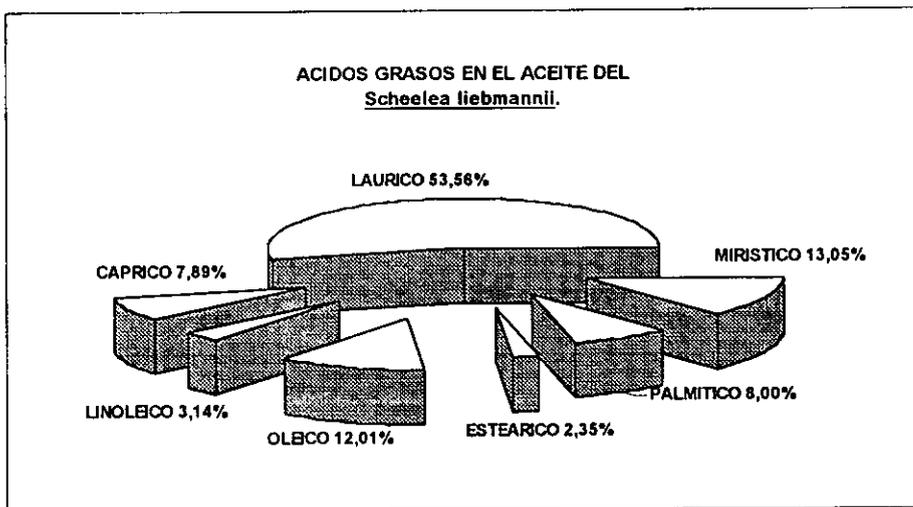
Como se puede observar, el aceite de *Scheelea liebmannii* es rico en ácidos grasos saturados, como son palmítico, estearico, caprico y especialmente en ácido laúrico y mirístico; también podemos observar que no existe caproico (C6:0) y caprílico (C8:0), en cantidad apreciable por lo cual sí es que existen son solo trazas de estos ácidos, sin embargo para asegurar que hay trazas, sería conveniente desarrollar otra técnica en cromatografía de gases donde se trate de encontrar si es que efectivamente caproico y caprílico se encuentran en cantidades mínimas de trazas además para completar los resultados de cromatografía de gases, durante el análisis fisicoquímico se desarrollarán los índices de Reichert-Meissl y Polenske, los cuales como ya se indico anteriormente, proporcionan información sobre la cantidad de ácidos grasos volátiles solubles e insolubles en agua respectivamente, obteniéndose en el índice de Reichert-Meissl valores menores de los que especifican las normas oficiales, por lo cual se deduce con este índice que la cantidad de butírico (C4:0) y caproico (C6:0), se encuentran en muy poca cantidad, lo cual se comprueba mediante la cromatografía, ya que estos ácidos no alcanzan a integrarse en los cromatogramas resultantes, por lo tanto se considera que sí es que se encuentran presentes en la muestra son en cantidades mínimas.

Para el caso de los ácidos grasos volátiles insolubles en agua, medidos en la determinación del índice de Polenske, se encontro para este, una cantidad un poco mayor que la permitida por el Codex Alimentario y por la Norma Oficial Mexicana, lo que podría significar la presencia de caprílico (C8:0) y/o de cáprico (C10:0) en el aceite de *Scheelea liebmannii* extraído por los tres métodos, lo cual se puede verificar mediante la identificación de los ácidos grasos por cromatografía. Sin embargo, en ningún caso se llegó a integrar algún pico

perteneciente al caprílico, por lo cual se consideró que esta muestra no posee el ácido graso C8:0, sin embargo, si se puede observar que se encuentra en una cantidad de consideración el cáprico, ya que para este si aparece un pico de integración para los tres aceites. Así, el índice de Polenske mide la suma de caprílico y cáprico y mediante la cromatografía se encontró que solo hay cáprico. Entonces se pueden relacionar ambos métodos ya que por Polenske se sabe que hay como mínimo un ácido graso volátil insoluble en agua y mediante la separación cromatográfica del aceite en sus ácidos grasos se puede encontrar cual de estos ácidos volátiles insolubles en agua estan presentes.

De los ácidos grasos insaturados solo se encontró ácido oleico principalmente y linoléico en muy baja concentración. Debido a esto el índice de yodo sea muy bajo en comparación con otros aceites de origen vegetal.

GRAFICA 5.10



ESTA TESIS NO PUEDE SAIR DE LA BIBLIOTECA

5.7 RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

El segundo componente principal que se encontró durante el análisis proximal en base seca fue la proteína cruda (19%), por lo cual se consideró importante conocer el perfil de aminoácidos de este macrocomponente. Para ello, se hizo el análisis al residuo de extracción del fruto de la palma de *Scheelea liebmannii*. En la tabla 5.22 se presentan los valores de aminoácidos esenciales, encontrándose que este fruto aporta el triptófano con 7.24 g/100g de proteína y además leucina, lisina y fenilalanina, con un aporte de 5.57, 5.22 y 5.05 g/100g de proteína, respectivamente.

TABLA 5.22. Perfil de aminoácidos.

AMINOACIDOS ESENCIALES	g/100g DE PROTEINA	AMINOACIDOS NO ESENCIALES	g/100g DE PROTEINA
VALINA	4.94	HISTIDINA	2.33
ISOLEUCINA	2.66	Ac.ASPARTICO	7.51
TREONINA	2.88	SERINA	3.85
TRIPTOFANO	7.24	Ac.GLUTAMICO	19.49
FENILALANINA	5.05	PROLINA	3.00
LEUCINA	5.57	GLICINA	3.65
LISINA	5.22	ALANINA	3.27
METIONINA	2.98	CISTINA	2.51
		TIROSINA	1.93
		ARGININA	11.03
TOTAL DE A.A.	36.54		58.57

Nota Aclaratoria: El estudio del Perfil de Aminoácidos se realizó en el Instituto Nacional De La Nutrición Salvador Zubiran.(INNSZ), con la autorización de la M.C. Josefina Morales de León, Jefe del Departamento de Ciencia y Tecnología de

los Alimentos y la participación de la Q.F.B. Silvia Ruiz Jimenéz, Coordinadora de Laboratorios de Alimentos.

El aporte total de aminoácidos esenciales encontrados en el residuo de extracción del fruto de *Scheelea liebmannii* fue de 38.42% con respecto al total de aminoácidos por cada cien gramos de proteína.

Para el perfil de aminoácidos no esenciales se encontró que los aminoácidos más representativos fueron: el ácido glutámico con 19.49 g/100 g de proteína, arginina con 11.03 y ácido aspártico con 7.51 g/100 g. Siendo el aporte total de aminoácidos no esenciales de 58.57 g/100g de proteína, representando esta cantidad al 61.58% con respecto al total de aminoácidos por cada cien gramos de proteína.

Teniendo en cuenta la consideración de la FAO/OMS y ONU (estas sugerencias son de 1985 y aun estan vigentes) para las necesidades de aminoácidos se han recopilado en la siguiente tabla algunos datos donde se muestra que las necesidades de aminoácidos esenciales disminuyen con la edad.

TABLA 5.23

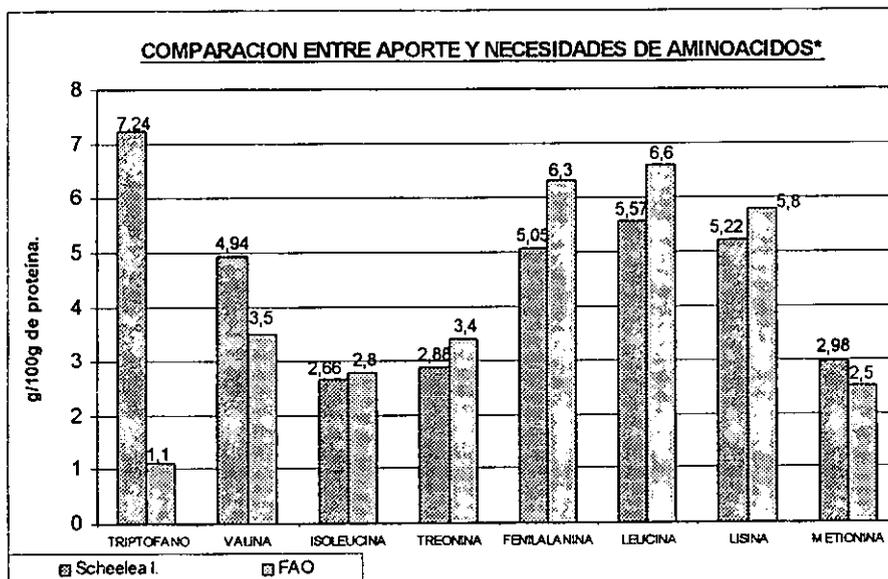
AMINOACIDO (g/100g de proteína)	Niños (de 2-5 años)	Adultos
Histidina	1.9	1.6
Isoleucina	2.8	1.3
Leucina	6.6	1.9
Lisina	5.8	1.6
Metionina/Cisteína	2.5	1.7
Fenilalanina/Tirosina	6.3	1.9
Treonina	3.4	0.9

Triptofano	1.1	0.5
Valina	3.5	1.3
TOTAL:	-----	-----
Incluyendo Histidina	33.9	12.7
Sin incluir Histidina	32.0	11.1

Tomando en cuenta que los aminoácidos esenciales disminuyen con la edad, se considerarán los requerimientos de la FAO para niños, para poder comparar entre estos datos y los resultados encontrados en el residuo de extracción. Esta comparación se hace más representativa con la gráfica 5.11.

*Los valores de la FAO considerados en la siguiente gráfica son para niños de 2-5 años.

GRAFICA 5.11



En el perfil de aminoácidos esenciales encontrados para *Scheelea liebmannii*, los más representativos fueron triptofano (7.24 g/100g de proteína), leucina (5.57 g/100g), lisina (5.22 g/100g) y fenilalanina (5.05 g/100g), además también se encontró durante este perfil que el aporte de valina (4.94 g/100g de proteína) y metionina (2.98 g/100g de proteína) son mayores a los recomendados por la FAO. treonina (2.88) e isoleucina (2.66) se encuentran en cantidades menores que las recomendaciones, sin embargo las diferencias no son considerables, por lo cual hasta este momento se considera al residuo de extracción del fruto de *Scheelea liebmannii* como un buen portador de aminoácidos esenciales.

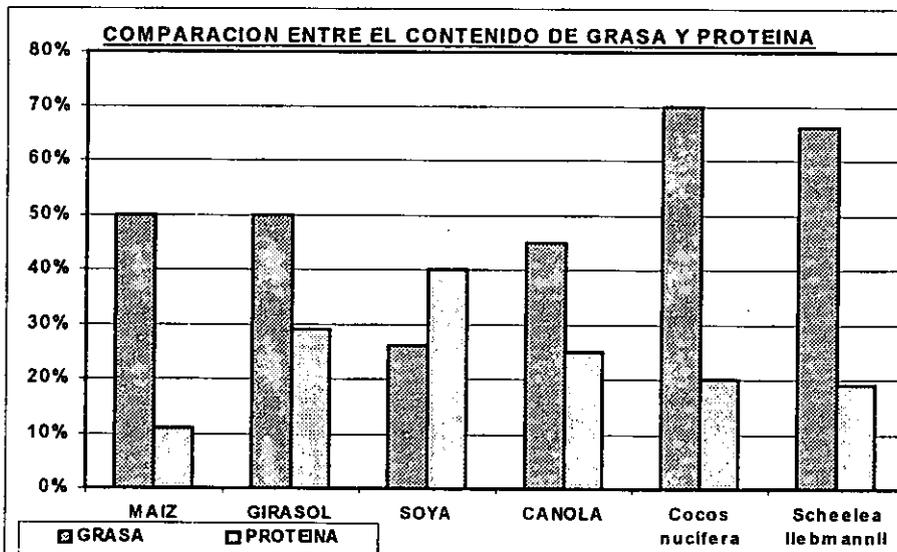
5.8 COMPARACION ENTRE SEMILLAS OLEAGINOSAS

Haciendo una comparación del rendimiento de aceite y proteína del fruto de *Scheelea liebmannii* con respecto a otras semillas oleaginosas que también sirven como fuentes de estos componentes se tiene la siguiente información:

TABLA 5.24

Semillas Oleaginosas	ACEITE (%)	PROTEINA (%)
MAIZ	50	11
GIRASOL	50	29
SOYA	26	40
CANOLA	45	25
Cocos nucifera	70	20
Scheelea liebmannii	66	19

GRAFICA 5.12



En la gráfica 5.12 se puede observar que *Scheelea liebmannii* es una semilla oleaginososa que contiene una cantidad alta de aceite y se puede considerar como una buena opción para la extracción de aceite, ya que con respecto a otras semillas oleaginosas utilizadas a nivel industrial presenta un valor alto para ser considerada como portadora de aceite, sobretodo que el aceite de *Scheelea liebmannii* es muy parecido al aceite de *Cocos nucifera*. Por otra parte, la cantidad de proteína de *Scheelea liebmannii* es muy similar a la econtrada en *Cocos nucifera* y ligeramente en mayor cantidad que la que se encuentra en la pasta de maíz; soya y girasol son semillas oleaginosas que ofrecen una mayor cantidad de proteína y que por esto son tan importantes a nivel industrial. Sin embargo, el aporte de proteína de *Scheelea liebmannii* puede considerarse como bueno y se puede considerar al residuo de extracción de este fruto como una fuente de proteína.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

1. Se realizó un análisis proximal al fruto de la palma *Scheelea liebmannii* encontrándose como componentes principales: 65% de grasa total, 18% de proteína y 13% de fibra, en base seca. Además, el bajo contenido que presenta de agua (6.65%) evita un proceso de secado previo para la extracción del aceite.
2. Después de la extracción del aceite, queda una pasta de la semilla de *Scheelea liebmannii* en la que la concentración de proteína aumenta hasta un 38%.
3. Se determinó el perfil de aminoácidos en la harina de coco desengrasada, encontrándose a esta como portadora de aminoácidos esenciales, especialmente de triptofano, valina y metionina.
4. El aceite extraído del fruto de la palma *Scheelea liebmannii*, presentó una buena calidad en diferentes pruebas fisicoquímicas y una estabilidad óptima al evaluarse sus características químicas y físicas, aún siendo este un aceite virgen.

5. Al determinar la composición del aceite del fruto de *Scheelea liebmannii*, se encontró que contiene del 54 al 56% de ácido laúrico, del 13 al 15% de ácido mirístico y de 7 a 8% de ácido cáprico; no se identificó la presencia de caprílico. Los ácidos insaturados presentes son muy pocos. El alto contenido en ácidos grasos saturados de peso molecular relativamente bajo dan lugar a las características físicas y químicas en el aceite.

6. Siendo el aceite uno de los componentes principales del fruto de *Scheelea liebmannii*, puede considerarse a este fruto como fuente para la extracción de aceite y, conteniendo este en mayor cantidad al ácido laúrico se puede utilizar en la industria alimentaria como es en coberturas para chocolates o en confitería, en la elaboración de margarinas en general, en mantecas para panificación, como sustituto de grasa en productos lácteos; también se puede emplear como aceite para freír debido a que es bajo en ácidos grasos insaturados y no tiende a oxidarse tan fácilmente. Además el aceite de *Scheelea liebmannii* puede ser utilizado en la fabricación de jabones como se ha utilizado el aceite de *Cocos nucifera*.

7. El segundo componente mayoritario en el fruto de la palma *Scheelea liebmanni* fue la proteína por lo cual puede considerarse como fuente de proteína y extraerse esta para ser utilizado como complemento alimentario debido al aporte de aminoácidos esenciales que esta proporciona.

8. La palma de *Scheelea liebmanni* es resistente al Amarillamiento Letal lo cual puede ser importante para aumentar su nivel de producción ya que hasta ahora es una especie silvestre no cultivada.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

1. Miranda F., Instituto de Biología., " El Coyol Real de la Región de Azueta, Veracruz. ", An.Inst.Biol: Mex.15: 349-368.1944.
2. Quero R. Hermilo J., " Las Palmas Silvestres de la Península de Yucatán", Instituto de Biología., Jardín Botánico., Publicaciones Especiales 10., UNAM., México, D.F.1992. 1a edición. Pags. 9-10 y 57-59.
3. Miranda F., 1959. " Vegetación de la Península Yucateca, en los Recursos Naturales del Sureste y su Aprovechamiento ". *Revista Soc. Mex. Hist. Nat.* 4: 161-271.
4. Balick Michael J., editor., " The Palm Tree of Life ": Biology, Utilization and Conservation., Proceedings of a Symposium at the 1986 Annual Meeting of the Society for Economic Botany Held at The New York Botanical Garden, Bronx, New York 13-14 June 1986., Vol.6 of *Advances in Economic Botany.*, Published by The New York Botanical Garden, Bronx, New York, U.S.A. Issued 3 May 1988.
5. Hernández X.E.,1959. " La Agricultura en los Recursos Naturales del Sureste y su Aprovechamiento ", *Revista Soc.Méx.Hist.Nat.*3: 1-57.
6. Bibliot. Agr. Colon Firenze 113. 1916.
7. Dirección Internet: <http://www.sagar.gob.mx/cea.htm>. Centro de Estadística Agropecuaria Programa: " Oleaginosas en su Componente Cocotero ". Programas y Proyectos en apoyo al campo 1996.

8. Robert Díaz Manuel L., Zizumbo Villareal; " La problemática del Amarillamiento Letal del Cocotero en México ". Yucatán, México. Cicy, 1990. 197 p.
9. Winton L Andrew and Barber Winton Kate., " Análisis de Alimentos "., Edit. Hispanoamericana., Buenos Aires 1947.
10. Osborne D.R. and Voogt P., " Análisis de los Nutrientes de los Alimentos "., Edit. Acribia., 1978. Zaragoza España 1986.
11. Bailey Alton Edward., " Bailey's Industrial Oil and Fat Products ", 4th edition., edited by Daniel Swern. N:Y: Wiley, 1979.
12. Vera Soto Carlos Francisco y López Martínez José., " Análisis de Alimentos "., Universidad Autónoma de Querétaro; Facultad de Ciencias Químicas., Qro.Méx.1977.
13. Hart F. Leslie. and Fisher Harry.J., " Análisis Moderno de los Alimentos "., Editorial Acribia., 1ª.Reimpresión 1894.,Zaragoza España.1971
14. Egan Harold, Ronald S. Kirk., " Análisis Químico de Alimentos de Pearson "., Compañía Editorial Continental S.A., México 1ª Ed.1987., 5ª Reimpresión 1993.Para CG: pags: 64-68.
15. Coulatate T:P:, Biol. M.I., Alimentos, " Química de sus Componentes "., Editorial Acribia S.A., The Royal Society of Chemistry, 1984., Zaragoza España.
16. Robinson David S. , " Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos "., Editorial Acribia., Zaragoza España, 1991.
17. Norman N. Potter, Ph.D., " La Ciencia de los Alimentos "., Edutex S:A:, 3ª.Reimpresión.
18. Parra Cabrera S, Fernández Ortega M del C, Vandale Toney S y López Carrillo L., " Fibra Dietética y Tumores Gastrointestinales. Implicaciones para la

- Población Mexicana ", *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol.44.No.2, 1994. Pag. 76-81.
19. Sánchez Carrillo C P, Dewey Peter J:S:, Bourgues H and James Philip T., " Dietary fibre, What it is and How it is Measured ", *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol.44.No.2, 1994. Pag. 68-75.
20. Enciclopedia de Química Industrial, Sección III.- " Industria Química y sus productos ", Dirigida por Dr.Fritz Ullmann., Tomo 5 de la enciclopedia., Guinart y Pujolar Barcelona 1931.
21. Barrios V:A:, Olmos D:A., Noyola R.A., López Munguía C.A., " Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction "., *Oléagineux*, 1990, Vol.45, No.1, p. 35-42.
22. García Garibay M.,Quintero Ramírez R., López-Munguía Canales A., " Biología Alimentaria " ., Ed. Limusa.,1ª ed. 1993.
23. Wintergerst Lavin Gracia María., " Extracción Enzimática de Aceite de Hígado de Tiburón "., Q.F.B., Facultad de Química. 1987.
24. Official Method 920.212, " Specific Gravity (Apparent) of Oils, Picnometer Method ". Chapter 41.Oils and Fats. David Firestone, Chapter Editor. Food and Drug Administration. 1995.
25. Norma Oficial Mexicana. NOM-F-75-1987." Determinación de la Densidad o Peso Específico en los Aceites y Grasas vegetales o Animales ".
26. IUPAC Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives 6th Edition 2.101." Determination of the Density " (Fifth edition: Method II.B1),Pg.20.
27. Norma Oficial Mexicana: NOM-F- 14-1985. " Aceite Comestible Refinado De Coco ".

28. 32.1.03 AOAC Official Method 925.10. " Solids (Total) and Moisture in Flour Air Oven Method ". Chapter 32. Cereal Foods. Ralph H.Lane, Chapter Editor. University of Alabama pg.1 (Método indirecto). 1995.
29. 32.1.05 AOAC Official Method 923.03. " Ash of Flour. Direct Method ". Chapter 32. Cereal Foods. Ralph H.Lane, Chapter Editor. University of Alabama pg.2 (Método directo). 1995.
30. 4.5.01 AOAC Official Method 920.396. Subchapter 5 Fat. " *Fat crude or Ether Extractin animal feed* ". Chapter 4. Animal Feed. William R. Windham, Chapter editor. United States Department of Agriculture pg.17. 1995.
31. 31.4.02 AOAC Official Method 963.15. " Fat in Cacao Product. Soxhlet Extraction Method ". Chapter 31. Cacao Bean and Its Products. John R. Flanyak, C.E. E.J. Brach Corporation pg 10. 1995.
32. 32.1.22 AOAC Official Method 920.87. " Protein (Total) in Flour ". Chapter 32. Cereal Foods. Ralph H.Lane, Chapter Editor. University of Alabama pg.12 y 13. 1995.
33. 32.2.03 AOAC Official Method 979.09. " Protein in Grains ". Chapter 32. Cereal Foods. Ralph H.Lane, Chapter Editor University of Alabama pg.23. 1995.
34. 4.6.01 AOAC Official Method 962.09. Subchapter 6 Fiber. " Fiber Crude in Animal Feed ". Ceramic Fiber Filter Method Pg. 18. 1995.
35. NOM-F-74-S-1981. " Alimentos para humanos-Aceites Esenciales, Aceites y Grasas Vegetales o Animales- Determinación del Índice de Refracción con el refractometro de Abbe ".
36. 2.102. " Determinación del Índice de Refracción " (Fifth Edition: Method II.B.2). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6th Edition. Part 1 (Sections 1 and 2).

- 37.41.1.07 AOAC Official Method 921.08. " Index of Refraction of Oils and Fats ".
Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th Edition 1995.
- 38.2.202 " Determinación de el Índice de Saponificación " (Fifth edition: Method II.
D.2). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6th Edition.
Part 1 (Sections 1 and 2).
- 39.NOM-F-174-S-1981. " Determinación del Índice de saponificación en Aceites y
Grasas Vegetales o Animales " .
- 40.41.1.18. AOAC Official Method 920.160. Saponification Number ("Koettstorfer
Number") of Oils and Fats. Titrimetric Method Official Methods of Analysis of
AOAC International. 16th.Edition 1995.
- 41.NOM-F-153-S-1981. " Alimentos para humanos, aceites y grasas vegetales o
animales Determinación de los Índices de Reichert-Meissl, Polenske y Kirchner " .
- 42.NOM-F-116-1987. " Alimentos - Aceites y Grasas Vegetales o Animales -
Determinación de Color " .
- 43.NOM-F-473-1987. " Alimentos - Aceites y Grasas Vegetales o Animales -
Determinación Sensorial de Impurezas Indeseables – Olor " .
- 44.NOM-F-154-1987. " Alimentos - Aceites y Grasas Vegetales o Animales -
Determinación del Índice de Peróxido " .
- 45.NOM-F-101-1970. " Alimentos - Aceites y Grasas Vegetales o Animales -
Determinación del Índice de Ácidez " .
- 46.2.201.Determination of the Acid Value and the Acidity (Fifth Edition: Method
II.D:1). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6th
Edition. Part 1 (Sections 1 and 2).

- 47.41.1.21. AOAC Official Method 940. " Fatty Acids (Free) in Crude and Refined Oils ". Titration Method. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th.Edition 1995.
- 48.NOM-F-211-1987. " Alimentos - Aceites y Grasas Vegetales o Animales - Determinación de Humedad y Materia Volátil ".
- 49." Producción, Análisis y Control de Calidad de Aceites y Grasas Comestibles ". Editor A. Madrid Vicente, Ediciones Madrid 1988.
- 50.NOM-F-222-1975. . " Alimentos - Aceites y Grasas Vegetales o Animales - Determinación de Rancidez ".
- 51.AOAC Official Methods of Analysis 982.30. " Protein Efficiency Ratio, Calculation Method. First action " pg.1096. 1990.
- 52.Kiritsakis A.K. " El aceite de Oliva ". Editor A. Madrid Vicente, Ediciones Madrid. Edición Española 1992.
- 53.Skoog Douglas A. " Análisis Instrumental ". Editorial McGraw-Hill. 2a.Edición. México 1993.
- 54.Storch de Gracia y Asencio J.M. " Fundamentos de la Cromatografía de Gases ". Editorial Alhambra. Segunda edición. Madrid 1975.
- 55.Chemistry and nutrition, "Tropical Foods". Ed. by George Charalambous. Academic Press 1979. Volum.2
- 56 Stanley H.Pine. "Química Orgánica". Ed. Mc Graw-Hill. 4a.Edición. México 1992.
- 57 B.W.Minifie. "Chocolate, Cocoa and Confectionery" , Chapman and Hall, Third Edition, New York 1989.
- 58 Badui D.S., "Química de los Alimentos", Ed.Alhambra Mexicana. 1a.Edición. México 1984.
- 59 O.R.Fennema, "Food Chemistry", Marcel Dekker, 2nd edition, New York, 1976.

ANEXO 1

METODOS OFICIALES DEL AOAC PARA LA REALIZACION DEL ANALISIS PROXIMAL

Humedad²⁸.

Procedimiento: Pesar tres gramos de muestra en un pesafiltro con tapa, que ha sido previamente pesado después de ponerlo a peso constante durante dos horas a 130 ± 3 °C. Secar la muestra durante una hora en la estufa a la temperatura de 130 ± 3 °C con la tapa del pesafiltro a un lado. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente.

Cálculos: Para calcular el porcentaje de humedad, se reporta como pérdida por secado a 130°C.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(A - B)}{M} \times 100$$

M

Donde:

A = Peso del pesafiltro más la muestra, antes de secar a la estufa

B = Peso del pesafiltro más la muestra, después de secar a la estufa

M = Peso de la muestra en gramos.

Cenizas.²⁹.

Procedimiento: Pesar tres gramos de muestra en un crisol, previamente pesado después de meterlo a la mufla durante dos horas a 600°C. Calcinar la muestra, para ello carbonizar primero con mechero o en parrilla, hasta que no haya

desprendimiento de humos y meter a la muffla cuidando que la temperatura no pase de 550°C*. Se suspende el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises, aproximadamente esto ocurre en dos o tres horas (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de agua destilada, se secan en la estufa a 130°C y se vuelven a calcinar). Enfriar en desecador y pesar.

**Para evitar que los cloruros presentes en la muestra se volatilicen.*

Cálculos: Para calcular el porcentaje de cenizas se puede resolver la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso de crisol con cenizas} - \text{Peso de crisol sin cenizas}}{\text{Peso de la muestra en gramos}} \times 100$$

Grasa cruda.^{30 y 31.}

Método de Soxhlet con éter etílico.

Para el método de Soxhlet se utiliza un extractor de Soxhlet, éste consta de tres partes: un matraz, un extractor y un refrigerante unidos por juntas esmeriladas.

Procedimiento: Se pesa el cartucho de celulosa vacío, después se colocan dentro del mismo 5 g de la muestra y se vuelve a pesar. Tapar la muestra con algodón y colocar el cartucho en el extractor.

Aparte, el matraz con perlas de ebullición se lleva a la estufa a 100°C durante 2 horas, se enfría y se pesa.

Se conecta el matraz al extractor y éste al refrigerante (no se pone grasa en las juntas). Se agrega éter etílico por el refrigerante en cantidad de dos cargas y se

calienta el matraz con parrilla. Generalmente son suficientes de 4 a 6 horas para extraer toda la grasa de la muestra.

Se saca el cartucho con la muestra desengrasada y se guarda en un frasco, se sigue calentando hasta casi la total eliminación del éter, recuperándolo antes de que descargue. Se quita el matraz y se calienta bajo la campana hasta la total evaporación del éter. Secar el extracto a 100°C por 30 min., enfriar y pesar.

Cálculos: Para calcular porcentaje de grasa cruda, se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{(\text{Peso del matr az con extracto} - \text{Peso del matr az vacío})}{\text{peso de la muestra en gramos.}} \times 100$$

Proteína cruda^{32 y 33.}

Método de Kjeldahl.

Fundamento: Las proteínas junto con la materia orgánica son oxidadas por el ácido sulfúrico; el n trgeno que se encuentra en forma orgánica se fija como sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte, se desprende amoniaco que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido valorado. Por titulación del ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoniaco desprendido y así, la cantidad de n trgeno de la muestra. El porcentaje del n trgeno de la muestra, multiplicado por el factor 6.25, da como resultado el porcentaje de proteína cruda.

Procedimiento: Se pesan en balanza analítica 0.5-1.0 g de muestra en papel delgado blanco, con todo y papel se introduce en un matraz de Kjeldahl de 800 ml; se agregan 0.3 g de sulfato de cobre pentahidratado, 5 g de sulfato de potasio ó sulfato de sodio, 15 ml de ácido sulfúrico concentrado y se añaden perlas de vidrio para regular la ebullición en la destilación. Se coloca el matraz en el digestor del aparato de Kjeldahl, abrir el extractor del vacío y calentar hasta la total destrucción de la materia orgánica. La solución debe quedar completamente cristalina (1 a 2 horas), enfriar. Diluir con 350 ml de agua destilada y enfriar sobre hielo.

Añadir 40 ml de una solución concentrada de hidróxido de sodio (100 g en 100 ml de agua), que también ha sido enfriada sobre hielo, haciéndola resbalar lentamente por la pared del matraz de manera que se estratifiquen las dos soluciones. Cuidando de no agitar porque podría haber desprendimiento prematuro de amoníaco. Adicionar 0.2 g de polvo de zinc y antiespumante, y conectar inmediatamente el matraz a la trampa de Kjeldahl, unida al refrigerante que a su vez está conectado a una alargadera que va introducida en 50 ml de ácido clorhídrico 0.1N (medidos con pipeta volumétrica), contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y adicionados de 5 gotas de indicador de rojo de metilo 0.1% en alcohol. Las conexiones deben de ser de un ajuste perfecto para evitar las fugas.

Una vez conectado el matraz agitar para mezclar las dos capas e inmediatamente colocar en la parrilla ya caliente del destilador, regular la ebullición al inicio de ésta agitando de vez en vez. Destilar aproximadamente

hasta un volumen de 250 ml. Suspender la destilación, retirando primero el matraz con el destilado de manera que la alargadera quede por encima y antes de apagar la parrilla dejar destilar unos minutos con objeto de lavar la alargadera por dentro y después lavarla por fuera recogiendo los lavados en el mismo matraz.

Titular el exceso de ácido con solución valorada de NaOH 0.1N, hasta vire amarillo del indicador.

Corregir mediante una determinación en blanco de los reactivos usados, empleando la misma cantidad de papel.

Cálculos: Para calcular el porcentaje de nitrógeno en la muestra se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{ml blanco} - \text{ml problema}) \times N \text{ NaOH} \times 0.014 \times 100}{\text{peso de la muestra en gramos}}$$

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ Nitrógeno} \times 6.25$$

0.014= meq Nitrógeno

Nota: Se determina el porcentaje de proteína multiplicando la cantidad de Nitrógeno por 6.25. Excepto para trigo y sus productos en los cuales la proteína equivale a N*5.7. Para todo análisis reportar %N y usar el factor de conversión. Los factores de conversión usuales son: para almendras 5.18, para cacahuates y nueces del Brasil 5.46, para nuez de palma y coco 5.3 y para productos lácteos 6.38.

Fibra cruda.^{34.}

Procedimiento: Se pesan 2 g de muestra desengrasada y seca (de preferencia se utiliza la muestra que quedó en el cartucho de la determinación de grasa cruda)⁴. Transferir a un vaso de 600 ml, evitar la contaminación con fibra de papel. Agregar 1 g de asbesto preparado y 200 ml de ácido sulfúrico al 1.25% (0.255 N) hirviendo y antiespumante Colocar el vaso en el aparato sobre la placa previamente caliente para que hierva exactamente 30 min. Girar el vaso periódicamente para evitar que los sólidos se adhieran a las paredes, quitar el vaso y filtrar a través del papel o tela de lino, luego enjuagar el vaso con 50-70 ml de agua hirviendo y verter sobre el papel satinado o el lino. Lavar el residuo tantas veces como sea necesario hasta que las aguas de lavado tengan un pH igual a la del agua destilada. Transferir el residuo al vaso con ayuda de 200 ml de NaOH al 1.25% hirviendo y calentar a ebullición exactamente a 30 min. Quitar el vaso y filtrar en el Buchner con papel de cenizas conocidas.

Lavar con agua hasta que las aguas de lavado tengan un pH igual a la del agua destilada. Transferir el residuo a un crisol que previamente se ha puesto a peso constante y secar a 130°C durante un tiempo de 2 hr, enfriar y determinar el peso. Calcinar a 600°C durante 30 min. Enfriar y determinar la masa del crisol con el residuo calcinado.

⁴*Si la muestra contiene menos del 1% en grasa se puede omitir la extracción.*

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(Ps - Pp) - (Pc - Pcp)}{M} \times 100$$

Ps = Peso en gramos del residuo seco a 130°C

Pp = Peso en gramos del papel filtro

Pc = Peso en gramos de las cenizas

Pcp = Peso en gramos de las cenizas de papel

M = Peso de la muestra en gramos

Carbohidratos asimilables

Fundamento: Son los carbohidratos no fibrosos como los almidones y los azúcares. Si se suman los porcentajes de humedad, cenizas, proteínas, grasa cruda y fibra cruda y el total se resta de 100, se puede suponer que esta diferencia son los carbohidratos asimilables

Cálculos:

$$\% \text{ Carbohidratos asimilables} = 100 - \% (\text{Humedad} + \text{Cenizas} + \text{Proteínas} + \text{Grasa} + \text{Fibra}) .$$

Por lo tanto se tiene para Carbohidratos Totales de la Muestra:

$$\% \text{ Carbohidratos Totales} = 100 - \% (\text{Humedad} + \text{Ceniza} + \text{Proteínas} + \text{Grasa})$$

ANEXO 2

METODOS FISICOQUIMICOS OFICIALES PARA EL ANALISIS DE ACEITES Y GRASAS, EXTRAIDOS DEL AOAC, METODOS ESTANDARES DE LA IUPAC Y NORMA OFICIAL MEXICANA

Densidad o Peso Especifico ^{24,25 Y 26.}

Determinar exactamente el peso del picnómetro vacío. Llenar el picnómetro con agua destilada, evitando la formación de burbujas, colocarlo en un baño de agua a 25°C controlando con termómetro cuidando de no tapar la rama del capilar y después de 30 min., controlando la temperatura del baño, ajustar el nivel del agua destilada. Sacar del baño, secar limpiando exteriormente, pesar para determinar su masa.

El picnómetro se vacía. Se seca interiormente con una corriente de aire seco y exteriormente con un paño seco.

Se llena el picnómetro seco y limpio con una muestra de aceite, evitando la formación de burbujas de aire, poner en un baño de agua a 25°C durante 30 min., y ajustar el nivel del aceite. Sacar del baño, secar y pesar.

La densidad se reporta a 20°C, si se ha determinado a una temperatura diferente sumar o restar el factor 0.00064 por cada grado sobre o abajo de 20°C respectivamente. La densidad disminuye con el aumento de temperatura.

Cuando la grasa no es líquida a una temperatura de 20°C, se toma la densidad a una temperatura de 40°C o si es necesario utilizar una temperatura más alta se usa a 60°C.

CÁLCULOS:

Para aceites y grasas se expresa como gr/ml

$$G1= M1-M$$

$$G2= M2-M$$

$$D= G1/ G2$$

Donde:

M1=Masa del picnómetro con muestra

M2= Masa del picnómetro con agua

M = Masa de picnómetro vacío

G1= Masa neta del aceite

G2=Masa neta del agua

D= Densidad relativa del aceite a cierta temperatura con respecto al agua a la misma temperatura.

Índice de Refracción.³⁵

Condiciones del aparato.- Refractómetro de Abbé, con escala graduada directamente en términos de índice de refracción de 1.3000 a 1.7000 con precisión de ± 0.0002 . En aceites y grasas ordinarias, las temperaturas recomendables para efectuar la determinación son: 25°C (298 K), 40°C (313 K) y 60°C (333 K), dependiendo de su punto de fusión. Se ocupa un baño con recirculación de agua con control de temperatura y con precisión de 0.2°C. Las determinaciones se realizan con una fuente de luz de sodio, preferentemente con una longitud de onda de 589.6 nm, correspondiente a las radiaciones D₁ y D₂, del espectro de sodio.

Procedimiento.- Calibración del Instrumento. Esta debe verificarse efectuando una prueba con una placa de índice de refracción conocido, que generalmente se obtiene al adquirir el refractómetro.

Después de calibrado el refractómetro, se coloca frente a la fuente de luz, se inserta el termómetro y se ajusta la circulación de agua, de manera que los prismas adquieran la temperatura adecuada. Los prismas se limpian con el disolvente y se dejan secar.

Se coloca una gota de la muestra sobre el prisma inferior y se presiona con el superior hasta que ambos queden juntos. Se ajusta la luz de manera que penetre en el aparato. Se enfoca el ocular sobre las líneas transversales cruzadas y sobre los lentes de la escala.

Moviendo el brazo del prisma se encuentra que la parte baja del campo está oscura y la superior iluminada. En general la línea divisoria siempre es colorida. Se gira la cremallera de ajuste cromático, hasta que aparezca una línea fina de separación perfectamente definida.

Se mueve el brazo del prisma hasta que la línea de separación se encuentre en la interacción del retículo.

Se toman varias lecturas del índice de refracción en la escala hasta la cuarta cifra decimal.

Cálculos.- El promedio de las lecturas efectuadas nos da el índice de refracción buscado. En caso de no disponer del baño a temperatura constante, la corrección del índice de refracción por temperatura se hace utilizando la siguiente expresión:

$$n_D^t = n'_D^{t'} + K(t' - t)$$

Donde:

n = Lectura de la temperatura de referencia

n' = lectura a la temperatura t' en ($^{\circ}\text{C}$)

t = temperatura de referencia

t' = temperatura a la cual se hizo la lectura n

K = 0.000365 para grasas

K = 0.000385 para aceites

K = 0.00045 para aceites esenciales

Indice de Saponificación.^{39.}

Reactivo de solución alcohólica de hidróxido de potasio.- Se muelen 40 gr de hidróxido de potasio, se adicionan 45 g de óxido de calcio y se muele hasta obtener un polvo. Se toma una alícuota de 100 ml de un litro de alcohol y se agregan al mortero, se hace una mezcla que se transfiere a un vaso, se enjuaga el vaso con varias porciones de alcohol y al final se agrega el alcohol restante al vaso de precipitados, se agita esta mezcla por cinco minutos, se tapa la boca del vaso y se repite la agitación varias veces durante el día. Al siguiente día se filtra en un frasco limpio y se coala solución alcohólica.

Procedimiento.- Se colocan 5 g de la muestra en un matraz, se le agregan 50 ml de hidróxido de potasio en solución alcohólica exactamente medidos con pipeta volumétrica.

Al matraz se le adapta el refrigerante de reflujo y se coloca en un baño María hirviente durante 30 min, agitándolo frecuentemente. El calentamiento se

prolonga de 30 a 60 min para que la saponificación sea completa.

Una vez terminada la saponificación de 60 min se le agrega un ml de solución indicadora de fenolftaleína al 1% titulándose en frío, con ácido clorhídrico 0.5 N; para observar con claridad y precisión el punto final, considerándose como tal cuando después de transcurrir medio minuto de que se agrega la última gota del ácido clorhídrico 0.5 N se produce la decoloración.

Se hace una prueba testigo usando la misma cantidad de reactivo, procurando que el tiempo de descarga de las pipetas sea semejante al de la muestra.

Cálculos.-

$$I.S. = \frac{V_1 - V}{P} \times 28.05$$

I.S. = Índice de Saponificación.

V_1 = ml de HCl 0.5 N empleados en la titulación del blanco

V = ml de HCl 0.5 N empleados en la titulación de la muestra

P = masa de la muestra en gramos

28.5 = mg de KOH equivalentes a 1 ml de HCl 0.5N

Nota: Si se va a determinar la materia insaponificable, se conserva el líquido titulado en el matraz en el que se peso la muestra.¹⁴

Materia Insaponificable.¹³

Procedimiento.- A partir del material de residuo del índice de saponificación:

Transferir la solución de la muestra saponificada a un embudo de separación, usando 50 ml de agua para lavar el matraz. Extraer la solución tres

veces con cantidades de 50 ml de éter dietílico. Agitar vigorosamente, y dejar reposar esperando a que se formen dos capas y se aclaren. Se transfiere la capa etérea (la superior) a otro embudo de extracción que contenga ya 20 ml de agua. Se repite la extracción otras dos veces más, traspasando en cada caso la capa etérea, como antes, al segundo embudo.

Se hace una extracción más con sólo 50 ml de éter y se evapora por separado el disolvente. Si la extracción previa fue completa, el residuo debe pesar menos de 1 mg.

Los extractos etéreos combinados con 20 ml de agua se agitan por rotación (la agitación violenta puede ocasionar emulsiones difíciles de romper). Esperar a que las capas se separen por completo y descartar la fase acuosa. Repetir el lavado otras dos veces más, con 20 ml de agua, descartando siempre la fase acuosa. Lavar la disolución etérea con 20 ml de hidróxido de potasio 0.5 N, después con 20 ml de agua, agitando en ambos casos vigorosamente. Se repiten dos veces más el lavado.

Después del tercer lavado con hidróxido de potasio, se lava con volúmenes de 20 ml de agua las veces necesarias para que los lavados dejen de ser alcalinos a la fenolftaleína.

Se transfiere la disolución etérea a un vaso de precipitados de 250 ml, se lava el embudo de extracción con éter y se añaden los lavados a la disolución etérea principal. Se evapora hasta reducir el volumen hasta unos 5 ml y se transfiere cuantitativamente el contenido a un matraz erlenmeyer de 50 ml previamente puesto a peso constante, lavando varias veces con pequeños

volúmenes de éter. Se elimina el éter por evaporación sobre un baño de vapor; cuando casi todo el éter se eliminó se añaden de 2 a 3 ml de acetona y se evapora todo el disolvente por calentamiento sobre el baño de vapor.

Se seca hasta un peso constante en una estufa, se enfría y se pesa. Una vez que se determinó el peso del mismo, se disuelve el residuo en 2 ml de éter, se añaden 10 ml de etanol neutralizado a la fenolftaleína y se titula con hidróxido de sodio 0.02 N se utiliza el mismo indicador y el punto de viraje.

Se corrige el peso del residuo por su contenido en ácidos grasos libres (1ml de NaOH 0.02N = 0.0056 gr de ácido oleico). Se prepara un blanco y resta el peso obtenido en la determinación en blanco del peso del residuo corregido por su contenido en ácidos grasos libres. Se calcula el tanto por ciento que representan las sustancias insaponificables.

Cálculos.- Fórmula extraída de la NOM-K-306-1972. "Método de Prueba para la Determinación de Materia Insaponificable en Aceites y Grasas Vegetales o Animales".

$$G_2 = VN \times 0.282 \text{ meq ac.oleico}$$

$$\% \text{ Materia insaponificable} = \frac{G_1 - G_2}{G} \times 100$$

G

Donde:

G₂ = Gramos de ácidos grasos en el extracto.

V = Volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación de los ácidos

grasos, en ml.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

G₁ = Peso del residuo, en gramos

G = Peso de la muestra empleada, en gramos.

Índice de Yodo.¹⁴

Solución de Wijs. Disolver 8 g de tricloruro de yodo en 200 ml de ácido acético glacial. Disolver 9g de yodo en 300 ml de tetracloruro de carbono. Mezclar las dos soluciones y diluir a 1000 ml con ácido acético glacial.

Procedimiento.- Se ponen a peso constante los matraces de yodo a utilizar durante el experimento. Se pesan 5 g de la muestra a analizar, en un matraz de yodo. Se adicionan 10 ml de tetracloruro de carbono al aceite o a la grasa fundida y disolver. Adicionar 20 ml de la solución de Wijs, colocar el tapón, previamente humedecido con solución de yoduro de potasio. Se deja reposar en la oscuridad durante 30 min.

Después de transcurrido el tiempo, se adicionan 15 ml de solución de yoduro de potasio al 10% y 100 ml de agua, mezclar y titular con solución 0.1 M de tiosulfato, usando almidón como indicador, justo antes del punto final (titulación = a ml). Se lleva a cabo una prueba en blanco al mismo tiempo con 10 ml de tetracloruro de carbono (titulación = b ml). Se expresa en % de gramos de iodo absorbido / gramo de Muestra de aceite.

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(b - a) \times 100 \times M \times 0.1269}{\text{peso de la muestra en gramos}}$$

Donde:

a = ml gastados en la titulación de la muestra.

b = ml gastados en la titulación del blanco.

M = Molaridad de tiosulfato

Indice de Reichert-Meissl.^{13, 41.}

Preparación de soluciones a y b:

- Solución (a).- Solución de NaOH al 50%, en peso; exento de carbonatos. Se deja sedimentar y se usa solo el sobrenadante.
- Solución (b).- Solución de glicerol-soda. Se añaden 20 ml de la solución de hidróxido de sodio al 50% (a) a 180 ml de glicerol U.S.P.

Procedimiento.- Se pesan 5 ± 0.1 g de muestra en un matraz de destilación de 250 ml limpio y seco se añaden 20 ml de la solución (b). Se calienta en una canastilla y se agita de vez en cuando, hasta la total saponificación de la muestra, lo que se pone de manifiesto por que la mezcla se torna completamente clara. Se enfría el contenido a unos 100°C (durante 5 min) y se añaden 135 ml de agua destilada, recientemente hervida, gota a gota al principio, para evitar pérdidas de vapor de agua. Se añaden 6ml de H_2SO_4 diluido (1+4) y unas piezas de piedra pómez. Se conecta el matraz al resto del equipo de destilación. Se regula la temperatura de manera que se recojan 110 ml de destilado en un tiempo de 30 min (se mide el tiempo desde el momento en que la primera gota cae del refrigerante al colector). El destilado debe caer al colector a una temperatura no superior a 20°C .

Cuando se han recogido 110 ml, se retira el calentamiento, se sustituye el matraz colector por una probeta de 25 ml para recoger las gotas que puedan caer después y se desconecta la cabeza de destilación y el condensador. Este

destilado deberá caer a una temperatura no mayor de 20°C El volumen del destilado obtenido se mezcló con agitación suave y se sumergió en agua a 15° durante 15 min, posteriormente se filtro en un papel filtro moderadamente fino y se titulan 100 ml con NaOH 0.01 N, utilizando fenolftaleína como indicador y cuidando que el color rosa persista de 2 a 3 min. Se hace una determinación en blanco.

$$\text{Indice de Reichert-Meissl} = 1.1 \times (S - B)$$

Donde:

S = ml de NaOH 0.1 N gastados en la muestra.

B = ml de NaOH 0.1 N gastados en el blanco.

Indice de Polenske.¹³

Procedimiento.- Se liberan los ácidos grasos insolubles retenidos por el papel filtro, de los restos de los ácidos hidrosolubles, lavándolos con tres porciones de 15 ml de agua a 15°C. Antes, con cada porción se lava el refrigerante, la probeta de 25 ml y el matraz colector. Se disuelven los ácidos insolubles en agua retenidos por el filtro, lavándolos sucesivamente con tres porciones de 15 ml de etanol neutralizado a la fenolftaleína, lavando también el condensador, la probeta de 25 ml y el matraz colector. Se combinan los tres lavados etanólicos y se titula con NaOH 0.1N hasta el punto de viraje de la fenolftaleína, esperando que el color persista de 2 a 3 min. Se realiza un blanco.

$$\text{Indice de Polenske} = S - B$$

Donde:

S = ml de NaOH 0.1 N gastados en la muestra.

B = ml de NaOH 0.1 N gastados en el blanco.

Color.^{42.}

Fundamento.- Este método se basa en la igualación de color de la muestra con la escala Lovibond.

Olor.^{43.}

Procedimiento.- Se pesan 5g de muestra en un vaso de precipitados de 250 ml; se calienta, y cuando se obtiene una temperatura máxima de 210°C, se efectúa la prueba organoléptica, no se deben percibir olores extraños o rancios. Esta muestra se realiza por triplicado.

Indice de Peróxido.^{44.}

Procedimiento.- Se pesa 5.0 ± 0.05 g de muestra dentro de un matraz, se añaden 30 ml de solución de ácido acético-cloroformo (3:2) y se agita hasta que la muestra se disuelva totalmente.

Con una pipeta, se agregan 0.5 ml de solución saturada de yoduro de potasio, se agita y se deja reposar durante 1 min., después del cual se adicionan 30 ml de agua. Se titula lenta y cuidadosamente con solución 0.1 N de tiosulfato de sodio; se agita vigorosamente después de cada adición, hasta tener una coloración ligeramente amarilla; se añaden 0.5 ml de solución indicadora de almidón y se continua la titulación sin dejar de agitar hasta la desaparición del color azul.⁽¹⁾

Se realiza un blanco en las mismas condiciones en las que se efectuó la muestra. Se anota en cada caso los ml de la solución de tiosulfato 0.1N

gastados en la titulación. Las diferencias no deberán exceder de 0.1 ml de tiosulfato.

(1) Si el gasto de solución 0.1N de tiosulfato de sodio es menor de 0.5 ml, repetir la determinación utilizando solución 0.01N de tiosulfato de sodio.

Cálculos:

Se calcula el índice de peróxidos expresando los miliequivalentes de peróxido contenidos en un Kg de grasa o aceite mediante la siguiente fórmula:

$$\text{I.P.} = \frac{(A - A_1) \times N \times (1000)}{M}$$

I.P. = Índice de peróxidos

A = ml de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra.

A₁ = ml de solución de tiosulfato de sodio gastados en el blanco.

N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.(meq/ml)

M = Masa de la muestra en gramos.

Índice de Ácidez.^{47.}

Procedimiento: Se pesan en una balanza analítica alrededor de 5 g de muestra en un matraz erlenmeyer de 250 ml, se funde a baño maría y se agregan 25 ml de alcohol previamente neutralizado a la fenolftaleína con una solución 0.02 N de hidróxido de potasio. Se calienta en baño de agua a ebullición incipiente y se titula con solución 0.02N de hidroxido de potasio, agitando fuertemente después de cada adición del álcali para asegurar la completa neutralización de los ácidos libres y hasta la aparición de un color rosa persistente de 2 a 3 min.

Cálculos:

Si se trata de aceites de almendra de palma o coco, los ácidos grasos libres deben expresarse en términos de ácido láurico.

En estos aceites el porcentaje de ácidos grasos libres, expresados como ácido láurico, vale:

$$\% \text{ de ácido láurico} = \frac{\text{ml gastados} \times N(\text{KOH}) \times 0.20 \times 100}{\text{g de muestra}}$$

La áidez de los aceites suele expresarse en términos de su índice de áidez. Se define este como el número de miligramos KOH necesarios para neutralizar 1 g de aceite.

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{56.1 \times T \times V}{M} \quad (46).$$

Donde:

T es la normalidad exacta de la solución de KOH usada

V es el número de ml gastados de la solución de KOH

M es la masa en gramos de la muestra usada

Determinación del Punto de Solidificación.

Procedimiento.- Se llena un capilar con la muestra de aceite hasta tener una columna de aproximadamente de 3cm de longitud. Se sella el capilar a la flama cuidando de no quemar la muestra y se guarda en condiciones de congelación (menos de 0°C), para asegurar la completa solidificación del aceite durante un tiempo razonable.

El capilar se ata al termómetro teniendo cuidado de que el fondo de la columna de la muestra en el capilar coincida con el bulbo del termómetro. A la mitad de un vaso de precipitados de 600 ml se llena de agua y se suspende el termómetro con el capilar, el agua debe estar a 0°C para evitar que se funda la muestra al introducirla al baño. Se comienza el calentamiento elevando la temperatura en un rango de 0.5°C/min, regulando la temperatura con una agitación moderada para tener homogeneidad durante el calentamiento.

Se toma como punto de fusión la lectura en el termómetro cuando la muestra es transparente. Generalmente este dato es un rango.

Prueba del frío.⁴⁹

Procedimiento.- Se filtra una cantidad suficiente de muestra (20 a 30 ml). Se calienta el filtrado, agitándolo continuamente hasta que adquiera exactamente una temperatura de 130°C. Con el aceite filtrado se llena un frasco completamente y se tapa con un tapón de corcho. Se coloca el frasco en un baño de agua a 25°C y se recubre el tapón con parafina. Posteriormente se sumerge completamente el frasco en un baño de agua-hielo, de tal forma que quede cubierto. Se agrega más hielo para mantener la temperatura a 0°C. Después de cinco o seis horas se retira el frasco del baño y se examina detenidamente para ver si se han formado cristales o enturbiamiento. No se deben confundir las burbujas de aire dispersas con cristales de grasa. La muestra habrá resistido la prueba si se conserva clara, limpia y brillante. Se expresan los resultados como prueba positiva o negativa.

Rancidez.^{50.}

Procedimiento.- En una probeta de 100 ml se vierte con una pipeta de 10 ml 5 gr de muestra, se agregan 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y se tapa con un tapón de goma, se agita vigorosamente por espacio de 30 seg, agregando a la mezcla 10 ml de solución de Floroglucinol al 0.1% en eter, se tapa para evitar alguna posible proyección y se agita enérgicamente. Posteriormente se deja en reposo y se observa el color. La formación de un color rojo intenso en la capa acuosa (inferior) indica la rancidez de la muestra.

Interpretación de resultados.- Al observar el color, si la grasa es rancia la capa de ácido adquiere un color rojo o rosado.

ANEXO 3

IDENTIFICACION DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Se pesan aproximadamente 10 mg de muestra en un vial para reflujo, se agrega un ml de hidróxido de potasio al 5% en metanol-agua (50:50) y se hierve a reflujo durante 20 min. Se enfría a temperatura ambiente y se adicionan 1.5 ml de ácido clorhídrico al 25% en metanol y 1 ml de trifluoruro de boro, se hace un segundo reflujo por 20 min. Se extrae con 1 ml de hexano, guardándose la capa superior del extracto en un vial. Se inyecta al cromatografo 1 μ L de esta solución.

ANEXO 4

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS.⁵¹

APARATOS:

Analizador de aminoácidos *Beckman System 6300/7500*. con capacidad para mediciones precisas de aminoácidos individuales de bajas concentraciones (hasta de 20 nmolar). Usar estándares de aminoácidos cada 24 horas.

Tubos de vidrio para hidrólisis de 15 ml.

Baño de agua a 55°C con recirculación.

REACTIVOS:

(a) Estándares de aminoácidos Beckman Instruments.

(b) Acido perbórmico.- Adicionar un ml de agua oxigenada al 30% a nueve ml de ácido fórmico al 88%. Se deja reposar durante una hora y se enfría a 0°C.

(c) Soluciones buffer.

(d) Acido clorhídrico 6N con 1% de fenol.

(e) Metanol, hielo seco.

(f) 1-octanol.

(g) Hidróxido de sodio 4.2N

Previamente se descascarilla la muestra, se desengrasa y se pulveriza. Se hace una determinación de nitrógeno por método de Kjeldahl.

Hidrólisis de la muestra.

(a) Hidrólisis ácida.- Se pesan 0.1 g de muestra en un tubo para hidrólisis, se adiciona 10 ml de ácido clorhídrico 6N y se mezcla. Se congela en un baño de hielo seco, se saca y se mantiene a vacío a no menos de 50 μ durante un min,

se cierra el tubo herméticamente bajo vacío. Se hidroliza durante 24 horas a 110°C. Se enfría, se abre el tubo y se filtra el hidrolizado a través de un papel Whatman No.1, se enjuaga el tubo durante tres veces con agua y se filtra cada enjuague. Secar a vacío el filtrado a una temperatura de 65°C. Se disuelve el hidrolizado seco en un volumen adecuado de buffer para el analizador de aminoácidos. Se puede guardar este hidrolizado no más de una semana antes del análisis de aminoácidos. Se usa este hidrolizado para la determinación de todos los aminoácidos excepto para metionina, cisteína y/o cistina y triptofano.

(b) Oxidación de ácido per fórmico seguido por hidrólisis ácida.- Se pesa una cantidad de 0.1g de la muestra en un tubo para hidrólisis, se adicionan dos ml de ácido per fórmico frío, se deja reposar durante la noche a una temperatura de 0 a 5°C. Se adicionan tres ml de antiespumante frío de ácido bromhídrico con 0.04ml de 1-octanol; inmediatamente se mezcla el contenido durante 30 seg en un baño de agua-hielo y se evapora a sequedad a 40°C bajo vacío. Se adicionan diez ml de ácido clorhídrico 6N al tubo y se lleva a cabo la hidrólisis ácida de la misma manera que en (a). Mediante este tratamiento se puede cuantificar metionina convertida en la sulfona de la metionina y cisteína o cistina en ácido cisteico.

(c) Hidrólisis alcalina.- Se pesan 0.1 g de muestra en un tubo de vidrio para hidrólisis, se adicionan 25 mg de hidrolizado de almidón de papa, (se omite este hidrolizado si la muestra tiene un alto contenido de almidón). Se adicionan 0.6 ml de solución de hidróxido de sodio 4.2 N conteniendo 0.04 ml de 1-octanol recién preparada. Se mezclan los contenidos del tubo durante dos minutos bajo vacío parcial. Se congela el tubo en un baño de hielo seco-alcohol, se saca y se

mantiene a vacío a no más de 50 μ durante un min. Se sella el tubo al vacío. Se hidroliza durante 22 horas a $110 \pm 1^\circ\text{C}$. Se enfría el tubo y se transfiere el contenido a un matraz de 5 ml que contenga suficiente ácido clorhídrico 6N frío para neutralizar el hidrolizado. Se diluye con una solución de buffer apropiada para el analizador de aminoácidos. Se centrifuga o se filtra el hidrolizado, se guarda en congelación. Se usa este hidrolizado para determinar triptofano.

(d) Análisis de aminoácidos.- Analizar cada uno de los tres hidrolizados usando parámetros óptimos para ser usados en el analizador de aminoácidos. Para calibrar el analizador se usan las soluciones estándares de aminoácidos mínimo cada 24 horas, cada pico de aminoácido deberá tener una resolución mayor o igual de 85%.