



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

DETERMINACIÓN DE FACTORES TOXICOS EN LA
ALMENDRA DE PIÑONCILLO (*Jatropha curcas*)
CONSUMIDA EN EL MUNICIPIO DE ZACUALTIPAN,
HIDALGO.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ONOFRE ZAVALA CRISTIAN DANIEL

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Bernardo Lucas Florentino

Vocal Prof. Lucia Gabriela Bascuñan Termini

Secretario Prof. Inocencia Maria de Lourdes Flores Téllez

1er sup. Prof. Rosa Maria Argote Espinosa

2do sup. Prof. Iliana Elvira González Hernández

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, y laboratorio 4-A del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto A; Facultad de Química, UNAM.

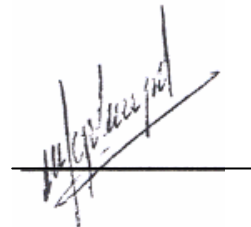
Asesor

M. en C. Bernardo Lucas Florentino



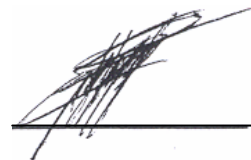
Supervisor técnico

QFB. Leticia Gil Vieyra



Sustentante

Cristian Daniel Onofre Zavala



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química por darme una excelente formación profesional.

Al M. en C. Bernardo Lucas Florentino y a la Q.F.B. Leticia Gil Vieyra por sus enseñanzas, su apoyo y la confianza que me brindaron durante la realización de esta tesis.

Al Q.F.B. Agustín Reyó Herrera y a el pasante de Q.A. Jesús Antonio Beaz Rivera por el apoyo que me brindaron en el uso del equipo de cromatografía de alta resolución (HPLC).

A el Colegio de profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 del AAPAUNAM por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis, por medio de la cátedra "Fernando Orozco Díaz" durante el período 2006-2.

DEDICATORIAS

A dios, por guiarme en mi vida y ayudarme a cumplir con mis metas.

A mi madre por el cariño, la comprensión y el apoyo que me ha brindado durante mi vida.

A mi hermana y a su esposo, por la amistad que hemos tenido todos estos años.

A todos mis amigos (Esteban, Luís, Janett, Isaac, Alfonso, Jorge, Enrique, Valentina, Roberto y Francisco) por todos los buenos momentos que vivimos en esta universidad, y por el apoyo que me brindaron cuando necesite de ellos.

A doña Lety por su compañía y amistad durante todo el tiempo que pase en el laboratorio 4-A.

A los profesores y alumnos del laboratorio 111 del departamento de farmacia, por la gran convivencia que se tiene al trabajar en este laboratorio.

*No podemos ayudar a otro a subir una montaña
sin acercarnos a la cima nosotros mismos.*

General H. Norman Schwarzkoff

INDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares	2
3 ANTECEDENTES	3
3.1 Desnutrición en México y el mundo	3
3.2 Alimentos “no convencionales”	4
3.3 El piñoncillo	5
3.3.1 Clasificación botánica	5
3.3.2 Generalidades	7
3.4 Análisis proximal	8
3.4.1 Humedad	8
3.4.2 Proteínas	9
3.4.3 Grasa	9
3.4.4 Carbohidratos	10
3.4.5 Fibra cruda	10
3.4.6 Cenizas	11
3.5 Factores tóxicos y antinutricionales	11
3.5.1 Inhibidores de tripsina	12
3.5.2 Fitohemaglutininas o lectinas	13
3.5.3 Fitatos	14
3.5.4 Saponinas	15
3.5.5 Esteres de forbol	17
3.6 Proceso general de refinación de una grasa cruda	17
3.6.1 Desgomado	18
3.6.2 Neutralización	18
3.6.3 Decoloración o blanqueo	19
3.6.4 Deodorización	19

3.7 Densidad calórica	20
3.8 Parámetros fisicoquímicos para la caracterización de grasas y aceites	21
3.8.1 Densidad	21
3.8.2 Índice de refracción	22
3.8.3 Punto de fusión	23
3.8.4 Índice de acidez	23
3.8.5 Índice de saponificación	23
3.8.6 Índice de yodo	24
3.9 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	25
4 METODOLOGÍA	26
4.1 Diagrama general de investigación	26
4.2 Origen de la semilla	27
4.3 Limpieza y selección de la semilla	27
4.4 Descascarado	27
4.5 Parámetros físicos	27
4.5.1 Dimensiones	28
4.5.2 Peso hectolítrico	28
4.5.3 Peso unitario	29
4.5.4 Relación cáscara-almendra	29
4.6 Molienda	29
4.7 Desengrasado	30
4.8 Refinación de la grasa cruda	33
4.8.1 Desgomado	33
4.8.2 Neutralización	34
4.8.3 Blanqueo	35
4.8.4 Deodorización	36
4.9 Análisis proximal	37
4.9.1 Humedad	37
4.9.2 Proteína	38
4.9.3 Grasa	40
4.9.4 Cenizas	41

4.9.5 Fibra	42
4.9.6 Determinación de proteína verdadera	44
4.10 Densidad calórica	46
4.11 Parámetros fisicoquímicos	49
4.11.1 Gravedad específica o densidad aparente	49
4.11.2 Punto de fusión	50
4.11.3 Índice de refracción	51
4.11.4 Índice de yodo (Método de Hanus)	53
4.11.5 Índice de Saponificación	55
4.11.6 Índice de acidez (IA)	56
4.12 Determinación de factores tóxicos	57
4.12.1 Inhibidores de tripsina	57
4.12.2 Determinación semicuantitativa de lectinas	62
4.12.3 Determinación de fitatos	64
4.12.3.1 Determinación de fósforo en estándares ácido fítico	64
4.12.3.2 Fitatos	67
4.12.4 Determinación de saponinas	69
4.12.5 Determinación de esteres de forbol por medio de HPLC	73
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
5.1 Parámetros físicos	77
5.2 Análisis proximal	78
5.3 Densidad calórica	80
5.4 Parámetros fisicoquímicos	82
5.5 Factores tóxicos	84
6 CONCLUSIONES	87
7 BIBLIOGRAFÍA	88
8 ANEXO A	93

1 INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuya potencialidad productiva es alta y que pueden ser fuente de nutrimentos para la alimentación humana o animal; sin embargo, estos recursos están infrautilizados, como es el caso del Piñoncillo (*Jatropha curcas*). El piñoncillo es un arbusto o árbol de amplia distribución, resistente a sequías, heladas y plagas, que puede crecer en suelos relativamente erosionados o en terrenos agrícolas marginados sin competir con cultivos tradicionales (Ostoa, 1997; Makkar et al, 1997); esta planta pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y en algunos países asiáticos tiene múltiples usos, considerándose de importancia económica, y desde el punto de vista alimenticio se podría considerar como una fuente alternativa de proteína y grasa ya que el contenido en la almendra de estos nutrimentos reportado es de 27-32% y 58-60% respectivamente (Aregheore et al, 2003).

Se reporta que la mayoría de las variedades de piñoncillo presentan toxicidad hacia el hombre y animales domésticos (especialmente las variedades provenientes de Nicaragua y del norte de África); sin embargo, se ha reportado que en México se encuentran tanto variedades tóxicas como no tóxicas de esta planta (Makkar et al, 1997). Sobre el aspecto tóxico de las semillas de *Jatropha curcas*, en un principio se responsabilizó a una glicoproteína con propiedad hemaglutinante denominada cursina y al alto nivel de inhibidores de tripsina; sin embargo, se ha observado que no obstante que las semillas se procesen con un tratamiento con calor, siguen manifestando efecto tóxico cuando se destinan a alimentación animal. Actualmente, se responsabiliza de la toxicidad de esta semilla a los esteroides de forbol, ya que estas sustancias presentan efectos carcinogénicos y teratogénicos en animales superiores (Aregheore et al, 2003; Abdu-Aguye et al, 1986). Por lo anterior y debido a que se tiene conocimiento de que se acostumbra consumir la almendra tostada de la semilla de esta planta en algunas zonas rurales de nuestro país, en particular en comunidades marginales del estado de Hidalgo, es conveniente conocer su composición química para poder predecir el posible riesgo o en su caso, el aspecto benéfico de su consumo por el hombre o animales domésticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Determinar los factores tóxicos intrínsecos que se reporta contiene la almendra de piñoncillo, con la finalidad de evaluar la seguridad alimentaría de este recurso vegetal, en particular de la fracción grasa y proteínica de la variedad que crece en el Municipio de Zacualtipan, Hidalgo.

2.2 Objetivos particulares:

- Realizar el análisis proximal y la determinación de energía gruesa en la almendra de piñoncillo integral y en la harina desengrasada.
- Refinamiento de la grasa cruda y determinación de parámetros fisicoquímicos, tanto a la grasa cruda como al aceite refinado.
- Determinar la densidad calórica o energía gruesa a la grasa cruda y aceite refinado de la almendra de piñoncillo
- Determinar el contenido de lectinas, fitatos, inhibidores de tripsina y saponinas en la harina desengrasada .
- Realizar la detección de esteres de forbol en el material biológico y en caso positivo hacer la cuantificación en la fracción grasa.

3 ANTECEDENTES

3.1 Desnutrición en México y el mundo

El hambre y la desnutrición se siguen acrecentando en ciertas regiones de la población mundial y nuestro país desafortunadamente no queda excluido de esta situación, pese al notable incremento en la importación de alimentos (FAO, 1995; INEGI, 2002). En México el hambre y la desnutrición son un problema ancestral y no obstante el aumento de la disponibilidad de los alimentos, más que la producción, todavía se presenta un alto porcentaje de desnutrición proteico-calórica, particularmente en las zonas rurales marginales. Uno de los grupos más vulnerables al problema de la desnutrición lo constituye la población infantil en particular los preescolares, y las cifras más recientes de mal nutrición en niños menores de cinco años indican que el problema se presenta entre un 18.8 a 22.4%, según las encuestas realizadas por la Secretaría de Salud y el IMSS, lo que indica que el problema es de salud pública prioritario. Si bien las cifras son alarmantes, lo más preocupante es que los datos proporcionados por las instituciones anteriores indican que de 1996 al 2001 se ha presentado un deterioro en el aspecto nutritivo de la población mexicana acentuándose más el problema en los estados del Sur del territorio nacional, donde se presenta un mayor nivel de marginación (Doode y Pérez, 1994; INEGI, 2002).

Paradójicamente a lo anterior, el mal planeado desarrollo agropecuario en muchas comunidades rurales, pone en peligro la conservación de plantas silvestres o de cultivo incipiente, no importando que algunas de ellas tienen un alto potencial alimenticio, y son apreciadas y utilizadas de manera sustentable en dichas comunidades. En estos entornos indígenas se destruye vegetación silvestre o en cultivo incipiente en forma indiscriminada, ya que con tal de obtener tierras adecuadas para el sistema intensivo de monocultivo y extensión de la ganadería, se pone en peligro el potencial germoplásmico de muchas especies silvestres, que algunos autores le denominan “erosión genética” (Flores, 1988; Doode y Pérez, 1994; Centurión et al, 2000). Por lo tanto, el riesgo de la implantación de la “modernidad” mal planeada en estas zonas, pone en peligro la pérdida de especies vegetales que hasta el momento no han sido valoradas en su plenitud (Bostid, 1989; Hernández y León, 1992).

Si bien en la producción nacional de los granos básicos se ha observado cierta tendencia a aumentar, en el renglón de las oleaginosas la dirección va en sentido inverso. Lo anterior parece un reflejo de la política agropecuaria nacional, en donde se pretende incrementar la producción de cultivos más rentables, sustituyendo incluso a los cultivos destinados al sustento humano y como consecuencia de la expansión de estos cultivos, el reemplazo de cultivos de oleaginosas ha sido el más afectado (Quilantán, 1992; FAO, 1997). La situación anterior, pone en la necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de grasas y aceites, debido a que la producción nacional es insuficiente. En esta búsqueda se han tomado acciones tales como mejorar la calidad y cantidad de las especies tradicionales (cártamo, ajonjolí, soya, girasol, canola entre otras), pero esto ha sido insuficiente. También, por medio de la ingeniería genética, plantas que originalmente no producían aceites comestibles, actualmente con esta innovación tecnológica se obtienen variedades con grasas alimenticias; ejemplo de ello tenemos las especies del género **Brassica**, cuyas semillas son auténticas oleaginosas y además tienen un alto contenido de proteína y a las cuales se ha eliminado en gran medida el contenido de ácido erúico y glucosinolatos los cuales son tóxicos tanto al hombre como a los animales domésticos o la reducción de glucósidos cianogénicos en la jojoba, por mencionar algunos casos (Quilantán, 1991; Murphy, 1994).

3.2 Alimentos “no convencionales”

La búsqueda de material biológico con potencial proteínico-calórico, no es nueva ni difícil de implantar como recurso agroalimentario, ya que el territorio mexicano cuenta con una gran biodiversidad, debido al amplio mosaico de ecosistemas (Villela y Gerez, 1994; Granados y López, 1996). Con respecto a lo anterior, cabe mencionar que el sur de México junto con Centroamérica, fue uno de los principales centros de origen de muchas plantas cultivadas y que actualmente son fuente de alimentos que el género humano disfruta (Granados y López, 1996). Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuya potencialidad productiva es alta y que pueden ser fuente de nutrimentos para la alimentación humana o animal; sin embargo, estos recursos están infrautilizados, como es el caso del Piñoncillo (***Jatropha curcas***), el cual es un arbusto que produce semillas con un alto contenido de proteína y grasa (Ostoa, 1997; Hernández y León, 1992; Ruvalcaba y Alcalá, 1993).

Aquellas plantas silvestres o en cultivo incipiente, si bien por una parte pueden proporcionar macro y micronutrientes en la alimentación humana o animal, no debe descartarse la presencia en estos recursos vegetales, de factores tóxicos o antinutricionales, que pueden poner en riesgo la salud de aquellos que la consumen en mayor cantidad de la considerada empíricamente como segura; por lo tanto, cuando se pretende utilizar con fines comestibles una planta silvestre o en cultivo incipiente, es necesario contemplar la presencia de factores tóxicos o antinutricionales, ya que algunos de ellos son muy comunes en los alimentos de origen vegetal, como son: inhibidores de proteasas, lectinas, taninos entre otros, o de tóxicos específicos, como el caso de gossipol en la semilla de algodón, o de glucosinolatos en la semilla de colza (Liener, 1980; Watson, 1987; Lindner, 1995). Para el caso de un recurso vegetal, como fuente potencial de grasa y proteína como es una oleaginosa, la obtención de preparados proteínicos o lipídicos purificados, como son concentrados o aislados de proteína y aceites refinados, permiten la eliminación de factores tóxicos y antinutricionales presentes en el material original (Mansour et al, 1993; Wanasundara y Shahidi, 1998). Sobre lo último mencionado, hay la posibilidad que estos fitoquímicos no deseados, puedan tener un uso no comestible, que puedan proporcionar un valor agregado al recurso vegetal (Murphy, 1994; Wanasundara y Shahidi, 1998).

3.3 El piñoncillo

3.3.1 Clasificación botánica

Linnaeus (1753) fue el primero en nombrar a esta planta como *Jatropha curcas L.*, de acuerdo con la nomenclatura binomial de "*Species Plantarum*" la cual hasta la actualidad sigue usándose. El nombre del género *Jatropha* deriva del griego *iatrós* (doctor) y *trophé* (comida), el cual implica usos medicinales. (Heller, 1996)

La familia *Euphorbiaceae* comprende aproximadamente 8000 especies y 321 generos. El genero *Jatropha* pertenece a la tribu *Joannesieae* de *Crotonoideae* en la familia *Euphorbiaceae* y contiene aproximadamente 170 especies conocidas. En 1976 Dehgan y Webster revisaron la subdivisión hecha por Pax (1910) y distinguieron 2 subgeneros (*curcas* y *jatropha*) del genero *Jatropha*, con 10 secciones y 10 subsecciones que comprenden todas las especies del viejo y nuevo mundo. Además ellos postularon que *Jatropha curcas* puede ser la más primitiva forma del género *Jatropha*,

ya que las especies en las otras secciones comprenden otras formas de *Jatropha curcas* con solo cambios en el tamaño y estructura de las flores. (Heller, 1996)

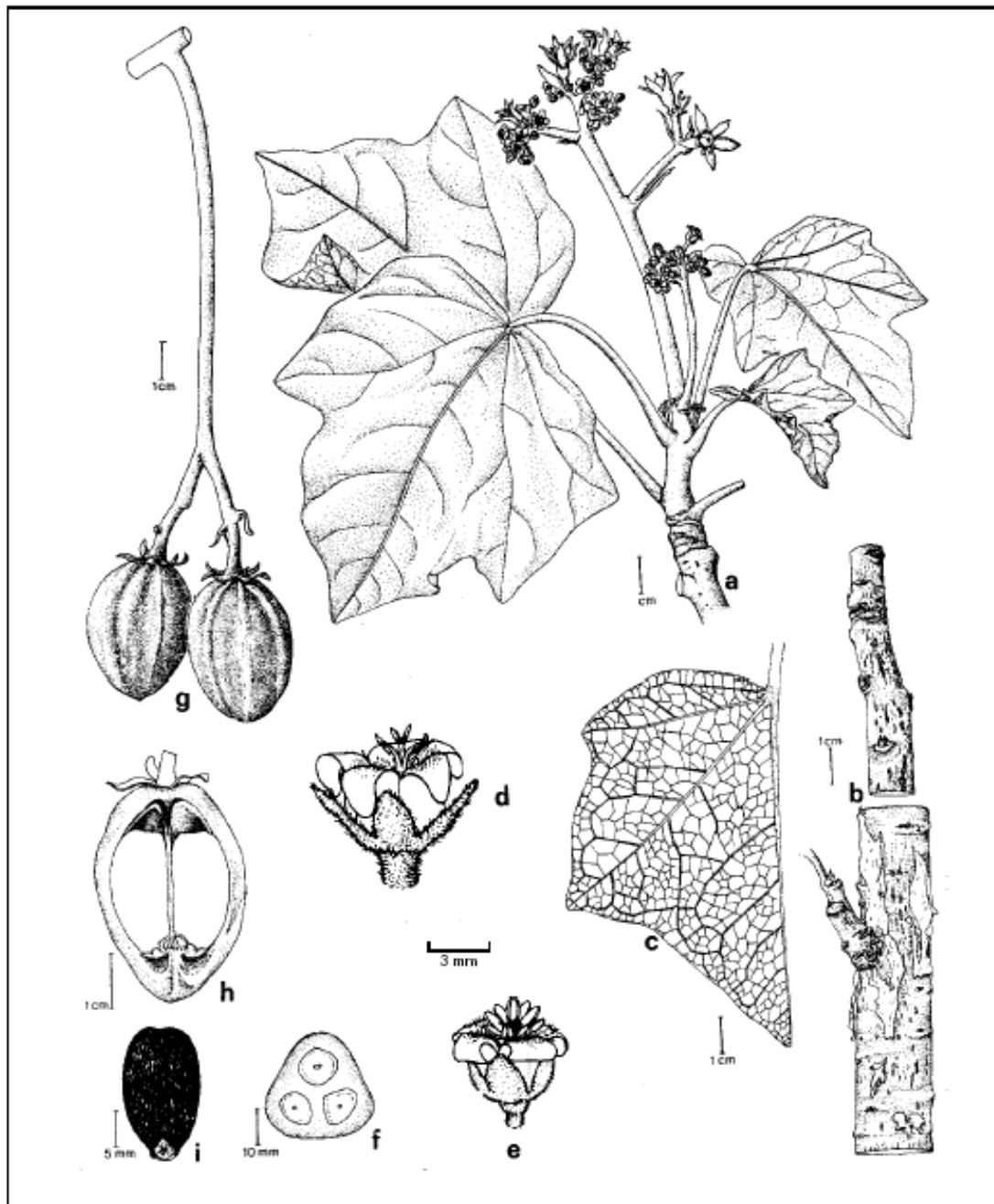


Figura 1. Características morfológicas de *Jatropha curcas*. a)rama de la flor, b)ramas, c)mitad de una hoja, d)pistilo de la flor, e)flor fecundada, f)corte por la mitad de un fruto inmaduro, g)frutos, h)corte longitudinal del fruto, i)semilla. (Heller, 1996)

Existen diversos nombres vernáculos para *Jatropha curcas*, entre los cuales podemos mencionar: Physic nut, purging nut (inglés); pourghére (francés); purgeernoot (holandés); purgiernub (alemán); purgueira (portugués); habel meluk (árabe); safed arand (India); kadam (Nepal); yu-lu-tzu (Chino); subudam (Tailandia); túbang-bákod (Filipinas); jarak budeg (Indonesia); vagan (Costa de marfil); kpoti (Togo); tabanani (Senegal); nupuluka (Angola); butaje (Nigeria); makaem (Tanzania); piñoncillo (México); tempate (Costa rica); tártago (Puerto rico); mundubí-assu (Brazil); piñol (Perú); y pinon (Guatemala). (Heller, 1996)

3.3.2 Generalidades

Jatropha curcas es un arbusto de amplia distribución, conocido comúnmente como nuez purgante, piñoncillo, Hab-El-Mueluk, black vomit nut, ratanjyoti, entre otros y es un miembro de la familia *Euforbiceae*. Esta planta tiene un rápido crecimiento y puede desarrollarse en suelos pobres y áridos, llegando a alcanzar una altura de 3 a 8 metros y es resistente a las heladas y plagas. El piñoncillo puede crecer en suelos relativamente erosionados o en terrenos agrícolas marginados donde no hay una buena irrigación o precipitación pluvial, o sea que este arbusto, no compite con las suelos destinados para los cultivos alimenticios; por consiguiente si se aprovechará la producción de las semillas de esta planta, las cuales contienen almendras con una alta concentración de grasa y proteína, se podría aliviar en parte la deficiencia de estos dos nutrimentos, situación que comúnmente se presenta en comunidades rurales de países tropicales y subtropicales en vías de desarrollo como lo es México (Ostoa, 1997; Makkar et al, 1997).

Se menciona que el rendimiento de la semilla del piñoncillo es de aproximadamente 5 ton/Ha, de la cual la almendra tiene hasta 60% de grasa y cuando ésta se extrae de esta parte vegetal, queda una torta residual con un nivel de 50 a 58% de proteína, la cual se podría utilizar como fuente alternativa de este nutrimento para la alimentación animal. Sin embargo, tanto la almendra como la grasa de esta planta, se ha encontrado que es tóxica hacia el hombre y muchos animales, responsabilizándose de esta propiedad dañina a los metabolitos secundarios que biosíntetiza este vegetal, pero a su vez se ha observado que el nivel de estos factores tóxicos, varía enormemente entre las diferentes variedades, ya que al parecer tiene una gran influencia las condiciones ambientales donde se desarrolla esta planta (Aguilar y Zolla, 1982; Abdu-Aguye et al, 1986; El Badwi et al, 1995; Makkar et al, 1997).

Esta planta de la familia de las Euforbiáceas, se encuentra ampliamente distribuida en el territorio nacional, en donde es conocida vulgarmente como piñoncillo, piñón, piñón purgante, avellana purgante y sangregado entre otros. No obstante que se considera como una planta venenosa, se menciona que en algunas regiones de México, es costumbre consumir las almendras de semillas tostadas, pero su ingesta debe ser pequeña y esporádica, pero también se indica que un consumo más halla de lo normal, puede provocar malestar gastrointestinal y dependiendo de la cantidad ingerida se puede presentar hasta irritación intensa de la garganta, dolores abdominales, diarrea, vómito y gastroenteritis severa (Martínez, 1987; Aguillar y Zolla, 1982; Makkar et al, 1998; Aregheore et al, 1998).

3.4 Análisis proximal

El análisis proximal juega un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la calidad de los alimentos. Este tipo de análisis se emplea en todo el mundo para hacer descripciones de los alimentos. Los principales componentes de interés son humedad, grasa, proteínas, cenizas, fibra y carbohidratos, aprovechables y no aprovechables. En la práctica los métodos usados pueden variar, de acuerdo al alimento que se examina: pueden también ser empíricos, pero si el mismo procedimiento estándar se aplica en cada ocasión al mismo alimento, los resultados proporcionan una adecuada base de interpretación. (Egan et al, 1991)

3.4.1 Humedad

El agua se encuentra en los alimentos en tres formas: como agua de combinación, como agua adsorbida y en forma libre, aumentando el volumen. El agua de combinación está unida en alguna forma química como agua de cristalización o como hidratos. El agua adsorbida está asociada físicamente como una monocapa sobre la superficie de los constituyentes de los alimentos. El agua libre es aquella que es fundamentalmente un constituyente separado, con facilidad se pierde por evaporación o por secado. Dado que la mayor parte de los alimentos son mezclas heterogéneas de varias sustancias, pueden contener cantidades variables de agua de los tres tipos. (Egan et al, 1991; Lehninger, 1985)

3.4.2 Proteínas

Las proteínas son compuestos químicos muy complejos que se encuentran en todas las células vivas, están formadas por la unión de sustancias más simples llamadas aminoácidos. Son la base de todos los procesos fisiológicos celulares ya que a partir de ellas se regulan la mayoría de los procesos metabólicos (Lehninger, 1985). Las funciones principales de las proteínas son:

- Proporcionan los aminoácidos esenciales fundamentales para la síntesis tisular. Las grasas y carbohidratos no las pueden sustituir, por no contener nitrógeno.
- Materia prima para la formación de los jugos digestivos, hormonas, proteínas plasmáticas, hemoglobina, vitaminas y enzimas.
- Funcionan como amortiguadores, ayudando a mantener el pH de diversos medios como el plasma.
- Actúan como catalizadores biológicos (enzimas).
- Actúan como transporte de gases en la sangre (hemoglobina).
- Actúan como defensa, los anticuerpos son proteínas de defensa natural contra infecciones o agentes extraños.
- Permiten el movimiento celular a través de la miosina y actina (proteínas contráctiles musculares).
- Resistencia. El colágeno es la principal proteína integrante de los tejidos de sostén.

3.4.3 Grasa

Las grasas o lípidos son sustancias químicamente muy diversas. Sólo tienen en común el ser insolubles en agua u otros disolventes polares y ser solubles en disolventes no polares u orgánicos. Existen diferentes familias o clases de lípidos, pero las propiedades distintivas de todos ellos derivan de la naturaleza hidrocarbonada de la porción principal de su estructura. Los lípidos desempeñan importantes funciones en los seres vivos. Estas son, entre otras, las siguientes (Lehninger, 1985; Morrison, 1976):

- Estructural: Son componentes estructurales fundamentales de las membranas celulares.
- Energética: Al ser moléculas poco oxidadas sirven de reserva energética pues proporcionan una gran cantidad de energía al ser oxidadas (un gramo de grasa

libera 9,4 Kcal, más del doble que la que se consigue con 1 gramo de glúcido o de proteína).

- Protectora: Las ceras impermeabilizan las paredes celulares de los vegetales y de las bacterias y tienen también funciones protectoras en los insectos y en los vertebrados.
- Transportadora: Sirven de vehículo de las vitaminas liposolubles.
- Reguladora del metabolismo: Contribuyen al normal funcionamiento del organismo, desempeñan esta función las vitaminas A,D, K y E, las hormonas sexuales y las de la corteza suprarrenal que también son lípidos.

3.4.4 Carbohidratos

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera y a su vez los más diversos. Químicamente son polihidroxicetonas o polihidroxialdehidos y sus derivados. Normalmente se les encuentra en las partes estructurales de los vegetales y también en los tejidos animales, como glucosa o glucógeno. Estos sirven como fuente de energía para todas las actividades celulares vitales. Las funciones que cumple en el organismo son (Lehninger, 1985; Morrison, 1976):

- Energética: los carbohidratos aportan 4 Kcal por gramo.
- Ahorro de proteínas: Si el aporte de carbohidratos es insuficiente, se utilizarán las proteínas para fines energéticos.
- Regulación del metabolismo de las grasas: En caso de ingestión deficiente de carbohidratos, las grasas se metabolizan.
- Estructural: Los carbohidratos constituyen una porción pequeña del peso y estructura del organismo.

3.4.5 Fibra cruda

Es el residuo orgánico combustible e insoluble que queda después de que la muestra se ha tratado en condiciones determinadas (H_2SO_4 diluido hirviendo, NaOH diluido hirviendo, HCl diluido, etc). Consiste principalmente de celulosa además de lignina y hemicelulosas contenidas en la muestra. La fibra le da ciertas propiedades físicas a los alimentos, y generalmente baja la densidad calórica de los alimentos.(Egan et al, 1991)

3.4.6 Cenizas

Se denomina así a la materia inorgánica que forma parte constituyente de los alimentos (sales minerales). Las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica del alimento. Todos los alimentos contienen elementos minerales formando parte de los compuestos orgánicos e inorgánicos. Es muy difícil determinarlos tal y como se presentan en los alimentos, la incineración pasa a destruir toda la materia orgánica, cambia su naturaleza, las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos o carbonatos, o reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros. Algunos elementos como el azufre y los halógenos pueden no ser completamente retenidos en las cenizas, pudiéndose volatilizar. (Egan et al, 1991)

3.5 Factores tóxicos y antinutricionales

Por su modo de acción, las sustancias nocivas en los alimentos pueden clasificarse en dos grandes grupos (López, 2000):

a) Sustancias antinutritivas. Su efecto tóxico se basa en disminuir la disponibilidad o provocar una pérdida suplementaria de los nutrientes esenciales. Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa con un aporte suplementario de los nutrientes implicados, a la larga determinan la aparición de una patología particular. Pertenecen a este grupo, por ejemplo antivitaminas, antienzimas y secuestrantes de minerales. Los efectos nocivos de estas sustancias pueden pasar desapercibidos en el caso de una abundante alimentación.

b) Sustancias tóxicas. Son compuestos que tienen un efecto tóxico directo sobre el organismo. Su modo de acción puede explicarse, ya sea por su particular reactividad, por un mimetismo molecular de las hormonas, aminoácidos, o, en ciertos casos por la existencia de una información genética que favorezca la aparición de una determinada patología y producen una intoxicación aguda en ocasiones con una sola dosis.

3.5.1 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasas son también proteínas que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas. Los inhibidores de tripsina son probablemente los más distribuidos en el reino vegetal y particularmente en las leguminosas. Actúan inhibiendo a la tripsina la cual es una enzima proteolítica de suma importancia en la digestión de los humanos y animales monogástricos.

Estos inhibidores son considerados factores antitripsicos que han sido aislados en gran variedad de fuentes naturales vegetales. Los inhibidores de proteasas son proteínas termolábiles que se encuentran en granos y semillas, cuyo consumo reduce la digestibilidad y el aprovechamiento de proteínas que participan en el proceso digestivo. Los inhibidores más conocidos son los de Kunitz y Bowman-Birk de la soya; el primero es una proteína celular, no helicoidal, con 197 aminoácidos, con un peso molecular de 21500 con dos enlaces disulfuro, de los cuales una de ellos es fundamental para su actividad; el segundo consta de 72 aminoácidos, con un peso molecular de 7975, éste contiene ocho enlaces disulfuro, se asocia reversiblemente y forma una mezcla de monómero-dímero siendo más estable al calor, a los ácidos y a la pepsina que el primero. Ambos inhiben el crecimiento, reducen la absorción de lípidos, la digestibilidad de proteínas, causan hipertrofia pancreática, aumento de la secreción de bilis y jugo pancreático. (Liener, 1975; Lindner, 1995).

En cuanto a su mecanismo de inhibición existen varias teorías entre los investigadores entre las cuales se mencionan:

- Los inhibidores de enzimas proteolíticas forman puentes complejos con las enzimas que ellos inhiben.
- La enzima e inhibidor experimentan un tipo de interacción enzima-sustrato.
- Los inhibidores son resistentes a la proteólisis, aunque en la interacción puede ocurrir la ruptura de algunos enlaces peptídicos.

Nutricionalmente los inhibidores de tripsina causan un retraso en el crecimiento o un índice bajo de la eficiencia proteica (PER). Estos inhibidores al ser inactivados por tratamientos térmicos hace que el PER aumente. Sin embargo, si se tratara de destruir

por completo a los inhibidores presentes, las condiciones serían bastante drásticas, ocasionando la degradación de nutrimentos. (Valle, 2000)

La mayoría de los inhibidores de tripsina pueden ser destruidos mediante un tratamiento térmico adecuado, con lo que se logra mejorar el valor nutritivo de las proteínas. (Feeney et al, 1969; Lindner, 1995)

3.5.2 Fitoheماغلutininas o lectinas

En muchas semillas principalmente de leguminosas existen sustancias de origen proteico, llamadas fitoheماغلutininas o lectinas por la capacidad de aglutinar a los glóbulos rojos humanos y de otras especies animales debido a su especificidad hacia las glucoproteínas presentes en los sitios receptores en la superficie celular. Estas son proteínas y más específicamente glico-proteínas. (López, 2000)

La primera descripción de una lectina fue presentada por Stillmark en 1889, quien estudió la semilla de ricino y atribuyó su toxicidad a una proteína que llamo ricina. Landstiner en 1908 encontró en las leguminosas un grupo importante de lectinas desde el punto de vista nutricional, observando que los extractos producían aglutinación pero en otros no se detectaba acción tóxica. (Liener, 1980)

Posteriormente, Summer aisló del Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) una globulina que llamó concavanina A, la cual tiene actividad aglutinante. La hemaglutinina de soya fue aislada por Liener en 1953 (Jaffé, 1968). No obstante el diferente origen de estas proteínas, los efectos tóxicos son los mismos, lo que varía es la intensidad de aquellas lectinas tóxicas.

Jaffé en 1960 encontró que la causa del efecto toxico de las lectinas ingeridas se relaciona con su acción sobre la absorción intestinal. Se supone que la lectina interacciona con grupos receptores situados en la superficie de las células que conforman la mucosa gástrica, de una manera semejante como se combinan con los glóbulos rojos, interfiriendo en la absorción de nutrientes. Se ha observado que cuando animales en experimentación consumen una dieta preparada con semillas de leguminosas con elevado contenido de lectinas tóxicas presentan diarreas, daño hepático, absorción

reducida de aminoácidos, hipoglucemia, pérdida de peso y en algunos casos hasta la muerte. (Jaffé, 1968; Liener, 1975)

Otros autores sugieren que la causa de la toxicidad de estas sustancias, se debe a que las lesiones epiteliales del intestino pueden favorecer la proliferación bacteriana que es la causante de la no biodisponibilidad de nutrimentos. Hay que mencionar, que al parecer algunas lectinas no resisten el proceso hidrolítico de las enzimas digestivas, por lo tanto no presentan propiedad tóxica, como es el caso de las lectinas del garbanzo (*Cicer arietinum*).

Las fitohemaglutininas como la mayoría de las proteínas, son termalábiles y generalmente su efecto tóxico se puede eliminar o reducir notablemente por medio de un tratamiento térmico adecuado, presentándose así, un incremento en el valor nutritivo de las leguminosas. (Hughes et al, 1973)

3.5.3 Fitatos

Químicamente el ácido fítico es hexafosfato de inositol, el cual es un constituyente muy común de los cereales. Es conocido por que disminuye la biodisponibilidad del zinc y otros elementos traza necesarios para humanos y animales monogástricos. (Wolfgang et al, 1983)

Puede ser desfosforilado en cierto grado hasta inositol en el lumen intestinal por la enzima fitasa, además se encuentra en abundancia en el trigo, en el centeno y la cebada, la fitasa de centeno es más activa. Está fitasa es destruida por el calor. (FAO, 1980)

El ácido fítico y sus sales (fitatos) son componentes comunes de los tejidos vegetales relacionados con productos alimenticios. Este ácido esta ampliamente distribuido en la naturaleza, particularmente en los cereales y las leguminosas, localizándose frecuentemente en el pericarpio, ya que es la principal forma de almacenamiento de fósforo. Por tratamiento con ácido y calor o por la acción de la enzima fitasa presentes en los alimentos ricos en ácido fítico, este se hidroliza, liberando inositol y ácido fosfórico.

Seis grupos reactivos de fosfato presentes en la molécula del ácido fítico hacen de este compuesto un agente fuertemente quelante, en el que 8 de los 12 protones disociables del fitato están disponibles para atrapar metales uniéndose a minerales tales como Ca^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} y Fe^{+2} . Bajo las condiciones de pH en el interior del conducto gastrointestinal se forman complejos insolubles de metal-fitato, los cuales hacen que algunos minerales tales como el calcio, hierro, zinc y otros metales bivalentes no estén disponibles para su absorción en las paredes del intestino de animales monogástricos y seres humanos. Además, forma complejos con proteínas impidiendo la absorción de estas.

El ácido fítico es dos veces desmineralizante; lo es una primera vez proporcionando fósforo inutilizable; y una segunda vez acomplejando elementos indispensables al organismo, puede provocar osteoporosis y/o raquitismo debido al papel descalsificante del ácido fítico. (López, 2000)

El ácido fítico se considera como una mala fuente de fosfato para el hombre por que no se libera o porque se encuentra en forma de sales insolubles. Existen numerosos reportes que indican que este ácido aumenta la pérdida fecal de calcio y vitamina D, también puede quedar reducidas la utilización digestiva de oligoelementos como cobre, zinc, magnesio y hierro. (Derache, 1990)

3.5.4 Saponinas

Las saponinas son glucósidos anfifílicos, en los cuales la parte polar la constituyen los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) que se encuentran enlazados a un grupo no polar llamado aglicona o sapogenina, el cual puede ser ya sea un esteroide ó un triterpeno, aunque la mayoría de las saponinas que han sido identificadas son triterpenoides. Estas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal en hojas, raíces, tallos y flores. (López, 2000)

Las saponinas son sustancias en su mayor parte amorfas, de sabor amargo, en general inodoras, de difícil cristalización; sus soluciones coloidales al producir espuma reducen fuertemente la tensión superficial por lo que pueden estabilizar las emulsiones de grasas y aceites, irritan los ojos y la piel cuando se frota, son termorresistentes, forman

complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroles. Son medianamente solubles en agua y muy solubles en alcohol. (López, 2000)

Algunas saponinas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos y hongos, ya que actúan precipitando esteroides en la pared celular.

Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y si pasan a la corriente sanguínea pueden hemolizar las células de los glóbulos rojos, pueden producir fallas de respiración, convulsiones y coma. Además, las saponinas producen hemólisis en diferentes tipos de glóbulos rojos; la hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos, que produce liberación de hemoglobina. Sin embargo, la toxicidad de las saponinas está en discusión ya que en algunos países se tienen límites permitidos mientras que en otros se utilizan como aditivos para alimentos. (Girón, 1992)

La membrana celular de los eritrocitos está constituida por esteroides, fosfolípidos y proteínas, se ha observado que 15 saponinas y 6 sapogeninas forman complejos con el colesterol, pero no con la lecitina ni con la albúmina; esto implica que el punto de ataque en la hemólisis con saponinas, es el colesterol de la membrana de los eritrocitos. Se ha observado que se necesita una mínima cantidad de saponinas que rodeen a la membrana para que se produzca la hemólisis, la cual es una consecuencia de que las moléculas de saponina se unan al colesterol, dando lugar a la formación de canales en la membrana y/o una posible desnaturalización. (Clavert et al, 1967)

Las saponinas son altamente tóxicas para peces y otros animales acuáticos de sangre fría o que respiren por branquias; sin embargo, su efecto dañino en animales superiores es variable. En la actualidad se ha realizado un notable incremento en el conocimiento de este tipo de compuestos, por que aparte de que manifiestan ciertas propiedades tóxicas, también se les ha asignado cualidades tecnológicas y medicinales. (Valle, 2000).

3.5.5 Esteres de forbol

Los ésteres de forbol son derivados de diterpenos tetracíclicos que parecen estar restringidos a las familias *Euphorbiaceae* y *Thymelaceae*. Estos compuestos son frecuentemente estudiados debido a sus actividades promotoras de tumores e inflamatorias. Los mecanismos moleculares que rigen la actividad promotora de tumor de los esterres de forbol son diferentes de los que desencadenan una actividad inflamatoria. La actividad promotora de tumores parece estar asociada a la habilidad que los esterres de forbol presentan de sustituir al diacilglicerol como activador de la proteína cinasa C, y también debido a su capacidad de estimular la síntesis de proteínas, de RNA y de DNA, comportándose como agentes mitogénicos y estimulando el crecimiento celular, esto en dosis muy altas. Con respecto a su actividad inflamatoria, los esterres de forbol mueven fosfolipidos, liberan ácido araquidonico y causan la secreción de prostaglandinas, provocando una respuesta inflamatoria de tejidos.

3.6 Proceso general de refinación de una grasa cruda

Los aceites de oleaginosas pueden ser extraídos de semillas, seguido de un proceso de refinación para eliminar la materia indeseable y modificar sus propiedades. A pesar de que las grasas provienen de diversas fuentes (animales y vegetal), en general son procesadas para su refinamiento y estandarización y así poder ser consumidas más fácilmente. Para que un aceite comestible sea considerado de buena calidad no deberá tener olor, ni sabor, ni impurezas y debe ser estable a la oxidación. El procesamiento de los aceites esta diseñado en parte para eliminar o destruir productos de la oxidación o factores como ácidos grasos libres y contaminantes metálicos que puedan iniciar o propiciar reacciones oxidativas. (Álvarez, 2002)

Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con disolventes orgánicos. En este proceso el aceite se extrae de la semilla con hexano que después se separa del aceite y se reutiliza. Las desventajas de éste es que es muy flamable pero debido a su alta volatilidad no queda resto alguno de hexano en el aceite final. Los aceites y grasas obtenidos directamente tras la extracción se denominan aceites y grasas "crudos". Contienen aún pequeñas cantidades de compuestos naturales que no son glicéridos que serán eliminados a lo largo de una serie de fases del procesado llamado refinación. (Álvarez, 2002)

Los aceites utilizados como alimento, requieren de remover todos los componentes extraños para obtener una calidad adecuada para su aplicación como alimento. Durante la refinación, sustancias que afectan la calidad del aceite son removidas o reducidas en su concentración. Esto incluye a los ácidos grasos libres, los hidratos de carbono, fosfolípidos, las proteínas y sus productos de degradación, el agua, pigmentos, compuestos volátiles, pesticidas, aflatoxinas, metales, productos que favorecen la oxidación y otras impurezas del aceite crudo. (Álvarez, 2002; McWilliams, 1989; Watson, 1987).

Los procesos básicos que se llevan a cabo en la refinación son: 1) desgomado; 2) neutralización; 3) blanqueo y 4) deodorización. La Hidrogenación del aceite también es considerado como parte del proceso de refinación en algunos casos (Watson, 1987).

3.6.1 Desgomado

El procedimiento para eliminar las gomas, resinas, proteínas y fosfolípidos se denomina desgomado. Esta operación se puede realizar por dos sistemas: uno que consiste floccular el aislamiento de la goma para una recuperación y obtención de un subproducto con valor comercial; y el desgomado por tratamiento generalizado sin separación específica de la goma. Las grasas crudas que se asume tienen un nivel alto de fosfolípidos como la lecitina, cefalina (1,5-2.5%), pueden precipitar por simple hidratación, la cual se efectúa por agregar del 2-3% de agua, mejorando este desgomado con la adición de ácido cítrico o fosfórico, separándolos con centrifugación al final. Al agregar alguno de estos ácidos, y calentando la mezcla a unos 60-70°C las gomas son hidratadas y flocculadas formando un mucílago que es insoluble en el aceite e inmediatamente son eliminadas por sedimentación o centrifugación. Durante el proceso es posible la recuperación de lecitina como subproducto, ya es un gran emulsificante natural utilizado con importancia en la industria alimentaria. (Ziller, 1996; Watson, 1987; Desrosier, 1997, Álvarez, 2002).

3.6.2 Neutralización

El término neutralización generalmente se aplica a la operación de eliminar los ácidos grasos libres y por tradición esta se realiza por el uso de bases tales como sosa cáustica (hidróxido de sodio al 12-15%). Las grasas crudas siempre tienen un contenido de ácidos grasos libres, el cual representa el grado de acidez de dicho aceite. El aumento

de la acidez se debe evitar al máximo posible, ya que un nivel alto de estos causan graves pérdidas en el proceso de refinación. El método más común de la neutralización consiste en el empleo de un álcali de concentración conocida, el cual se mezcla con el aceite que se calienta entre 75 a 95°C y después se deja sedimentar la fase acuosa para posteriormente separar esta fase jabonosa por centrifugación y proceder a lavar el aceite varias veces con agua caliente y someterlo nuevamente a centrifugación intensa. La neutralización alcalina realiza una completa eliminación de los ácidos grasos libres que transforman en jabones insolubles en el aceite. Del mismo modo se combinan con el álcali otras sustancias ácidas y se eliminan algunas impurezas del aceite por adsorción en el jabón formado en el proceso. Se eliminan también todas las sustancias que se insolubilizan por hidratación. (Álvarez, 2002).

3.6.3 Decoloración o blanqueo

El término blanqueado se refiere al proceso de eliminación de sustancias coloreadas para purificar aún más la grasa o aceite. Normalmente se realiza después de la neutralización. Se utiliza para eliminar pigmentos (clorofilas, carotenoides, xantinas y gosipol y antocianinas), así como productos de la autooxidación, residuos de jabones alcalinos, sustancias mucilaginosas, compuestos azufrados, así como parte del insaponificable. (Prior, 2004; Ziller, 1996).

El proceso de blanqueo es un proceso físico que consiste en mezclar un material adsorbente (arcillas neutras, arcillas ácidas activadas o carbón activado, siendo este el más efectivo aunque tiene sus inconvenientes porque es caro y retiene una gran cantidad de aceite; por esta razón para lograr mejores resultados a veces se mezclan arcillas neutras con 5-10% de carbón activado) con el aceite y se somete a calentamiento (aproximadamente a 85°C) para mayor actividad del adsorbente. El material adsorbente son algunas tierras o arcillas de colorantes, las cuales son obtenidas por activación física o química. (Álvarez, 2002; Prior, 2004).

3.6.4 Deodorización

La deodorización es un proceso de destilación con vapor y vacío con el objeto de eliminar componentes traza que proporcionarían olores (aldehídos y cetonas), con bajos umbrales de detección por el gusto y el olfato, procedentes en su mayoría de la oxidación del aceite, o sabores no deseados a los aceites y grasas. Esto es posible gracias a las

grandes diferencias de volatilidad entre las sustancias que dan olores y sabores a las grasas, y los triglicéridos. Generalmente la presión de vapor de los compuestos odoríferos es relativamente baja y se requerirán de temperaturas demasiado elevadas si la destilación se llevará a cabo a presión atmosférica; de ahí la necesidad de regular esta operación a una presión reducida (vacío) y la corriente de un gas inerte para abatir la temperatura de destilación y evitar el daño y descomposición de la grasa neutra. Se realiza al vacío también para evitar la hidrólisis no deseada de la grasa. Normalmente se realiza después del desgomado, de la neutralización y el blanqueado. (Ziller, 1996).

Este tratamiento también da lugar a la destrucción térmica de algunas sustancias no volátiles de aroma desagradable, y los compuestos volátiles resultantes son entonces destilados. (Fennema,1993).

3.7 Densidad calórica

La energía necesaria para el funcionamiento y crecimiento del organismo humano se obtiene de la degradación enzimática de los alimentos que se ingieren, la serie de reacciones involucradas en esta tarea constituyen el denominado metabolismo. La energía total intercambiada en éste proceso es posible asociarla a la de un proceso de combustión. Sin embargo, éste último ocurre en un solo paso (reacción) y a altas temperaturas. La densidad calórica es la cantidad de calor liberado cuando se quema en forma completa la masa de una sustancia a presión y temperatura constantes. Esta proporciona una medida de la energía química contenida en el alimento y puede ser determinado a través de un calorímetro adiabático. Este dispositivo mide el calor producido al quemar completamente una muestra en atmósfera con exceso de oxígeno. (Chang, 1992; Laider, 1997)

3.8 Parámetros fisicoquímicos para la caracterización de grasas y aceites

Los parámetros físicos y químicos son muy utilizados para poder caracterizar y detectar una posible adulteración. También para identificar los cambios químicos y físicos inducidos por procesos a los que son sometidos como el refinamiento de las grasas y aceites. Las propiedades físicas y químicas de un aceite o grasa varían entre ciertos límites, generalmente no muy amplios, de allí que se encuentre con relativa facilidad información de las características fisicoquímicas de cada una de los aceites o grasas comestibles. (Prior, 2004)

3.8.1 Densidad

La densidad relativa de un aceite se define como el cociente de la masa aparente (que se determina mediante pesada de un volumen dado de la grasa a una temperatura (20°C)) entre la masa del mismo volumen de agua a 20°C. La densidad de un aceite siempre debe determinarse a una temperatura por lo menos 10°C por encima de su punto de fusión. El valor de la densidad se utiliza principalmente para calcular el peso del aceite contenido en grandes depósitos fijos. El volumen del depósito se puede determinar fácilmente mediante el calibrado, así como la temperatura. La medida cuidadosa de la densidad del aceite a una temperatura t puede utilizarse, por tanto, para calcular su peso. La gravedad específica de aceites y ceras varía de 0.88 a 0.99 la determinación generalmente se determina con un hidrómetro, balanza hidrostática o un picnómetro. (Álvarez, 2002; Ruiz, 2000)

La densidad expresa la relación masa del lípido entre la masa del agua. Indica una relación directa con el estado de la insaturación e inversa con el peso molecular. Es decir, la densidad de ácidos grasos y glicéridos es mayor, cuanto menor sea su peso molecular y mayor sea su insaturación. (Álvarez, 2002; Ruiz, 2000)

3.8.2 Índice de refracción

El índice de refracción de una muestra es un valor que relaciona el ángulo de incidencia de un rayo luminoso sobre una muestra con el ángulo de refracción. Mide el cambio de dirección que se produce cuando un rayo de luz pasa a través de la sustancia problema. Constituye un medio valioso para comprobar la calidad de aceites y grasas; útil para procesos de identificación, determinar pureza y además para observar el progreso de reacciones como la hidrogenación catalítica y la isomerización. Es una característica importante, debido a la facilidad y rapidez con la que puede ser determinado con precisión, la pequeña cantidad de muestra que se necesita, y la relación que guarda con la estructura de la sustancia. (Álvarez, 2002; Prior, 2004; Ruiz, 2000)

El índice de refracción varía con la longitud de onda de rayo de luz refractado y con la temperatura; se indica con la notación n^t para $t^\circ\text{C}$. La relación entre el índice de refracción y la estructura de los ácidos grasos y de glicéridos puede ser generalizado de la siguiente manera:

- El índice de refracción de las grasas y ácidos grasos aumentan con el incremento del largo de la cadena hidrocarbonada.
- Los índices de refracción de grasas y ácidos grasos aumentan con el número de dobles enlaces y con el incremento en la conjugación (sí los hay).
- Los índices de refracción de glicéridos mixtos son, en general cercanos a aquellos que presentan sus correspondientes mezclas o glicéridos simples.
- Los índices de refracción de los monoglicéridos son considerablemente mayores que aquellos que presentan los correspondientes triglicéridos simples.

3.8.3 Punto de fusión

Es una propiedad que se considera de importancia primaria en los aceites y grasas. Los aceites son exactamente una mezcla de triglicéridos los cuales su punto de fusión se encuentra por debajo de la temperatura ambiente, y la grasa tiene un punto de fusión cercano a la temperatura ambiente. Los ácidos grasos puros, esteres y glicéridos presenta polimorfismo, es decir, son capaces de solidificar en más de una forma cristalina poseyendo cada forma un punto de fusión y densidades distintos. (Álvarez, 2002)

Los aceites y grasas naturales son mezclas de varios glicéridos, los cuales no tienen un punto de fusión definido, pero si tienen un rango de temperatura a la cual se fusionan todos los glicéridos; es decir, que la estructura es una característica importante que influye directamente en el punto de fusión. Los puntos de fusión de los ácidos grasos incrementan con el aumento de la longitud de la cadena y disminuyen cuando los ácidos grasos llegan a ser más insaturados. (Álvarez, 2002)

3.8.4 Índice de acidez

Se conoce con el nombre de índice de acidez al número de miligramos de hidróxido de potasio necesario para neutralizar los ácidos minerales u orgánicos libres contenidos en un gramo de grasa. A partir de este valor, se puede calcular el porcentaje de ácidos libres, cuando se conoce la clase de los que producen esta acidez en la grasa o aceite.

El índice de acidez no es una constante específica para cada grasa o aceite, y su valor es variable según el procedimiento de obtención utilizado o los tratamientos ulteriores a los que se le hubiera sometido. (Álvarez, 2002)

3.8.5 Índice de saponificación

El índice de saponificación designa el número de miligramos de hidróxido de potasio necesario para la neutralización de los ácidos grasos contenidos en un gramo de grasa, bien se hallen estos libres o combinados en forma de éster o lactonas. Si los triglicéridos contienen ácidos grasos de bajo PM, el número de moléculas presentes en 1g de muestra será mayor que si los ácidos grasos poseen pesos moleculares más altos, por lo tanto los aceites con menor peso molecular de ácidos grasos presentarán índices de saponificación mayores. (Álvarez, 2002)

3.8.6 Índice de yodo

Se define como el peso de yodo (en gramos) absorbido por 100 gramos de grasa o aceite bajo condiciones estándar. Los glicéridos de los ácidos grasos no saturados presentes se unen con una cantidad de halógeno y el valor de yodo es una medida del grado de insaturación. (Álvarez, 2002)

El índice de yodo representa el grado de insaturación real solo cuando los dobles enlaces no se hallan conjugados y la estructura del ácido graso no impida la entrada del halógeno. En la tabla 1 se muestra una clasificación para grasas y aceites, algunos de los cuales tienen la propiedad de formar una película fuerte y sólida cuando se desecan en el aire, tales aceites se conocen como aceites secantes, utilizándose en la elaboración de pinturas y barnices; ya que contienen un gran número de ácidos grasos poli-insaturados. Los aceites clasificados como no secantes, ni se secan, ni forman películas duras. Finalmente la industria admite un tercer grupo, el de los aceites semisecantes, que forman películas con gran lentitud; algunos autores relacionan también la propiedad de secante de una grasa o aceite con el contenido de ácido linoléico, pero en general, cuando la concentración de éste ácido llega a un 35%, el aceite o grasa no se considera apto para el consumo humano y si como secante. (Prior, 2004; Álvarez, 2002)

Las grasas naturales menos insaturadas con valores de yodo bajos son sólidas a temperatura ambiente y por el contrario los aceites que están más insaturados son líquidos indicando una relación con el punto de fusión. A medida que aumenta el grado de insaturación, es más probable que la grasa o el aceite sufra enranciamiento por oxidación. (Álvarez, 2002; Ruiz, 2000)

Tabla 1. Clasificación de grasas y aceites según su índice de yodo.

Grupo	Ejemplo	Índice de yodo
Ceras	-	<30
Grasas animales	Mantequilla, manteca de cerdo	30-70
Aceites no secantes	Aceite de oliva, cacahuete	80-110
Aceites semisecantes	Aceite de semilla de algodón, soya	80-140
Aceites secantes	Aceite de linaza, girasol	125-200

3.9 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (High Performance Liquid Chromatography) es el método más sofisticado y moderno de la cromatografía líquida, que utiliza partículas de fase estacionaria en el interior de la columna con diámetros muy pequeños para aumentar la eficiencia. Así, se ha conseguido reducir el tamaño de la columna a 10-30cm de largo y 4-10mm de diámetro en la HPLC, y el tiempo necesario para la separación, de una hora a minutos. (Skoog, 2001; Rubinson, 2001)

La HPLC permite muy buenas separaciones e identificaciones de sustancias o grupos de sustancias en un tiempo corto, tanto cualitativa como cuantitativamente. Como condición, es imprescindible que la muestra sea soluble en un disolvente al ser la fase móvil un líquido (Skoog, 2001). Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a sus cualidades de sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran adaptabilidad a sustancias que son de gran interés para la industria, la ciencia y la sociedad. (Rubinson, 2001)

El empleo de HPLC en sus muchas variantes se ha especializado mucho. Algunas aplicaciones incluyen sustancias tan diversas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenos, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una gran variedad de sustancias inorgánicas (Matissek et al, 1992). Ejemplos de utilización de HPLC:

- Detección y cuantificación de sacarina, benzoatos, cafeína y aspartame.
- Detección de ciclamato en jugos de fruta.
- Separación de ésteres de ácidos grasos por fase inversa y con argentización de columnas (Silicato de Al con Ag).
- Separación de Triglicéridos por la longitud de la cadena y el grado de insaturación por fase inversa y detector de dispersión luminosa, para el estudio de aceites y grasas adulteradas.
- Determinación del contenido de vitamina A y sus precursores (α y β caroteno) en margarina y aceites de hígado por fase inversa.
- Determinación del contenido en vitamina D en leche en polvo y cereales por fase normal.

4 METODOLOGÍA

A continuación se presenta el diagrama general de investigación y posteriormente las técnicas utilizadas para cada análisis realizado.

4.1 Diagrama general de investigación

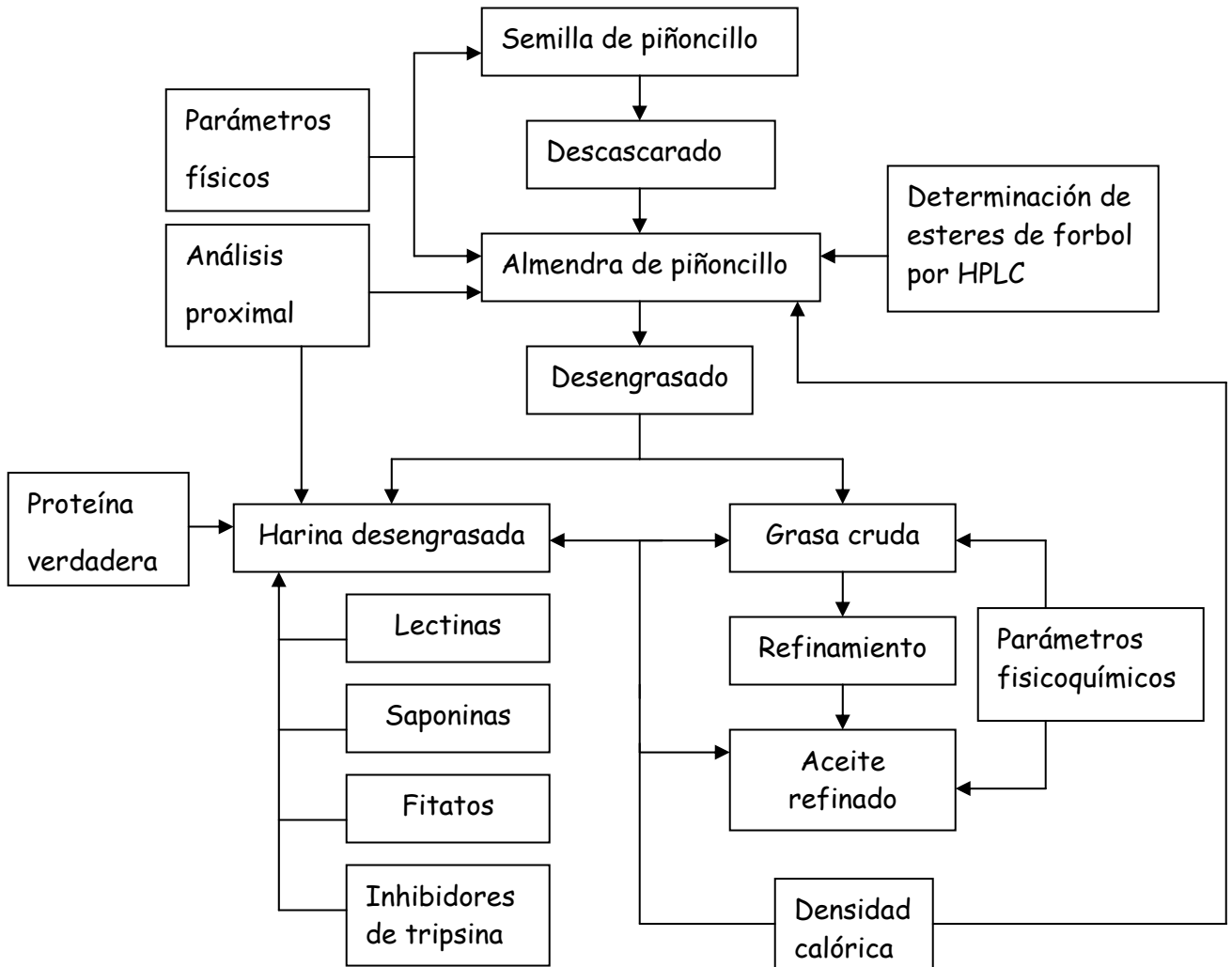


Figura 2. Diagrama general de investigación

4.2 Origen de la semilla

La semilla de piñoncillo procede del municipio de Zacualtipan en el estado de Hidalgo. La compra se realizó en la central de abastos de la ciudad de Pachuca a una persona que habita ese municipio.

4.3 Limpieza y selección de la semilla

Contando con suficiente semilla de piñoncillo, se procedió a seleccionar la semilla, eliminando cualquier material extraño, así como aquellas semillas dañadas física, química o biológicamente. Debido a que esta semilla tiene un alto contenido de grasa, las semillas seleccionadas, se almacenaron en un recipiente cerrado en refrigeración hasta su uso.

4.4 Descascarado

Objetivo: Obtener la almendra en forma integral por un método manual y mecánico, a partir de la semilla de piñoncillo.

Material:

- ✓ Pinzas de punta marca Tulumex de 6x15cm

Procedimiento:

Se toma una semilla de piñoncillo y se coloca entre los dientes de la pinzas; se aprieta ligeramente con las pinzas (evitando dañar la almendra) hasta quebrar la cáscara, después se saca la almendra manualmente de la cáscara. Este procedimiento se repite para todas las demás semillas del lote. Las almendras obtenidas de esta forma se colocan en un recipiente hermético y se guardan en refrigeración hasta su uso. Los residuos de cáscara se guardan en una bolsa y se almacenan a temperatura ambiente.

4.5 Parámetros físicos

Se determinaron algunos parámetros físicos, con la finalidad de poder comparar los resultados del presente trabajo con estudios anteriores de esta misma especie, y ver si se trata de la misma variedad; así como poder hacer una rápida identificación para adquisiciones posteriores. (Moreno, 1984; Makkar et al, 1998)

4.5.1 Dimensiones

Se refiere a la toma aleatoria de la materia prima integra que se tiene para determinar y caracterizar físicamente la muestra. Las dimensiones se determinaron tanto para la semilla como para la almendra.

Material:

- ✓ Vernier Stainless Hardened

Procedimiento:

Se mide con el vernier, el largo y ancho de la almendra y la semilla. La determinación se realizó con 20 unidades elegidas aleatoriamente.

4.5.2 Peso hectolítrico

Fundamento: El peso hectolítrico es el criterio más utilizado para determinar el grado y la calidad de los cereales. Se cuantifica midiendo el peso de una muestra representativa del lote que ocupa un volumen estandarizado, es decir la densidad aparente del grano. Generalmente el valor se expresa en kg/HL (100 litros). Se relaciona con la densidad real del grano. (Serna, 1996)

Material:

- ✓ Probeta 1L marca KIMAX
- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic

Procedimiento:

La probeta (tarada previamente) se llena con el material (semilla y almendra respectivamente), hasta la marca de 1L, tratando de acomodarlo con ligeros golpes sobre la mesa. Se realizó la determinación por triplicado. El peso volumétrico corresponde a el peso en gramos de las semillas contenidas en el probeta y entonces se saca la relación de Kg por HL. La determinación se realizó de manera aleatoria y tratando de homogeneizar previamente el lote.

4.5.3 Peso unitario

Fundamento: Conocer el peso unitario promedio de la semilla y la almendra que se utilizaron en este estudio.

Material:

- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic

Procedimiento:

Tomar aleatoriamente 50 unidades de la semilla y de la almendra respectivamente, pesarlas, y obtener el peso unitario promedio para cada muestra.

4.5.4 Relación cáscara-almendra

Objetivo: Conocer la relación porcentual de cáscara y almendra de la semilla integral de piñoncillo.

Material:

- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ✓ Pinzas de punta marca Tulumex de 6x15cm
- ✓ 2 Vasos de precipitado de 50ml

Procedimiento:

Tomar aleatoriamente 10 semillas de piñoncillo y pesarlas en el vaso de precipitado previamente tarado, posteriormente descascararlas usando las pinzas, y pesar tanto las almendras como los restos de cáscara. A partir de estos datos se calcula el porcentaje que representa el peso de almendra en la semilla. Esta determinación se realiza por triplicado.

4.6 Molienda

La almendra de la semilla de piñoncillo tiene una alta concentración de grasa (Makkar et al, 1997; Aregheore et al, 2003) por lo cual es necesario moler y posteriormente desengrasar la harina integral de la almendra para poder determinar algunos factores tóxicos en la harina desengrasada.

Material:

- ✓ Molino Thomas Willey, Modelo 4
- ✓ Malla de diámetro 4mm
- ✓ Vaso contenedor
- ✓ Balanza granataria

Procedimiento:

Se realiza una molienda gruesa, con el Molino Thomas Willey, Modelo 4, utilizando una malla de diámetro 4mm, teniendo cuidado de no agregar demasiada muestra, ya que debido al alto contenido de grasa en la almendra, el molino se puede atascar o sobrecalentar. Se recolectó la harina obtenida en un recipiente, se etiquetó adecuadamente y se guardó en refrigeración.

4.7 Desengrasado

Fundamento: La grasa es soluble en disolventes orgánicos y la grasa presente en la muestra tiene una alta solubilidad en hexano por lo que al estar en contacto con este disolvente la grasa es extraída dando como resultado una harina desengrasada. (Huerta, 2005)

Material / Reactivos:

- ✓ Equipo de extracción Soxhlet (Figura 3)
- ✓ Matraz bola de 1L con una boca 24/40
- ✓ Canastilla de calentamiento
- ✓ Refrigerante
- ✓ Rotavapor Büchi modelo RE-111
- ✓ Baño de agua Büchi modelo 461
- ✓ Bomba de agua
- ✓ Charola de plástico
- ✓ 2 Mangueras de látex
- ✓ Hexano (R.A.)
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Papel filtro
- ✓ Charola de aluminio
- ✓ Termómetro de -20 a 400°C

Procedimiento:

Se colocaron de 150 a 200g de muestra molida en un cartucho de celulosa (a), esta última se introduce en el tubo contenedor (b) y se coloca el refrigerante(e) sobre el tubo contenedor. Es necesario agregar grasa de silicón en las juntas del material esmerilado, para evitar accidentes se cubren las manos con guantes y se agrega el hexano al matraz de bola hasta la mitad de su capacidad (d) no olvidando agregar perlas de ebullición y finalmente se introduce el matraz dentro de una canastilla de calentamiento. Es necesario verificar que todo el equipo quede perfectamente nivelado y asegurado (Figura 3) para evitar el derrame de disolvente. Se conectan las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante a una bomba de agua que se encuentre dentro de un baño de hielo, y se enciende la canastilla de calentamiento a 60-65°C. El aparato hace descarga de disolvente aproximadamente cada 30 minutos. EL disolvente del matraz se cambia periódicamente, cuidando de guardar en un contenedor adecuado este para recuperar posteriormente la grasa cruda extraída de la muestra.

Después de 6 horas de funcionamiento continuo se realiza la prueba de papel filtro, que consiste en tomar un pedazo de papel filtro limpio y ponerlo en contacto con un poco del disolvente que ha pasado por la muestra, si sobre el papel filtro no se observa una mancha de grasa se considera que la muestra esta desengrasada en caso contrario se continua con el proceso de desengrasado por 2 horas mas o hasta que la prueba del papel filtro sea negativa.

Terminado el tiempo de desengrasado se desmonta el equipo y la harina se coloca sobre una charola de aluminio, se deja en la campana de extracción para la completa evaporación del disolvente. Cuando ya no sea perceptible el olor a disolvente, se coloca la harina en un recipiente adecuado, se etiqueta y almacena.

Con respecto a el disolvente que contiene la grasa cruda, se recolectan todas las fracciones que se hallan obtenido y se extrae la grasa cruda del disolvente usando un rotavapor Büchi modelo RE-111 con un baño de agua Büchi modelo 461 a una temperatura de 50°C y a presión reducida. La grasa cruda obtenida se guarda en un frasco ámbar, se etiqueta y se almacena en refrigeración.

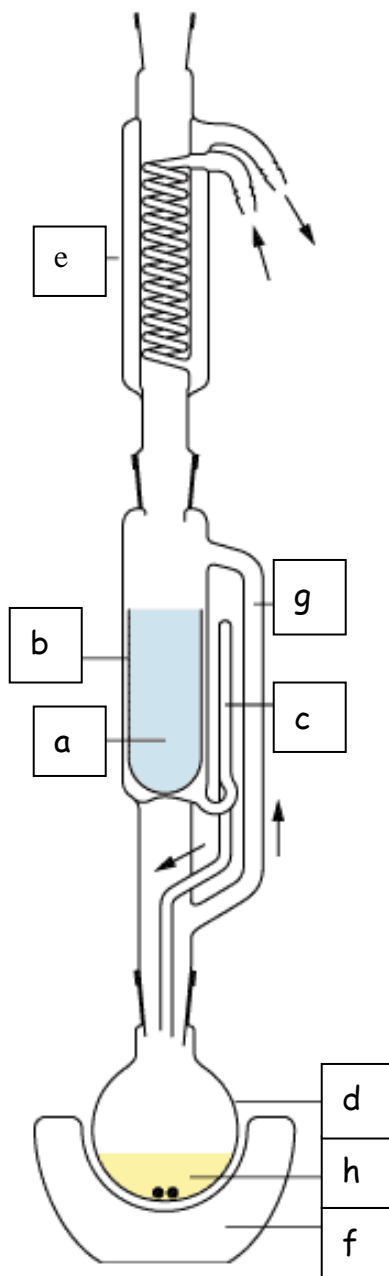


Figura 3. Equipo tipo Soxhiet utilizado. (a)cartucho de celulosa, (b)recipiente contenedor, (c)tubo de reflujo, (d)matraz bola, (e)refrigerante, (f)Canastilla de calentamiento, (g)tubo bypass, (h)disolvente.

4.8 Refinación de la grasa cruda

El refinamiento del aceite consta básicamente de los siguientes pasos: Desgomado, Neutralización, Blanqueo y Deodorización. (Watson, 1987; Akon y Min, 1998)

4.8.1 Desgomado

Fundamento: Consiste en la eliminación de diversos compuestos que son solubles en el aceite como proteínas, fosfolípidos, hidratos de carbono, gomas o sustancias mucilaginosas, y se eliminan por precipitación con una simple hidratación con adición de un ácido (cítrico o fosfórico), calor y agitación. Al agitar las sustancias se hidratan y flocculan formando una goma mucilaginosa insoluble en el aceite. Estas se dejan sedimentar y después se separan del aceite por centrifugación. La cantidad de los reactivos que se utilizan, esta en relación a la cantidad de aceite que se somete a este proceso. (Ziller, 1996; Watson, 1987; Desrosier, 1997, Álvarez, 2002)

Material / Reactivos:

- ✓ Matraz Erlenmeyer de 1 L
- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025
- ✓ Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™
- ✓ H_3PO_4 al 0.1%
- ✓ Termómetro de -20 a 400°C

Procedimiento:

Determinar previamente el volumen de aceite a refinar, el cual será el volumen de referencia (100%).

Mezclar en un matraz erlenmeyer el aceite con H_3PO_4 al 0.1%, en una proporción del 3% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a refinar. Calentar la mezcla en la parrilla de calentamiento a 60°C durante 5 minutos con agitación. Posteriormente centrifugar a 2400 r.p.m a temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitar los residuos del desgomado. Recuperar el aceite por decantación.

4.8.2 Neutralización

Fundamento: Se efectúa posteriormente al desgomado para neutralizar los ácidos grasos libres que contengan los aceites, pero también se neutralizan los monoglicéridos, los fosfolípidos y los agentes quelantes que pudieran quedar del desgomado, así como hidratos de carbono, resinas, metales y proteínas. El aceite se mezcla con sosa cáustica y se somete a 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 de agua caliente. El agua de lavado se separa del aceite también por sedimentación o centrifugación. (Álvarez, 2002)

Material / Reactivos:

- ✓ Matraz Erlenmeyer de 1 L
- ✓ Potenciómetro CORNING mod. 430
- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación THERMOLYNE mod. SP-13025
- ✓ Centrifuga CLAY-ADAMS, Dynac™
- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ✓ Mechero Bunsen
- ✓ NaOH al 15%
- ✓ Agitador de vidrio
- ✓ Agua destilada
- ✓ Tripié
- ✓ Termómetro de -20 a 400°C
- ✓ Tela de asbesto

Procedimiento:

Colocar el aceite previamente desgomado, en un matraz erlenmeyer y colocar este matraz en una parrilla con agitación. Calibrar el potenciómetro y una vez calibrado realizar la lectura del pH del aceite.

Con una pipeta Pasteur añadir NaOH al 15% hasta obtener un pH neutro (pH=7). Se recomienda realizar este paso lentamente, gota por gota para evitar un aumento mayor

del pH. Inmediatamente, colocar el matraz con el aceite neutro en una parrilla de calentamiento y calentar la mezcla a 50°C durante 5 minutos.

Centrifugar a 2400 r.p.m. a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, mezclar el aceite con agua destilada en una proporción del 10% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite, y calentar la mezcla a 80°C durante 5 minutos. Centrifugar a 2400 r.p.m. a temperatura ambiente por 25 minutos.

4.8.3 Blanqueo

Fundamento: El blanqueo se realiza después de la neutralización de los aceites para eliminar las sustancias que le imparten un determinado color, pero también son removidos trazas de metales, partículas coloridas tales como la clorofila, jabones y productos de la oxidación. La eliminación completa de los colorantes puede llevarse a cabo calentando el aceite y tratándolo con adsorbentes, como el carbón activado o tierras diatomeas. (Álvarez, 2002; Belitz, 1997)

Material / Reactivos:

- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE md. SP-13025
- ✓ Papel filtro Whatman # 4 y # 40
- ✓ Silicato de aluminio
- ✓ Carbón activado
- ✓ Vaso de precipitado de 1 L
- ✓ Matraz kitasato de 500ml
- ✓ Manguera de vacío
- ✓ Buchner con alargadera
- ✓ Termómetro de -20 a 400°C

Procedimiento:

Mezclar el aceite con carbón activado en un porcentaje del 10% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a blanquear. Adicionar silicato de aluminio, en un porcentaje del 2% con respecto al volumen de referencia (100%) del aceite a blanquear. Calentar en una parrilla de agitación con calentamiento a 90°C durante 5 minutos.

Filtrar con vacío el aceite a través de papel Whatman # 40. Una vez filtrado volver a filtrar con vacío pero esta vez usando papel Whatman # 4. (en caso de no haber papel filtro de esta marca y número, se recomienda utilizar uno que sea de poro muy fino). Repetir el proceso de blanqueo en caso de que permanezca color en el aceite.

Filtrar las veces que sean necesarias hasta ya no tener partículas de carbón activado en el aceite. Si es necesario filtrar con doble papel filtro.

4.8.4 Deodorización

Fundamento: La deodorización remueve materiales volátiles en el aceite: tocoferoles, esteróles, ácidos grasos libres, herbicidas, pesticidas, gases disueltos y componentes mezclados que imparten cierto sabor. Disminuye el color del aceite y le otorga estabilidad oxidativa, así como una disminución de peróxidos y de ácidos grasos libres. Generalmente la presión de vapor de los compuestos odoríferos es relativamente baja y se requerirán de temperaturas demasiado elevadas si la destilación se llevará a cabo a presión atmosférica; de ahí la necesidad de regular esta operación a un buen vacío y la corriente de un gas inerte para abatir la temperatura de destilación y evitar el daño y descomposición de la grasa neutra. (Ziller, 1996)

Material / Reactivos:

- ✓ Rotavapor Büchi modelo RE-111
- ✓ Baño de temperatura controlada POLYSTAT Instrument Company Mod.12002
- ✓ Tanque de N₂
- ✓ Aceite mineral (1 galón).
- ✓ Matraz Bola con una boca 24/40
- ✓ Termómetro de -20 a 400°C

Procedimiento:

Adaptar un recipiente de acero para poder utilizar el baño de temperatura controlada y además que el matraz bola pueda estar en contacto con el aceite mineral. Encender el baño de circulación y esperar a que alcance la temperatura máxima (110-130°C). Abrir el vacío e inyectar continuamente nitrógeno al sistema de destilación a presión reducida.

Sumergir el matraz bola que contiene el aceite previamente decolorado en el aceite mineral a la temperatura de (110-130°C) y dejar 2 horas continuas. Después de este tiempo, retirar el matraz bola del aceite y dejar enfriar.

Si se va almacenar por algunos días, inyectarle una atmósfera de nitrógeno al recipiente que va a contener el aceite deodorizado y mantenerlo en refrigeración (4°C).

4.9 Análisis proximal

El análisis proximal o bromatológico fue desarrollado por Weende hace mas de 100 años, en este tipo de estudio se determinan los componentes principales de los alimentos como humedad, proteína, grasa, cenizas, fibra y carbohidratos. Los resultados de este análisis son de suma importancia ya que son una guía hacia donde dirigir un estudio posterior. En el presente trabajo se realizó el análisis proximal siguiendo las técnicas descritas y aprobadas en el AOAC con ligeras modificaciones (Bateman, 1970; Herlich, 1990).

4.9.1 Humedad

Fundamento: Determinación de la pérdida de material por la evaporación de agua de la muestra durante el calentamiento de la misma se denomina humedad (Herlich, 1990).

Material / Reactivos:

- ✓ Estufa de vacío LAB - LINE. Mod . 3620
- ✓ Balanza Analítica Sartorius Analytic
- ✓ Desecador
- ✓ Charolas de aluminio
- ✓ Estufa con corriente forzada LAB -LINE, mod. Imperial III

Procedimiento:

Poner a peso constante las charolas de aluminio en las que se va a efectuar la determinación, rotularlas correctamente; de 4-5 horas es suficiente, a continuación se adiciona la muestra (2-5g), tratando de que presente la mayor superficie de evaporación;

a continuación se colocan en la estufa, la cual debe estar a una temperatura de 60-65°C, y a una presión de por lo menos 25mm de Hg. Verificar a las 8 horas que se haya alcanzado peso constante, de no ser así continuar con el secado hasta alcanzar este propósito. Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal.

Cálculos:

Teniendo el peso de la charola con muestra antes y después de secada, y con el peso de la charola sola, se puede hacer la determinación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

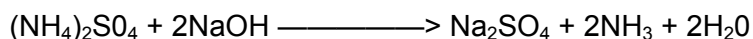
P_i = Peso de la charola con muestra antes de secada (g)

P_f = Peso de la charola después de secada (g)

m = Peso de la muestra (g)

4.9.2 Proteína

Fundamento: Basado en la degradación de la sustancia orgánica por acción del ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador hasta pasar el nitrógeno amínico a una sal de amonio. El amonio del sulfato amónico pasa a amoníaco libre por tratamiento con hidróxido de sodio:



El amoníaco así formado se separa mediante destilación y se recoge sobre una cantidad exactamente conocida de disolución ácida titulada. El amoníaco se determina indirectamente mediante valoración del exceso de ácido titulado.

Material / Reactivos:

- ✓ Digestor TECATOR, mod.ab-20/40
- ✓ Dispositivo destilación Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- ✓ Tubos de digestión TECATOR de 75ml
- ✓ Mezcla digestiva (a)
- ✓ Peróxido de hidrógeno al 30%
- ✓ Sulfato de potasio (R.A)
- ✓ Solución de NaOH al 60%
- ✓ Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- ✓ Solución de HCl 0.01 N valorada

(a) Disolver 3g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20ml de agua destilada; a continuación se agrega 50ml de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430ml de ácido sulfúrico concentrado . Agitar esta mezcla por 30 minutos.

(b) Se pesan 5g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 L, se adiciona agua destilada hasta disolverlo y a continuación se afora a 1L. Se agrega al ácido 3.5ml de rojo de metilo y 10ml de verde de bromocresol, mezclar bien y colocar en el recipiente indicado.

Procedimiento:

Pesar de 10 -100mg de muestra según sea la cantidad de proteína que contiene y colocarlos en el tubo de digestión, agregar aproximadamente 0.5g de K_2SO_4 y 3 ml de mezcla de digestión, se coloca el tubo en el digestor por espacio de 15 minutos y después de ello se retira, se deja enfriar un poco y se adiciona 1.5ml de H_2O_2 y nuevamente se coloca en el digestor que debe estar a 370°C . Se considera que la digestión es completa, cuando el tubo no muestra manchas, puntos negros y la mezcla digerida es transparente. Después de la digestión los tubos se colocan en una gradilla y se dejan enfriar; se agregan 25ml de agua destilada y se introducen uno a uno en el microdestilador para su destilación y titulación estas se efectúan de forma automática por el equipo pero es necesario introducir un blanco de glucosa.

Cálculos:

Primero se expresa el resultado como contenido de nitrógeno:

$$\% N = \frac{(P-B)(N)(\text{meq})(100)}{m}$$

Donde:

P = ml de la titulación de la muestra

B = ml de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

Para expresar el resultado en contenido de proteína bruta, debe multiplicarse el contenido de nitrógeno por un factor que depende del tipo de muestra, pero en forma general se usa el valor de 6.25.

% Proteína = %N (F)

F=6,25

4.9.3 Grasa

Fundamento: Las grasas presentan una alta solubilidad en compuestos no polares siendo los más utilizados el hexano, éter etílico y éter de petróleo, los cuales al ponerse en contacto con el alimento, solubilizan la grasa y la arrastra consigo para su posterior cuantificación (Herlich, 1990).

Material / Reactivos:

- ✓ Aparato de extracción Goldfish Labconco Modelo 35001
- ✓ Cartuchos de celulosa
- ✓ Vasos de borde esmerilado para equipo Goldfish
- ✓ Estufa de vacío Lab Line Modelo 3620
- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ✓ Desecador
- ✓ Éter de petróleo (R.A.)

Procedimiento:

Poner los vasos Goldfish a peso constante. Colocar en un cartucho de celulosa de 4-5 g de muestra, y tapar el cartucho con un trozo de algodón y colocarlo en un sostenedor sobre el aparato Goldfish con un porta dedal. En los vasos a peso constante agregar 50ml de éter de petróleo y colocarlo en el aparato de Goldfish y sostenerlo con un anillo con empaque de hule, ajustar la parrilla para que este en contacto con el vaso, se abre la llave de agua para que circule esta sobre los refrigerantes y calentar durante 4 horas a baja temperatura (Low). Una vez transcurrido el tiempo de extracción se bajan las parrillas de calentamiento y se quita el anillo de rosca, se saca el porta dedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador, volviéndose nuevamente a colocar el vaso para de nuevo calentarlo y que el disolvente quede en el tubo recuperador; una vez que el vaso este libre de disolvente, se coloca en la estufa de vacío para la completa eliminación del disolvente y humedad. Se pesa los vasos con la fracción lipíde.

Cálculos:

Con los pesos del recipiente colector antes y después del procedimiento de extracción, se calcula el porcentaje de extracto etéreo de la siguiente forma:

$$\%Grasa = \frac{Pf - Po}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del recipiente después de la extracción (g)

Po= peso del recipiente antes de la extracción (g)

m = peso de la muestra seca (g)

4.9.4 Cenizas

Fundamento: De la carbonización y posterior calcinación de la muestra a 550°C se obtiene lo que se denomina cenizas y que comprende el material inorgánico (minerales).

Material / Reactivos:

- ✓ Mufla THERMOLYNE, mod. 1500
- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ✓ Mechero Bunsen

- ✓ Tripie
- ✓ Desecador
- ✓ Triangulo de porcelana
- ✓ Pinzas para crisol
- ✓ Crisoles de porcelana

Procedimiento:

Los crisoles deben ponerse a peso constante, para lo cual deben colocarse en la mufla a una temperatura de 550°C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine en el proceso de incineración. Colocar de 2-3 gramos de muestra en el crisol y se carboniza a la flama del mechero bajo una campana ya que se desprenderá una gran cantidad de humo; cuando ya no haya desprendimiento de humo, se introduce el crisol a la mufla, la cual debe estar a una temperatura entre 500-550°C . El tiempo de permanencia es muy variable y depende del material que se esté trabajando. En cuanto se obtiene cenizas grisáceas o blancas pero homogéneas, se tiene el punto final de esta determinación.

Cálculos:

El cálculo de cenizas en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del crisol con la muestra después de incinerada (g).

Po= peso del crisol a peso constante (g).

m = peso de la muestra (g).

4.9.5 Fibra

Fundamento: Determinación de las sustancias orgánicas libres de grasa e insolubles en medio ácido y alcalino, es llamada convencionalmente fibra bruta. La muestra, en su caso desengrasada, se trata sucesivamente con soluciones en ebullición de ácido sulfúrico e hidróxido potásico, se lava, se deseca, se pesa y se calcina a 500°C. La pérdida de peso debida a la calcinación corresponde a la fibra bruta de la muestra de ensayo.

Material / Reactivos:

- ✓ Vasos de Berzelius de 600ml KIMAX
- ✓ Aparato de Digestión LABCONCO 8811 Prospect
- ✓ Estufa de vacío LAB - LINE, mod. 3620
- ✓ Crisoles de porcelana
- ✓ Papel Whatman # 40
- ✓ Mufla THERMOLYNE, mod. 1500
- ✓ Buchner con alargadera
- ✓ Solución de H₂SO₄ al 1.25% (m/v)
- ✓ Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- ✓ Antiespumante (emulsión SIGMA - B)
- ✓ Alcohol etílico

Procedimiento:

Pesar de 2-3 gramos de muestra desengrasada sobre un vaso Berzelius que contenga 0.5g de silicato de aluminio y unas perlas de vidrio, adicionar 200ml de H₂SO₄ al 1.25% que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente , se deja digerir por espacio de 30minutos exactos.

Después de dicho periodo se vacía el contenido sobre un buchner y se realiza la filtración con ayuda de vacío y con papel Whatman # 40, se lava el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500ml). Una vez lavado el residuo se trasfiere nuevamente al vaso de Berzelius, se adiciona 200ml de NaOH 1.25% hirviendo y se mantiene en el aparato de digestión por 30minutos exactos; transcurrido este tiempo se repite la operación de lavado que se realizo con el ácido, se retiran las perlas de vidrio y se lavan con agua destilada para recuperar el material adherido y por último se le adiciona 25ml de alcohol etílico.

El residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) cuidando de pasarlo en forma cuantitativa, se coloca en la estufa de vacío para su secado, y después se pesa. A continuación se carboniza e introduce en la mufla para su incineración, y después de realizar esto volver a pesar el crisol.

Cálculos:

El calculo de cenizas en termino de % es el siguiente:

$$\%Fibra = \frac{Ps - Pc}{m} \times 100$$

Donde:

Ps= peso del crisol con residuo después de secado (g)

Pc= peso del crisol con residuo después de calcinado (g)

m = peso de la muestra (g)

4.9.6 Determinación de proteína verdadera

Fundamento: La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble (de ahí que la muestra deba estar finamente molida) y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por medio de un micro-Kjeldahl. (Lucas et al, 1988).

Con este método la proteína no-soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración esta es incluida junto con la proteína soluble precipitada.

Material / Reactivos:

- ✓ Balanza Analítica Sartorius Analytic
- ✓ Microdigestor marca TECATOR Mod. Ab-20/40
- ✓ Destilador marca Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- ✓ Agitador magnético marca CORNING, con agitadores pequeños
- ✓ Papel Whatman # 50 de 5 cm. f (poro cerrado) o equivalente
- ✓ Tubos de digestión TECATOR de 75ml
- ✓ Mezcla digestiva (a)
- ✓ Solución de H₂O₂ al 30%
- ✓ Solución de ácido bórico (b)
- ✓ Solución de HC1 0.01N (valorado)
- ✓ Solución de NaOH al 60%
- ✓ Solución precipitante (c)
- ✓ Sulfato de potasio (R.A.)

(a) Mezcla digestiva: Se mezclan durante aproximadamente 30 min. los siguientes reactivos en la siguiente proporción: 3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 300 ml de H_2SO_4 , (concentrado) y 100ml de H_3PO_4 .

(b) Se pesan 5g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 L, se adiciona agua destilada hasta disolverlo y a continuación se afora a 1L. Se agrega al ácido 3.5ml de rojo de metilo y 10ml de verde de bromocresol, mezclar bien y colocar en el recipiente indicado.

(c) Solución precipitante: Disolver 5g de tungstato de sodio y 1.51g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de agua, añadir 2.2 ml de HCl 2N y mezclar; aforar a 50 ml con agua destilada.

Procedimiento:

a) Proceso de Precipitación: Pesar de 50-100 mg de muestra finamente molida (que pase por una malla de 1 mm) y colocarla en un vaso de precipitado de 50 ml. Agregar 5 ml de agua caliente y agitar mecánicamente por 15 minutos, se agregan 2 ml de solución precipitante y se deja reposar 10 minutos; transferir cuantitativamente para su filtración en papel (Whatman #50 ó 542) utilizando 25 ml de agua destilada caliente y ligera succión.

b) Proceso de Digestión: Colocar el papel filtro con el precipitado en un tubo de digestión, al cual se le agregan 0.5g de K_2SO_4 y 5 ml de mezcla digestiva. Se coloca en el digestor y se calienta aproximadamente 15 minutos, se retira del digestor y se espera a que se enfríe para añadirle 3 ml de H_2O_2 al 30%. Se introduce nuevamente al digestor y se calienta hasta que la digestión sea completa (temperatura de digestión de 370°C).

c) Destilación y titulación: Una vez efectuada la digestión se deja enfriar el tubo digestor y se procede a la destilación, se agregan 25ml de agua destilada y se introducen uno a uno en el microdestilador para su destilación y titulación estas se efectúan de forma automática por el equipo pero es necesario introducir un blanco de glucosa.

NOTA: Es conveniente correr un blanco en donde se incluya el papel filtro, junto con aprox. 50-100 mg de glucosa, cada vez que se prepara nuevamente algún reactivo.

Cálculos:

$$\% N = \frac{(P-B)(N)(\text{meq})(100)}{m}$$

Donde:

P = ml de la titulación de la muestra

B = ml de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

Para expresar el resultado en contenido de proteína verdadera, debe multiplicarse el contenido de nitrógeno por un factor que depende del tipo de muestra, pero en forma general se usa el valor de 6.25.

% Proteína verdadera= %N (F)

F=6,25

4.10 Densidad calórica

Fundamento: La estimación del contenido calórico de los alimentos o dietas es indispensable para el estudio del metabolismo y balance de energía. El principio en el cual se basa la determinación del contenido calórico del material en la bomba calorimétrica, es en la primera ley de la termodinámica, la cual se fundamenta en el enunciado : "la energía en cualquier proceso físico o químico no se crea ni se destruye". En el caso de la bomba calorimétrica, hay una conversión de la energía química en la producción de energía térmica, la cual se detecta por el cambio en la temperatura. (Prior, 2004; Muller y Tobin, 1986)

Material / Reactivos:

- ✓ Bomba calorimétrica GALLENKAMP, mod. CBB-330-010L
- ✓ Galvanómetro GAM METRIC LTD
- ✓ Balanza analítica Sartorius Analytic
- ✓ Crisoles de acero inoxidable
- ✓ Mango metálico prensador
- ✓ Desecador de vidrio
- ✓ Estufa de secado
- ✓ Mechas de algodón de 7 cm de longitud
- ✓ Estándar de Ácido Benzoico certificado

Procedimiento:

(a) Realizar una curva patrón con ácido benzoico.

(b) La cantidad de muestra depende del contenido calórico esperado, ya que se recomienda que la cantidad pesada libere aproximadamente 16 KJ (4.0 Kcal), para que entre en el rango de detección del instrumento, para materiales con alta densidad como aceite se pesa aproximadamente 1.5g mientras que para harinas con baja densidad se pesa hasta 4g.

(c) La muestra se coloca en un crisol previamente puesto a peso constante, se tara junto con una mecha de algodón, de tal manera que el hilo quede introducido dentro de la muestra. Posteriormente se procede a pesar en una balanza lo que corresponde al peso preliminar (Pp) se recomienda pesar un exceso aproximado del 10%.

(d) 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 con mucho cuidado por encima de la muestra el capuchón de la bomba sobre el anillo metálico el cual se levanta con la mano y con la otra se sostiene el capuchón y se comienza a girar hasta que quede cerrado. Se coloca el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

(e) Previamente se debe de prender el galvanómetro, y verificar una vez cerrado el sistema que la llave de liberación de presión este cerrado. Abrir el tanque de oxígeno (presión de 30 bars) y abrir la válvula de paso del cilindro de combustión hasta alcanzar aproximadamente la presión de 25 bars, una vez alcanzado, girar la perilla rápidamente hasta cerrar nuevamente quedando fija la presión de oxígeno en el cilindro de combustión aproximadamente 10 segundos.

(f) Una vez estable, se calibra el galvanómetro hasta la lectura de cero y se oprime el botón de ignición y en 10 a 15 segundos se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro, que a su vez se traduce en una señal en la escala del galvanómetro. Se debe observar con atención el movimiento del indicador en el galvanómetro, ya que una vez alcanzado el valor máximo empieza a decaer rápidamente. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.

(g) Una vez tomada la lectura, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, la cual se localiza en la base de la bomba del lado opuesto a la entrada del oxígeno; a la vez, se desconecta el termopar y una vez liberados los gases de combustión, se procede a abrir la bomba girando el anillo metálico en sentido inverso al cierre. Por último, se cierra la válvula de liberación de gases y el capuchón se enfría a temperatura ambiente o en baño de agua fría, para realizar una nueva determinación.

(h) Esta determinación se realiza por triplicado y los valores obtenidos se extrapolan en la curva patrón de ácido benzoico certificado, obteniendo así la densidad calórica de la muestra como el promedio de las tres determinaciones.

4.11 Parámetros fisicoquímicos

4.11.1 Gravedad específica o densidad aparente

Fundamento: Se determina la masa por unidad de volumen, expresada en gramos por centímetro cúbico, a una temperatura dada (en este caso 20°C), que es determinada en un picnómetro o matraz aforado previamente calibrado a la misma temperatura con agua. (Herlich, 2000)

Material / Reactivos:

- ✓ Matraz aforado 25 ml
- ✓ Baño regulador de temperatura.
- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Termómetro.
- ✓ Etanol (R.A.)

Procedimiento:

Se lava perfectamente el matraz aforado y se deja secar. Posteriormente se pesa el matraz aforado limpio y vacío (M) y en el matraz aforado se vacía agua destilada recientemente hervida y fría (temperatura ambiente), hasta la marca de aforo del matraz; se coloca el matraz en un baño de agua a 50°C durante 30 minutos ajustando el volumen de agua y se le coloca el tapón.

Pasados los 30 minutos se retira del baño, se seca perfectamente el exterior y se pesa en la balanza analítica con agua a la temperatura de referencia (M'). Después se vacía el matraz y se enjuaga varias veces con etanol, se seca y se dejan evaporar los residuos.

Se vacía el aceite en el matraz perfectamente limpio y seco, llenando hasta la marca de aforo y se coloca el matraz en un baño de agua a 50°C durante 30 minutos. Se ajusta el volumen de aceite y se coloca el tapón de la misma manera que con agua. Retirar del baño y secar perfectamente el exterior. Por último se pesa el matraz en la balanza analítica (M").

El peso específico se obtiene relacionando los valores obtenidos, expresando como peso de aceite/ peso de agua a la misma temperatura.

Si la determinación no se realizó a la temperatura de referencia sumar 0.00068 por cada grado arriba de 20°C, o restar la constante si la temperatura fue menor a la referencia.

Cálculos:

$$\text{Densidad} = [(M'' - M) / (M' - M)] \times D \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

Donde;

M = peso en gramos del matraz vacío

M' = peso del matraz con agua a la temperatura de referencia (50°C)

M'' = peso del matraz con aceite a la temperatura de referencia (50°C)

D = densidad del agua a la temperatura de la determinación

4.11.2 Punto de fusión

Fundamento: Las grasas y aceites naturales, como mezclas de glicéridos y otras sustancias, no tienen punto de fusión exacto y bien definido, sino que presenta un rango. No presentan punto crítico de sólido a líquido, este paso lo realizan gradualmente a través de estados pastosos hasta completamente líquidos. El punto de fusión de una grasa viene definido en éste método por dos temperaturas; una, la inicial de ablandamiento deslizante, y otra final de líquido perfectamente fluido. (Herlich, 2000)

Material / Reactivos:

- ✓ Capilares de vidrio (1mm de diámetro interno)
- ✓ Lente de aumento de vidrio
- ✓ Termómetro graduado (división de 0.2°C)
- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple THERMOLYNE mod. SP-13025
- ✓ Vaso de precipitado de 500 mL
- ✓ Ligas plásticas
- ✓ Lámpara

- ✓ NaCl (grado comercial)
- ✓ Mechero Bunsen

Procedimiento:

Se llena el tubo capilar con aceite (aproximadamente 10 mm) y se sellan los dos extremos del tubo a la flama. Se coloca el tubo capilar con muestra en un congelador a una temperatura de -10°C durante 24hrs, atando a nivel del bulbo del termómetro el capilar con la muestra. En este caso se utilizó un baño de hielo con 2 porciones de hielo y una cucharada de sal para alcanzar la temperatura de -10°C .

En caso de tener una idea aproximada del punto de fusión de la muestra, comenzar la determinación de $8-10^{\circ}\text{C}$ por abajo del mismo.

Una vez alcanzada la temperatura retirar el termómetro con el tubo capilar del congelador y comenzar el calentamiento en la parilla de calentamiento a una tasa de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ con agitación moderada para lograr homogeneidad. Colocar la lámpara de tal forma que ilumine el tubo capilar con aceite.

Con el lente de aumento observar y tomar como punto de fusión el rango de lectura en el termómetro a la cual la muestra se vuelve transparente. Esta determinación se realiza por triplicado.

4.11.3 Índice de refracción:

Fundamento: 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 la temperatura. (Herlich, 2000)

Material / Reactivos:

- ✓ Refractómetro de Abbé OPL No. 2.154
- ✓ Baño de temperatura controlada (POLYSTAT Instrument Company Mod.12002)

- ✓ Acetona (R.A.)
- ✓ Agua destilada

Procedimiento:

Calibrar la escala del prisma con el que se lleva a cabo la determinación del índice de refracción con agua destilada. La escala izquierda deberá indicar 0% mientras que la derecha 1.333 a la temperatura de 20°C. La temperatura a la cual debe funcionar el refractómetro es de 50°C. Para tener la escala del prisma a una temperatura constante, se hace circular agua a una temperatura de 50°C a través del refractómetro, verificando que no existan posibles fugas de agua. La temperatura del prisma viene indicada por el termómetro del instrumento.

Para leer el índice de refracción se limpia la superficie del prisma mediante un algodón o tela impregnado con acetona.

Se coloca el refractómetro frente a la fuente luminosa, de preferencia artificial, y se levanta el espejo metálico observando por el ocular. El campo deberá aparecer uniformemente iluminado. Girando el tornillo izquierdo se hará visible una línea fronteriza con una zona clara inferior y una oscura superior. Tal línea deberá coincidir con el punto de intersección de los ejes. En el ocular se lee tanto la concentración de sólidos solubles (para el caso de sustancias azucaradas) como el índice de refracción.

Se recomienda realizar las lecturas por triplicado con nuevas porciones de la muestra. Se calibra el refractómetro por lo menos cada vez que se cambien los tipos de muestra.

Nota: Limpiar cada vez que se utilicen nuevas porciones de muestra, evitando trazas de agua ya que afectan las lecturas.

4.11.4 Índice de yodo (Método de Hanus)

Fundamento: Los acilglicerolos de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite se unen mediante sus dobles enlaces (principalmente los de la serie de ácido oleico) a una cantidad de monobromuro de yodo en ácido acético glacial (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso en la determinación. El halógeno no utilizado es transformado a yodo libre por la adición de solución de yoduro de potasio al 15%. El yodo libre es, entonces titulado con 0.1N de tiosulfato de sodio con almidón como indicador. Por diferencia con un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo adsorbido en la muestra. (Herlich, 2000; Prior, 2004)

Material / Reactivos:

- ✓ Matraz de boca ancha de 500 ml con tapón de plástico
- ✓ Matraz Erlenmeyer
- ✓ Probeta de vidrio de 50 ml
- ✓ Probeta de 10ml
- ✓ Buretas graduadas de vidrio de 50 ml
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Horno LAB-LINE imperial III
- ✓ Solución de Hanus
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Tiosulfato de sodio pentahidratado
- ✓ Solución de yoduro de potasio al 15% p/v
- ✓ Solución de almidón al 1% p/v
- ✓ Cloroformo (R.A.)
- ✓ Ácido clorhídrico 1N
- ✓ Dicromato de potasio
- ✓ Agua destilada hervida

Preparación de solución de tiosulfato de sodio 0.1 N:

Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición por 5 minutos. Transferir en caliente a un frasco de vidrio color ámbar (previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada). Pesar en una balanza analítica 0.20 a 0.23 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en un matraz erlenmeyer y secar a 100°C durante 2 horas. Disolver

en 80 ml de agua destilada (recién hervida y fría) junto con 2 g de KI y añadir 20 ml de HCl 1 N, guardar en la oscuridad durante 10 minutos.

Titular con la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1% hacia el final de la valoración (pasando de color amarillo paja a azul/verdoso y al final con una coloración azul). Calcular la normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mediante la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{gK}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 1000}{\text{mlNa}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 49.032}$$

Procedimiento:

Se pesan de 0.20 a 0.25 g de aceite en un matraz de boca ancha y se la agregan 10 ml de cloroformo, agitar para disolver el aceite. Es necesario que cada vez que se agite se libere la presión de aire retirando el tapón.

Con la bureta agregar 25ml de la solución de Hanus y dejar reposar en la oscuridad por 30 minutos con agitación ocasional. Transcurrido el tiempo, añadir 10 ml de solución de KI al 15% y agitar vigorosamente. Se añaden 100 ml de agua destilada (hervida y fría), lavando los residuos que queden en el tapón de plástico.

Titular la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca y se añaden unas gotas de almidón al 1%, continuando la titulación hasta que el color cambie (el color de vire depende del color del aceite). Hacia el final de la titulación, tapar el matraz y agitar vigorosamente para que el yodo remanente en solución en CHCl_3 sea titulado.

Se debe repetir por triplicado cada muestra, tratando que los tiempos de reposo sean los mismos, realizando además un blanco.

Cálculos:

$$\% \text{ índice de Yodo} = \frac{(B-S) \times N \times 12.69}{\text{g muestra}}$$

Donde:

B = ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en el blanco

S = ml de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en la muestra

N = Normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

4.11.5 Índice de Saponificación

Fundamento: Se expresa en mg de KOH requeridos para saponificar 1g de grasa (incluye a los ácidos grasos libres y los esterificados). Si los triglicéridos contienen ácidos grasos de bajo PM, el número de moléculas presentes en 1 g de muestra será mayor que si los ácidos grasos poseen PM más altos, por lo tanto los aceites con menor PM de ácidos grasos presentarán índices de saponificación mayores. (Herlich, 2000)

Material / Reactivos:

- ✓ Solución KOH (4 %) en etanol libre de aldehídos
- ✓ HCl (0.5 M) valorado
- ✓ Solución de fenolftaleína al (1 %)
- ✓ Eter etílico (R.A.)
- ✓ Solución KOH (0,1 %) en etanol libre de aldehídos
- ✓ Matraz erlenmeyer de 250 ml
- ✓ Tubo de vidrio

Procedimiento:

Se pesan en un matraz erlenmeyer de 2.5 a 5 g de la muestra y se la añaden 50 ml exactamente medidos de una solución recientemente filtrada de KOH (al 4%) en etanol de 96° libre de aldehídos. Se prepara paralelamente con la muestra, un blanco con el reactivo, usando a la misma pipeta.

Se conecta a un refrigerante de aire (tubo de vidrio) y se somete a reflujo en baño maría durante 30 minutos; al terminar este tiempo, se lava el interior del tubo refrigerante y el tapón con 5 ml de etanol previamente neutralizado con fenolftaleína y se titula con HCl (0.5 M) en presencia de fenolftaleína (6-8 gotas de solución al 1%). La titulación debe realizarse en caliente para evitar la precipitación de los jabones más pesados, lo que disminuiría la precisión del punto final.

Se restan los ml de HCl (0.5 M) requeridos en la titulación de la muestra a los consumidos por el blanco, obteniendo así los ml de ácido equivalentes al KOH que intervino en la saponificación. Calcular e informar el índice según su definición (peso fórmula KOH = 56,1).

Esta determinación se realiza por triplicado y se informa el promedio de las tres determinaciones.

Cálculos:

(mg KOH requeridos para saponificar 1g de muestra) = $(28.05 \times (B-S)) / g$ de muestra

Donde:

B = ml de HCl 0.5M consumidos por el blanco

S = ml de HCl 0.5M consumidos por la muestra

4.11.6 Índice de acidez (IA)

Fundamento: Se expresa en mg de KOH requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en 1g de grasa. Los aceites y grasas, debido a la acción de las lipasas, contienen ácidos grasos libres en mayor o menor cantidad según sean las condiciones de manufactura, edad y almacenamiento del producto.

Material / Reactivos:

- ✓ Solución de etanol: éter etílico (1:1 v/v) neutralizada
- ✓ NaOH (0.05 N) valorado
- ✓ Solución de fenolftaleína (1 %)
- ✓ Matraz erlenmeyer de 125ml

Procedimiento:

Se pesan exactamente, en un Erlenmeyer tarado de 125 ml, de 1 a 2 g de muestra y se disuelve en 60 ml de la mezcla de disolventes, previamente neutralizada usando fenoftaleína con NaOH diluído. Agitar.

Se titula con NaOH 0.05 N valorado, usando fenolftaleína como indicador. Se calcula e informa la acidez libre en mg de KOH por g de aceite. Esta determinación se realiza por triplicado y se informa el promedio de las tres determinaciones.

Cálculos:

$$\% \text{ índice de Yodo} = \frac{A \times N \times 56.1053}{\text{g muestra}}$$

Donde:

A = ml de solución de NaOH gastados

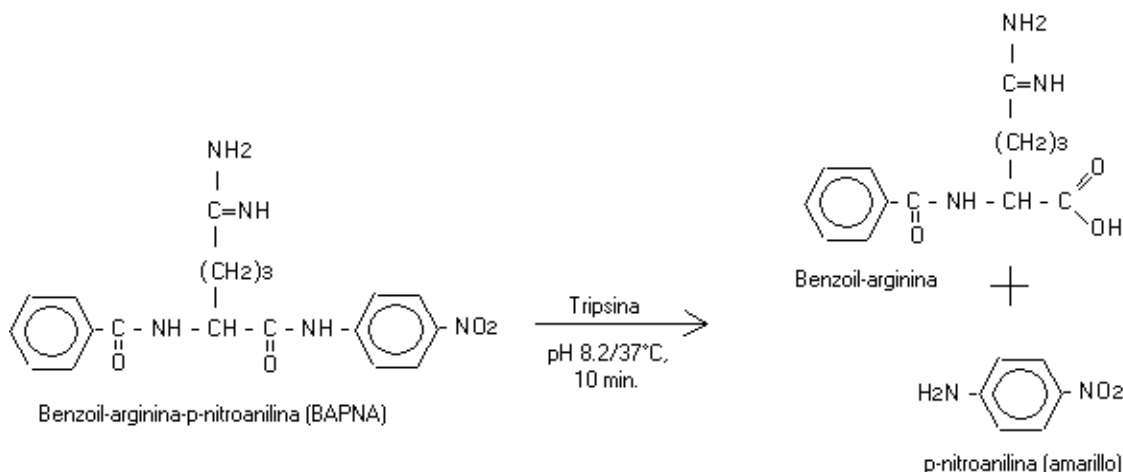
N = Normalidad de la solución de NaOH

4.12 Determinación de factores tóxicos

4.12.1 Inhibidores de tripsina

Fundamento: La técnica se basa en poner en contacto el extracto acuoso de una muestra con una solución estándar de tripsina y posteriormente se determina si hay actividad proteolítica remanente mediante el uso de un sustrato sintético: Benzoil-arginina-p-nitroanilina (BAPNA), el cual producirá una coloración debido a la producción de p-nitroanilina, que se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410nm. Dicha coloración será inversamente proporcional al contenido de inhibidores de tripsina en la muestra. (Kakade, et al. 1974)

Figura 4. Hidrólisis de BAPNA con tripsina.



Material / Reactivos:

- ✓ Baño María GRNT Mod. SE10
- ✓ Potenciómetro CORNING Mod. 10
- ✓ Espectrofotómetro SEQUOIA TURNER MOD. 340
- ✓ Mezclador de tubos LAB -LINE MOD. SUPER MIXER
- ✓ NaOH 0.1N
- ✓ Solución amortiguadora TRIS 0.05M(a) pH 8.2
- ✓ Solución BAPNA (Sigma B-4875)(b)
- ✓ Ácido acético al 30%
- ✓ Solución estándar de tripsina (Sigma T- 8253)(c)
- ✓ HCl 0.001 N

a) Solución amortiguadora hidroximetil-aminometano (TRIS): pesar 6.05g de TRIS y 2.94g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, disolverlos en agua destilada y llevar a un volumen de 900ml, ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1000ml

b) Solución BAPNA (benzoil-arginina-p-nitroanilida): pesar 100mg de BAPNA y disolverlos en 2.5ml de dimetil sulfoxido, la disolución es mas rápida si se calienta en un baño de agua a 37°C , se afora a 250ml con solución amortiguadora TRIS previamente calentada a 37°C . Esta solución se prepara el mismo día de su uso y debe mantenerse a 37°C .

- c) Solución de tripsina: se pesan con exactitud 4mg de tripsina bovina y se disuelven en 200 ml de HCl 0.001 N, la concentración final es de 20 μg de tripsina/mL. Es recomendable tener esta solución en refrigeración de esta forma se conservará de dos a tres semanas sin pérdida apreciable de actividad.

Procedimiento:

Preparación del extracto acuoso de la muestra: se pesa 1g de muestra finamente molida y desengrasada en un vaso de precipitado, se adicionan 45 ml de NaOH 0.01 N y se procede a ajustar el pH de esta solución a 9.6 ± 0.2 , se afora a 50 ml con NaOH 0.01 N, se transvasa el contenido del matraz a un vaso de precipitado y se pone a agitación mecánica constante durante 2.5 horas a 300rpm. Transcurrido este tiempo se deja en reposo durante 30 minutos y por decantación se separa el sobrenadante del residuo insoluble. El sobrenadante debe ser diluido de tal forma que 1ml produzca una inhibición del 40 al 60 %, con esto se logra reducir la desviación estándar.

Determinación de la actividad: se preparan 10 tubos de ensaye como se muestra en la tabla 2, se agrega la cantidad especificada del extracto diluido o directo por duplicado y se ajusta el volumen final de cada tubo a 2 ml con agua destilada. Adicionar a todos los tubos 2ml de tripsina a 37°C agitando cada tubo con el vórtex. A los blancos se les adiciona además 1ml de ácido acético para detener la reacción. Colocar todos los tubos en el baño de agua a 37°C y dejar durante 10 minutos para que entren en contacto inhibidor y enzima. A continuación se adiciona a cada tubo 5ml de la solución de BAPNA a 37°C y volver a colocar los tubos en el baño de agua por un espacio de 10 min. Es importante tener un control estricto del tiempo sobre todo después de adicionar el BAPNA, por lo cual debe utilizarse un cronómetro.

Tabla 2. Preparación de la serie de tubos para determinar actividad inhibitoria.

Tubo	ml de extracto	ml de agua	ml de sol. estándar de tripsina	ml de BAPNA	ml de ácido acético
B1	1.8	0.2	2.0	5.0	0.0
1	1.8	0.2	2.0	5.0	1.0
B2	1.4	0.6	2.0	5.0	0.0
2	1.4	0.6	2.0	5.0	1.0
B3	1.0	1.0	2.0	5.0	0.0
3	1.0	1.0	2.0	5.0	1.0
B4	0.6	1.4	2.0	5.0	0.0
4	0.6	1.4	2.0	5.0	1.0
BR	0.0	1.8	2.0	5.0	0.0
R	0.0	1.8	2.0	5.0	1.0

NOTA: A los blancos después de adicionarles la solución estándar de tripsina se les adiciona 1.0ml de ácido acético.

Posteriormente se detiene la reacción enzimática añadiendo 1ml de ácido acético a cada tubo a excepción de los blancos a los cuales ya se les había adicionado.

Es frecuente la formación de precipitados o el enturbamiento de la mezcla de reacción por lo que se deja reposar durante 15 min. y después se filtra a través de papel de filtración rápida, el filtrado deberá estar traslúcido.

La lectura de cada tubo se realizará en el espectrofotómetro a 420nm tanto en absorbancia como en % T.

Cálculos:

La actividad de los inhibidores de tripsina se expresa en términos de UTI (Unidades de Tripsina Inhibida), y se a definido una unidad de tripsina como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción descritos por Kakade y colaboradores.

De acuerdo a la siguiente relación se obtienen las siguientes unidades de tripsina

$$U. T. = Absorbancia \times 100$$

Una vez que se hayan obtenido las U.T. de cada alícuota del extracto es conveniente obtener el % de inhibición tomando como referencia el tubo con 1 ml de extracto, para conocer si cae en el rango 40-60 % de inhibición o bien si es necesario hacer dilución.

Para obtener las unidades de tripsina inhibidas se hace el siguiente cálculo:

U.T.I. = Unidades de Tripsina de la Referencia – Unidades de tripsina del extracto

Al graficar las U.T.I./ml vs ml de extracto se obtiene una correlación negativa de la cual se extrapola el valor de la ordenada y este dato es el más cercano a la actividad inhibitoria real cuando se refiere al inhibidor tipo Kunitz como en el caso de la soya.

Si la correlación lineal no es satisfactoria ($r \leq -0.9$) se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas y reporta como U.T.I./ml:

$$\frac{\text{U.T.I.}}{\text{ml}} = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{U.T.I./ml})_i}{n}$$

Es conveniente reportar en U.T.I. con respecto a los mg de la muestra:

U.T.I. / mg de muestra = B X F x (50/1000)

Donde:

B = Ordenada al origen de la gráfica = U.T.I. / mL vs volumen del extracto

F= Factor de dilución = Aforo/Alícuota, en el caso del extracto directo F=1

4.12.2 Determinación semicuantitativa de lectinas

Fundamento: Una manera de detectar la presencia de hemaglutininas en extractos de plantas es con una técnica de diluciones seriadas de un extracto salino de la muestra, en la cual se determina el punto final de la aglutinación de los glóbulos rojos en estudio por una estimación visual. La metodología utilizada es la técnica de Jaffe, en donde se detecta la presencia de lectinas aprovechando su capacidad de aglutinación de los eritrocitos de hámster, y se expresan los resultados en forma semicuantitativa como la última dilución que presenta aglutinación. (Lucas and Sotelo, 1993)

Material / Reactivos:

- ✓ Agitador magnético con tacómetro, multi-stir plate "4", marca Thermolyne
- ✓ Centrífuga para tubos marca Dynac CL.
- ✓ Tubos de centrífuga de 15 ml con graduación
- ✓ Jeringa de 5 ml.
- ✓ Incubadora marca BLUE-M. "Dry type bacteriológico incubator"
- ✓ Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340.
- ✓ Adaptador para celdas de 10 X 75 mm
- ✓ Microtiter Kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- ✓ Filtro de vidrio poroso (poro grueso)
- ✓ Sangre de hámster dorado
- ✓ Solución anticoagulante: heparina
- ✓ Solución salina al 1%
- ✓ Solución salina al 0.9%
- ✓ Solución de pronasa al 0.2% en solución salina
- ✓ Pronasa de *Streptomyces griseus* (SIGMA p-5147)

Procedimiento:

(a) Preparación del extracto:

Se muele la muestra finamente, se suspende 0.1g en 10 ml de solución salina al 1% y se efectúa una extracción con agitación magnética durante dos horas a 300r.p.m. a la temperatura ambiente.

Se centrifuga a 1,400 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el residuo insoluble; el sobrenadante se filtra a través del filtro de vidrio y de ser necesario se puede lavar el residuo con más solución salina al 1% para llevar el extracto filtrado al volumen inicial de 10 ml.

(b) Preparación de la sangre:

Se sangra por vía ocular a un hámster y la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, se agita suavemente y se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla 3 veces con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5. Se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada 1.0 ml de glóbulos rojos 24 ml de solución salina al 0.9%.

(c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% se les agrega 1 ml de solución de pronasa al 0.2% y se coloca en la incubadora por espacio de 1 hora a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Después del tiempo estipulado, se centrifuga, se lava 3 veces con solución salina al 0.9%. Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 4% (por cada 1ml de paquete de eritrocitos se adiciona 24 ml de solución salina al 0.9%).

(d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se toma 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9 mL de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm^2 de luz y para ajustar el espectrofotómetro al 100%T se usa como blanco, solución salina al 0.9%. La lectura que se debe obtener es de 24 a 29% de transmitancia, de lo contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

(e) Microtitulación:

En las placas tipo "V" del microtiter , colocar en cada pozo de una hilera, 100 μl de solución salina al 0.9% con la micropipeta multicanales evitando tocar las paredes del pozo.

Se llena el microdilutor de 50µl por inmersión del extracto problema y se procede a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión, para realizar una microdilución seriada.

Con un pipetero de gota se coloca en cada pozo 50µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados. Luego se gira la placa en forma circular y se lleva a la incubadora que está a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 hora.

(f) Lectura:

Se coloca la microplaca de plástico sobre el dispositivo de lectura y se observa a través del espejo el fondo de los pozos de cada hilera de prueba. Se reporta la máxima dilución que presente aglutinación.

Cálculos:

La máxima dilución que presenta aglutinación se denomina como título (t) de la muestra. La prueba debe efectuarse varias veces para mayor representación y confiabilidad de la determinación (mínimo 3). Se saca el promedio de los títulos de las diferentes lecturas y se redondea al número entero más cercano.

4.12.3 Determinación de fitatos

4.12.3.1 Determinación de fósforo en estándares de ácido fítico

Objetivo: Para la determinación de fitatos por medio de la técnica de Wolfgang (Haug y Lantzsch, 1983) se debe realizar como paso previo la determinación de la concentración total de fósforo en el estándar de ácido fítico que se usara.

Fundamento: En una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdofosfórico, que en presencia de vanadio forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfatos. (Herlich, 2000)

Materiales / Reactivos:

- ✓ Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340
- ✓ Adaptador para celdas de 10 X 75 mm
- ✓ Molibdato de amonio tetrahidratado (R.A.)
- ✓ Metavanadato de amonio (R.A.)
- ✓ KH_2PO_4 (R.A.)
- ✓ Ácido nítrico concentrado
- ✓ HCL concentrado
- ✓ Matrazes erlenmeyer de 25ml
- ✓ Pipeta graduada de 10ml
- ✓ Mufia THERMOLYNE, mod. 1500
- ✓ Papel Whatman # 40
- ✓ Matrazes aforados de 1L y 10ml
- ✓ Mechero Bunsen
- ✓ Tripie
- ✓ Triángulo de porcelana
- ✓ Pinzas para crisol
- ✓ Crisoles de porcelana

a) Reactivo molibvanadato.

Se disuelven 60g de molibdato de amonio $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 900ml de agua caliente, se enfría y se diluye a 1L. Se disuelve 1.5g de metavanadato de amonio en 690ml de agua caliente y se adicionan 300ml de HNO_3 , se enfría y se diluye a 1L. Gradualmente y con agitación se adiciona la solución de molibdato a la solución de vanadato. Esta solución se guarda a temperatura ambiente en polietileno o pirex.

b) Soluciones estándar de fosfato.

1. Solución stock de fosfato (0.5mg de $\text{P}_2\text{O}_5/\text{ml}$). Se disuelven 0.2397g de KH_2PO_4 puro y seco (2h a 105°C) a un volumen de 250ml con agua.

2. Soluciones de trabajo. Diluir 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35ml de solución stock a 500ml para obtener soluciones con concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 y 0.35mg de $\text{P}_2\text{O}_5/10\text{ml}$ respectivamente.

Procedimiento:

Preparación de la curva estándar:

Para ajustar el espectrofotómetro llene 4 celdas con solución estándar de 0mg/ml, ajuste a 0 de absorbancia con una celda y después lea la absorbancia de las otras celdas. Use las celdas con la menor absorbancia para futuras mediciones. Determine la absorbancia de cada estándar con el instrumento ajustado a 0 de absorbancia con el estándar de 0mg. Después de cada 3 determinaciones, vuelva a ajustar a 0 de absorbancia con el estándar de 0mg.

Pipetear 10ml de cada solución estándar en matraces erlenmeyer de 25ml tapándolos inmediatamente. Rápidamente en cuanto este la serie completa adicionar 5ml de solución de molibdovanadato a cada una, tapando y mezclando cada matraz. Deje descansar 10 minutos para desarrollar color y lea la absorbancia de cada solución dentro de 1 hora.

Preparación de la muestra:

Carbonice una muestra del peso apropiado (para que el producto examinado este en un volumen de 50-100ml) en un crisol a 550°C. Posteriormente incinere la muestra en una mufla a 525°C hasta peso constante. Disuelva las cenizas en 10ml de HCl (1+3) y evapore a sequedad en un baño de agua. Disuelva el residuo en 10ml de HCl (1+9) en el baño y lleve esta solución a un volumen final de 100ml con agua. Enfrié, y si es necesario diluya nuevamente a el volumen final de 100ml. Si la ceniza tiene más P_2O_5 del esperado y se sale de la curva patrón, haga una dilución secundaria para que el contenido de P_2O_5 sea menor a 0.35mg/ml. Desarrolle color y determine la absorbancia de las muestras de la misma manera que con la curva estándar.

Cálculos:

Realice la gráfica de concentración vs absorbancia de la curva patrón y a partir de esta extrapole la concentración de P_2O_5 de las muestras. Con este resultado y conociendo el peso inicial de la muestra se puede calcular la concentración de fósforo en los estándares de ácido fítico, eligiendo así el más adecuado para la determinación de fitatos.

4.12.3.2 Fitatos

Fundamento: El método se basa en la determinación colorimétrica indirecta del fósforo de fitato en la muestra. El extracto de la muestra es calentado con una solución acidificada de hierro III de concentración conocida de hierro. El decremento de hierro (determinado coloriméricamente con 2,2-bipiridina) en el sobrenadante es una medida del contenido del ácido fítico. El método debe ser calibrado con soluciones estándar de ácido fítico. (Haug y Lantzsch, 1983)

Materiales / Reactivos:

- ✓ Parrilla de calentamiento, SUPELCO, mod. 3-3315
 - ✓ Espectrofotómetro, SEQUOIA-TURNER, mod. 340.
 - ✓ Mezclador de tubos LAB-LINE, mod. Súper-mixer
 - ✓ HCl 0.2N
 - ✓ HCl 2N
 - ✓ Ácido tioglicólico (R.A.)
 - ✓ Solución de referencia de fitato (1)
 - ✓ Solución férrica (2)
 - ✓ Solución de 2,2-bipiridina (3)
1. Se prepara la solución stock diluyendo 125mg de sal sódica de ácido fítico (SIGMA No. P-3168, 92%) en agua destilada y aforando esta solución a 50ml. Como la fitasa está ausente esta solución es estable.
 2. Disolver 0.2g de sulfato de amonio fierro (III)·12H₂O (Merck Art. 3776) en 100ml de HCl 2N y aforar a 1L con agua destilada.
 3. Disolver 10g de 2,2-bipiridina (Merck Art. 3098) y 10ml de ácido tioglicólico en agua destilada y aforar a 1L.

Nota: estas soluciones son estables por varios meses a temperatura ambiente.

Procedimiento:

Curva patrón:

Se prepara una curva patrón diluyendo alícuotas de la solución stock con HCl 0.2N, para tener un rango de concentraciones de fósforo de fitato de 3 a 30 μ g/ml como se muestra a continuación:

Tabla 3. Curva patrón de fósforo de fitato

Solución stock (ml)	HCl 0.2N (ml)	Concentración (μ g/ml)
1	99	3
3	97	9
5	95	15
7	93	21
10	90	30

Muestras:

Se pesan aproximadamente 0.05g de la harina desengrasada de la muestra (esta cantidad varia dependiendo de la cantidad de fósforo de fitato presente en la muestra) y se extrae con 10ml de HCl 0.2N. Se pipetea 0.5ml de este extracto en un tubo con tapa de teflón. Se agrega 1ml de solución férrica y se cierra el tubo con su tapa. Se calienta el tubo en la parrilla de calentamiento a $100 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, dejar enfriar un poco los tubos y enfriar en agua con hielo por 15 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente, una vez que los tubos han alcanzado la temperatura ambiente se agregan 2ml de solución de 2,2-bipiridina y se mezcla el contenido. Se mide la absorbancia a 519nm a los 30seg exactos después de haber agregado la 2,2-bipiridina a cada tubo, ya que la bipiridina reacciona con el fitato de fierro y el color cambia con el tiempo. Este mismo procedimiento se repite para las soluciones de la curva patrón.

Cálculos:

Se elabora una curva patrón Absorbancia vs concentración (μ g P de fitato/ml), con el valor de absorbancia obtenido para la muestra se calcula de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal, el contenido de fitato (μ g P de fitato/ml). Con el dato obtenido se puede calcular el % de ácido fítico en la muestra.

4.12.4 Determinación de saponinas

Fundamento: La detección de saponinas en extractos de plantas se lleva a cabo con la técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el puntó final por una estimación visual de la hemólisis de los glóbulos rojos de sangre de conejo. El método de microtitulación es rápido y requiere una mínima cantidad de muestra. Se necesita trabajar con glóbulos rojos lavados y activados con una solución de proteasa disponible (como pronasa, tripsina o papaína), ya que la sensibilidad se mejora considerablemente con este tratamiento. (Girón, 1992)

Material / Reactivos:

- ✓ Extractor de grasa Goldfish, LABCON CO
- ✓ Cartuchos de celulosa Whatman 22x88mm
- ✓ Rotavapor Büchi, 461, modelo RE-111
- ✓ Centrifuga Dynac
- ✓ Incubadora bacteriológica, BLUE M.
- ✓ Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER, mod. 340
- ✓ Tubos de centrifuga de 15ml con graduación
- ✓ Jeringa de 5 o 10ml # 22.
- ✓ Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA).
- ✓ Filtro de vidrio poroso.
- ✓ Solución de metanol al 85% (v/v)
- ✓ Sangre de conejo desfibrinada y lavada
- ✓ Solución anticoagulante (a)
- ✓ Solución salina al 0.9%.
- ✓ Solución de proteasa al 0.1% en solución salina (b)
- ✓ Tripsina de páncreas de porcino (Sigma t-8128)
- ✓ Solución estándar de saponinas al 0.5% en solución salina (c)

(a) Cuando la sangre se va a trabajar inmediatamente se puede utilizar ya sea solución de heparina o citrato, las cuales se usan en la siguiente relación: Solución Heparina:sangre = 15-20UI:1ml sangre, Solución de citrato:sangre = 0.1ml:1ml sangre.

Sin embargo, si la sangre no se va a trabajar de inmediato y se desea conservar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, la

solución ELSEVER, en la siguiente proporción: 1:1 o sea 1ml de solución ELSEVER por 1ml de sangre fresca.

(b) Se usa tripsina de páncreas de porcino (Sigma T-8128) al 0.1% en solución salina al 0.9%, para el proceso de sensibilización.

(c) El estándar de saponinas es una mezcla 1:1 de digitonina (saponina tipo esteroidal) y un extracto de quillaja (saponina tipo triterpenoide).

Procedimiento:

a) Preparación del extracto:

Una vez que se tiene la muestra finamente molida y desengrasada (si el caso lo amerita) se pesan 7.5g en el cartucho de celulosa, se colocan en los portadedales y en el extractor Goldfish. La extracción se realiza a la máxima temperatura del aparato por 2 horas, con metanol-agua (85:15) como solución extractora de las saponinas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el extracto se concentra a sequedad en el rotavapor, a una temperatura aproximada de 65°C, la muestra se redisuelve con solución salina 0.9% y se filtra con ayuda de vacío para aforar a 100ml con la misma solución. Si no se realiza la determinación de inmediato, el extracto se debe refrigerar o congelar para evitar contaminación.

b) Preparación de la sangre:

Una vez que se sangra al animal, la sangre se coloca en un matraz pequeño que contenga solución anticoagulante, agitar suavemente para la completa homogenización de la sangre con la solución anticoagulante (No interrumpir hasta el momento de diluirla). La sangre con anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina al 0.9%. La relación sangre:solución salina es aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. Después del último lavado, se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad de paquete de eritrocitos y se diluyen al 4% para lo cual se agregan por cada mililitro de glóbulos rojos 24ml de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10ml de suspensión de glóbulos rojos al 4% agregarles 1ml de solución de tripsina al 0.1% (en solución salina) y colocarlos en incubadora por espacio de 1 hora a 37°C. Después del tiempo estipulado, centrifugar para eliminar la enzima sobrenadante, dando además 3 lavados con solución salina 0.9%.

Después del último lavado se resuspende el paquete de glóbulos rojos al 5% por lo cual a cada mililitro del paquete de eritrocitos se le adicionan 19ml de solución salina 0.9%.

NOTA: Cuando se observa que la sangre tiene algunos coágulos (aunque sean pequeños), es necesario separarlos de esta suspensión, para lo cual se puede hacer a través de un pequeño trozo de gasa, colocado dentro de un embudo de cuello corto.

d) Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se toma 0.1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregan 4.9 mL de solución salina al 0.9%. Se lee en el espectrofotómetro a 620 nm, usando un adaptador de celdas que permita el paso de solo 1 cm² de luz y para ajustar el espectrofotómetro al 100%T se usa como blanco, solución salina al 0.9%. La lectura que se debe obtener es de 24 a 29% de transmitancia, de lo contrario se realizará la dilución necesaria para que la suspensión de glóbulos quede dentro de dicho rango.

e) Microtitulación:

En las placas tipo "U" del microtiter, colocar en cada pozo una hilera de 50µl de solución salina al 0.9% con el pipeteador de gota evitando tocar las paredes del pozo. A continuación se llena el microdilutor de 50µl por contacto con la superficie del extracto problema o de estándar de saponina para proceder a realizar las diluciones sucesivas en la hilera escogida, introduciendo el microdilutor en el pozo y rotándolo sin excesiva presión. Se elimina el residuo de la última dilución.

NOTA: Es recomendable checar que el volumen que este tomando nuestro microdilutor, sea el requerido. Esto se realiza con solución salina en una placa de prueba.

Por último con un pipetero de gota colocar en cada pozo 50µl de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizada y ajustada teniendo también un control negativo con solución

salina 0.9% sin extracto problema y otro positivo con solución salina 0.9% y el estándar de saponinas al 0.5% en solución salina. Luego se rota la placa en forma circular y se lleva a la incubadora a 37°C por espacio de 1 hora.

f) Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo, se coloca la placa sobre el dispositivo de lectura. Se localiza en la placa, el número que corresponda al último pozo donde se aprecia hemólisis y que resulta ser la mínima cantidad de muestra que produce prueba positiva de hemólisis.

Cálculos:

Las unidades asignadas en el método se definieron como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg de muestra), lo cual se explica a continuación:

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1.1) tiene una concentración de 0.5% en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 0.05ml, se tiene entonces una concentración de 0.25mg de saponina en dicho volumen.

En una dilución seriada se tiene la formula:

Concentración del extracto / (2^t)

Donde t= titulo de hemólisis

Si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 8 para el titulo de hemólisis, entonces en este pozo se tiene la siguiente concentración:

$$0.25\text{mg} / (2^8) = 0.001\text{mg} = 1\mu\text{g}$$

Por definición 1μg del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades hemolíticas (U.H.).

Entonces el cálculo para las muestras es:

La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75mg/ml, en 0.05ml tenemos 3.75mg, para un título de hemólisis con valor de 1 se tiene la siguiente concentración:

$$3.75 / (2^1) = 1.875\text{mg de muestra}$$

Así por definición se obtienen las Unidades hemolíticas por miligramo de muestra (U.H./mg de muestra).

$$10 \text{ U.H.} / (1.875\text{mg de muestra}) = 5.3 \text{ U.H./mg de muestra}$$

4.12.5 Determinación de ésteres de forbol por medio de HPLC

Fundamento: De la información bibliográfica se menciona que los principales responsables de la toxicidad aguda por la ingesta de la semilla de *Jatropha curcas* son los ésteres de forbol; por tal motivo, se realizara la cuantificación de estos tóxicos usando la técnica reportada por Makkar y colaboradores. (Makkar, et al, 1997, 1998)

Materiales y reactivos:

- ✓ Integrador: PE NELSON modelo 1022
- ✓ Bomba: PERKIM ELMER binary LC pump Mod. 250
- ✓ Detector: Waters 2487
- ✓ Salvacolumnas: Phenomenex KJO-4282
- ✓ Columna: Columna de fase reversa C18 Waters WAT027324, 3.9 x 300mm.
- ✓ Sistema millipore
- ✓ Sonificador ultrasonico: Branson modelo 3210
- ✓ Tetrahidrofurano (THT) grado HPLC
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC (disolvente B)
- ✓ Ácido fosfórico (R.A.)
- ✓ Diclorometano (R.A.)
- ✓ Mortero con pistilo
- ✓ Rotavapor Büchi modelo RE-111
- ✓ Baño de agua Büchi modelo 461

- ✓ Bomba de agua
- ✓ Charola de plástico
- ✓ 2 Mangueras de látex
- ✓ Termómetro de -20 a 400°C
- ✓ Matraz Bola de 50ml con una boca 24/40
- ✓ Estándar de forbol 12-miristato 13-acetato (SIGMA P-8139)
- ✓ Matraz kitasato de 250ml
- ✓ Buchner con alargadera

Procedimiento:

Extracción de los esteres de forbol

5 almendras de la muestra de piñoncillo fueron pesadas y molidas con un poco de arena usando un pistilo con mortero y adicionando después 20ml de diclorometano. Esta mezcla fue homogeneizada por otros 5 minutos con el mortero. El material se dejó asentar y la fase líquida fue filtrada en frío con ayuda de vacío. El residuo en el papel filtro y en el pistilo fue recuperado usando otros 20ml de diclorometano y homogeneizado por otros 5 minutos usando el mortero. La fase líquida fue de nuevo colectada. Este procedimiento se repitió otras 3 veces y el filtrado de las 5 extracciones fue recolectado.

El residuo (de la arena y las semillas) fue sujeto a ondas ultrasónicas (105 W) por 3 minutos en presencia de otros 50 ml de diclorometano. Esta solución fue filtrada, y el filtrado se sumó con los otros filtrados recolectados en las 5 extracciones previas. El filtrado fue secado con ayuda de un rotavapor, a una temperatura de 40°C con usando vacío. El residuo seco de cada muestra fue guardado en el mismo matraz bola en el que se extrajo, sellando este con parafilm y se almacena en congelación hasta ser utilizado.

Nota: El diclorometano es un disolvente altamente volátil, por lo que para evitar pérdidas de este durante la extracción, se trabaja en frío, usando un baño de hielo para enfriar el mortero en donde se muele la muestra.

Preparación del buffer de ácido fosfórico (disolvente A):

De acuerdo con lo reportado en la literatura (Makkar et al, 1997), se prepara esta solución tomando 1.75ml de ácido fosfórico al 65% y llevando este volumen a 1L con

agua destilada. Ahora, como no se reporta que pH presenta esta solución, se lee el pH de esta solución y se ajusta a un pH de 1.8 ± 0.02 , ya que este factor es muy importante por la variación que se puede tener en los tiempos de retención. Por último se filtra esta solución por medio de un sistema millipore de 0.45μ y se almacena en refrigeración dentro de un frasco ámbar.

Condiciones de cuantificación.

Los dos eluyentes utilizados son: acetonitrilo (disolvente B) y buffer de ácido fosforico (disolvente A), los cuales se desgasifican por 1h en el sonicador Branson antes de usarse. A continuación se programa el gradiente que se utilizara, el cual es:

1. Condiciones de inicio 60% de A y 40% de B (20 minutos)
2. En los próximos 10 se lleva A a 50% y B a 50%
3. En los siguientes 30 minutos se decrementa A a 25% y se incrementa B a 75%
4. En los siguientes 15 minutos se incrementa B al 100%

La cuantificación se lleva a cabo a temperatura ambiente, los picos se integran a 280nm y los resultados son expresados en equivalentes de forbol 12-miristato 13-acetato (obtenido de sigma).

Después de cada corrida la columna se lava por 15 minutos con THT al 100%, y posteriormente se vuelve a ajustar el equipo a las condiciones de inicio (60% de A y 40% de B).

Preparación de la curva patrón:

Se preparó una curva patrón a partir del estándar de forbol 12-miristato 13-acetato (obtenido de sigma), para lo cual se prepara una solución stock diluyendo este estándar (1mg) en 1ml de THT y preparando a partir de esta los puntos de la curva patrón (0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.4mg/ml). La preparación de la curva patrón y de la solución stock se realiza en frío, debido a el bajo punto de ebullición del THT, lo cual ocasiona que este se evapore fácilmente. La solución stock y los puntos de la curva patrón se guardan en refrigeración (5°C).

Preparación de la muestra:

El residuo seco de la muestra fue aforado a 5ml con THT, y posteriormente fue filtrado a través de una membrana millipore de 0.45 μ m.

Inyección de la muestra

Tanto de la muestra como de la curva patrón se inyectan 20 μ L, las inyecciones de los puntos de la curva patrón se realizaron por triplicado y las inyecciones de las muestras (se prepararon 3 muestras del mismo lote de semillas de piñoncillo) se realizan por duplicado.

Nota: Como forma preventiva para verificar la reproducibilidad del sistema se inyecta por quintuplicado una concentración conocida del estándar de esteres de forbol y se verifica que en efecto exista reproducibilidad en el sistema a partir de estos resultados.

Cálculos:

El procedimiento para calcular la concentración de esteres de forbol en la muestra se describe en el anexo A del presente trabajo.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Parámetros físicos

En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados para los parámetros físicos de la semilla y la almendra de piñoncillo respectivamente, comparados con los reportados en la literatura para otras variedades.

Tabla 4. Parámetros físicos de la semilla de piñoncillo.^a

Variedad	Largo(mm)	Ancho(mm)	Peso(g)	Peso ^c Hectolítrico(g)
Zacualtipan, Hidalgo	17.5±0.86	8.8±0.61	0.61±0.01	47.1±0.35
Castillo de Teallo, Veracruz ^b	17.0±0.96	8.4±0.38	0.64±0.07	sd
Pueblillo (Papantla), Veracruz ^b	18.0±0.95	9.5±0.73	0.72±0.07	sd
Coatzacoalcos, Veracruz ^b	18.7±0.95	9.3±0.35	0.71±0.04	sd
Yautepec, Morelos ^b	15.0±0.79	7.6±0.45	0.44±0.06	sd

^aValor promedio ± desviación estándar.

^bMartínez, et al, 2006.

^cg/100ml equivalente a kg/100L.

sd: Dato no reportado.

Tabla 5. Parámetros físicos de la almendra de piñoncillo.^a

Variedad	Largo (mm)	Ancho (mm)	Peso (g)	Peso ^c Hectolítrico (g)	% en peso de la almendra en la semilla
Zacualtipan, Hidalgo	14.8±0.78	7.9±0.41	0.39±0.01	56.8±0.35	64.84±0.56
Castillo de Teallo, Veracruz ^b	15.1±0.84	7.2±0.38	0.43±0.05	sd	68.06
Pueblillo(Papantla), Veracruz ^b	16.0±0.58	7.7±0.45	0.49±0.04	sd	68.19
Coatzacoalcos, Veracruz ^b	16.4±0.04	7.4±0.39	0.48±0.04	sd	68.34
Yautepec, Morelos ^b	13.1±0.71	6.1±0.33	0.31±0.03	sd	70.08

^aValor promedio ± desviación estándar.

^bMartínez, et al, 2006.

^cg/100ml equivalente a kg/100L.

sd: Dato no reportado.

Al comparar estos resultados con los de otras variedades reportadas en la literatura se encuentra que, aunque existen ciertas similitudes entre estos valores, en conjunto si existe una diferencia significativa entre los valores de la variedad estudiada de piñoncillo con los de las otras variedades reportadas en la literatura; por lo que podemos predecir que esta es una variedad diferente.

5.2 Análisis proximal

En las tablas 6 y 7 se presenta el análisis proximal de la harina integral y de la harina desengrasada de la almendra de piñoncillo, comparando estos valores con los reportados en la literatura para otras variedades; y posteriormente se presenta en la tabla 8 el resultado de la determinación de proteína verdadera en la harina desengrasada.

Tabla 6. Análisis proximal de la harina integral de la almendra de piñoncillo expresado en porcentaje (%).^a

Variedad	Proteína cruda	Grasa cruda	Cenizas	Fibra cruda	Carbohidratos (por diferencia)
Zacualtipan, Hidalgo	25.0	60.0	4.3	3.0	7.6
Castillo de Teallo, Veracruz ^b	34.5	57.2	3.8	2.8	sd
Pueblillo(Papantla), Veracruz ^b	31.1	57.7	4.7	3.2	sd
Coatzacoalcos, Veracruz ^b	33.6	56.3	3.9	3.4	sd
Yautepec, Morelos ^b	32.1	55.3	5.1	3.1	sd
Capa Verde ^c	22.2	57.8	3.6	sd	sd
Nicaragua ^c	25.6	56.8	3.6	sd	sd
Ife-Nigeria ^c	27.7	53.9	5.0	sd	sd

^aValor promedio en base seca.

^bMartínez, et al, 2006.

^cMakkar et al, 1997.

sd: Dato no reportado.

Tabla 7. Análisis proximal de la harina desengrasada de la almendra de piñoncillo expresado en porcentaje (%).^a

Variedad	Proteína cruda	Grasa cruda	Cenizas	Fibra cruda	Carbohidratos (por diferencia)
Zacualtipan, Hidalgo	61	1.4	10.6	9.2	17.4
Castillo de Teallo, Veracruz ^b	64.9	0.4	10.4	4.9	sd
Pueblillo(Papantla), Veracruz ^b	63.1	0.5	9.8	5.5	sd
Coatzacoalcos, Veracruz ^b	61.9	0.6	10.4	6.1	sd
Yautepec, Morelos ^b	62.5	0.5	10.8	5.7	sd
Capa Verde ^c	56.4	1.5	9.6	sd	sd
Nicaragua ^c	61.2	1.2	10.4	sd	sd
Ife-Nigeria ^c	55.7	0.8	9.6	sd	sd

^aValor promedio en base seca.

^bMartínez, et al, 2006.

^cMakkar et al, 1997.

sd: Dato no reportado.

Tabla 8. Determinación de proteína verdadera en la harina desengrasada, expresado en porcentaje (%).^a

Discriminación del contenido de nitrógeno			
Nitrógeno proteico	88.15	Proteína cruda	61
Nitrógeno no proteico	11.85	Proteína verdadera	53.76

^aValor promedio en base seca.

Al observar el análisis proximal de la harina integral y de la harina desengrasada de la almendra, se corrobora que la harina integral presenta un alto contenido de proteína (25%) y grasa (60%), y que cuando esta se desengrasa el contenido de grasa se reduce a menos del 2%, concentrándose las proteínas hasta un nivel de aproximadamente un 60%, el cual podría ser aprovechado desde el punto de vista alimenticio para alimentación animal.

Comparando los resultados del análisis proximal de la muestra con los reportados para otras variedades se observa que al igual que en el análisis de los parámetros físicos, existen ciertas similitudes entre estos valores, encontrándose una notoria semejanza entre la variedad estudiada con la variedad de Nicaragua, la cual se reporta como tóxica. Sin embargo, en conjunto existe una diferencia significativa entre estos valores; por lo que aparentemente la variedad estudiada pertenece a una variedad diferente de la reportadas en la literatura.

Con respecto al análisis de proteína verdadera que se realizó, se encontró que existe un nivel alto de nitrógeno no proteico (11.85%), por lo que disminuye significativamente la cantidad de proteína presente en la muestra (de un 61% a un 53.76%), lo cual no se esperaba ya que no se reporta que la almendra de esta semilla contenga fuentes de nitrógeno no proteico en elevadas concentraciones (amoníaco, urea, ácidos nucleicos, etc).

5.3 Densidad calórica

A continuación se presentan en la tabla 9 los resultados de la determinación de densidad calórica en la harina integral y la harina desengrasada de la almendra de piñoncillo, comparando estos con los reportados en la literatura para otras variedades; y posteriormente se presentan en la tabla 10 los resultados de esta determinación para la grasa cruda y el aceite refinado comparando estos valores con los reportados para algunos aceites comestibles comerciales.

Tabla 9. Densidad calórica (en KJ/g) de la harina integral y de la harina desengrasada de la almendra de piñoncillo.^a

Variedad	Harina Integral	Harina desengrasada
Zacualtipan, Hidalgo	28.28±0.58	20.09±0.75
Castillo de Teallo, Veracruz ^b	31.5	18.2
Pueblillo (Papantla), Veracruz ^b	31.1	19.0
Coatzacoalcos, Veracruz ^b	31.5	18.8
Yautepec, Morelos ^b	31.4	18.0
Capa Verde ^c	30.7	18.2
Nicaragua ^c	30.5	18.3
Ife-Nigeria ^c	29.7	17.8
Varias ^d	30.5-31.1	18.0-18.3

^aValor promedio ± desviación estándar.

^bMartínez, et al, 2006.

^cMakkar et al, 1997.

^dRango reportado por Gübitz et al, 1999.

Tabla 10. Densidad calórica (en KJ/g) de la grasa cruda y del aceite refinado de la almendra de piñoncillo.^a

Muestra	Grasa cruda	Aceite refinado
Piñoncillo (<i>Jatropha curcas</i>)	38.21±1.42	39.96±1.97
Cacahuete (<i>Arachis hipogaea</i>) ^b	sd	36.96
Soya (<i>Glicine max</i>) ^b	sd	39.96
Maíz (<i>Zea mays L.</i>) ^b	sd	36.96

^aValor promedio ± desviación estándar.

^bPrior, 1994.

sd: Dato no reportado.

Analizando los resultados de la determinación de la densidad calórica, se encuentra que la harina integral y la harina desengrasada presentan valores similares a los de otras variedades de *Jatropha curcas*, los cuales son altos en la harina integral debido a el alto contenido de grasa que presenta esta especie vegetal, por lo cual podría resultar interesante el uso de estas fracciones para la alimentación animal, como es el caso de su utilización para la alimentación de pollos en algunas comunidades de los estados de Veracruz y Quintana Roo (Martínez, et al,2006).

Al comparar los resultados de densidad calórica de la grasa cruda y de el aceite refinado con valores reportados para algunos aceites comestibles se observó que los del piñoncillo son ligeramente mayores, por lo que esta fracción puede resultar interesante industrialmente como es su uso como biodisel en ciertos países del sudeste asiático y del norte de África (Gübitz et al, 1999), el cual es uno de los principales usos a los que se esta destinando la fracción grasa de la almendra de piñoncillo en la actualidad.

5.4 Parámetros fisicoquímicos

En la tabla 11 se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos determinados a la grasa cruda y el aceite refinado de la almendra de piñoncillo, comparando estos valores con los permitidos para el aceite de maíz comercial.

A partir de estos resultados se observa que el peso específico o densidad relativa en la grasa cruda y aceite refinado es muy parecido, debiéndose seguramente la pequeña diferencia al proceso de refinación al cual se sometió de aceite refinado, puesto que la grasa cruda antes de ser refinada contiene diversos compuestos de menor peso molecular los cuales son eliminados durante la refinación.

El punto de fusión indica el grado de insaturación y el tamaño de los ácidos grasos presentes tanto en la grasa cruda como en el aceite refinado, aumentando su valor al disminuir la presencia de insaturaciones y viceversa, lo cual explica el por que el punto de fusión del aceite refinado aumenta con respecto al de la grasa cruda, ya que durante el proceso de refinación se rompen dobles enlaces y se liberan ácidos grasos, por lo que aumenta la saturación del aceite.

Tabla 11. Parámetros fisicoquímicos de la grasa cruda y de el aceite refinado de la almendra de piñoncillo.^a

Parámetro	Grasa cruda	Aceite refinado	Aceite de maíz ^b
Índice de acidez (mgKOH/g)	3.11±0.08	0.44	0.05 máximo
Índice de Yodo (gI ₂ /100g)	104.95±0.68	106.4±0.74	107-135
Peso específico (g/ml)	0.9165±0.0004	0.9167±0.0001	0.9170-0.9250
Punto de fusión (°C) (Método del tubo capilar)	-9 a 4	0 a 4	sd
Índice de refracción (η_D^{20})	1.4715	1.4715	1.4650-1.4687
Índice de saponificación (mgKOH/g)	176.30±2.007	176.35±1.62	187-195

^aValor promedio \pm desviación estándar.

^bNorma mexicana NMX-F-030-SCFI-2005.

sd: Dato no reportado

El índice de acidez nos da una medida de la cantidad de ácidos grasos libres en el aceite, por lo que disminuye su valor en el aceite refinado al haberse sometido este a un proceso de neutralización; sin embargo, aún con este proceso no se logró disminuir este valor como el de un aceite comestible, como lo es el de maíz refinado que se presenta en la tabla 1.

Con respecto al índice de saponificación de las muestras, se observa que su valor prácticamente no varía con el proceso de refinación, por lo que podemos decir que la cantidad de ácidos grasos contenidos en la grasa no varía con el proceso de refinación. Por otra parte, al igual que el índice de acidez, el valor de índice de saponificación no entra dentro del rango reportado para el aceite de maíz comestible.

Existe una relación entre el índice de refracción y el índice de yodo, el cual se puede aplicar a la mayoría de las grasas y aceites: a medida que disminuye el índice de yodo, el índice de refracción también disminuye. Sin embargo, en este caso, los resultados para el

índice de refracción se mantuvieron constantes, mientras que el índice de yodo aumento en el aceite refinado, lo cual indica que en esta muestra no se observa notoriamente esta relación. Con respecto al aumento del índice de yodo, cabe señalar que este no fue muy alto, lo que nos indica que durante la refinación no se insatura considerablemente el aceite.

Por ultimo, cabe señalar que también el índice de refracción y el índice de yodo de la muestra no entran dentro de los rangos reportados para el aceite de maíz comestible (el cual es usado como referencia por que sus valores son similares a los del resto de los aceites comestibles comerciales).

5.5 Factores tóxicos

A continuación se muestran los resultados de los factores tóxicos estudiados en la almendra de piñoncillo, presentándose primero en la tabla 12 un resumen de los tóxicos determinados en la harina desengrasada, y posteriormente en la tabla 13, el resultado de la determinación de esteres de forbol por HPLC comparando este resultado con los reportados para otras variedades de piñoncillo reportadas en la literatura.

Tabla 12. Factores tóxicos en la harina desengrasada de la almendra de piñoncillo.^a

Factor	Resultado
Inhibidores de tripsina (UTI/mg) ^b	65.26±0.942
Saponinas (U.H./mg) ^c	nd
Fitatos (%m/m)	5.63±0.112
Hemaglutininas (título) ^d	6

^aValor promedio ± desviación estándar.

nd: No detectado.

^bUnidades de tripsina inhibida / mg de muestra

^cUnidades de hemólisis / mg de muestra

^dMáxima dilución que produce prueba positiva de hemaglutinación

Analizando los resultados presentados en la tabla 12 se encuentra que la muestra no presenta actividad de saponinas al no observarse hemólisis de la sangre, por lo que se consideran ausentes las saponinas en la muestra. Por otra parte, la muestra también presenta un nivel seguro de lectinas (título 6), ya que la técnica utilizada solo considera como riesgosas las muestras con un título mayor o igual a 10; y si además, consideramos que las lectinas son factores termolábiles que se inactivan fácilmente por tratamiento térmico tenemos argumentos para afirmar que el valor encontrado de lectinas es seguro, a pesar de que en la bibliografía se reporta que entre las lectinas que se encuentran en la almendra de piñoncillo esta la cursina, cuya actividad tóxica se asemeja a la de la ricina.

Con respecto a los inhibidores de tripsina, el valor encontrado de inhibidores en la muestra (65.25 UTI/mg) sobrepasa al nivel considerado como seguro por la técnica para fines alimenticios (10 UTI/mg); sin embargo, se reporta en la bibliografía que los inhibidores de tripsina presentes en la almendra de piñoncillo son termolábiles (Makkar, et al, 1997, 1998; Martínez, et al, 2006), logrando disminuir hasta niveles seguros la actividad de estos factores tóxicos en la muestra, después de un adecuado tratamiento térmico.

En cuanto a el contenido de fitatos en la muestra, este valor es muy alto (5.63%), ya que se reporta que a valores arriba de 0.4% (400mg de acá. fítico/100g) se aumenta la pérdida fecal de calcio y además puede quedar disminuida fuertemente la utilización digestiva de oligoelementos (Cu, Zn, Mg, Fe); sin embargo, se reporta en la bibliografía que el efecto tóxico que presenta el alto nivel de fitatos en el piñoncillo puede ser mitigado tratando la muestra con fitasas sintéticas (Martínez, et al, 2006).

Por ultimo, con respecto a los esteroides de forbol, en la tabla 13 se realiza una comparación entre los valores que presentan diversas variedades de piñoncillo (tanto tóxicas como no tóxicas) con el valor obtenido para la muestra estudiada, la cual nos permite realizar una diferencia entre las variedades tóxicas (2.3 a 3.85mg/g) y las no tóxicas (\leq a 0.09mg/g).

Tabla 13. Determinación de esteres de forbol, en la almendra de piñoncillo.^a

Variedad	Valor (mg/g) ³	Observaciones de campo
Zacualtipan, Hidalgo	0.24	Es consumida por la población en algunas ocasiones, después de ser tostada.
Castillo de teallo, Veracruz ¹	nd	No es consumida
Pueblillo (Papantla), Veracruz ¹	nd	Es consumida por humanos y usada como alimento para pollos.
Coatzacoalcos, Veracruz ¹	3.85	Su consumo por humanos causa diarrea, dolor abdominal y vómitos
Yautepec, Morelos ¹	nd	No es consumida
NC7 (Quintana Roo) ²	0.09	Consumida por humanos y pollos en algunas ocasiones.
NC9 (Quintana Roo) ²	0.03	Consumida por humanos y pollos con mayor frecuencia que NC7.
NC26 (Laguna, Guerrero) ²	2.49	Su consumo por humanos causa diarrea, dolor abdominal y vómitos.
Capa Verde ²	2.70	Variedad Toxica
Nicaragua ²	2.17	Variedad Toxica
Ife-Nigeria ²	2.30	Variedad Toxica

^aLos cromatogramas y el resultado de la prueba de adecuabilidad del sistema se reportan en el anexo A.

¹Martínez, et al, 2006.

²Makkar et al, 1997.

³Equivalentes a forbol 12-miristato-13-acetato.

nd: No detectado.

Observando el nivel de esteres de forbol encontrados en la muestra (0.24mg/g), podemos decir al comparar este valor con los de las variedades tóxicas que este es un valor relativamente bajo y que además se aproxima mucho a los valores reportados para las variedades no tóxicas de piñoncillo.

6 CONCLUSIONES

- ❖ Al comparar los resultados del análisis proximal y de los parámetros físicos con los reportados para otras variedades se encuentra que, aunque existen ciertas similitudes entre estos valores, en conjunto si existe una diferencia significativa entre los valores de la variedad estudiada de piñoncillo con los de las otras variedades reportadas en la literatura; por lo que podemos predecir que esta es una variedad diferente.
- ❖ Se encontró que existe un nivel alto de nitrógeno no proteico (11.85%) en la muestra, por lo que el contenido real de proteína presente disminuye de un 61% a un 53.76%.
- ❖ El aceite refinado y la grasa cruda de la almendra de piñoncillo tienen un alto contenido energético, comparado con otro tipo de aceites, por lo que estas fracciones pueden resultar interesantes industrialmente como es el caso de su uso como biodisel.
- ❖ Al analizar los resultados de los parámetros fisicoquímicos de el aceite refinado y la grasa cruda, se encontró que estas propiedades no entran dentro de los rangos reportados para el aceite de maíz comestible.
- ❖ Los niveles encontrados de saponinas y lectinas no representan ningún riesgo para el consumo
- ❖ Se encontró un contenido de inhibidores de tripsina y de fitatos por arriba del límite señalado como seguro; sin embargo estos valores se pueden reducir mediante un tratamiento térmico adecuado en el caso de los inhibidores de tripsina, y por un tratamiento con fitasas sintéticas en el caso de los fitatos.
- ❖ El contenido de esteres de forbol encontrado (0.24mg/g) es cercano a los valores de las especies reconocidas como no tóxicas (\leq a 0.09mg/g).

7 BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abdu-Aguye, I., Sannusi, A., Alifiya-Tayo, R. and Bhusnurmath, S. Acute toxicity with **Jatropha curcas L.** Human Toxicol. 5, p.p. 269-274 (1986).
- ❖ Al-khalifa, A. Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. J. Agric. Food Chem. 44, p.p. 964-966 (1996).
- ❖ Álvarez, M.A. Evaluación bromatológica y toxicológica del aceite de la semilla de cacahuanano (**Gliricidia sepium**). Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (2002).
- ❖ Aguilar, A. y Zolla, C. Plantas tóxicas de México. División de Información Etnobotánica del IMSS, pág. 124-125, México, D.F. (1982).
- ❖ Aregheore, E., Makkar, H. and Becker, K. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of **Jatropha curcas** using latex agglutination and hemoagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. J. Sci. Food Agric. 77, p.p. 349- 353 (1998).
- ❖ Aregheore, E., K. Bekker. Detoxification of a toxic variety of **Jatropha curcas** using heat and chemicals treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. S. Pac. J. National Sci. 21, p.p. 50-56 (2003).
- ❖ Akoh, C. and Min, D. Food lipid (Chemistry, nutrition, and biotechnology), Marcel Dekker, pág. 115-136, N.Y., p.p. 115-136 (1998).
- ❖ Bateman, J. Nutrición animal (Manual de métodos analíticos). Herrero Hnos.,S.A., pág. 110-112, 170-172, México D.F. (1970).
- ❖ Belitz, H.D., Química de los alimentos, Ed. Acribia, 2da edición, pág. 132-206, 691-723, Zaragoza (1997).
- ❖ Bostid, F.R. (Editor) Lost crops of the incas: little known plants of the andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press., p.p. 203-209, Washington, D.C. (1989).
- ❖ Centurión, D., Espionza, M. y Cázares, G. Catálogo de plantas de uso alimentario tradicional en la región sierra del estado de Tabasco. SIGOLFO, pág. 1-3, 7, 10, Villahermosa (2000).
- ❖ Chang, Raymond., Química general (4ª Edición), pág. 217-257, N.Y. (1992)
- ❖ Clavert, M.A., Dinole, J.T., and Lucy, J.A., Action of saponins on biological cell membranes. Nature 196, p.p. 952-955, (1967).

- ❖ Derache R., Toxicología y seguridad de los alimentos. Ed. Omega, pág. 111-121, Barcelona (1990).
- ❖ Desrosier, N., Elementos de tecnología de alimentos. CECSA, pág. 523, 531; México, D.F. (1997).
- ❖ Doode, M. y Pérez, E.P. Sociedad, economía y cultura alimentaria. CIAD, A.C., pág. 9-20, 273-302, Hermosillo (1994).
- ❖ Egan, H., Kirk, R., & Sawyer, R., "Análisis Químico de Alimentos de Pearson", 4^a edición, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., pág. 13-17, 19-39, México, D.F. (1991).
- ❖ El Badwi, S., Adam, S. and Harper, H. Comparative toxicity of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* in Brown Hisex chicks. Dtsch. Tierärztl. Wschr. p.p. 75-77, 102, (1995).
- ❖ FAO. Alimentos tradicionales y no tradicionales. FAO. Colección Alimentación y nutrición No 2, pág. 30-35, Roma (1980).
- ❖ FAO. Estado mundial de la agricultura y la alimentación 1995. FAO: Colección de agricultura No. 28, pág. v-vi, 3-88, Roma (1995).
- ❖ Feeney, R.E., Means, G.E., and bigler, J.C., Inhibition of human trypsin plasmid and trombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes, J. Biol. Chem. 244, p.p. 1957-1960 (1969)..
- ❖ Fennema, O., Química de los alimentos. Ed. Acribia, pág. 158-161, 221-261, Zaragoza (1993).
- ❖ Flores, N. (Editor), ¿Producir para la desnutrición?, Centro de Ecodesarrollo, pág. 13-34, 243-266, México, D.F. (1988).
- ❖ Girón, M. Determinación semicuatitativa de saponinas en muestras vegetales aprovechando su capacidad hemolítica. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D.F. (1992).
- ❖ Granados, D. y López, G. Agroecología. U.A.de Chapingo, pág. 37-166, Texcoco (1996).
- ❖ Gübitz G.M., M. Mittelbach, M. Trabi. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas L.* Bioresource Techn. 67, p.p. 73-82 (1999).
- ❖ Heller, Joachim. Physic nut. *Jatropha curcas*. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, (1996). I.S.B.N. 92-9043-278-0.

- ❖ Herlich, K. Official methods of analysis of AOAC. Published by AOAC 15th edition, Vol. I, p.p. 17-18, 40-62, 69-83; Vol. II, p.p. 1095-1098, Arlington (1990).
- ❖ Herlich, K. Official methods of analysis of AOAC. Published by AOAC 17th edition, Vol. II, chapter 41, p.p. 2-7, 12; Arlington (2000).
- ❖ Hernández, J.E. y León, C. Cultivos marginados (otra perspectiva de 1942) FAO: Colección de alimentación y nutrición No. 2, pág. IX-XI, 3-33, 37-120; Roma (1992).
- ❖ Haug, W. and Lantzsch, H. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal and products. J. Sci. Food Agric. 34, p.p. 1423-1426 (1983).
- ❖ Huerta, B. H., Evaluación nutricional de la fracción proteínica de la semilla de colorín (*Erythrina americana*) destoxificada. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (2005).
- ❖ Hughes D.W. and Genest K., Miller, L.P. (Editor), Phytochemistry (Alkaloids), Van Nostrand Reynold Co. Vol. 2, p.p. 118-170, Arlintong (1973).
- ❖ INEGI, El sector Alimentario en México, Dirección General de Difusión del INEGI, pág. 237-257, México, D. F. (2002).
- ❖ Jaffé, W.G., Factores tóxicos en leguminosas. Arch. Lat. Nutr. 18, p.p. 205-218 (1968).
- ❖ Kakade, M., Rackis, J., Mc.Ghee, J, and Puski, G. Deteermination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chem. 51, p.p. 376-382 (1974).
- ❖ Laider, K. Y., Meiser, J., FISICOQUIMICA, Ed. Acribia, S.A. 2^a Edición, pág. 45-87, Zaragoza (1997).
- ❖ Lehninger, Albert L., Bioquímica, 2da edición, Ediciones Omega, S.A., pág. 59-68, 285-289; Barcelona (1985).
- ❖ Liener, I.E., Effects of antinutritional and toxic factors ion utilization of legume proteins, in protein nutritional qualiti of foods and feeds. Frieman, M. Editorial Marcer Dekker. Inc, Vol. 2, p.p. 523-550 (1975).
- ❖ Liener, I.E. Toxics constituents of plant foodstuffs. Academic Press, p.p. 1-237, N.Y. (1980).
- ❖ Lindner, E. Toxicología de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. 2^a Edición, pág. 1-39, Zaragoza (1995).
- ❖ Lopéz, M.I., Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (2000).

- ❖ Lucas, B., Guerrero, A., Sigales, L. and Sotelo, A., True protein content and non-protein amino acids in legume seeds. *Nutr. Rept. Int.* 37, p.p. 545-553 (1988).
- ❖ Lucas, B. and Sotelo, A., A useful modification of the haemagglutination method for screening of lectins in legume seeds. 2th International Workshop on ANFs. in legumne seeds. EAAP Publication No. 70, p.p.71-74, Wageningen (1993).
- ❖ Makkar, H. Becker, K, Spores, F. and Wink, M., Studies on nutritive potential and toxics constituents of different provenances of ***Jatropha curcas***. *J. Agric. Food Chem.* 45, p.p. 3152-3157 (1997).
- ❖ Makkar, H., Aderibigde, A. and Becker, K., Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of ***Jatropha curcas*** for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chem.* 62, p.p. 207-215 (1998).
- ❖ Mansour, E., Dworschák, E., Lugasi, A., Barna, E. and Gergely, A., Nutritive value of pumpkin (***Cucurbita pepo*** kakai 35) seed products. *J. Sci. Food Agric.* 61, p.p. 61, 73-78 (1993).
- ❖ Martínez, M., Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, pág. 748 y 141, México, D. F. (1987).
- ❖ Martínez-Herrera, J.; Siddhuraju, P.; Francis, G.; Dávila-Ortíz, G.; Becker, K., Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of ***Jatropha curcas*** L. from Mexico. *Food Chem.*,. 96, p.p. 80-89 (2006).
- ❖ Matissek, Schnepel, y Steiner., *Análisis de los Alimentos*. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza (1992).
- ❖ McWilliams, M. *Foods experimental perspectives*. McMilian Publishing Company, p.p. 249-252, New York (1989).
- ❖ Moreno, E. *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. Instituto de Biología, UNAM, pág. 250-252, México, D.F. (1984).
- ❖ Morrison, Robert T. & Boyd, Robert N., *Química Orgánica*, 3ra edición, Fondo Educativo Interamericano, S.A., pág. 1081-1084, 1160-1189; N.Y. (1976).
- ❖ Muller, H. y Tobin, G. *Nutrición y ciencia de los alimentos*. Acribia, pág. 73-77, Zaragoza (1986).
- ❖ Murphy, D.J. *Designer oil crops (breeding, processing and biotechnology)*. VCH Publisher Inc. p.p. 73-130, 253-281, N.Y. (1994).
- ❖ Norma mexicana NMX-F-030-SCFI-2005, Secretaria de Gobernación de los E.U. Mexicanos (2005).

- ❖ Ostoa, M. Determinación de factores tóxicos y antinutricionales en algunas semillas crudas y procesadas consumidas en la etnia tenek del municipio de Aquismón, S.L.P. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (1997).
- ❖ Panigrahi, S., Francis, B., Cano, L. And Burbage, M. Toxicity of *Jatropha curcas* seeds from México to rats and mice. Nutr, Rept. Int. 29, p.p. 1089-1099 (1984).
- ❖ Prior, C. C., Detoxificación del aceite crudo de la almendra de capulín (*Prunus serotina*) y su evaluación toxicológica aguda. Tesis Fac. de Química, UNAM, México, D. F. (2004).
- ❖ Quilantán, V. La evolución demográfica de las oleaginosas en la alimentación e industria, ahora y a plazo. Rev. Asoc. Nal. Ind. Aceites y Mantecas 2 (12), pág. 17-19 (1992).
- ❖ Rubinson, K.A., Rubinson, J.F. Análisis Instrumental. Prentice Hall. Washington D.C. pág. 356-360 (2001).
- ❖ Ruíz, C.A. Evaluación bromatológica y toxicológica de la fracción lípidica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*). Tesis Facultad de Química, UNAM, México, D.F., (2000).
- ❖ Ruvalcaba, J. Y Alcala, M.G. (Coordinadores). Huasteca (práctica agrícolas y medicina tradicional). Centro de Investigación en Estudios Superiores de Antropología Social, SEP, pág. 11-39, México, D. F. (1993).
- ❖ Skoog, Douglas A. F.J. Holler, T.A. Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw-Hill Interamericana. 5ª ed, pág. 467-469, N.Y. (2001).
- ❖ Valle P., Lucas, B., Toxicología de alimentos. México D.F. (2000). I.S.B.N. 92-75-37004-4.
- ❖ Villela, O. y Gerez, P. Biodiversidad y conservación en México. Ed. Técnico Científicas, SA de CV-UNAM, 2ª Edición, pág. 7-34, 269-276, México, D.F. (1994).
- ❖ Wanasundara, P. and Shahidi, F. Process-induced chemical changes in food. Plenum Press, p.p. 307-327, N. Y. (1998).
- ❖ Watson, D.H. Natural toxicants in Food. (Progress and prospects). Ellis Harwood, p.p. 76-109, 110-124, Chichester (1987).
- ❖ Ziller, S., Grasas y aceites alimentarios, Ed. Acribia, pág. 1-11, 35-47, Zaragoza (1996).

8 ANEXO A

Resultados de la determinación de esteres de forbol por HPLC

A continuación se presentan los resultados del estándar (forbol 12-miristato-13-acetato). Las inyecciones de las concentraciones de 0.1, 0.15, 0.2, y 0.25mg/ml se realizaron por triplicado, mientras que la concentración de 0.4mg/ml se inyectó por quintuplicado para realizar una prueba de reproducibilidad del sistema.

Tabla 14. Resultados de las inyecciones del estándar.^a

Concentración (mg/ml)	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5
0.1	1366753	815540	1169873		
0.15	2375705	2444267	2146025		
0.2	4258147	4650638	4394390		
0.25	5460571	5790096	5314785		
0.4	9422820	8879670	9125409	9276709	9364116

^aValores del área integrada para cada pico sin unidades. Tiempos de retención de 40 a 42 minutos.

Para realizar la regresión lineal, se tomaron los valores de las tres primeras inyecciones del estándar de 0.4mg/ml, utilizando los otros 2 valores junto con los primeros para la prueba de reproducibilidad.

Los resultados de la regresión lineal son los siguientes:

Pendiente: 26905925.6

Ordenada al origen: -1411657.698

Coefficiente de variación: 0.9922296

A continuación se presentan los resultados para la muestra. Las inyecciones de las muestras (se prepararon 3 muestras del mismo lote de semillas de piñoncillo) se realizaron por duplicado.

Tabla 14. Resultados de las inyecciones de la muestra.^a

Muestra	Inyección 1	Inyección 2	Concentración inyección 1 ^b	Concentración inyección 2 ^b
A	1299868	1275117	0.100778	0.099858
B	1538632	1539313	0.109652	0.109677
C	1508538	1735800	0.108533	0.116980

^aValores del área integrada para cada pico sin unidades. Tiempos de retención de 47 a 49 minutos.

^bValores obtenidos después de despejar el resultado en la ecuación de la regresión lineal. Valores en mg/ml.

Ahora, con estos resultados y sabiendo el peso inicial de la muestra y el volumen al cual se diluyó (5ml) se calcula la concentración de los esteres de forbol en la almendra de piñoncillo, como se muestra a continuación.

Tabla 15. Concentración de los esteres de forbol en la almendra de piñoncillo.

Muestra	Inyección	Peso inicial (g)	Concentración en la dilución(mg/ml)	Concentración en la almendra (mg/g)
A	1	2.2105	0.100778	0.227952
A	2	2.2105	0.099858	0.225871
B	1	2.2573	0.109652	0.242883
B	2	2.2573	0.109677	0.242938
C	1	2.2791	0.108533	0.238104
C	2	2.2791	0.116980	0.256636

Los resultados de la concentración de esteres de forbol en la almendra se promedian, dándonos el valor de esteres de forbol en la muestra:

0.239064 ± 0.01128 mg/g

Los resultados de la prueba de reproducibilidad del sistema los resultados se presentan a continuación:

Media aritmética (x): 9213744.8

Desviación estándar (s): 217771.447

Coefficiente de variación: $(x/s) \times 100\% = 2.36\%$

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos durante la cuantificación de los esteres de forbol, presentándose por fines prácticos solo un cromatograma característico de cada concentración y de las muestras inyectadas.

Figura 5. Cromatograma del estándar de 0.1 mg/ml.

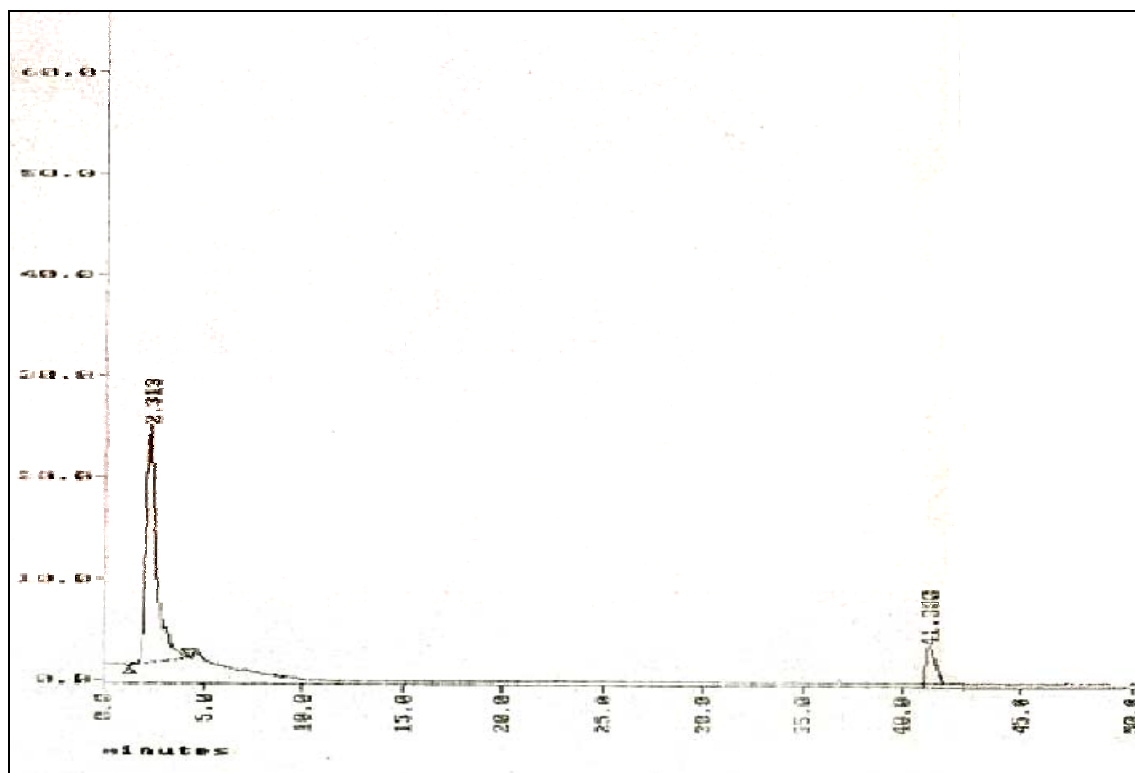


Figura 6. Cromatógrama del estándar de 0.15 mg/ml.

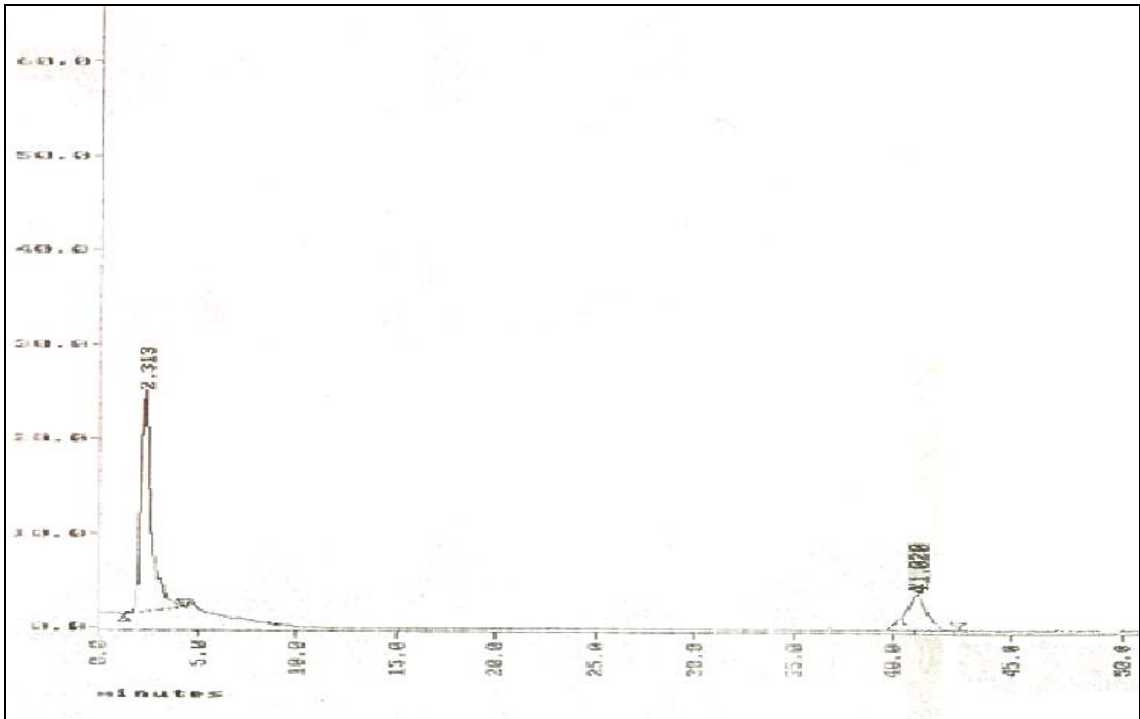


Figura 7. Cromatógrama del estándar de 0.2 mg/ml.

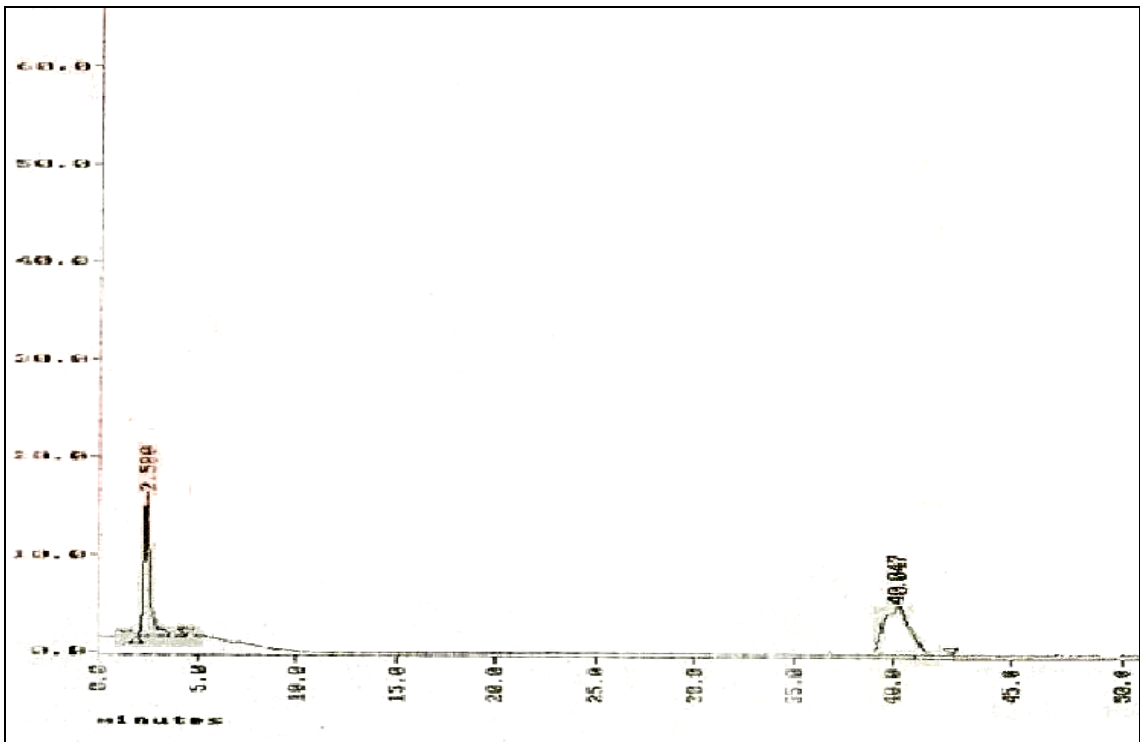


Figura 8. Cromatógrama del estándar de 0.25 mg/ml.

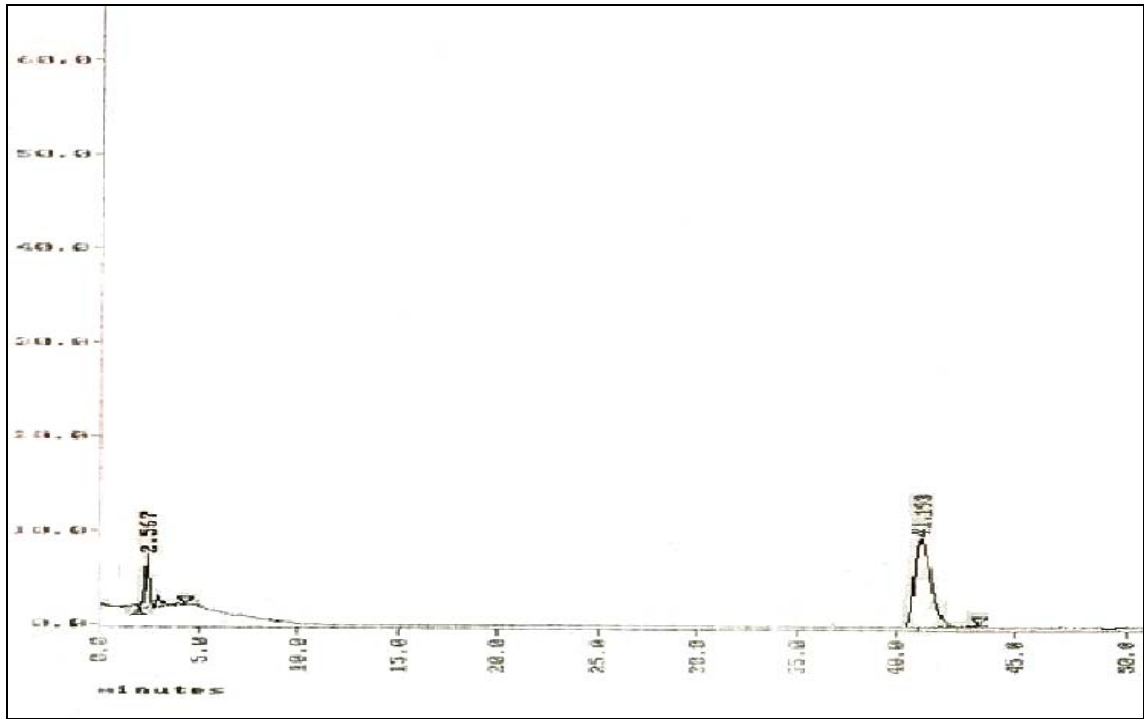


Figura 9. Cromatógrama del estándar de 0.4 mg/ml.

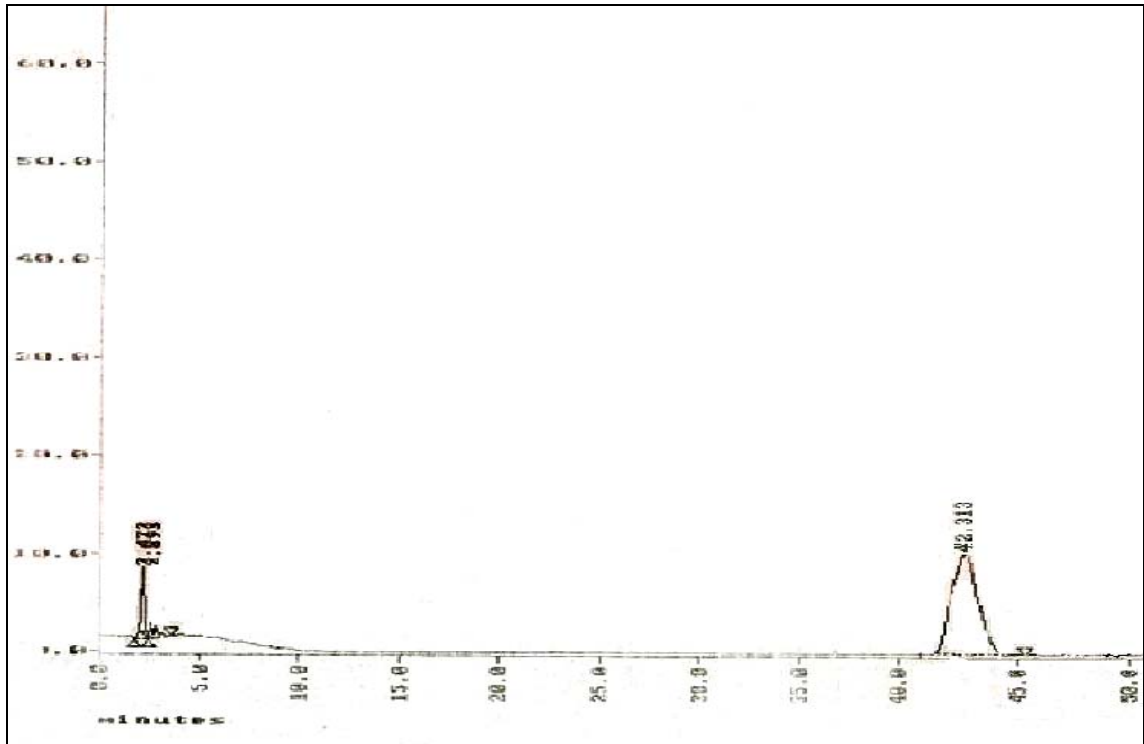


Figura 10. Cromatograma de la muestra A.

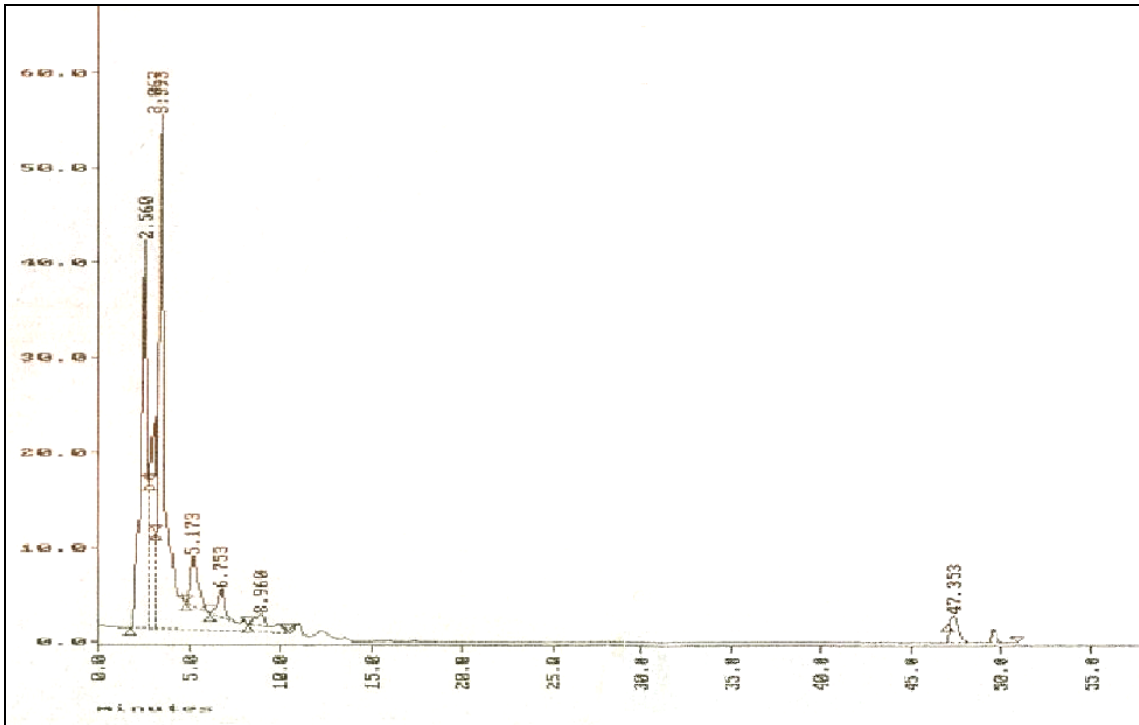


Figura 11. Cromatograma de la muestra B.

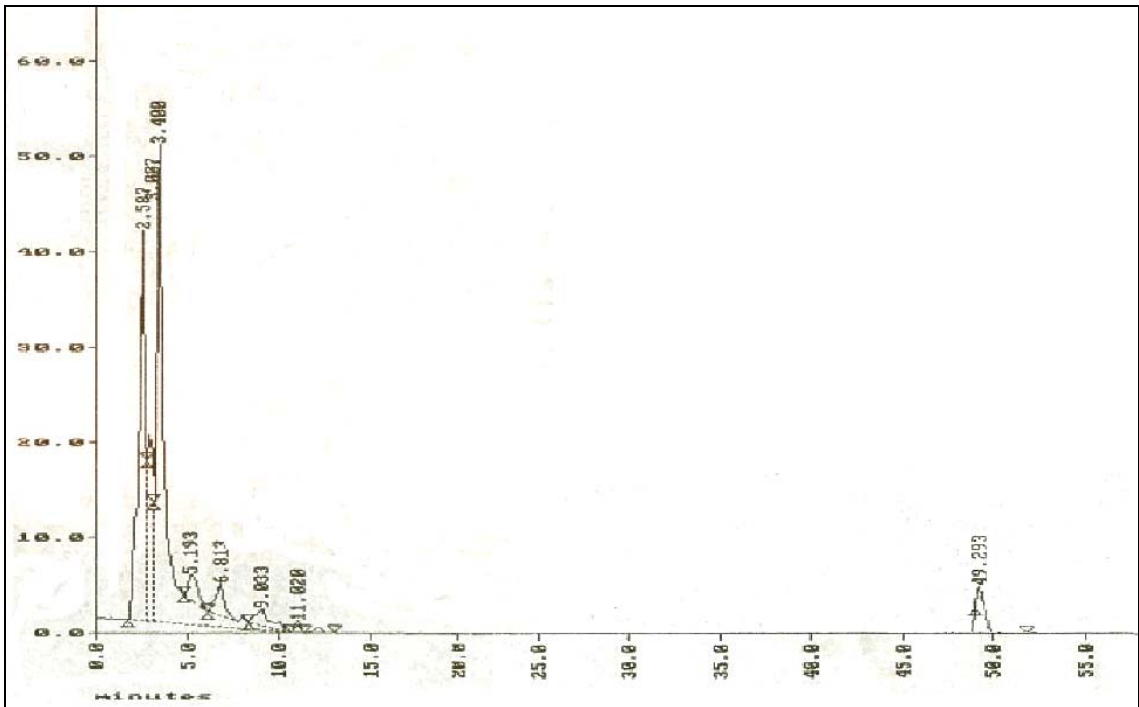


Figura 12. Cromatógrama de la muestra C.

