



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación Nutritiva de la grasa
de la semilla de cacahuanano
(*Gliricidia sepium*)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
ALICIA URBINA SALAS



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA
MÉXICO, D. F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



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. Bernardo Lucas Florentino
Vocal	Prof. Lucia Cornejo Barrera
Secretario	Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén
1er. Suplente	Prof. Evangelina Camacho Frías
2º. Suplente	Prof. Jorge Aburto Anell

Sitio en donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM.**

Asesor


M. en C. Bernardo Lucas Florentino

Supervisor técnico


Q.F.B. Leticia Gil Vieyra

Sustentante


Alicia Urbina Salas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de ser puma y con esto darme su apoyo incondicional para lograr este objetivo.

A mi maestro Bernardo Lucas por su paciencia y entrega en este proyecto, mil gracias.

A Lety Gil por su ayuda y buenos consejos durante mi estancia en el laboratorio.

A Glinda Irazoque por brindarme sus consejos y apoyo, en el primer semestre los cuales me dieron fuerza para seguir adelante y cumplir mis metas propuestas.

A todos los maestros que conocí y me instruyeron para que yo realizara este trabajo.

Gracias a todos los que están en el Laboratorio 111, M. en C. Angelita, Sra. Vicy, Arge, Ili, Rosita, Hector y a todos mis compañeros, que me soportaron con mi escándalo.

AGREDECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi mamá y a mi papá, por que me han dado lo mejor de sí, la vida, su amor, su apoyo y sus consejos, los amo y no puedo pedir más, ya que con ustedes Dios me dio todo.

A mis hermanos Alejandra, Antonio, Rodrigo, Juan Carlos y Liz que siempre me han apoyado, amado y me han hecho pasar lo mejores momentos de mi vida, gracias.

A Toñito y Tamarita por ser el cariño que me impulsa a ser mejor cada día ya que son las personitas más importantes que tengo en este momento.

A Mario Figueroa por ser mi compañero, mi apoyo incondicional y la persona con quien quiero compartir todos mis logros.

A mis abuelitas Lupita y Eva, las cuales me han dado su amor, a mi Tía Elvira por hacerme sentir bien cuando lo necesito.

A primos Karla que aunque ya no esta es inolvidable, Jaime, Silvia Areli y Ambar lo quiero mucho.

A mis amigos de toda la vida Renata, Rocío, Carlos y Lety quienes han compartido conmigo momentos felices y tristes a lo largo de mi vida.

A mis amigos de la carrera Enedina, Gaby Stern, Magas, Pepe, Gaby chiquita, Susa, Victor y todas las chicas (Naya, Jime, Abi, Chan, etc.) que estuvieron conmigo en el equipo de Basquetbol, ya que me hicieron pasar los mejores momentos en la Facultad de Química.

“Gracias Dios por darme la oportunidad de realizarme”

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	3
OBJETIVOS	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1 DESNUTRICIÓN EN MÉXICO	6
1.2 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL CACAHUNANO (<i>Gliricidia sepium</i>)	6
1.3 CONCEPTOS GENERALES SOBRE GRASAS Y ACEITES	8
1.4 PROCESAMIENTO DE GRASAS Y ACEITES	9
1.5 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS USADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES	12
1.6 METABOLISMO DE GRASAS Y ACEITES	15
1.7 CONSUMO MÍNIMO CONVENINTE DE GRASAS Y ACEITES	17
1.8 BIOENSAYOS NUTRITIVOS	18
1.9 DETERMINACIÓN DE ÍNDICES CALÓRICOS NUTRICIONALES	19
1.10 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA	21
1.11 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	24
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
2.1 RECEPCIÓN DE LA SEMILLA	27
2.2 MOLIENDA	28
2.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN CON HEXANO	28
2.4 REFINACIÓN DE LA GRASA	29
2.4.1 CLARIFICACIÓN	29

2.4.2 DESGOMADO	30
2.4.3 NEUTRALIZACIÓN	30
2.4.4 BLANQUEO	31
2.4.5 DEODORIZACIÓN	31
2.5 DENSIDAD CALÓRICA	32
2.6 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL ACEITE	34
2.7 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	34
2.8 BIOENSAYO	36
2.9 DETERMINACIÓN DE ÍNDICES CALÓRICOS NUTRIMENTALES	38
2.10 DETERMINACIÓN DEL APROVECHAMIENTO PROTEÍNICOS	40
2.11 OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	64

EVALUACIÓN NUTRITIVA DE LA GRASA DE LA SEMILLA DE CACAHUANANO

(*Gliricidia sepium*)

RESUMEN

La alimentación es una de las necesidades fisiológicas básicas de cualquier ser vivo, que tiene como finalidad satisfacer el reflejo biológico del hambre, sin embargo, existe evidencia donde la discrepancia entre el suministro de alimentos y el crecimiento en la población provocan problemas como la desnutrición, principalmente, en los países en desarrollo donde hay familias rurales, que con frecuencia, son los miembros más pobres de la sociedad y tienen una alimentación con bajo contenido energético.

Liener y un grupo de investigadores consideran que una solución a corto plazo, consiste en incrementar la producción de alimentos de origen vegetal y la búsqueda de nuevas fuentes que tengan una buena calidad nutricia, como son las semillas de oleaginosas, ya que éstas tienen una alta eficiencia en el aprovechamiento de la energía solar, y son más redituables en la producción de víveres para el hombre.

Las nuevas alternativas de alimentos de origen vegetal deben proporcionar un alto nivel de proteína, pero también es importante considerar el contenido de grasa, ya que este último es un nutrimento esencial en la dieta porque proporciona la mayor densidad energética (9 Kcal/g), suministra los ácidos grasos indispensables, es el vehículo de las vitaminas liposolubles y contribuye a la palatabilidad y saciedad de la comida.

Ante la problemática anteriormente mencionada, este trabajo tiene como finalidad proponer una nueva fuente de grasa comestible extraída de una semilla silvestre llamada cacahuanano (*Gliricidia sepium*), la cual se localiza en regiones en donde es muy frecuente encontrar un alto índice de desnutrición. Para cumplir con lo anterior, se realiza la evaluación nutritiva del material propuesto tomando como base estudios previos acerca

de la caracterización bromatológica de la semilla, en donde se reporta un porcentaje significativo de lípidos (21.5%), mientras que en el análisis toxicológico, se encuentra que la grasa es relativamente inocua.

Para tener un estudio completo de la evaluación nutritiva, se utilizó tanto la grasa cruda como el aceite refinado, posteriormente se obtuvo el aprovechamiento de la proteína en presencia de dichos materiales, así como de una dosificación diferente, para detectar la influencia de estas variables en el crecimiento de los animales de experimentación.

Los índices calóricos nutricionales obtenidos con la grasa y el aceite en estudio no mostraron diferencias al compararlas con el control (dieta elaborada con aceite de maíz), el aprovechamiento de la proteína por los animales de experimentación fue normal y el crecimiento de éstos, en todas las dosis, fue óptimo por lo que se concluyó que tanto la grasa cruda como el aceite refinado de la semilla de cacahuanano se pueden considerar como una nueva fuente potencial de grasa comestible

OBJETIVO GENERAL

Realizar la valoración nutricia de la grasa cruda y aceite refinado de la semilla de cacahuanano (*Gliricidia sepium*), para proponerla como una nueva fuente comestible de grasa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener suficiente grasa cruda y, consecuentemente, aceite refinado para realizar los bioensayos correspondientes.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos así como obtener el perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y el aceite refinado, para correlacionar éstos resultados con los del grupo oleico linoleico.
- Evaluar el potencial nutricional de la grasa cruda y aceite refinado mediante los parámetros clínicos y subclínicos obtenidos en un bioensayo.

1. ANTECEDENTES

1.1 DESNUTRICIÓN EN MÉXICO

En México, el hambre y la desnutrición son un problema ancestral. Particularmente en las zonas rurales se presenta un alto porcentaje de desnutrición proteínico-calórico, producida por una deficiencia de macronutrientes debido a que hay una ingesta insuficiente de alimentos, donde la deficiencia energética es más importante y más frecuente que la proteínica (**Com. Nac. Alim., 1990; Doode y Pérez, 1994**).

En estadísticas del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) en 1998, se reporta que la desnutrición es la causa número 10 de defunciones en nuestro país, presentándose en ese año 10 492 muertes. El Sistema de Vigilancia Epidemiológica en el 2001, considera que la desnutrición es una causa de enfermedad, ya que se encuentran 230.3 casos por cada 100 mil habitantes, además de tener un 6% de nacidos vivos con bajo peso al nacer. Éste último caso, aparece de forma más frecuente en los estados de Tlaxcala, Guerrero, Yucatán y Chiapas, entre otros, por lo que es necesario tomar acciones tendientes a una solución inmediata (**INEGI, 2000; INEGI, 2002**).

1.2 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL CACAHUNANO (*Gliricidia sepium*)

Además de la problemática de la desnutrición en el país, se ha observado que en los entornos indígenas, la vegetación silvestre se destruye en forma indiscriminada, con tal de obtener tierras adecuadas para el sistema de monocultivo o extensión ganadera, lo que pone en peligro el potencial de muchas especies silvestres, que hasta el momento, no han sido valoradas en su plenitud, por lo cual, es urgente caracterizar química y biológicamente estas especies, con el fin de visualizar su posible aprovechamiento integral y, de esta manera, incorporar a la alimentación la gran diversidad vegetal que

existe en el país disminuyendo a su vez, la importación de algunos alimentos de alto valor nutricional (Hernández y León, 1992; Doode y Pérez, 1994; Villela y Gérez, 1994).

Dentro de las especies vegetales más abundantes en el país se encuentran las leguminosas, las cuales pueden ser utilizadas tanto para la alimentación animal como humana, sin embargo, estos recursos están infrautilizados. Tal es el caso del cacahuanano (*Gliricidia sepium*) que es una planta que pertenece a esta familia botánica, perenne, de tamaño medio y raíces profundas. Se conoce comúnmente en distintas regiones del país con el nombre de "cacahuananche", "muiti", "madre de cacao", "lengua de perico", "mata ratón", y "cocuite" entre otros. La distribución de esta planta en el Gfo de México comprende desde Tamaulipas a San Luis Potosí, el Norte de Puebla y de Veracruz hasta Yucatán, mientras que en la vertiente del Pacífico se encuentra desde Sinaloa hasta Chiapas, incluso se menciona que es originaria del Sur de México y Centro América, desarrollándose en altitudes de 0 a 1 600 metros sobre el nivel del mar (Martínez, 1959; Martínez, 1987; Pedraza, 1994; Pennigton y Sarukhán, 1998).

Dentro de los usos de esta planta, se ha encontrado que provee de sombra a cultivos más delicados como el cacao, café, vainilla y té. También se le atribuyen propiedades bactericidas, fungicidas, insecticidas y rodenticidas, además se le asocia con ciertas propiedades medicinales, debido a que tiene un contenido apreciable de taninos, flavonoides y otros compuestos de interés terapéutico, de entre los cuales destaca la canavanina (aminoácido no proteínico con actividad antimicrobiana, pesticida y citotóxica) (Martínez, 1959; Lucas *et al*, 1988; Soto y Souza, 1995).

Estudios previos realizados en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM a la semilla integral de cacahuanano, reportan los siguientes datos del análisis proximal (Sotelo *et al*, 1986) (TABLA 1):

TABLA 1. Datos del análisis proximal de la semilla integral de cacahuanano.

COMPONENTES	SEMILLA CRUDA (g/100 g muestra)
HUMEDAD	5.8
PROTEÍNA CRUDA	39.3
EXTRACTO ETERO	21.5
FIBRA	6.3
CENIZAS	3.8
CARBOHIDRATOS	23.3

En el estudio toxicológico, éste material ha mostrado tener efectos nocivos por vía oral a corto y mediano plazo en animales de laboratorio, sin embargo, cuando la fracción lipídica se separa, manifiesta parámetros fisicoquímicos muy similares a los aceites comestibles, además de no presentar efectos tóxicos aún administrándose en dosis relativamente altas por vía oral (Lucas, 1985; Álvarez, 2002).

Generalmente, una grasa vegetal debe ser procesada para eliminar algunos componentes minoritarios indeseables y obtener, lo que en la industria alimentaria se conoce como, aceite vegetal refinado. A pesar de esto, hay que tomar en cuenta que en el procesamiento de un alimento primario se pueden producir efectos contrarios, es decir, componentes tóxicos ó antinutrimientales (Andersen y Williams, 1965; Bailey, 1979; Hui, 1996). Por consiguiente, es necesario realizar la valoración nutricia tanto de la grasa cruda como del aceite refinado de la semilla de cacahuanano, para tener mayores elementos que validen su potencial uso como fuente alternativa de grasa con fines comestibles (Gandhi *et al*, 1997; Wanasundara y Shaidi, 1998).

1.3 CONCEPTOS GENERALES SOBRE GRASAS Y ACEITES

Las grasas y aceites son sustancias hidrofóbicas, insolubles en agua, de origen vegetal o animal que están constituidas principalmente por ésteres de glicerol y ácidos grasos, llamados triacilgliceroles. Las grasas sólo se distinguen de los aceites por sus

puntos de fusión: a temperatura ambiente las grasas son sólidas, mientras que los aceites son líquidos. Las grasas pertenecen a un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos conocidos como lípidos, los cuales se caracterizan principalmente por su solubilidad en disolventes orgánicos. En este grupo, además de las grasas, se encuentran otros compuestos como ceras, fosfolípidos, esteroides, vitaminas liposolubles, glucolípidos, cerebrósidos y entre otros compuestos relacionados (Ziller,1996).

El término de ácidos grasos se aplica en general, a los ácidos carboxílicos que se encuentran formados por un grupo carboxilo unido al final de una cadena hidrocarbonada. La mayoría de los ácidos grasos presentes en la naturaleza tienen una cadena hidrocarbonada lineal formada por un número par de átomos de carbono. Todos aquellos ácidos grasos que no tienen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada se les denominan saturados, mientras que aquellos que si contienen dobles enlaces se les da el nombre de insaturados. Para el ser humano hay 2 ácidos grasos indispensables (no sintetizados por el organismo): el ácido linoleico (*cis, cis*-9,12-octadecadienoico) y el ácido α -linoleico (*cis, cis, cis*-9,12,15-octadecatrienoico). Se ha demostrado que el organismo puede sintetizar el ácido araquidónico (5,8,11,14-eicosatetranoico) a partir del ácido α -linoleico, mediante una serie de pasos que involucran la elongación de la cadena y deshidratación, por lo que este último no se considera como indispensable (Conca, 1995).

1.4 PROCESAMIENTO DE GRASAS Y ACEITES

La grasa vegetal directamente obtenida de la extracción con un disolvente orgánico se denomina grasa cruda. Esta grasa contiene impurezas solubles e insolubles que se encuentran en cantidades minoritarias y varían según la fuente de obtención. Por lo tanto, la grasa cruda se somete a un proceso de purificación tradicional o refinación, el cual

incluye como mínimo las siguientes fases: clarificación, desgomado, neutralización, blanqueo y deodorización (**Andersen y Williams, 1965; Bailey, 1979; Murphy, 1994**).

- **Clarificación:** La clarificación consiste en la eliminación de las impurezas insolubles como los fragmentos de semilla y tejidos celulares. Éstos pueden contener enzimas como lipasas, las cuales, en presencia de trazas de agua, hidrolizan los triacilgliceroles e incrementan el contenido de ácidos grasos libres. Además, en el proceso de refinación la presencia de estas impurezas aumenta las pérdidas de aceite refinado. Las operaciones más recomendadas para la clarificación son: asentamiento o sedimentación, filtración y centrifugación.

Las impurezas solubles se pueden encontrar en forma de solución verdadera o en un estado de suspensión coloidal. Todas aquellas sustancias que le imparten un efecto desfavorable en el aroma, apariencia, sabor, color y estabilidad deben eliminarse, dando así, características de aceptabilidad al aceite refinado (**Andersen y Williams, 1965; Bailey, 1979; Ziller, 1996**).

- **Desgomado:** Este proceso se usa para eliminar las gomas, resinas, proteínas y fosfolípidos. Se puede llevar a cabo por dos sistemas: el primero consiste en flocular de forma aislada los fosfátidos como la lecitina y la cefalina, para su recuperación y obtención posterior, ya que cuentan con cierto valor comercial. Este es el caso de las grasas crudas, las cuales proporcionan niveles relativamente altos (1.5-2.5 %) de éstos compuestos y son solubles en el aceite sólo en su forma anhidra, por lo que pueden precipitar por simple hidratación agregando de 2 a 3% de agua. Además, este proceso se puede optimizar adicionando ácido cítrico o fosfórico. El segundo sistema se realiza mediante un tratamiento generalizado sin separación específica de fosfátidos, ya que hay

grasas que contienen un nivel bajo de éstos compuestos y la separación se lleva a cabo adicionando ácido fosfórico al 0.05-0.2 %, para posteriormente someter la grasa a una temperatura de 90-150 °C (Hui, 1996; Ziller, 1996).

- **Neutralización:** El término neutralización generalmente se aplica en la operación de eliminar los ácidos grasos libres y, por tradición, esto se realiza utilizando bases tales como sosa cáustica o calhidra. A pesar de que el objetivo principal de esta etapa es eliminar los ácidos grasos libres es inevitable que otros compuestos minoritarios como fosfátidos, proteínas, carbohidratos, ceras y gomas sean separados por la presencia de una fase acuosa y un pH alcalino (Lawson, 1999).

Las grasas crudas siempre tienen un contenido de ácidos grasos libres produciendo acidez en éstas. El aumento de la acidez se debe evitar lo más posible, puesto que causa graves pérdidas en el proceso de refinación y desencadena reacciones de deterioro. El método más común de neutralización consiste en el empleo de un álcali de concentración conocida, el cual se mezcla con el aceite, se calienta entre 75 a 95°C y después se deja sedimentar la fase acuosa, para posteriormente separar esta fase jabonosa y proceder a lavar el aceite varias veces con agua caliente (Andersen y Williams, 1965; Bailey, 1979; Ziller 1996).

- **Blanqueo:** Ésta es una operación importante en la refinación ya que elimina el material colorante que normalmente está constituido por carotenos, xantofilas, clorofilas, gopipol y antocianinas, entre otros, que pueden ser productos de degradación de los colores naturales o, el resultado del procesamiento previo o inadecuado almacenamiento. El blanqueo es un proceso físico que consiste en mezclar un material adsorbente y calentar (aproximadamente a 85 °C) para que éste tenga una mayor actividad. Los materiales

adsorbentes que normalmente se utilizan son tierra o arcilla naturales. Actualmente, éstos han sido sustituidos por arcillas o tierras activadas químicamente, los cuales tienen un mayor poder decolorante (**Andersen y Williams, 1965; Bailey, 1979**).

- **Deodorización:** La deodorización es la operación del refinamiento que consiste en eliminar las sustancias que imparten olores y sabores indeseables a la grasa. No todas las grasas requieren de este proceso, sin embargo, es recomendable dado que las características naturales se pueden afectar por cambios durante el almacenamiento o procesado previo.

Este proceso, en la práctica, se lleva a cabo por destilación con arrastre de vapor de agua a presión reducida (parcial vacío), y a temperaturas relativamente altas. Generalmente la presión de vapor de los compuestos odoríferos es relativamente baja y se requieren por lo tanto, de temperaturas muy elevadas si la destilación se realiza a presión atmosférica, de ahí, la necesidad de regular esta operación con un buen vacío y una corriente de un gas inerte para abatir la temperatura de destilación y así evitar descomposición de la grasa neutra.

La deodorización no tiene efectos significativos sobre la composición en los ácidos grasos de la mayoría de los aceites y grasas. En el caso de los aceites vegetales, el contenido final de tocoferoles es suficiente para asegurar su estabilidad (**Andersen y Williams, 1965; Bailey, 1979; FAO/OMS, 1993; Ziller, 1996**).

1.5 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS USADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES

La identidad y pureza de las grasas puede determinarse mediante diversas técnicas físicas y químicas, siendo las principales el punto de fusión, el índice de

refracción, yodo y saponificación. Puesto que en las grasas naturales, la composición en ácidos grasos puede variar de muestra en muestra, ninguno de los valores analíticos anteriores son datos puntuales e inflexibles. Por ello, es común definir, para las diversas grasas, los límites superiores e inferiores de los diferentes valores. A continuación se define cada una de los parámetros más usados:

- **Gravedad específica:** Se define como la masa de grasa o aceite por unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico a una temperatura dada. Se determinada con la ayuda de un picnómetro previamente calibrado. (Pearson, 1998).

- **Punto de fusión:** Este parámetro se encuentra limitado en los aceites vegetales, ya que estos, en general, son líquidos a la temperatura ambiente. Las grasas y aceites son mezclas de varios triglicéridos, entre otros componentes, los cuales, no tienen un punto de fusión definido, pero si tienen un intervalo de temperatura a la cual fusionan todos. Para realizar esta determinación, se utiliza principalmente el método del capilar. Éste método consiste en llenar el capilar aproximadamente 10 mm de longitud con la muestra, luego se cierra por sus extremos, después se deja solidificar por 16 horas a una temperatura de refrigeración (4-10 °C). Posteriormente, se fija a un termómetro y se sumerge en un baño de agua, la cual se calienta gradualmente, y se observa el intervalo de temperatura al que el capilar se torna claro (Pearson 1998; Álvarez, 2002).

- **Índice de refracción:** En este proceso se mide la desviación de un haz de luz al pasar del aire, a un medio líquido. En términos matemáticos, es la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción. Esta determinación se realiza con un

refractómetro ABBE o con Butirorefractómetro. La temperatura de referencia para los aceites es de 25 °C y para las grasas es de 40 °C (Akon y Min, 1998).

- **Índice de yodo:** Proporciona una estimación del grado de insaturación de las grasas extraídas. Bajo determinadas condiciones el yodo es cuantitativamente introducido en los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados y triglicéridos. El método más utilizado para determinar este parámetro es el Método de Hanus (Pearson, 1998).

- **Índice de saponificación:** Se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio que se requieren para hidrolizar los ácidos grasos libres y combinados, de un gramo de grasa. La grasa se introduce en un sistema de reflujo con 50 mL de KOH 0.5 M en alcohol al 90%, durante 30 minutos. Después, se titula con HCl 0.5 M usando fenoftaleína como indicador.

- **Índice de acidez:** Es el número de miligramos de KOH alcohólica requerida para neutralizar los ácidos grasos libres de 1g de aceite o grasa. Se determina mediante la disolución de la grasa en éter etílico y etanol neutralizados, y se titula con álcali valorado (KOH 0.1N), usando fenoftaleína como indicador (Pearson, 1998; Álvarez, 2002).

- **Índice de Peróxidos:** Es útil para identificar los compuestos de deterioro iniciales en el aceite. Se realiza inicialmente disolviendo la muestra con ácido acético y cloroformo, posteriormente se adiciona KI (sólido o en solución) y se mantiene en la obscuridad por un minuto. El yodo liberado se titula con tiosulfato de sodio, usando almidón como indicador (Akon y Min, 1998; Álvarez, 2002).

- **Perfil de ácidos grasos:** Aunque los índices precedentes son útiles para caracterizar las grasas, la información que proporcionan sobre su valor nutritivo es limitada. Al referirse a la calidad de la grasa, hay que tener en consideración dos criterios principales: (1) el contenido de ácidos grasos indispensables y, (2) la proporción de ácidos grasos insaturados, teniendo mayor importancia los ácidos grasos poliinsaturados (**Álvarez, 2002**). Para realizar esta determinación, se emplea la cromatografía de gas-líquido, la cual, de manera muy eficaz, nos indica la composición y proporción de cada uno de los ácidos grasos de aceite en estudio.

Normalmente, la muestra es sometida a una esterificación para obtener compuestos más volátiles que proporcionen resultados más precisos. La muestra se introduce a través de la válvula de inyección, es absorbida por la fase estacionaria en la columna del cromatógrafo y posteriormente se volatiliza. El gas acarreador inerte (helio, argón, nitrógeno o hidrógeno), al fluir por la columna a una velocidad fija, arrastra los ácidos grasos. El desplazamiento de éstos, varía dependiendo del grado de afinidad que tengan con la fase estacionaria, así como de su peso molecular. Para la detección y cuantificación de los ácidos grasos se emplea la técnica de ionización de flama, en donde el compuesto que eluye, al mezclarse con el hidrógeno (gas acarreador), se ioniza y a su vez conduce la electricidad. La conductividad del hidrógeno es despreciable, por lo que la corriente generada corresponde a la ionización del ácido graso, la cual es amplificada y representada en forma gráfica por el registrador. Para mejorar la separación es conveniente tener una rampa de temperaturas (**Muller y Tobin, 1986**).

1.6 METABOLISMO DE GRASAS Y ACEITES

El metabolismo de las grasas y aceites inicia desde la cavidad bucal. La lipasa lingual hidroliza los triglicéridos, generando digliceroles y ácidos grasos libres.

Posteriormente, en el tracto gastrointestinal, la lipasa gástrica hidroliza los productos generados anteriormente a monogliceroles y más ácidos grasos. Éstos productos de la digestión, junto con las sales biliares, forman una estructura micelar que se desplaza hacia la membrana de la célula epitelial intestinal. Ahí, los ácidos grasos y los monogliceroles se absorben en el interior de las células. Los ácidos biliares son retenidos en la luz intestinal. Entre un 95 y 100 % de las grasas de la dieta son absorbidas. En la pared intestinal, los monogliceroles y ácidos grasos libres son reconvertidos a triglicéridos. Los ácidos grasos que contienen 10 o menos átomos de carbono (triglicéridos de cadena media), son transportados vía portal hasta el hígado, donde se metabolizan rápidamente. Los triglicéridos con ácidos grasos de más de 10 átomos de carbono (triglicéridos de cadena larga) son transportados vía linfática. Éstos, endógenos o procedentes de la dieta, se transportan por la sangre en forma de lipoproteínas y se almacenan en el tejido adiposo hasta su requerimiento como fuente de energía. La cantidad de grasa acumulada depende del equilibrio energético del organismo en su conjunto. El exceso energético en la dieta, independientemente si procede de la grasa, carbohidratos o proteínas, se almacena como grasa. Es común observar que cantidades apreciables de carbohidratos y proteínas son almacenadas en esta forma. El organismo puede sintetizar ácidos grasos saturados y monoinsaturados por modificación de otros o a partir de hidratos de carbono y proteínas. Sin embargo, ciertos ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico no pueden ser fabricados por el organismo, por lo que deben ser suministrados en la dieta (FAO/OMS, 1993; Ziller, 1996).

La grasa se moviliza del tejido adiposo a la sangre como ácidos grasos libres. Éstos forman complejos con proteínas plasmáticas, las cuales los distribuyen por todo el organismo. La oxidación de ácidos grasos libres es una fuente de energía de primer orden para el organismo. Se ha demostrado que todas las grasas de la dieta poseen el mismo

valor calórico. El establecimiento de una vía común de β -oxidación por la ruta del acetato, independientemente de que el ácido graso sea saturado, monoinsaturado o poliinsaturado, si contiene dobles enlaces *cis* o *trans*, indica que el valor calórico es el mismo (Ziller, 1996).

1.7 CONSUMO MÍNIMO CONVENINTE DE GRASAS Y ACEITES

Existen tres factores mayoritarios del gasto de energía que deben ser considerados para la determinación adecuada de las necesidades energéticas. Estos factores son: (a) la velocidad metabólica basal, la cual se refiere al gasto de la energía relacionada con el metabolismo que tiene lugar, principalmente, en la masa corporal magra, (b) la termorregulación, que es la capacidad del organismo para mantener la temperatura corporal interna (37 °C) y externa (33 °C) y, (c) el ejercicio físico, que es la cantidad de energía gastada en una actividad corporal que dependerá de varios factores, como son, el tipo y tiempo del ejercicio, así como la eficiencia metabólica del individuo.

Con base a lo anterior, se ha determinado una recomendación general (Ingestión Mínima Recomendada) propuesta por FAO/ OMS en 1993, la cual indica que:

- En adultos, las grasas ingeridas en la alimentación deben aportar al menos el 15 % de su consumo energético.
- En mujeres en edad fértil, se deben obtener al menos el 20 % de sus necesidades energéticas en forma de grasas.
- Finalmente, en niños pequeños, durante el destete y al menos hasta la edad de dos años, la alimentación infantil debe de contener del 30 al 40 % de la energía en forma de grasas, y aportar niveles de ácidos grasos indispensables similares a los que se encuentran en la leche materna, la cual contiene aproximadamente 56 % de ácidos

grasos insaturados [monoinsaturados (2.2-6.04 g/L) y de cadena larga (0.56-1.65 g/L)] (FAO/OMS, 1993; Schanler, 2001).

1.8 BIOENSAYOS NUTRITIVOS

La calidad de los nutrimentos de un alimento o dieta se puede evaluar determinando su composición química. Aunque estas estimaciones son muy útiles, no siempre se puede predecir adecuadamente la verdadera calidad biológica de un alimento. Por ejemplo, normalmente la evaluación química no considera la posibilidad de pérdidas de algún nutrimento a consecuencia de una deficiente absorción. Por lo que solamente midiendo la respuesta, en un modelo biológico, se puede obtener una verdadera estimación de la calidad (Muller y Tobin, 1986).

En las pruebas biológicas, se requiere que los animales de laboratorio cumplan las siguientes características: (1) Que se encuentren totalmente sanos, (2) que pertenezcan a la misma cepa, (3) que el intervalo de su peso sea el recomendado y, (4) que de preferencia sean del mismo sexo. Además se debe contar con el espacio e infraestructura adecuada para preservar las condiciones óptimas que permitan el pleno desarrollo durante el tiempo de experimentación.

Un factor importante en los bioensayos nutritivos es la ración o tipo de dieta que se suministra. Las dietas proporcionadas a los animales de experimentación contribuyen de manera sustancial en los resultados experimentales, ya que sus componentes, pueden afectar numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos en los animales del laboratorio (Gay, 1965).

Algunas dietas especiales son requeridas con frecuencia con la intención de evidenciar un determinado efecto, y que los resultados puedan ser interpretados

adecuadamente. En este contexto, es de gran importancia considerar el tipo de ingredientes que deben incluirse en la dieta.

Se recomienda que las dietas para los animales de laboratorio contengan aproximadamente 50 nutrientes en un balance adecuado, y se les debe proporcionar suficiente agua (**National Reserch Council, 1978**).

Hay aproximadamente 14 vitaminas, 10 aminoácidos y 18 minerales que son indispensables para el mantenimiento adecuado de la vida del hombre y de la mayoría de los animales del laboratorio. Además, una dieta completa debe incluir una porción de fibra dietética, la cual, en los animales monogástricos, no tiene un aporte energético, pero si contribuye a una adecuada digestión de bolo alimenticio (**Gay, 1965; National Reserch Council, 1978**).

El tipo de dieta recomendada para evaluar el efecto de la variación de un nutriente específico, es la dieta purificada, la cual está elaborada con ingredientes refinados. Por ejemplo, la caseína y el aislado de proteína de soya, son una fuente exclusiva de proteína; el azúcar y el almidón, son una fuente de carbohidratos; el aceite vegetal, como el de maíz, es una fuente de grasa; la celulosa comercial es una fuente de fibra cruda; y, las sales inorgánicas químicamente puras y vitaminas también son adicionadas a este tipo de dietas. El costo de estas dietas es relativamente alto y se ha observado que no son consumidas rápidamente por todos los animales (**National Reserch Council, 1978**).

1.9 DETERMINACIÓN DE ÍNDICES CALÓRICOS NUTRICIONALES

Para realizar la evaluación de nutritiva de una grasa se tienen que determinar los siguientes índices calóricos nutricionales:

- **Índices calóricos:** El contenido energético de un alimento se determina mediante un procedimiento en el que se utiliza la bomba calorimétrica balística. El principio de este sistema consiste en la ignición eléctricamente de una cantidad de muestra desecada, dentro de una atmósfera de oxígeno. El calor producido es transferido por conducción a un capuchón de acero inoxidable, el cual tiene un termopar de alta sensibilidad. El resultado obtenido de esta determinación se compara con el producido por una sustancia estándar (ácido benzoico), que tiene un contenido energético conocido. La energía liberada por la ignición de una muestra se conoce como calor de combustión **(Muller y Tobin, 1986; Molinar, 1988)**.

El calor de combustión de una muestra de dieta es la energía ingerida, sin embargo, ésta no representa la energía total utilizada por el organismo, puesto que existen pérdidas a causa de materiales no digeribles, como son la fibra, los aminoácidos y los carbohidratos no absorbidos, así como los metabolitos de desecho: Todos estos son excretados en heces y orina, los cuales contienen cantidades significativas de energía que puede ser cuantificada. Para estimar correctamente la energía utilizable o energía digerible (ED) por el animal, es necesario realizar una prueba biológica. Las heces y la orina se recogen de forma separada y se determina su contenido energético. Este valor se resta al valor de la energía ingerida obtenido a partir de la dieta **(Figura 1) (Conca, 1995)**.

También se puede obtener la eficiencia energética, la cual se calcula haciendo la relación de la ganancia de peso entre la energía ingerida total consumida durante todo el bioensayo, tomando en cuenta la proporción de nutrimentos no digeribles **(Muller y Tobin, 1986; Conca, 1995)**.

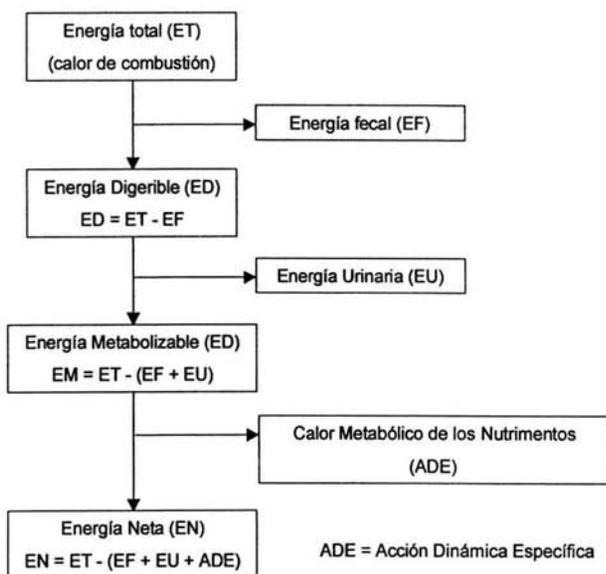


Figura 1. Diagrama esquemático de utilización de la energía por organismos vivos.

1.10 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA

Debido a la íntima relación que tienen los diferentes nutrientes en el metabolismo energético, en particular, en el aprovechamiento de la proteína de la dieta de acuerdo a la fuente de grasa, se hará la revisión bibliográfica de la evaluación nutritiva de una fuente proteínica. De esta manera, se puede observar si la grasa por evaluar tiene algún efecto sobre la cantidad de proteína aprovechada por el organismo en el bioensayo nutricional.

Para la evaluación nutritiva de una proteína se obtienen los siguientes parámetros:

- **Relación de Eficiencia de la Proteína (REP):** Es el más simple de los parámetros a evaluar. Se define como la ganancia en peso por gramo de proteína ingerida:

$$REP = \frac{\text{ganancia en peso}}{\text{proteína ingerida}}$$

Durante el bioensayo se proporciona una dieta con una cantidad de 100 g de proteína por cada Kg de alimento. Los animales de experimentación se alimentan durante cuatro semanas a partir del destete. Si existen problemas en la palatabilidad (rechazo organoléptico) en el periodo del ensayo, este parámetro se puede evaluar con sólo dos semanas de alimentación. Las variables que se monitorean en esta prueba son la ganancia de peso y alimento ingerido. Los valores del REP pueden variar dependiendo del tipo de aminoácidos que contiene la proteína, la extirpe y el sexo de la rata, la experiencia y destreza del operador, el alojamiento y la temperatura del bioterio. Para evitar errores en la determinación, algunos investigadores sugieren realizar una dieta adicional, llamada dieta control, en donde la fuente de proteína es la caseína. En esta dieta se obtiene un REP de 2.5. Con este valor se pueden ajustar los valores experimentales determinando de esta forma un REP ajustado, y este valor sí es comparable con otros bioensayos (Muller y Tobin, 1986).

- **Valor biológico (VB):** Es la proporción de nitrógeno retenido con base al nitrógeno absorbido, y se representa:

$$VB = \frac{\text{nitrógeno retenido}}{\text{nitrógeno absorbido}}$$

Este parámetro constituye un índice de la calidad de la proteína, es decir, de cómo las proporciones relativas de los aminoácidos satisfacen las necesidades del organismo. Se mide el nitrógeno ingerido, así como el nitrógeno de orina y heces de las ratas tras un

período de adaptación de al menos cinco días. Para esto se utiliza el método Kjeldahl¹ y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$VB = \frac{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} + N \text{ urinario})}{N \text{ ingerido} - N \text{ fecal}}$$

La fórmula anterior corresponde al Valor Biológico aparente (VB), puesto que no toma en cuenta el nitrógeno fecal metabólico ni el nitrógeno urinario endógeno, ya que éstos son valores independientes del alimento problema.

- **Utilización Neta de Proteína (UNP):** Debido a la dificultad de realizar estimaciones tales como el Valor Biológico, Bender y Miller introdujeron en 1953 un nuevo método basado en el análisis de la canal. El método expresa la retención de nitrógeno en proporción al nitrógeno ingerido y el valor se denomina Utilización Neta de Proteína (UNP).

$$\%UNP = \frac{\text{nitrógeno retenido}}{\text{nitrógeno ingerido}} * 100$$

Su utilidad reside no sólo en la simplicidad del método, sino también en que el valor obtenido expresa el grado de absorción de la proteína, así como la proximidad entre los aminoácidos absorbidos y los requeridos.

La técnica elimina la necesidad de recoger y analizar heces y orina, con los problemas inherentes al uso de jaulas metabólicas. Las ratas se alimentan con la proteína problema o con una dieta exenta de proteína, durante un período mínimo de diez días. Al término de este período, los animales se sacrifican y se determina su nitrógeno corporal por la técnica de Kjeldahl. (Muller y Tobin 1986; Álvarez, 2001)

¹ ANEXO I. Descripción del fundamento y procedimiento del método Kjeldahl

1.11 PARÁMETROS HEMÁTOLÓGICOS.

Además de los cuidados obligatorios que requiere el manejo de animales de laboratorio y las condiciones de trabajo estandarizadas, se requiere verificar el estado de salud de los animales de prueba, con el fin de reducir las posibles causas de variabilidad de los resultados durante el experimento. Uno de éstos análisis indispensables es el hematológico (Gay, 1995).

La manera más común de tomar la muestra en ratas o ratones, es mediante de un sangrado ocular con capilares. La sangre se colecta en tubos Microtiner® que contienen EDTA como anticoagulante. De 300 a 400 μL son suficientes para realizar la citometría hemática (Álvarez, 2001).

Los instrumentos más comúnmente empleados para la determinación de la citometría hemática son los autoanalizadores, los cuales son capaces de realizar la lectura automática de los diferentes parámetros hematológicos y citométricos como son: conteo de serie blanca (leucocitos), conteo de serie roja (eritrocitos), hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (MCV), hematocrito y plaquetas, entre otros.

A continuación se presenta una descripción general de parámetros hematológicos (TABLA 2). Se observan los valores normales de los parámetros hematológicos de ratas Wistar de peso entre 180-250 g (Derelanks y Holliner, 1995).

TABLA 2. Valores normales de los parámetros sanguíneos en ratas Wistar.

Parámetro	Unidades	Promedio	Intervalo
Leucocitos (WBC)	1000/ μL	9.92	8.00 a 11.8
Eritrocitos (RBC)	1×10^6 / μL	8.95	8.15 a 9.75
Hemoglobina (Hb)	g/dL	14.6	13.4 a 15.8
Volumen corpuscular medio (MCV)	(%)	47.4	44.4 a 50.4
Plaquetas	No. Pla./ μL	340	150 a 450

- **Leucocitos (WBC):** Su valor expresa posibles infecciones por bacterias, virus o parásitos, infecciones agudas e intoxicaciones, entre otros. Cuando se encuentran valores por arriba de los normales, se considera una leucocitosis, mientras que cuando se observan valores menores a los normales, de una leucopenia. El número de leucocitos varía dependiendo de diversos factores entre los cuales destacan la edad, peso y sexo, entre otros.

- **Eritrocitos o glóbulos rojos (RBC):** Su función es principalmente el transporte de oxígeno por todo el cuerpo. Es importante mencionar que este parámetro no debe de ser considerado único para declarar la presencia de anemia en caso de encontrarse valores menores a los normales, ya que dichos los niveles pueden modificarse por diversos factores externos.

- **Hemoglobina (Hb):** Representa la cantidad presente de éste complejo proteico por unidad de volumen. Este parámetro debe ser el único empleado para definir la existencia de anemia en presencia de cifras menores a los valores normales.

- **Volumen Corpuscular Medio (MCV):** Se mide en femtolitros (fL). Se considera el parámetro más importante de la serie roja ya que permite saber si la anemia es macrocítica (valores mayores de MCV a los normales) o microcítica (valores menores de MCV a los normales).

- **Hematocrito:** Representa la proporción de eritrocitos totales en la sangre. Se mide en porcentaje por unidad de volumen de sangre (%/mL). Este parámetro no se mide directamente, sino que se calcula a partir de la medición de los eritrocitos y del volumen

corpúscular medio, por cual es un parámetro con menor exactitud que el de la hemoglobina y los glóbulos rojos

- **Plaquetas:** Su principal función es intervenir en los procesos de coagulación sanguínea. Cuando el número de plaquetas se encuentra por arriba del normal, se habla de trombocitosis (Ruiz, 1998).

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la **Figura 2²** se muestra la metodología seguida en este estudio.

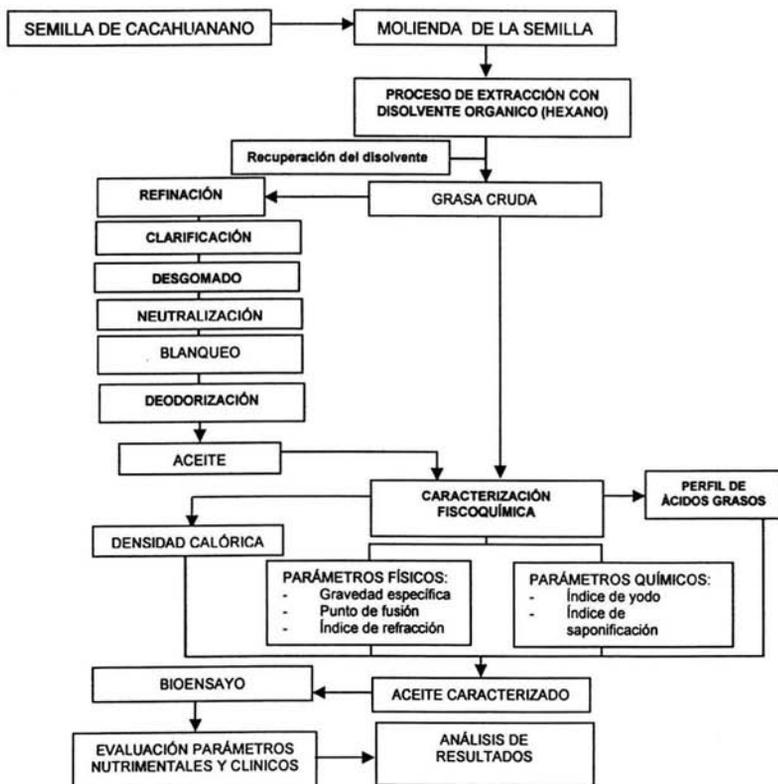


Figura 2. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.

2.1 RECEPCIÓN DE LA SEMILLA

La semilla se recolectó en la zona sur de nuestro país, en el estado de Guerrero, región de Tierra Caliente, donde se encuentran los árboles silvestres (Figura 3) de éstos se toman las vainas las cuales contienen la semilla de cacahuanano.



Figura 3. Planta de cacahuanano (*Gliricidia sepium*).

Las vainas son llevadas al lugar de experimentación (Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM). Posteriormente, se secan en una estufa a una temperatura de 60 °C para evitar la formación de hongos y facilitar la obtención de la semilla, la cual, se guarda en botes de plástico adecuadamente etiquetados con el peso total de la muestra y la fecha de recolección, en tanto que la vaina se almacena en recipientes para otros estudios.

² ANEXO II Descripción del material de las técnicas: molienda, extracción, refinación del aceite y densidad calórica.

2.2 MOLIENDA

La semilla integral se fracciona utilizando un molino THOMAS WILEY Modelo 4, hasta obtener una harina con tamaño de partícula de 2 a 3 mm. La cantidad que se somete a este proceso es la suficiente como para extraer la grasa requerida en las determinaciones experimentales propuestas.

2.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN CON HEXANO

Inicialmente se monta el dispositivo tipo Soxhlet para realizar la extracción. En la **Figura 4** se muestra el dispositivo utilizado:

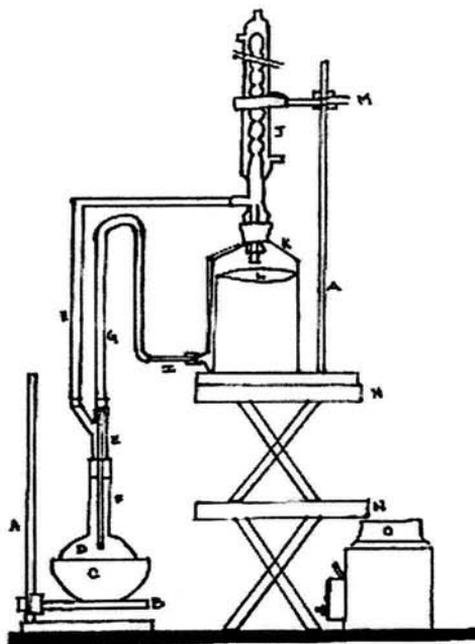


Figura 4. Dispositivo tipo Soxhlet con: A= soportes universales, B= anillo metálico, C= canastilla de calentamiento, D= matraz de bola de 4L, E= codo con dos cabezas, F= tubos de vidrio 3 x 5 mm, G= tubo de vidrio en forma de U de 20 x 5 cm, H= tubo de vidrio de 40 x 18 cm, I= tubo de vidrio de 10 cm, J= refrigerante, K= frasco de vidrio con salida en el fondo, L= papel filtro, M= pinzas, N= soportes, O= reóstato.

Se coloca la semilla a extraer, previamente fraccionada, en el recipiente de vidrio de 4L, el cual, tiene un cartucho elaborado con papel filtro. Después el matraz de bola de 4L se llena aproximadamente a la mitad del volumen del total con el disolvente (hexano). Se debe cuidar que el matraz que contiene el disolvente nunca este vacío durante el proceso de extracción. La temperatura del proceso se debe de mantener alrededor de 60°C y el tiempo de la extracción debe ser el necesario, hasta que el disolvente no presente ninguna coloración. Este proceso se llevó a cabo en aproximadamente 18 horas.

Posteriormente se elimina todo el disolvente, utilizando un rotaevaporador a presión reducida, para obtener la grasa, la cual, al final de este proceso, no debe presentar olor a hexano.

La grasa se divide en dos lotes para que una proporción sea almacenada con N₂ (gas) a temperatura de refrigeración y la fracción restante se someta al proceso de refinación que a continuación se describe.

2.4 REFINACIÓN DE LA GRASA:

El refinado produce un aceite comestible con las características deseadas por los consumidores, como el sabor y olor suave, aspecto limpio, color translucido, estabilidad frente a la oxidación e idoneidad para freír. Los pasos fundamentales se describen a continuación:

2.4.1 CLARIFICACIÓN

Se deja reposar la grasa obtenida, de tal forma que todas las partículas visibles se sedimenten y por decantación se eliminan.

2.4.2 DESGOMADO

Los aceites crudos que poseen niveles relativamente altos de fosfátidos, lecitina, cefalina, proteínas o sus productos de degradación, complejos metálicos y gomas, son solubles en el aceite sólo en su forma anhidra y se pueden eliminar por precipitación con una simple hidratación, calor y agitación. Al agitar, las sustancias se hidratan y precipitan formando un floculo viscoso insoluble en el aceite. Este floculo se deja sedimentar y después se separan por centrifugación. El desgomado se puede mejorar agregando ácido cítrico o fosfórico o gel de sílice.

El primer paso es determinar el volumen de aceite a refinar, el cual será el volumen de referencia (100 %). El aceite se mezcla con ácido fosfórico al 0.1 % en un matraz Erlenmeyer, la cantidad de ácido que se agrega es del 3 % con respecto al volumen de referencia (100%). Después la mezcla es calentada a una temperatura 60 °C durante 5 minutos con agitación; cuando la muestra está a temperatura ambiente, se centrifuga a 2 400 r.p.m. durante 15 minutos para precipitar y separar por decantación los residuos del desgomado del aceite.

2.4.3 NEUTRALIZACIÓN

El aceite desgomado es tratado con un álcali para eliminar los ácidos grasos libres, glicerol, hidratos de carbono, resinas, metales y proteínas. El aceite se mezcla con sosa cáustica y calentamiento, convirtiendo los ácidos grasos en jabones solubles en agua. La solución jabonosa se separa entonces del aceite por sedimentación o por centrifugación. El jabón acumulado es removido por medio de lavados con agua caliente. El agua de lavado se separa del aceite también por sedimentación o centrifugación.

El aceite previamente desgomado es colocado en una parrilla con agitación constante, se le adiciona hidróxido de sodio al 15 % hasta neutralizar. Inmediatamente, el

aceite neutro se sitúa en un tripié y se calienta a 50 °C durante 5 minutos. Cuando el aceite se encuentre a temperatura ambiente se centrifuga a 2 400 r.p.m. durante 20 minutos y se decanta, después éste es mezclado con agua destilada en una proporción del 10 % con respecto al volumen de referencia (volumen de aceite a refinar), y se somete a una temperatura de 80 °C durante 5 minutos. Por último, se deja enfriar a temperatura ambiente y se centrifuga nuevamente a 2 400 r.p.m. durante 25 minutos y se decanta.

2.4.4 BLANQUEO

Durante el blanqueo trazas de metales, partículas coloridas como la clorofila, jabones y productos de la oxidación son removidos. La eliminación completa de los colorantes puede llevarse a cabo calentando el aceite y tratándolo con adsorbentes, como son las tierras de diatomeas o el carbón activado.

Se mezcla el aceite con 2 % de carbón activado y con 0.5 % de silicato de aluminio. Los porcentajes de estos compuestos son con respecto al volumen de referencia (aceite a refinar). La mezcla es calentada a una temperatura de 90 °C durante 5 minutos con agitación constante, después, el aceite se filtra al vacío con papel Whatman #541 en un embudo STM de poro "M" ó se puede filtrar con doble papel filtro Whatman #541, hasta que el aceite se observe totalmente translucido y, en caso de que éste presente turbiedad o partículas de carbón activado, se reitera el proceso de filtración.

2.4.5 DEODORIZACIÓN

La deodorización se lleva a cabo mediante una destilación con vapor de agua a presión reducida con el objeto de eliminar compuestos volátiles presentes en cantidades traza, los cuales proporcionan olores o sabores no deseables. Este proceso no tiene

efectos significativos sobre la composición de ácidos grasos además asegura la estabilidad del aceite porque la cantidad de tocoferoles es suficiente en el producto final.

Para llevar a cabo este proceso se requiere el sistema que a continuación se describe:

- Es necesario contar con un rotaevaporador. Las mangueras del refrigerante se deben de conectar de la siguiente forma: una manguera va conectada del refrigerante hacia la llave de agua, otra va del refrigerante hacia la llave de vacío, y por último, se debe de conectar una manguera del refrigerante hacia un tanque de N_2 para crear una atmósfera inerte y de esta manera, evitar reacciones de oxidación en el aceite durante el proceso.
- Además se debe de contar con un baño de aceite mineral y como el rotaevaporador sólo tiene baño de agua, éste es sustituido por una parrilla de calentamiento, la cual, tiene un recipiente de aluminio donde se coloca el aceite mineral y se procede a calentar para llegar a una temperatura aproximada de $120\text{ }^\circ\text{C}$.

Una vez montado el equipo se ajusta el flujo de N_2 , se abre la llave de agua y la del vacío, la muestra a deodorizar se coloca en un matraz de bola y se conecta con el refrigerante para que se realice la destilación. El tiempo del proceso es diferente para cada tipo de aceite y depende de la cantidad de compuestos volátiles que la muestra presente, en el caso del aceite de cacahuanano fue de una hora, éste se determinó de forma experimental.

2.5 DENSIDAD CALÓRICA:

El principio en el cual se basa la determinación del contenido energético de una muestra en la bomba calorimétrica es el de la primera ley de la termodinámica, la cual se fundamenta en el enunciado: "la energía en cualquier proceso físico y químico no se crea

ni se destruye solo se transforma". En este proceso, hay una conversión de la energía química a energía térmica la cual se transforma a una señal eléctrica detectada por un equipo de alta sensibilidad.

La cantidad de muestra que se debe de utilizar se determina tomando en cuenta que la calibración del termopar (dispositivo de alta sensibilidad que detecta la señal eléctrica) no es lineal y fluctúa por encima de una temperatura límite, por lo que se sugiere que el contenido energético liberado por una muestra sea de aproximadamente 16 KJ (4.0 Kcal), por lo tanto, para materiales como el aceite y las heces (contenido energético alto), se pesan 0.4 g, mientras que para muestras como las dietas y orina (contenido energético bajo) se pesan 1.5 g. Además, en cada caso se puede pesar un exceso aproximado del 10 % respecto a su peso inicial. Es importante mencionar también que las muestras deben estar totalmente homogéneas.

La cantidad de muestra se pesa en un crisol tarado junto con una mecha de algodón compactándose todo perfectamente con un instrumento llamado "mango", de tal manera que la mitad de la mecha queda dentro de la muestra. Toda la determinación desde que se pesa la muestra hasta que se hace la ignición se realiza de forma individual para evitar una gran variabilidad en las lecturas, además es recomendable esperar el tiempo suficiente para que el equipo se enfríe completamente.

El crisol se coloca en la base superior del pilar central de la bomba y, con mucho cuidado, se introduce la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición. Se coloca el cilindro o capuchón, las mangueras se conectan así como el termopar y se abre el oxígeno. Se oprime el botón de ignición y de 10 a 15 segundos se realiza la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro y obteniéndose posteriormente, una señal en la escala del galvanómetro. Se debe observar con atención el movimiento del indicador en el galvanómetro, ya que el valor máximo alcanzado es

directamente proporcional al calor liberado en la combustión y éste al contenido energético.

2.6 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DEL ACEITE

Se determinaron los siguientes parámetros:

- Físicos:

Gravedad específica o densidad aparente (Método 28.008, AOAC, 1995)

Índice de refracción (Método 28.011, AOAC, 1995)

Punto de fusión (Tubo de capilaridad, Método 28.014, AOAC, 1995)

- Químicos:

Índice de acidez (Método 28.032, AOAC, 1995)

Índice de yodo (Método 28.021, AOAC, 1995)

Índice de Saponificación (Método 28.028, AOAC, 1995)

Las técnicas³ aplicadas para la obtención de estos parámetros fueron los métodos oficiales de análisis (FAO/OMS, 1993; Cunniff, 1995; Pearson, 1998).

2.7 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

En un cromatógrafo de gases-líquidos, los ésteres metílicos de los ácidos grasos son separados como consecuencia del reparto entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria líquida contenida en una columna. Para esta determinación el material⁴ debe lavarse perfectamente con agua destilada e inmediatamente lavar con: tolueno, acetona y metanol (todos los reactivos utilizados son como de mínimo de grado analítico).

Para realizar la esterificación de las muestras, se pesan de 20 a 50 mg de grasa en un tubo de ensaye, se agregan 2 mL de hidróxido de potasio al 5 % en metanol, se tapa, y se coloca en un baño de temperatura controlada (80 ± 2 °C) durante una hora,

después, se retira el tubo del baño y se deja enfriar. Posteriormente se agregan 2 mL de ácido clorhídrico al 10 % en metanol y 100 μ L de trifluoruro de boro, nuevamente se tapa, y se coloca en el baño de temperatura controlada durante otra hora y se deja enfriar. Después se agregan 4 mL de agua destilada y 2 mL de mezcla de disolventes (tolueno: hexano), y se agita durante un minuto en un vórtex, se destapa el tubo y se recupera hasta que se separen las fases, se extrae la fase superior y coloca en un matraz aforado de 5 mL. Se repite el procedimiento a partir de donde se agregan los 4 mL de agua destilada y 2 mL de mezcla de disolventes. Al final se tienen 4 mL de la fase superior en el matraz, y posteriormente se afora a 5 mL con la mezcla de disolventes.

En la **TABLA 3** se describen las condiciones que se requieren en el cromatógrafo de gases.

TABLA 3. Condiciones del cromatógrafo de gases-líquidos.

CONDICIONES	
Al encender el cromatógrafo se debe de tener:	
Gas acarreador helio	80 psi
Gas hidrógeno	30 psi
Aire de alta pureza	40 psi
Antes de inyectar la muestra se debe tener:	
Temperatura de la columna*	50 °C
Temperatura del detector	300 °C
Temperatura del inyector	250 °C
Presión del gas acarreador	10 psi
Volumen de inyección	1 μ L

* La temperatura de la columna se varía mediante el siguiente gradiente de temperatura el cual permite una mejor separación de los ácidos grasos presentes en la muestra: (a) temperatura inicial 50 °C durante 1min (b) subir 10 °C/1 min hasta llegar a 180 °C y se mantiene por 2 min (c) subir 5 °C/1min hasta llegar a 240 °C y se mantiene por 2 min.

³ ANEXO III Descripción detallada de las técnicas empleadas para la obtención de parámetros fisicoquímicos.

⁴ ANEXO IV Material y Reactivos del perfil de ácidos grasos.

2.8 BIOENSAYO

Las ratas, en el periodo después del destete, siguen creciendo y ganando peso en forma exponencial, lo cual es de gran utilidad en aquellos estudios donde la ganancia en peso y el tamaño se utilizan como indicadores en el transcurso de un experimento, como por ejemplo, en la evaluación nutritiva de un aceite empleando diferentes dosis.

Para llevar a cabo la evaluación biológica de la grasa cruda y aceite refinado de la semilla de cacahuanano, se deben elaborar dietas isoproteínicas e isocalóricas, tomando como base una dieta de referencia, de tal manera que el nutrimento en estudio (grasa y aceite de cacahuanano) sea la única variable.

En el caso del aceite refinado se elaboran dietas con diferente dosificación, para observar si el crecimiento de la rata muestra alguna dependencia a la cantidad de aceite que esta ingiriendo. En el caso de la dieta en donde la cantidad de aceite refinado de cacahuanano no sea suficiente para mantener el nivel energético requerido, se complementará esta deficiencia con aceite de maíz.

La dieta de referencia se elabora con los ingredientes mostrados en la **TABLA 4**.

TABLA 4. Dieta de referencia.

INGREDIENTES	g/100 g de dieta
Proteína Caseína Sigma (No.C-3400, Pureza 89.19 %)	11.21*
Sacarosa comercial	22
D-(+)-dextrosa anhidra (No. 901521 ICN)	19
Dextrina comercial	25
Manteca vegetal	8
Aceite comercial	6
Mezcla de minerales TEKLAD (No.70760)	4
Mezcla de Vitaminas (No 904 ICN)	2
Celulosa (Sigma No. C-8002)	2.39
Colina (Solución al 50%)	0.4

*La cantidad de proteína proporcionada depende de la pureza del reactivo, con la finalidad de mantener un nivel del 10 % de este nutrimento.

- Preparación de dietas⁵:

Se preparan cinco dietas con modificaciones en la fuente de lípidos por la muestra de estudio y, adicionalmente se agregó un antioxidante en la siguiente forma:

- Dieta Control: 15 g de aceite de maíz/Kg de peso corporal (p.c.) y 0.01 g palmitato de ascorbilo/100 g de Dieta.
- Dieta Crudo: 15 g de grasa cruda de la semilla de cacahuanano/Kg de p.c. y 0.01 g palmitato de ascorbilo/100 g de Dieta.
- Dieta Refinado 1: 15 g de aceite refinado de la semilla de cacahuanano/Kg de p.c. y 0.01 g palmitato de ascorbilo/100 g de Dieta.
- Dieta Refinado 2: 7.5 g de aceite refinado de la semilla de cacahuanano/Kg de p.c. y 0.01 g palmitato de ascorbilo/100 g de Dieta.

Dieta Refinado 3: 3.25 g de aceite refinado de la semilla de cacahuanano/Kg de p.c. y 0.01 g palmitato de ascorbilo/100 g de Dieta

La cantidad de grasa que se adicionó para asumir la ingesta de aceite por peso corporal de los animales en estudio, se obtuvo con datos de experimentos previos (Álvarez, 2002).

Cada uno de los componentes de las diferentes dietas se pesó en una balanza granataria. La caseína se mezcla junto con los componentes sólidos y, el último paso, es la adición de los diferentes aceites dependiendo de la dieta que se este preparando. Todo se incorpora hasta tener una mezcla completamente homogénea. La dieta se coloca en un recipiente de plástico de boca ancha y se guarda a temperatura de refrigeración para que se conserve adecuadamente.

⁵ ANEXO V Material necesario para la elaboración de dietas.

- Bioensayo:

- Se utilizan ratas macho Wistar recién destetadas (21-23 días de nacidas), éstas se dividen en grupos de tal manera que se tengan de preferencia lotes con igual número de animales. Los lotes se conforman con base en el peso inicial utilizando la distribución de tipo culebra japonesa, con el objeto de que sean homogéneos.
- Cada rata es colocada en una jaula individual otorgándole un comedero donde se le suministra la dieta correspondiente (la cantidad de dieta que se les abastece queda en un ligero exceso, el cual es determinado por el registro periódico de su ingesta), y un bebedero con agua administrada *ad libitum*. Debajo de cada jaula se colocan charolas de papel, con el objeto de recuperar el alimento que los animales desperdician. Éstas son renovadas periódicamente cuando se encuentren muy húmedas.
- En el transcurso del estudio, se registra el peso de cada rata y el alimento ingerido considerando la cantidad de dieta desperdiciada por el animal, se cambia el agua del bebedero para evitar la formación de hongos y se desechan las heces. En los últimos 11 días del ensayo se recolectan las heces por separado en frascos de plástico, y la orina se recupera en un papel filtro impregnado de ácido bórico, para posteriormente realizar las determinaciones de los parámetros nutrimentales calóricos.

2.9 DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES CALÓRICOS NUTRIMENTALES

Para hacer la determinación de estos índices se requieren muestras de las dietas empleadas en este estudio, así como de las heces recolectadas durante los últimos 11 días. Antes de hacer la determinación se homogeneizan y preparan como se describe a continuación:

- Preparación de muestras:

a) Heces: Se registra el peso total las heces recolectadas en los frascos de plástico etiquetados correctamente, se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 horas en un lugar aislado, y posteriormente se muelen en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo.

b) Dietas: solo se toma la cantidad requerida para las determinaciones, ya que hay una previa homogeneización en su preparación.

Una vez que se tienen las muestras homogeneizadas se determina la densidad calórica de las heces de cada una de las ratas (energía fecal, EF) y de las dietas empleadas en el bioensayo (energía total, ET), con la lectura directa de la bomba calorimétrica y siguiendo la metodología anteriormente descrita en la sección de desarrollo experimental. Tanto en la energía total como en la energía fecal se toma en cuenta el peso total de alimento y heces respectivamente. Con estos valores, se calculan los siguientes índices: por ciento de energía digerible (% ED) y eficiencia energética (% EE).

1) % Energía Digerible (% ED): se determina dividiendo la diferencia de la energía gruesa de la dieta menos la fecal entre la energía gruesa de los componentes metabolizables del alimento total ingerido durante los últimos 11 días, y todo este valor por cien.

2) % Eficiencia Energética (% EE): se determina dividiendo el incremento de peso de los animales entre la energía total por cien, durante los 28 días del bioensayo. En esta determinación, a la energía total se le resta el contenido energético teórico de las sustancias no digeribles (como la fibra, de la cual se conoce la cantidad ingerida), es decir, el que no es aprovechado por el organismo.

2.10 DETERMINACIÓN DEL APROVECHAMIENTO PROTEÍNICÓ

Esta determinación se hace con la finalidad de observar si las variables en estudio (grasa cruda y aceite refinado de cacahuanano) tienen un efecto en la digestibilidad de los otros componentes en la dieta, como la proteína, por lo que se requiere de la obtención de los parámetros nutrimentales proteínicos.

Para el cálculo de la Relación de eficiencia de la proteína, Utilización neta de la proteína, la Digestibilidad y el Valor biológico, se necesita obtener la cantidad de nitrógeno contenido en las dietas, heces y orina. A continuación se describe la preparación de las muestras para obtener dichos parámetros.

- Preparación de muestras:

a) Dietas y Heces: Se utilizan las muestras que se emplearon en la determinación de los índices calóricos nutrimentales.

b) Orina: Las hojas de papel filtro donde se recolectó la orina impregnadas de ácido bórico (sustancia que retiene nitrógeno urinario) se cortan en tiras y posteriormente se muelen con el fin de obtener muestras más homogéneas

Teniendo todas las muestras se determinan % Nitrógeno ** y se calculan los parámetros nutricionales siguientes:

- $REP = \frac{\Delta P}{PI}$; donde ΔP = Incremento de peso, PI = Proteína ingerida = % Nitrógeno *6.38

- $REP_{ajustado} = REP_{prueba} * \frac{REP_{caseína_{(ref)}}}{REP_{caseína_{(Exp)}}$

- $Digestibilidad = \frac{NI - NF}{NI} * 100$

** Para la determinación del % de nitrógeno en una muestra ver el ANEXO 1.

$$- \text{ValorBiológico} = \frac{NI - (NF + NU)}{NI - NF} * 100$$

$$- \text{Utilización Neta de Proteína} = \frac{NI - (NF + NU)}{NI} * 100; \text{ donde: NI = nitrógeno ingerido,}$$

NF = nitrógeno fecal, NU = nitrógeno urinario en todas las fórmulas.

2.11 OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Después de los 28 días de bioensayo, a los animales en estudio se les retira el alimento por aproximadamente 12 horas y, al día siguiente son anestesiados con éter para que posteriormente se les realice un sangrado ocular.

Se extrae 1 mL de sangre y ésta se deposita en tubos heparinizados. Las muestras obtenidas en este experimento se analizaron en el Laboratorio de Hematología del Hospital General Gabriel Mancera del IMSS.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Se obtuvieron 1 300 g de harina integral de las semillas de cacahuanano para posteriormente desengrasarla, generando 250 mL de grasa (Lote 1). Al determinar la gravedad específica de esta grasa, se obtienen 232.5 g de grasa cruda. En la bibliografía se reporta que cada 100 gramos de semilla contienen aproximadamente 21.5 % de grasa (Sotelo *et al*, 1986). Tomando en cuenta este dato, se calcula el por ciento de recuperación:

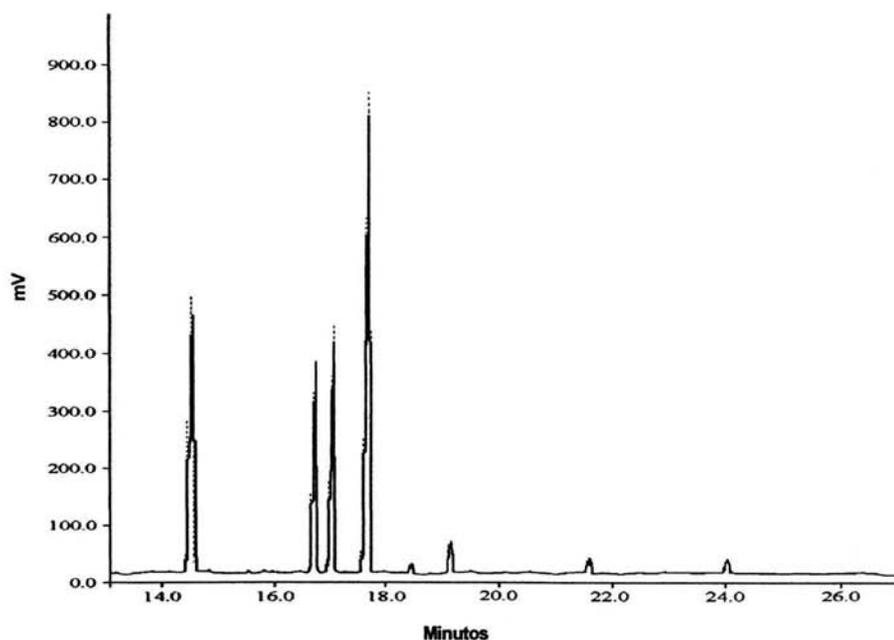
- Grasa cruda teórica a obtener = 279.5g

- Grasa experimental obtenida = 232.5g

$$\% \text{Recuperación} = \frac{232.5g}{279.5g} * 100 = 83.18\%$$

Este valor indica la diferencia que existe entre la cantidad de grasa teórica obtenida y la experimental. Esta diferencia se puede deber a dos factores: (a) el tamaño de la muestra fue mayor y (b) las semillas fueron recolectadas en una región diferente al sitio de colecta del estudio previo.

La cantidad de grasa obtenida en esta extracción no fue suficiente materia prima para realizar el bioensayo, por lo que se utilizó una muestra adicional extraída en experimentos previos en este laboratorio (873.5 g). Para poder mezclar estas dos muestras se obtuvo el perfil de ácidos grasos en donde se observó que no tenían diferente composición (Figura 5).



--- Grasa extraída en experimentos previos — Grasa extraída en este experimento

Figura 5. Cromatograma de las dos muestras de grasa cruda de cacahuanano.

Al mezclar las dos muestras se obtuvieron 1 116 g grasa cruda, de la cual 837 g se refinaron y 279 g quedaron como materia prima para la dieta de grasa cruda, así como para la determinación de los parámetros fisicoquímicos.

Al refinar la grasa cruda se obtuvo el siguiente rendimiento:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{651 \text{ g de aceite refinado}}{837 \text{ g de grasa cruda}} * 100 = 77.78\%$$

El proceso de refinación por lote generó una pérdida de aceite, aunque para los fines de este estudio y tomando en cuenta que ningún proceso tiene un rendimiento del 100 por ciento, se considera aceptable. La etapa de deodorizado durante el refinamiento, no se generó un aceite totalmente libre de aroma indeseado, debido a que no se contaba con el equipo más apropiado para este fin.

Después de tener la grasa cruda y el aceite refinado se realizaron las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos. Los resultados se presentan en la **Tabla 5**. Estos resultados se comparan con los del grupo de aceites oleico-linoleico, los cuales son comercialmente importantes ya que contienen principalmente ácidos grasos insaturados y un contenido de ácidos grasos saturados bajo. En este grupo se encuentran la mayor parte de los aceites tales como el de maíz, algodón, cacahuate, cártamo, oliva, girasol y ajonjolí, entre otros.

En la **Tabla 5** se comparan los parámetros fisicoquímicos de la grasa cruda como del aceite refinado y se observa que se encuentran dentro del intervalo comprendido por el grupo oleico-linoleico. Las diferencias de éstos parámetros, sólo entre la grasa cruda y el aceite refinado, se deben a que en el proceso de refinación se da una modificación en la proporción de ácidos grasos, los cuál se observa en la **Tabla 6**.

Comparando el perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y del aceite refinado con sus respectivos índices fisicoquímicos, se observan las siguientes diferencias (**Tabla 7**) (Formo, 1979; Hui, 1996; Álvarez, 2002).

- a) El índice de yodo disminuye en el aceite refinado, debido a que en el proceso de refinación se neutralizan los ácidos grasos libres, que en este caso, son insaturados, ya que de éstos se obtuvo un porcentaje total menor (**Tablas 5 y 6**).
- b) La proporción de ácidos grasos saturados, en particular al ácido graso palmítico, aumenta en el aceite refinado a causa de la eliminación de los ácidos grasos libres insaturados, lo cual se ve reflejado, como un incremento, en el índice de saponificación (**Tablas 5, 6 y 7**).
- c) El índice de acidez es menor en el aceite refinado por la neutralización al que fue sometido en el proceso de refinación (**Tabla 5**), mientras que la gravedad específica, índice de refracción y el punto de fusión, no se modifican significativamente por éste proceso.
- d) Finalmente, se puede observar que la grasa cruda y el aceite refinado, tienen una importante proporción de ácido linoleico, el cual, es un ácido indispensable en la nutrición humana, por lo que lo hace de suma importancia el estudio nutricional de esta fuente para validar su consumo (**Tabla 7**).

TABLA 5. Parámetros Fisicoquímicos de la grasa cruda y aceite refinado de la semilla del cachuanano (*Gliricidia sepium*)

Parámetro	Grasa Cruda	Aceite Refinada	Grupo oleico –linoleico
▪ Índice de yodo (Hanus) (g I ₂ /100g aceite)	81.07± 0.75	78.62 ± 0.68	77 a 150
▪ Índice de saponificación (mg NaOH/g aceite)	190.26 ± 9.53	204.35 ± 9.95	185 a 200
▪ Gravedad específica (20°C)	0.93 ± 3.6E-3	0.92 ± 5.2E-3	0.909 a 0.924
▪ Índice de refracción (20°C)	1.4729	1.4726	1.467 a 1.475
▪ Índice de acidez (% ácido oleico)	1.7± 0.19	1.1± 0.5	0.5 a 1.5
▪ Punto de fusión (°C)	7 a 9	7 a 9	-10 a 20

TABLA 6. Proporción de ácidos grasos.

Tipo de ácido graso	Grasa Cruda	Aceite Refinado	Grupo oleico-linoleico
▪ Saturados	32.8	33.9	5 a 33
▪ Monoinsaturados	17.5	18.5	13 a 85
▪ Poliinsaturados	49.7	47.6	4 a 79
▪ Total de insaturados	67.2	66.1	80.5 a 95

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y aceite refinado.

Ácido graso	Grasa Cruda (%)	Aceite Refinado (%)	Grupo oleico-linoleico (%)
▪ Palmítico	16.0	16.4	3 a 45
▪ Esteárico	16.8	17.5	1 a 6
▪ Oleico	17.5	18.5	13 a 85
▪ Linoleico	42.3	39.1	4 a 79
▪ Linolénico	1.1	1.1	-
▪ Araquídico	3.0	3.7	-
▪ Desconocidos	3.3	3.7	-

Se le determinó la densidad calórica de la grasa cruda y aceite refinado. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

TABLA 8. Densidad calórica.

Muestra	(KJ/g)
Grasa cruda	36.18 ± 0.43
Aceite refinado	37.95 ± 1.11
Factor de Conversión*	37

*Factor de conversión propuesto por Atwater

Los valores del contenido energético de la grasa cruda y del aceite refinado, indican las cantidades de energía que se proporcionarán por el consumo de éstas, el cual es semejante al propuesto por Atwater.

Una vez determinados los parámetros fisicoquímicos, el perfil de ácidos grasos y los ensayos toxicológicos (éstos últimos de trabajos previos (Álvarez, 2002)), se procedió a realizar el bioensayo en donde la formulación de las dietas se muestra en la **Tabla 9**.

TABLA 9. Elaboración de dietas.

Ingredientes (g /100g dieta)	Control	Crudo	Refin 1	Refin 2	Refin 3
Caseína Sigma # C-3400	11.21	11.21	11.21	11.21	11.21
Sacarosa Comercial	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
Glucosa ICN # 901521	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
Dextrina Comercial	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Aceite de maíz Comercial	14.00	1.00	1.00	7.50	10.75
Grasa de Cruda	0.00	13.00	0.00	0.00	0.00
Aceite de Refinado	0.00	0.00	13.00	6.50	3.25
M. de sales TEKLAND # 70760	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
M. de vitaminas ICN #904	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Celulosa Sigma # C-8002	2.78	2.78	2.78	2.78	2.78
Palmitato de ascobilo	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
(antioxidante) Roche					

Donde Crudo = equivale a una dosis de 15 g de grasa /Kg. p.c.
 Refin 1 = equivalente a una dosis de 15 g aceite/ Kg de p.c.
 Refin 2 = equivalente a una dosis de 7.5 g aceite/ Kg de p.c.
 Refin 3 = equivalente a una dosis de 3.25 g aceite/Kg de p.c.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados del alimento acumulativo promedio consumido por los animales en estudio, por dieta, durante el bioensayo. En la **Figura 6** se grafican estos resultados, observándose una tendencia similar para cada dieta, además de no determinarse una diferencia significativa al realizar el análisis estadístico mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA⁷), utilizando un nivel de confianza del 0.01%.

⁷ Anexo VI, datos de ANOVA.

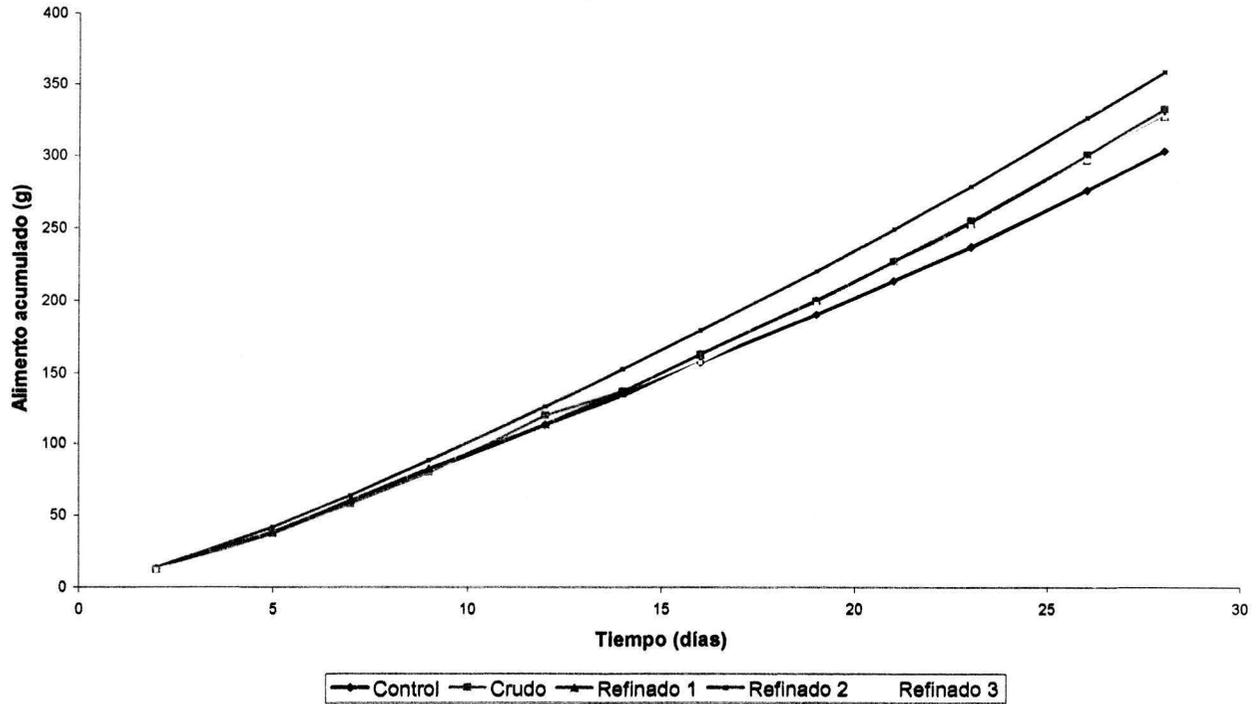


Figura 5. Curvas de ingesta de alimento de los diferentes lotes de animales-

TABLA 10. Alimento Acumulativo Promedio (g)*

Tiempo (días)	Control	Crudo	Refin 1	Refin 2	Refin 3
2	12.98±0.69	12.42±2.32	13.08±1.42	13.68±2.04	12.02±1.73
5	38.27±3.03	37.65±7.31	38.52±5.50	41.97±6.46	33.68±8.33
7	58.85±4.83	57.72±10.6	59.95±8.16	63.43±8.29	50.22±11.0
9	80.58±6.32	79.12±12.4	82.27±11.4	87.78±12.1	72.95±10.00
12	113.07±9.59	199.87±23.9	113.47±14.9	126.05±18.4	107.97±9.70
14	134.12±12.1	136.88±15.3	136.72±17.9	151.70±23.3	131.47±10.3
16	156.32±16.6	161.65±16.6	161.85±20.7	178.38±28.8	156.47±12.6
19	189.42±22.5	198.97±19.7	199.67±27.8	219.58±38.4	196.77±16.6
21	212.97±26.7	226.48±22.5	226.47±31.6	248.82±44.3	222.75±17.6
23	236.55±31.2	254.38±24.2	252.25±36.2	278.18±48.5	251.22±22.6
26	275.45±36.8	299.68±26.9	296.43±42.2	325.62±56.3	296.43±30.8
28	302.52±38.8	332.00±27.7	326.83±46.1	357.85±61.1	326.12±33.7

* Valor promedio ± desviación estándar donde n = 6

En la **Tabla 11** se presenta el incremento de peso promedio acumulativo de los animales de experimentación, en las cinco dietas aplicadas. La tendencia de éstos valores se grafican en la **Figura 7** en donde se observa un comportamiento similar al que manifiesta la dieta control. El análisis de varianza (ANOVA)⁸ de estos resultados no mostró diferencia significativa, es decir, que la grasa y el aceite refinado de la semilla de cacahuanano en la dieta, no influyeron sustancialmente en el desarrollo de los animales.

Después del bioensayo, se realizó la preparación adecuada de las muestras para determinar los índices calóricos (% de energía digerible y % de la eficiencia energética) (**Tabla 12**).

⁸ Anexo VI

TABLA 11. Promedio del Incremento de Peso Acumulativo (g)

Tiempo (días)	Control	Crudo	Refin 1	Refin 2	Refin 3
2	9.07±0.71	6.93±3.62	9.23±0.82	9.57±4.03	5.25±4.03
5	18.22±1.64	15.72±7.61	18.22±2.00	19.93±8.86	12.58±9.38
8	26.50±2.42	25.45±5.56	27.32±2.50	30.82±10.3	21.95±6.88
9	34.83±2.44	30.77±8.82	34.47±6.35	39.30±11.2	31.97±6.92
12	44.22±5.58	42.43±6.02	42.18±9.71	50.83±14.1	42.73±7.76
14	49.42±6.63	48.92±7.63	50.13±5.70	56.05±15.03	48.98±8.53
16	54.68±7.75	54.67±7.05	56.85±6.26	61.85±16.85	55.27±9.35
19	61.40±8.79	63.13±7.71	64.40±8.36	71.82±20.01	65.60±9.30
21	68.87±10.3	71.72±8.80	73.48±9.92	82.02±22.60	73.98±12.0
23	76.40±11.9	81.07±9.43	82.57±12.9	92.00±24.08	84.03±13.9
26	87.95±13.2	80.83±36.4	94.68±13.6	104.22±26.0	96.78±18.7
28	96.15±12.7	105.62±10.2	104.70±16.1	115.12±26.9	107.13±18.7

* Valor promedio ± desviación estándar donde n = 6

TABLA 12. Índices calóricos

Dieta	% Energía Digerible	% Eficiencia Energética
Control	95.29 ± 0.48 ^a	1.75 ± 0.05
Crudo	91.54 ± 1.50 ^b	1.69 ± 0.02
Refinado 1	90.83 ± 1.07 ^b	1.64 ± 0.06
Refinado 2	93.69 ± 1.12 ^a	1.65 ± 0.11
Refinado 3	94.43 ± 1.27 ^a	1.72 ± 0.12

Donde Refinado 1, dosis (15 g aceite/ Kg de p.c.).

Refinado 2, dosis (7.5 g aceite/ Kg de p.c.).

Refinado 3, dosis (3.25 g aceite/Kg de p.c.)

^{a,b,c} Diferente letra indica diferencia significativa ($\alpha = 0.01$)

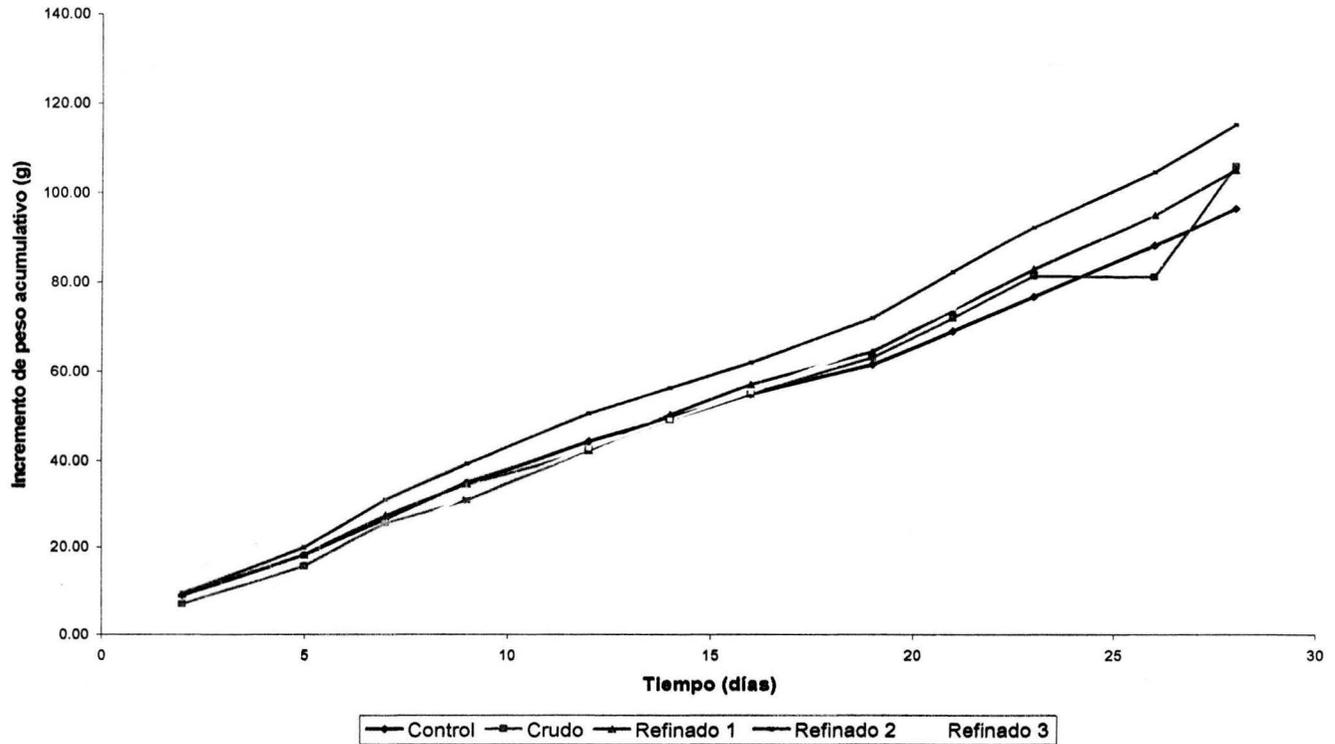


Figura 6. Curvas de crecimiento de cada una de los animales de experimentación

Al realizar el análisis estadístico (ANOVA)⁹ de los valores del %ED (Tabla 12), se muestran diferencias significativas (Figura 8), por lo que se procedió a determinar la prueba de rango múltiple (DUNCAN)¹⁰, en donde se observa que en la dieta de grasa cruda y aceite refinado 1, el %ED es menor al que genera por la dieta control. La disminución de éstos valores, puede deberse a errores experimentales durante el homogeneizado de las muestras.

En los resultados de % EE (Tabla 12) no se encontró diferencia significativa al realizar el análisis de varianza (ANOVA)¹¹ (Figura 9), por lo que el aprovechamiento de la fuente de lípidos, por los animales de experimentación, en todas las dietas fue satisfactorio.

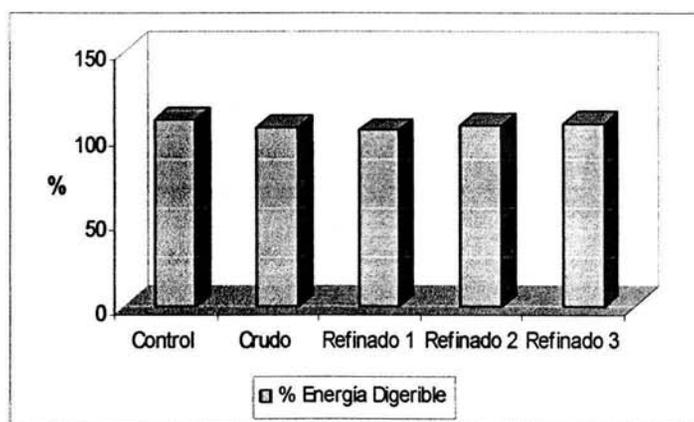


Figura 8. Resultados del parámetro nutrimental calórico % Energía Digerible.

⁹ Anexo VI

¹⁰ Anexo VI

¹¹ Anexo VI

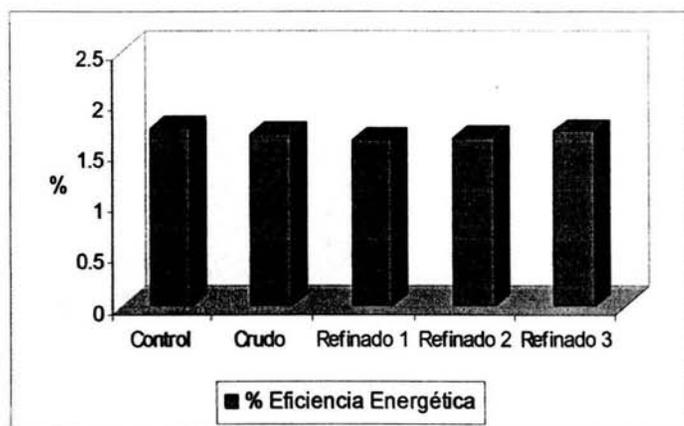


Figura 9. Resultados del parámetro nutricional calórico % Eficiencia Energética.

Los resultados de la evaluación de los parámetros nutricionales de la proteína son los siguientes:

a) Se calcularon los valores del REP_{exp} , para posteriormente obtener los datos del REP_{ajus} (Tabla 13 y Figura 10). Estos últimos no presentaron diferencia significativa (ANOVA)¹² al compararlos con el control, lo cual indica, que tanto la grasa como el aceite refinado de la semilla de cacahuanano, no influyen en la eficiencia de la proteína.

TABLA 13. Relación de la Eficiencia Proteínica (REP).

Dieta	REP_{exp}	REP_{ajus}
Control	3.15 ± 0.09	2.50 ± 0.07
Crudo	3.33 ± 0.03	2.64 ± 0.03
Refinado 1	2.88 ± 0.11	2.29 ± 0.09
Refinado 2	2.98 ± 0.21	2.37 ± 0.17
Refinado 3	3.09 ± 0.22	2.46 ± 0.18

Donde Crudo = equivale a una dosis de 15 g de grasa /Kg. p.c.
 Refinado 1=equivalente a una dosis de 15 g aceite/ Kg de p.c.
 Refinado 2 =equivalente a una dosis de 7.5 g aceite/ Kg de p.c.
 Refinado 3 =equivalente a una dosis de 3.25 g aceite/Kg de p.c.

¹² Anexo VI

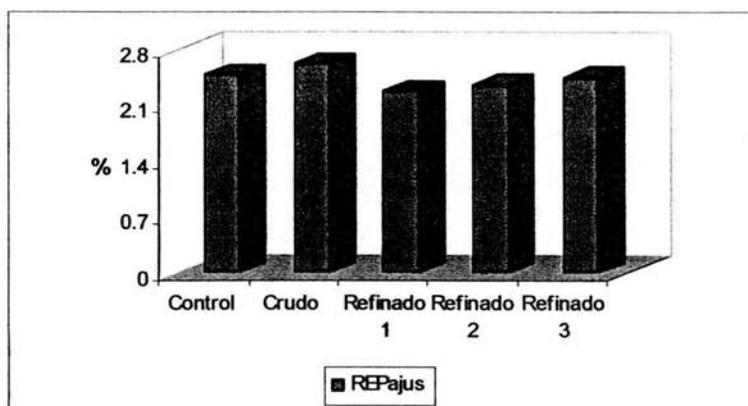


Figura 10. Resultados del bioensayo; ganancia de peso y el aprovechamiento proteínico REP_{ajus} .

b) Como se mencionó en los antecedentes, los valores de la digestibilidad, valor biológico y UNP evalúan la cantidad de proteína requerida para satisfacer las necesidades fisiológicas de los animales, mediante el aporte de nitrógeno. Los resultados de éstos parámetros se muestran en la **Tabla 14**, y al realizar el análisis estadístico (ANOVA)¹³ de los mismos, no se observa diferencia significativa con respecto al control (**Figuras 11 y 12**), lo que significa que el aprovechamiento integral de la proteína es adecuado a pesar de los cambios en la fuente de lípidos en las dietas

¹³ Anexo VI

TABLA 14. Digestibilidad, Valor biológico y UNP.

Dieta	Digestibilidad	Valor Biológico	UNP
Control	93.71 ± 0.80	0.91 ± 0.02	85.58 ± 1.79
Crudo	92.54 ± 1.04	0.92 ± 0.04	85.24 ± 4.52
Refinado 1	93.47 ± 0.83	0.90 ± 0.01	84.47 ± 1.49
Refinado 2	93.96 ± 1.37	0.90 ± 0.02	84.31 ± 2.49
Refinado 3	93.81 ± 1.20	0.88 ± 0.02	82.50 ± 2.87

Donde UNP=Utilización Neta de Proteína

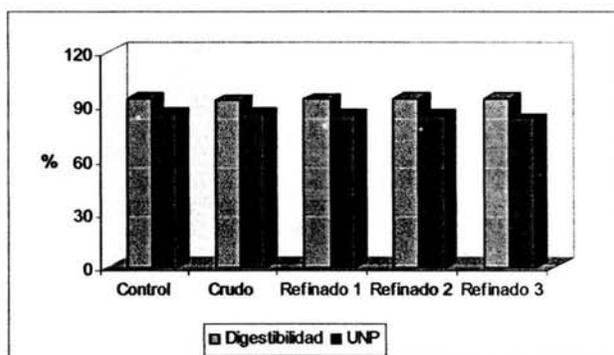


Figura 11. Resultados del aprovechamiento proteínico; Digestibilidad y Utilización Neta de la Proteína (UNP)

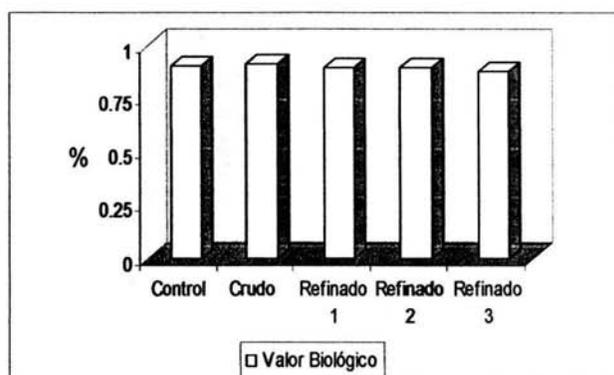


Figura 12. Resultados del aprovechamiento proteínico; Valor biológico

Al finalizar el bioensayo se realizó la citometría hemática mediante la metodología descrita en la sección de desarrollo experimental y los resultados obtenidos se muestran en la **(Tabla 15)**, los cuales, al obtener el análisis estadístico no presentaron diferencia significativa con respecto a los valores del control (Valores de Referencia)

Esta determinación corrobora que los animales en estudio no presentan ninguna anomalía, ya que el desarrollo del sistema hematopoyético es normal, En la **Figura 13** se observa uno de los parámetros hematológicos de, mayor relevancia.

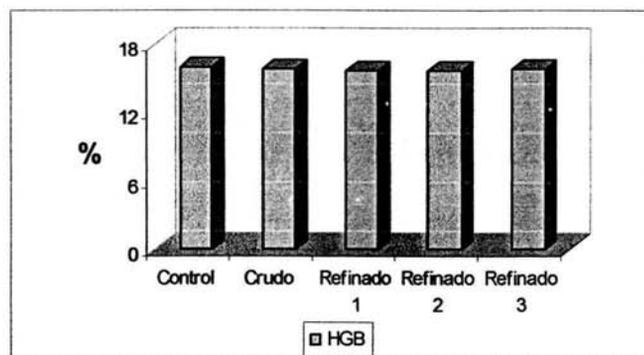


Figura 13. Resultados Hematológicos, parámetro Hemoglobina.

TABLA 15. Citometría Hemática

Dieta	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
▪ Control	8.45±1.78	8.65±0.43	15.95±0.49	78.25±3.19	90.55±3.40	18.47±0.81	17.27±7.10	819.17±126.65
▪ Crudo	7.41±2.18	8.42±0.59	15.83±0.72	76.82±3.86	91.33±2.99	18.85±0.65	20.62±0.56	804.83±100.67
▪ Refinado 1	5.15±1.04	8.29±0.24	15.62±0.58	74.33±2.49	89.68±2.86	18.83±0.67	21.00±0.21	758.33±130.97
▪ Refinado 2	7.63±2.56	8.18±0.30	15.60±0.58	74.88±2.46	91.52±2.63	19.08±0.47	20.87±0.41	733.50±97.39
▪ Refinado 3	6.29±2.09	8.25±0.51	15.75±0.62	75.67±4.61	91.82±3.71	19.12±0.78	20.85±0.56	670.00±225.55

Donde WBC= Leucocitos, RBC= Glóbulos rojos, HGB= Hemoglobina, HCT= Hematocrito, Volumen Corpuscular Medio, MCH= Hemoglobina Corpuscular Media, MCHC= Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular, PLT= Plaquetas.

CONCLUSIONES

- Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron tanto en la grasa cruda como en el aceite refinado son muy similares a los presentados por el grupo oleico–linoleico y, el perfil de ácidos grasos, es el adecuado para proveer al ser humano una buena proporción de ácidos grasos insaturados y de ácido linoleico, el cual es indispensable.
- La cantidad de KJ que proporciona es la misma que para cualquier aceite comestible. Los índices calóricos nutricios confirman que la grasa y aceite refinado de la semilla de cacahuanano cubre las necesidades energéticas de los animales de experimentación.
- El proceso de refinamiento no produjo ninguna alteración que pudiera afectar la salud de los animales en estudio, Además, el crecimiento de estos fue semejante en todas las dietas empleadas.
- Los parámetros nutricionales que evalúan la calidad de la proteína mostraron que la incorporación de la grasa cruda y aceite refinado en estudio no afectan el aprovechamiento proteínico.
- Los parámetros hematológicos de los animales no mostraron anomalías con respecto al lote de referencia por lo que al parecer es relativamente inócua.
- La grasa cruda y el aceite refinado de la semilla (*Gliricidia sepium*) puede considerarse como una nueva fuente potencial de grasa comestible.

RECOMENDACIONES

- Es necesario optimizar el método de refinación para obtener un aceite organolépticamente aceptable, ya que el olor que presenta no es del todo satisfactorio.
- Es necesario diseñar un método adecuado de extracción de la grasa de tal manera que la gente de las comunidades rurales no tengan inconvenientes para el uso de esta nueva alternativa de grasa comestible.

BIBLIOGRAFIA

- Akoh, C. y Min, D. FOOD LIPIDIC (CHEMISTRY, NUTRITION, AND BIOTECHNOLOGY), Macer Dekker, pp. 15-136, N.Y. (1998).
- Álvarez, M. EVALUACIÓN BROMATOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE CACAHUANANO (*Gliricidia sepium*) Tesis Licenciatura, Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2002).
- Álvarez, U.I., EVALUACIÓN NUTRITIVA DE DIFERENTES PREPARADOS PROTEINICOS DE LA ALMENDRA DE CALABAZA (*Curcubita pepo*), Tesis Licenciatura, Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (2001).
- Andersen, A. y Williams, P. REFINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS COMESTIBLES. Compañía Editorial Continental, S.A., pp. 57-225, México, D.F. (1965).
- Bender, E y Dobell, H. BIOLOGICAL EVALUATION OF PROTEINS: A NEW ASPECT *British Journal of Nutrition*, 11,140 (1977).
- Comisión Nacional de Alimentación ENCUESTA NACIONAL DE ALIMENTACIÓN EN EL MEDIO RURAL, Publicación del INNSZ L-86, pp. 92-93, México, D.F. (1990).
- Conca, T.A., EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA GRASA CRUDA Y DESTOXIFICADA DE DOS SEMILLAS DE ERHYTRINA MEXICANAS, Tesis Licenciatura, Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1995).
- Cunniff P. MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS, AOAC INTERNACIONAL 16^a edición, pp. 503-510, Virginia, USA, (1995).
- Derelanks, M.J. y Holliner, M.A. HANDBOOK OF TOXICOLOGY, CRC. Press, pp. 518, 519, 530, 531, 805. Boca Raton, (1995).
- Doode, M. y Pérez, E. SOCIEDAD, ECONOMÍA Y CULTURA ALIMENTARIA, CIAD A.C., pp. 9-20, 273-302, Hermosillo (1994).

- FAO/OMS. GRASAS Y ACEITES EN LA NUTRICIÓN HUMANA, Consulta FAO/OMS expertos 57, Roma, (1993).
- Formo, W.M., Jurgemann, E., Norris, F.A., Sonntag, O.N., BAILEY'S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTOS, Vol. 1, Ed John Wiley & Sons 4ª Edición pp.352-403, 1979.
- Gay, W. METHODS OF ANIMAL EXPERIMENTATION, Vol. 1 Academic Press, 104,109-111, N.Y. (1965).
- Gandhi, V., Mulky, M. Mukerji, B. Iyer, V. and Cherian, D. SAFETY EVALUATION OF WILD APRICOT OIL. Food Chem. Toxicol. 35, 583-587 (1997).
- Hernández, J. y León, C. CULTIVOS MARGINADOS (OTRA PERSPECTIVA DA 1492) FAO: Colección de alimentación y nutrición 2, pp. IX-XI, 3-33, 37-120, Roma (1992).
- Hui, Y. BAILEY'S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS, John Wiley & Sons, Inc. 5ª Edition, Vol. 1, pp 215-280, N.Y. (1996).
- INEGI, ESTADÍSTICAS DEL SECTOR SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL, Cuaderno No.16 México D.F. (2000).
- INEGI, BOLETÍN DE INFORMACIÓN ESTADÍSTICA, DAÑOS A LA SALUD, Cuaderno No.21 México D.F. (2001-2002).
- Liener, I. E. TOXIC CONSTITUENTS OF PLANT FOODSTUFFS. Academic Press, pp. 1-5, N.Y. (1980).
- Lucas, B. ESTUDIO QUÍMICO Y TOXICOLOGICO DE LA SEMILLA DE CACAHUANANO (*Gliricidia sepium*). Tesis Maestría, Esc. Nac. De Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F. (1985).
- Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. y Sotelo, A. TRUE PROTEIN CONTENT AND NONPROTEIN AMINO ACIDS IN LEGUME SEEDS. Nutr. Rept. Int. 37, 545-553 (1988).

- Martínez, M. PLANTAS UTILES DE FLORA MEXICANA, Ed. Botas, pp. 499-500, México D. F. (1959).
- Martínez, M. CATALOGO DE NOMBRES VULGARES Y CIENTÍFICOS DE PLANTAS MEXICANAS, Ed. Fondo de Cultura Económica, pp. 195 y 1122, México D.F. (1987).
- Miller, S. y Payne, A. A NOMOGRAPHFOR THE PREDICTION OF THE PROTEIN VALUE OF DIETS PROCEEDINGS OF THE NUTRITION SOCIETY, 19, p XXXVII, (1960).
- Molinar, M.G. VALOR ENERGÉTICO DE DIVERSOS ALIMENTOS DETERMINADOS POR MEDIO DE UNA BOMBA CALORIMÉTRICA Y MÉTODOS BIOLÓGICOS. Tesis Esc. de Química, U. La Salle, México D. F. (1988).
- Muller, H. y Tobin, G. NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Acriba, pp. 73-77, Zaragoza (1986).
- Murphy, D.J. DESIGNER OIL CROPS (BREEDING, PROCESSING AND BIOTECHNOLOGY), VCH Publisher, Inc. , pp.73-130, 253-281, N.Y. (1994).
- National Research Council. NUTRIENT REQUERIMENTS OF LABORATORY ANIMAL, National Academic of Science, Committee on Animal Nutrition, Agricultural Board. 3ª rev. Washington, D.C. (1978).
- Pearson, D. TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS, 3ª Reimpresión, Editorial Acribia S.A. 62-68, Zaragoza, (1998).
- Pedrazo, O. Cervantes, R. y Pozos, G. PRESENCIA DE ALGUNOS FACTORES ANTINUTRITIVOS EN LA HARINA DE FOLLAJE DE *Gliciridia sepium* CON DIFERENTES EDADES DE REBROTE Rev. Prod. Anim. 8, 49-51 (1994).
- Pennigton, T. y Sarukhán, J. ÁRBOLES TROPICALES DE MÉXICO, UNAM Fondo de Cultura Económica 2ª, pp. 254-255, México, D.F. (1998).

- Ruiz, A. FUNDAMENTOS DE HEMATOLOGÍA, 2ª Edición, Medica Panamericana, 31-43, México D.F. (1998).
- Schanler, R. PRÁCTICAS MODERNAS EN LA ALIMENTACIÓN INFANTIL, 2ª edición, Capítulo 2, Gerber Products, Co., (2001)
- Sotelo, A. Lucas, B. Blanc, F. y Giral, F. CHEMICAL COMPOSITION OF SEEDS OF *Gliricidia sepium*. Nutr. Rept. Int. 34, 315-322 (1986).
- Soto, J. y Souza, M. PLANTAS MEDICINALES DE LA CUENCA DEL RIO BALSAS. Cuadernos del Inst. de Biología # 25, pp. 41,52, 96, 119, México, D.F. (1995).
- Villela, O y Gérez, P. BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN EN MÉXICO. Ed. Técnico Científico, S.A. de C.V. – UNAM, 2ª, pp.7-34, 269-276, México, D.F.(1994).
- Wanasundara, P. y Shaidi, F. PROCESS-INDUCED CHEMICAL CHANGES IN FOOD. Plenum Press, pp. 307-327, N.Y. (1998).
- Ziller, S. GRASAS Y ACEITES ALIMENTARIOS, Editorial Acribia, 5-10, 12,35-41, Zaragoza, (1996).

ANEXO I

FUNDAMENTO DEL MÉTODO KJELDHAL

- **Método Kjeldhal:** El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl y varias modificaciones se han desarrollado en la actualidad. El procedimiento consiste en una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como amoníaco; el amoníaco existe en la solución ácida como sulfato ácido de amonio, debido a que la mezcla de reacción siempre hay un exceso de ácido.



La digestión de la muestra para formar el sulfato de amonio, es la parte más difícil de la operación. Muchos agentes catalizadores han sido usados para aumentar la velocidad de digestión de la muestra; como son el cobre, mercurio y el selenio, entre otros. Se han usado con mucha efectividad la combinación de catalizadores como es el uso de cobre – mercurio, cobre- selenio y mercurio – selenio.

Numerosos agentes oxidantes han sido adicionados al final del período de digestión para obtener una completa oxidación; en varios tipos de muestras la pérdida de nitrógeno a través de la formación de aminas o de nitrógeno libre se ha presentado por el uso de estos agentes a excepción del uso del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno debe ser usado cuidadosamente y es común preservarlo con acetanilida para reducir la formación de oxígeno y agua.

Sales como el sulfato de potasio o de sodio son comúnmente adicionadas para aumentar el punto de ebullición de la mezcla de digestión de la sal de amonio.

La sal de amonio obtenida después de la digestión, es liberada por acción de un álcali formando hidróxido de amonio que posteriormente es titulado por una cantidad conocida de ácido clorhídrico valorado. (Pearson, 1998)

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO KJELDHAL

Material y Reactivos

- Digestor TECATOR, modelo ab-20/40
- Dispositivo de microdestilación LABCONCO
- Tubos de digestión TECATOR de 75mL
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores
- Solución de HCl 0.01N valorada

Procedimiento

Pesar de 10-100 mg (pesar para heces y orina 80 mg, para dietas 100 mg) y colocarlos en el tubo de digestión, se les agrega aproximadamente 0.5 g de K_2SO_4 y 3 mL de mezcla de digestión; se pone el tubo en el digestor por espacio de 15 minutos y después de ello se saca del digestor para que se enfríe un poco, para poder adicionarle 1.5 mL H_2O_2 y nuevamente colocarlo en el digestor que se encuentra a $370^\circ C$. Se considera que la digestión es completa, cuando el tubo no muestra manchas y puntos negros y además la mezcla de digestión es transparente. Después de la digestión se dejó enfriar los tubos para agregarles 25 mL de agua destilada, se coloca el tubo en el microdestilador para que la destilación y la titulación se efectuaran automáticamente, se introdujo un blanco, donde se sustituyó la muestra por glucosa o sacarosa.

$$\%Nitrógeno = \frac{(mLmuestra - mLblanco)(N_{HCl})(0.014)(100)}{g \text{ de muestra}}$$

$$\%proteína = \%Nitrógeno * F$$

$$F_{caseína} = 6.38$$

ANEXO II

DESCRIPCIÓN DE MATERIAL

MATERIAL REQUERIDO PARA LA MOLIENDA

Material

- Molino mecánico THOMAS WILEY modelo 4.
- Malla con abertura de partícula $\leq 1\text{mm}$ de diámetro

MATERIAL PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN CON HEXANO

Material y Reactivos:

- Dispositivo tipo Soxhlet
- Disolvente Hexano grado QP.
- Papel filtro Whatman No. 1
- Rotaevaporador BUCHI modelo R

MATERIAL PARA CADA ETAPA DE REFINACIÓN DEL ACEITE

- ETAPA DE DESGOMADO

Material y Reactivos:

- Matraz Erlenmeyer de 2 L
- Balanza analítica
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE modelo. SP-13025.
- Centrífuga CLAY-ADAMS, Dynac™.
- H_3PO_4 al 0.1%

- ETAPA DE NEUTRALIZACIÓN

Material y Reactivos:

- Matraz Erlenmeyer de 2L
- Potenciómetro CORNING modelo 430
- Parrilla de calentamiento y agitación THERMOLYNE modelo SP-13025
- Centrífuga CLAY – ADAMS, Dynac™.
- Balanza analítica
- Mechero Bunsen.
- NaOH al 15%
- Agitador de vidrio
- Agua destilada
- Tripié
- Tela de asbesto

- ETAPA DE BLANQUEO

Material y Reactivos:

- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025
- Papel filtro Whatman #541 o tela que se utiliza para filtrar fibra
- Embudo de filtración STM poro "M".
- Silicato de aluminio
- Carbón activado
- Matraz Erlenmeyer 2L

- ETAPA DE DEODORIZACIÓN

Material y Reactivos:

- Rotaevaporador BUCHI modelo R
- Parrilla de calentamiento y agitación THERMOLYNE modelo SP-13025
- Matraz de bola del 2 L
- Mangueras de hule
- N₂ gaseoso en cilindro comprimido
- Una olla de aluminio de tamaño adecuado para el rotaevaporador
- Aceite mineral u otro aceite que sirva como baño
- Termómetro con una escala >100°C

MATERIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE DENSIDAD CALÓRICA

Material y Reactivos

- Bomba calorimétrica GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L
- Galvanómetro GAM METRIC LTD.
- Balanza analítica
- Crisoles de acero inoxidable
- Desecador de vidrio
- Estufa de secado
- Mechas de algodón de 7 cm de longitud
- Ácido benzoico (Certificado N.P.L. 26.454 J / g)

ANEXO III

TÉNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

- GRAVEDAD ESPECÍFICA O DENSIDAD APARENTE

Se determina la masa por unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico a una temperatura dada, que es determinada en un picnómetro que es previamente calibrado a la misma temperatura.

Material y Reactivos:

- Picnómetro de 10mL
- Baño regulador de temperatura GRANT modelo LR22493
- Balanza analítica
- Termómetro
- Etanol (GA)
- Éter etílico

Procedimiento

Limpiar el picnómetro con mezcla crómica, pesarlo limpio y vacío; llenar el picnómetro con agua previamente hervida colocarlo en el baño de temperatura controlada a 25°C, después de una hora, retirar el picnómetro ajustar el nivel de agua, limpiando siempre el agua sobrante y se pesa.

Vaciar el picnómetro, y enjuagar varias veces con etanol y después con éter etílico, secar y dejar que se evapore los residuos de éter.

Enseguida, llenar el picnómetro con la muestra colocarlo en el baño de temperatura controlada y proseguir como se indicó con el agua.

Los cálculos se hacen de la siguiente forma:

Se corrigen los datos a la temperatura de referencia que es de 20°C, se obtiene la densidad del Agua (masa / volumen), densidad de la muestra (masa/ volumen).

$$\text{Gravedad específica} = \frac{\text{densidad de la muestra}}{\text{densidad del agua}}$$

- ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción de una sustancia dada, es la razón de la velocidad de un rayo de luz en el vacío a la velocidad de la luz a través de la sustancia. Por conveniencia práctica se refiere a la relación aire - sustancia. El índice de refracción varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y con la temperatura.

Material y Reactivos

- Refractómetro de mano ATAGO tipo 500 No. 2340

Procedimiento

Colocar una o dos gotas de la muestra sobre el prisma principal y cerrar el prisma suplementario, Colocar en la escala 1, 2 ó 3, con el selector de escala, dependiendo de la concentración de la muestra a medir, colocar el refractómetro de tal manera que reciba la luz difusa del día u otra fuente de luz; rotar el ocular de tal forma que quede correctamente ajustado y la escala sea claramente visible. Determinar el valor dependiendo de la escala y la línea de frontera (parte clara y oscura).

Para calibrar el refractómetro repetir el procedimiento con agua destilada a 20°C si la línea de frontera no coincide con el 0% hacer un ajuste por rotación del "tornillo de ajuste de escala". Cuando la temperatura de la muestra es diferente de 20°C hacer una corrección con el termómetro especial incluido en el refractómetro, para ajustar la lectura a 20°C.

- PUNTO DE FUSIÓN (TUBO DE CAPILARIDAD)

Las grasas y aceites naturales, como mezclas de glicéridos y otras sustancias, no tienen punto de fusión exacto y bien definido, sino que se presenta un rango. No presentan punto crítico de sólido a líquido, este paso lo realizan gradualmente a través de estados semisólidos hasta completamente líquidos. El punto de fusión de una grasa está definido en este método por dos temperaturas; una, la inicial de ablandamiento deslizante, y otra, final de líquido perfectamente fluido.

Material y Residuos:

- Tubo capilar de vidrio (1mm de diámetro interno)
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE modelo SP-13025
- Termómetro graduado (con división mínima de 0.1°C)
- Mechero Bunsen
- Vaso de precipitado de 500mL
- Lámpara
- Una jeringa

Procedimiento

Llenar el tubo capilar con aceite (aproximadamente 10 mm) con una jeringa, sellar los dos extremos del tubo a la flama, colocar el tubo capilar con muestra en el congelador durante 24 horas, atar al nivel del bulbo del termómetro el capilar con muestra, suspender en un vaso de precipitado de 500mL con agua (previamente enfriada a 0°C), colocar la lámpara de tal forma que ilumine el tubo capilar con aceite; en caso de tener una idea aproximada del punto de fusión de la muestra, comenzar la determinación a 10°C por debajo del mismo, posteriormente iniciar el calentamiento de la parrilla y tomar como

punto de fusión el rango de lectura en el termómetro a la cual la muestra se vuelve translúcida.

- ÍNDICE DE ACIDEZ

Es usualmente una medida directa de titulación con alcohol - sosa cáustica y fenoftaleína como indicador y es el número de miligramos de hidróxido de sodio que se requieren para neutralizar la acidez libre de una muestra de 1 g.

Material y Reactivos:

- Balanza analítica
- Matraz Erlenmeyer de 250mL
- Vaso de precipitados de 250mL
- Bureta graduada 0.1 mL de 50 mL
- Etanol (GA)
- Solución indicadora de fenoftaleína al 1%
- Hidróxido de sodio al 0.1N

Procedimiento

En un vaso de precipitado de 250 mL agregar 50 mL de etanol y 5 gotas de fenoftaleína, titular con NaOH 0.1 N, para neutralizar el etanol (logrando una coloración levemente rosada).

Pesar en un matraz Erlenmeyer de 1 a 10 g de aceite (esto depende de la coloración del aceite), añadir etanol previamente neutralizado, titular con NaOH 0.1N agitando constantemente hasta que el color rosa permanezca durante 15 segundo. Evitar que la titulación consuma 10 mL, de otra forma se pueden separar las dos fases.

Cálculos:

$$\text{Índice de acidez} = \text{mL NaOH} \left(\frac{0.1 \text{ meq NaOH}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{40 \text{ mg NaOH}}{1 \text{ meq NaOH}} \right) \left(\frac{1}{\text{g de muestra}} \right)$$

$$\% \text{ de ácido oleico} = \frac{(\text{mL NaOH})(0.0282)}{\text{g de muestra}} (100)$$

- ÍNDICE DE YODO

Los acilglicerolos de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite se unen mediante sus dobles enlaces a una cantidad de monobromuro de yodo en ácido acético glacial. El halógeno no utilizado es transformado a yodo libre, es entonces, titulado con tiosulfato utilizando como indicador una solución de almidón y por diferencia de un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo absorbido por la muestra.

Material y Reactivos:

- Matraz de boca ancha de 500mL con tapón de plástico.
- Matraz Erlenmeyer
- Probeta de vidrio de 50mL
- Probeta de 10 mL
- Buretas graduadas
- Balanza analítica I
- Solución de Hanus
- Ácido acético glacial
- Tiosulfato de sodio pentahidratado
- Solución de yoduro de potasio al 15%
- Solución de almidón al 1%
- Cloroformo
- Ácido Clorhídrico 1N
- Dicromato de potasio

Procedimiento

Pesar 0.2-0.25 g de aceite (esta cantidad depende de la coloración del aceite), agregar 10 mL de cloroformo (CH_3Cl) y agitar, para disolver el aceite, con la bureta agregar 25 mL de la solución de Hanus y dejar reposar en la oscuridad por 30 min con agitación ocasional. Transcurrido el tiempo, añadir 10mL de solución de KI al 15% y agitar vigorosamente, añadir 100mL de agua destilada, tener cuidado de lavar cualquier residuo que quede en el tapón de plástico. Titular con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1N hasta que el color amarillo desaparezca. Añadir unas gotas de almidón al 1% y continuar titulando hasta que el color cambie (el vire depende del color del aceite). Hacia el final de la titulación, tapan el matraz y agitar vigorosamente para que el yodo remanente en CH_3Cl sea titulado. Se lleva a cabo un blanco en las mismas condiciones.

Cálculos:

$$\% \text{ Índice de yodo} = (V_{\text{blanco}} - V_{\text{titulante}})(N_{\text{titulante}}) \left(\frac{127 \text{mgI}}{1 \text{meq}} \right) \left(\frac{1}{\text{gMuestra}} \right) (100)$$

- ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

Los ácidos grasos de los acilgliceroles de la grasa son liberados con calentamiento y con exceso de KOH hasta completar la saponificación. El exceso de KOH se determina por titulación con ácido clorhídrico 0.5N y por diferencia con un blanco se determina la cantidad de KOH empleado para saponificar la muestra.

Material y Reactivos:

- Matraz de bola de fondo plano con cuello largo de 500mL
- Matraz aforado de 1 L
- Condensador
- Buretas graduadas de 50mL

- Canastilla de calentamiento
- Termostato
- Balanza analítica
- KOH
- Etanol (GA)
- HCl 0.5 N
- Solución de fenofaleína al 1%

Procedimiento

Pesar en la balanza analítica 2-4 g de aceite en un matraz de bola de fondo plano de 250mL, añadir con la bureta 50mL de la solución de KOH, Conectar el matraz al condensador y llevar a ebullición durante 30 min, titular en caliente usando fenofaleína al 1% como indicador hasta que vire de color (depende de la coloración del aceite). Llevar a cabo un blanco en las mismas condiciones que la muestra.

Cálculos:

$$\text{Índice de saponificación} = (V_{\text{blanco}} - V_{\text{titulante}})(N_{\text{titulante}}) \left(\frac{56\text{mgKOH}}{1\text{mgKOH}} \right) \left(\frac{1}{\text{gMuestra}} \right)$$

ANEXO IV

MATERIAL PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Material y Reactivos:

- Tubos de ensaye con tapa de rosca
- Matraz aforado de 5mL
- Pipetas pasteur
- Balanza analítica
- Baño de temperatura controlada marca POLYSTAT 12002-SERIES
- Vórtex LAB-LINE MISTRAL
- Cromatógrafo de gases PERKIN ELMER modelo AUTOSYSTEM
- Integrador PE- NELSON modelo 1022
- Columna ATTM-SILAR de 30m*0.32mmD*0.25µm(50%cianopropil-50metilpolixiloxano)
- Microjeringa HALMITON de 10µL
- Cinta teflón
- Estándares de ácidos grasos
- Trifloruro de boro
- KOH 5%
- HCl10%
- Mezcla de disolventes tolueno- hexano (80:20)

ANEXO V

MATERIAL PARA LA ELABORACIÓN DE DIETAS

Material y Reactivos

- Balanza granataria
- Mezcladora HOBART Modelo N-50
- Caseína SIGMA # C-3400
- Sacarosa grado alimenticio
- α -D- glucosa SIGMA # G-5000
- Dextrina grado alimenticio
- Aceite de maíz grado alimenticio
- Mezcla de Minerales Roger Harper TEKLAD Cat. #170760
- Mezcla de vitaminas Roger Harper TEKLAD Cat. #40060
- Celulosa Roger Harper TEKLAD Cat. #160390
- Papel manila suficiente para 30 charolas

ANEXO VI

DATOS DE ANOVA DE CADA DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL

- ANOVA DE ALIMENTO ACUMULATIVO PROMEDIO

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
4234.10	4	1058.524	0.098	3.74
594852.46	55	10815.49		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE PESO ACUMULATIVO PROMEDIO

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
641.963	4	160.49	0.170	3.74
51953.571	55	944.61		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE EFICIENCIA ENERGÉTICA

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
0.05463	4	0.1365	1.897	4.18
0.17996	25	0.00719		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE ENERGÍA DIGERIBLE

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
86.8501	4	21.7125	16.714	4.18
32.47617	25	1.2990		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, Si hay diferencia significativa, por lo tanto se hace la siguiente prueba para observar donde hay diferencia significativa.

- PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DUNCAN

Comparaciones entre grupos	Diferencia
Control – Crudo	3.7516*
Control – Refinado1	4.4550*
Control – Refinado2	1.5916
Control – Refinado 3	0.8600

* Grupos con diferencia significativa

- ANOVA DE REP_{ajus}

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
0.4314	4	0.1078	0.318	4.18
0.3685	25	0.0147		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
2.1116	4	0.5279	0.467	4.18
28.2831	25	1.1313		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE VALOR BIOLÓGICO

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
8.3864	4	2.0966	0.953	4.18
55.0179	25	2.2007		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE UNP

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
34.1911	4	8.5477	1.063	4.18
201.098	25	8.0439		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE LEUCOCITOS (WBC)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
39.4941	4	9.8735	2.481	4.18
99.4838	25	3.9793		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE ERITROCITOS (RBC)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
0.8304	4	0.2076	1.106	4.18
4.6924	25	0.1876		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE HEMOGLOBINA (HGB)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
0.5233	4	0.1308	0.361	4.18
9.0516	25	0.3620		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE HEMATOCRITO (HCT)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
59.1887	4	14.7971	1.263	4.18
292.918	25	11.7167		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (MVC)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
17.8746	4	4.4686	0.466	4.18
239.633	25	9.5853		

Nivel de confianza $\alpha = 0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
1.6246	4	0.4061	0.865	4.18
11.7383	25	0.4695		

Nivel de confianza $\alpha=0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE CONCENTRAIÓN MEDIA DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR (MCHC)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
1.9980	4	0.4995	1.368	4.18
9.1300	25	0.3652		

Nivel de confianza $\alpha=0.01$, No hay diferencia significativa

- ANOVA DE PLAQUETAS (PLT)

Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F experimental	F teórica
85653.67	4	21413.4	1.033	4.18
518418.5	25	20736.74		

Nivel de confianza $\alpha=0.01$, No hay diferencia significativa