



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DE LA GRASA CRUDA Y EL ACEITE REFINADO
DE LA SEMILLA DE COLORÍN (*Erythrina americana*)"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MÓNICA ISABEL MORALES CORTÉS



MÉXICO, D.F.

2013



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: DR. PEDRO VALLE VEGA

VOCAL: M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SECRETARIO: M. EN C. LUCÍA CORNEJO BARRERA

1ER. SUPLENTE: M. EN C. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

2° SUPLENTE: DRA. LILIANA ROCÍO GONZÁLEZ OSNAYA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ANEXO DEL LABORATORIO 4C Y 4B DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO A DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. BERNARDO LUCAS FLORENTINO

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. JESÚS ANTONIO BEAZ RIVERA

SUSTENTANTE :

MÓNICA ISABEL MORALES CORTÉS

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	3
4. Antecedentes	
4.1 Leguminosas	4
4.2 Colorín (<i>Erythrina americana</i>)	6
4.3 Lípidos	9
4.4 Producción de grasas y aceites	14
4.5 Perfil de ácidos grasos	16
4.6 Ensayo biológico	17
5. Metodología	
5.1 Diagrama de flujo	19
5.2 Recolección del material biológico	20
5.3 Limpieza y selección de las semillas	20
5.4 Fraccionamiento	20
5.5 Extracción de la grasa	20
5.6 Refinación de la grasa	21
5.7 Factores físicos y químicos	24
5.8 Determinación cuantitativa de alcaloides	31
5.9 Perfil de ácidos grasos	34
5.10 Ensayo biológico	37
5.11 Determinación de energía digerible	40
6. Resultados y discusión	
6.1 Extracción del aceite	43
6.2 Proceso de refinado	44
6.3 Parámetros fisicoquímicos	46
6.4 Determinación de alcaloides	46
6.5 Perfil de ácidos grasos	47
6.6 Ensayo biológico y energía digerible	50
7. Conclusiones	53
8. Bibliografía	54

1. RESUMEN

En México existe una flora de gran diversidad, de la cual cabe resaltar especies subutilizadas como la *Erythrina americana*, mejor conocida como colorín, perteneciente a la familia *Leguminosae*, de especial relevancia por su alto contenido en proteína (aprox. 30%), grasa (aprox. 15%) y alcaloides. Para conocer las características fisicoquímicas y evaluar el posible uso en la alimentación animal de la grasa cruda y el aceite refinado de la semilla de colorín (*Erythrina americana*), que se ve impedido por el alto contenido de alcaloides (considerados factores tóxicos), se realizó en primer lugar el desengrasado de la semilla, con un rendimiento del 12%. La grasa fue refinada para obtener el aceite, así como para eliminar los alcaloides (destoxificación). Se realizaron las siguientes determinaciones tanto a la grasa cruda como al aceite refinado: densidad, índice de refracción, punto de fusión, índice de saponificación, índice de yodo, índice de acides, perfil de ácidos grasos, determinación cuantitativa de alcaloides, evaluación biológica (Relación de Eficiencia Proteínica), y Energía Digerible *in vivo*.

Los resultados obtenidos indican que tanto la grasa cruda como el aceite refinado son ricos en ácidos grasos como el oleico y linoleico, esenciales en la alimentación. Además de comprobar que el proceso de refinación no afecta la composición del aceite, aumenta la digestibilidad del mismo y reduce la cantidad de alcaloides, haciendo del aceite refinado de colorín un producto no tóxico y apto para el consumo alimenticio.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la situación alimenticia se ha deteriorado debido al rápido crecimiento demográfico en comparación con la baja producción de alimentos. Nuestro país no ha sido autosuficiente en la producción de semillas de oleaginosas, situación que lo lleva a la importación. Para remediar esta situación, es necesario investigar otras posibles fuentes de aceites comestibles.

Dentro de la gran diversidad de la flora mexicana, existen especies cuyo potencial es alto; por ejemplo, la familia botánica **Leguminosae o Fabaceae**, se caracteriza por tener frutos en forma de vaina, dentro de las cuales hay semillas que pueden ser comestibles. Sin embargo, estos recursos están subutilizados, en algunas ocasiones justificado por la presencia de sustancias dañinas que se presentan en forma natural, como es el caso del colorín (***Erythrina americana***), especie de gran adaptabilidad, tanto al suelo como a las condiciones climáticas adversas.

La semilla de colorín (***Erythrina americana***) es una especie cuyo interés se debe a su alto contenido de proteína (aprox. 30%) y grasa (aprox. 15%), pero tiene la presencia de alcaloides (eritroidinas), que si bien son factores tóxicos, según algunas investigaciones tienen propiedades curarizantes y en dosis terapéuticas pueden funcionar como sedantes.

Las semillas de colorín han sido objeto de numerosos estudios para el aprovechamiento de la proteína y los alcaloides; sin embargo, en el caso de la grasa hay pocas investigaciones y generalmente es un material de desecho en el proceso de la obtención de la proteína.

Este proyecto tuvo como objetivos extraer la grasa cruda, llevar a cabo el proceso de refinado para obtener aceite refinado y realizar la caracterización fisicoquímica, determinar el contenido de ácidos grasos y hacer un seguimiento en el contenido de alcaloides, tanto de la grasa cruda como del aceite refinado de la semilla de colorín (***Erythrina americana***), así como evaluar su potencial alimenticio con un ensayo biológico.

3. OBJETIVOS

I. Objetivo general

Conocer la composición química del aceite refinado y la grasa cruda del colorín (*Erythrina americana*), así como la presencia de factores tóxicos, con la finalidad de evaluar su potencial alimenticio.

II. Objetivos particulares

- Obtener el aceite refinado de la semilla de colorín.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos más comunes en la grasa cruda y el aceite refinado obtenido de la semilla de colorín.
- Determinar el perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y del aceite refinado.
- Cuantificar la cantidad de alcaloides antes y después del proceso de refinado.
- Evaluar a través de un ensayo biológico, el potencial alimenticio de la grasa y aceite de colorín.

4. ANTECEDENTES

- **4.1 LEGUMINOSAS** ^(6,8,27)

Se les llama comúnmente “Leguminosas” (del latín **Legumen**, que significa vaina) a las plantas de la familia botánica del orden de las Fabales denominada **Leguminosae** o **Fabaceae** y que comprende cerca de 17 mil especies y más de 650 géneros.

Es fácil reconocer a las fabáceas, desde el punto de vista botánico, por sus flores zigomorfas y su fruto, que es una vaina, nacido de un solo carpelo.

Los principales representantes de esta familia son: alfalfa, soya, cacahuate tamarindo, chícharos, lentejas, habas, frijol, ejotes, entre otros.

- **4.1.1 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS** ⁽⁶⁾

La importancia económica de las legumbres es considerable, ya que están incluidas en diferentes rubros como la agricultura, la ganadería, la industria maderera, la industria alimentaria y la jardinería.

Muchas leguminosas son excelentes forrajes que se utilizan en la ganadería como alimento animal; se utilizan también como fuente de aceites, lecitina (soya), gomas o hidrocoloides, maderas preciosas y maderas duras; los paisajistas y jardineros aprecian la diversidad de portes, follajes y flores, que aportan al entorno color y formas nuevas.

- **4.1.2 ASPECTOS NUTRIMENTALES** ^(26,27,12)

El ser humano consume como alimento distintas partes de las leguminosas: las flores, las semillas (frijol, lentejas, habas), las vainas verdes (ejotes), los germinados (soya, alfalfa), las hojas (alfalfa), etc.

Las semillas son relevantes, ya que tienen un alto porcentaje de proteína y son fuentes importantes de minerales como hierro, fósforo y calcio, además de vitaminas como la niacina y la tiamina. En el caso de la soya y el cacahuate, son

fuentes importantes de ácidos grasos. Estas semillas forman parte fundamental de la alimentación de muchas regiones, entre las que se encuentra México, con un amplio consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), en sus diferentes variedades.

Sin embargo, existen limitantes: el bajo contenido de aminoácidos azufrados como la cistina y la metionina, y factores tóxicos como lectinas, saponinas, inhibidores de tripsina, alcaloides, que disminuyen la posibilidad de uso alimenticio.

- 4. 1.3 FACTORES TÓXICOS ^(6,26,27)

Las leguminosas, como la mayoría de las plantas, tienen en su composición sustancias generadas a través de metabolismo secundario, que sirven como defensa hacia microorganismos, insectos y otros depredadores naturales. Estos compuestos tienen efectos negativos en el organismo del consumidor y son considerados factores tóxicos.

Dentro de la toxicología se pueden distinguir dos tipos de agentes que representan un peligro para el consumidor:

Factor antinutricional: son sustancias presentes en el alimento que interfieren con la digestión y absorción de ciertos nutrientes, y que puede ser compensado o atenuado con un aporte complementario de nutrimento afectado. Ejemplos de estos factores en las leguminosas son los inhibidores de tripsina.

Factor tóxico: aquellas sustancias que están presentes en el alimento y que producen patologías, anormalidades fisiológicas y/o anatómicas, y que no puede ser disminuida con una fortificación o suplementación alimenticia. Entre estos factores encontramos a los alcaloides.

- **4.2 COLORÍN (*Erythrina americana*)** ^(8,23,24)

El género *Erythrina*, perteneciente a la familia botánica *Leguminosae*, comprende alrededor de 115 especies, está ampliamente distribuido en México y cuenta con aproximadamente 27 especies localizadas en el centro y sur del país.

Entre estas especies se encuentra *Erythrina americana*, árbol nativo del continente americano y apreciado como planta ornamental. Es también conocido como colorín, pito, patol, chac molché, pureque, colorina, chocolín, madre chontal y tzon-pantli. Se localiza en los estados de Querétaro, Estado de México, Puebla, Distrito Federal, Morelos, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán.

- **4.2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA** ^(8,23,27)

Erythrina americana es un árbol de clima tropical y subtropical, caducifolio, que mide de 7- 10 metros de altura. Tiene hojas trifoliadas de forma triangular ovaladas; las flores son de color rojo brillante, en racimos cónicos con los pétalos enrollados y aparecen en el extremo de la rama, cuando el árbol ha perdido sus hojas. El fruto es una vaina, mide entre 10 y 20 cm de largo y aproximadamente 2 cm de ancho. Dentro de las vainas se encuentran las semillas, de aproximadamente 1 cm de longitud, con superficie lisa y de color rojo, venenosas debido al contenido de alcaloides. El tronco y tallos son de madera suave y ligera. La corteza, al igual que las semillas, es venenosa.



Figura 1. Flores de *Erythrina americana*.



Figura 2. Hojas de *Erythrina americana*.



Figura 3. Vainas con semillas de *Erythrina americana*.

- 4.2.2 PRINCIPALES PRODUCTOS Y UTILIZACIÓN ^(8,23,24)

El árbol es utilizado como planta de sombra y ornato, para jardines, parques y calles, ya que es muy atractivo debido al color rojo de sus flores. También es usado para dar sombra en plantaciones de cacao y café.

La madera tiene poco valor y su uso se limita a la manufactura de tapones para botellas, esculturas y tablas pequeñas.

Las flores se consumen en algunas regiones y ya sean fritas o hervidas, son muy apreciadas como complemento alimenticio. En México es común guisarlas capeadas con huevo y servir acompañadas de frijoles. Para evitar un sabor amargo, sólo se consumen los pétalos, la parte roja de la flor.

Las semillas son sumamente venenosas, El extracto de éstas tiene propiedades semejantes al curare. Se utilizan para hacer adornos y bisutería como collares, pulseras.

La corteza se utiliza como veneno para animales nocivos, como estupefaciente para peces y en pequeñas cantidades en medicina casera como agente hipnótico.



Figura 4. Semillas de *Erythrina americana* en un collar.

- 4.2.5 ALCALOIDES DE *Erythrina americana* ^(6,28,30)

En las semillas se han encontrado principalmente inhibidores de tripsina y alcaloides, siendo estos últimos los más relevantes.

En estudios realizados en las semillas, se ha observado que contienen gran cantidad de alcaloides, especialmente erisodina, erisovina, erisopina, α -eritroidina y β -eritroidina. También se tiene la referencia de que los más abundantes son las eritroidinas.

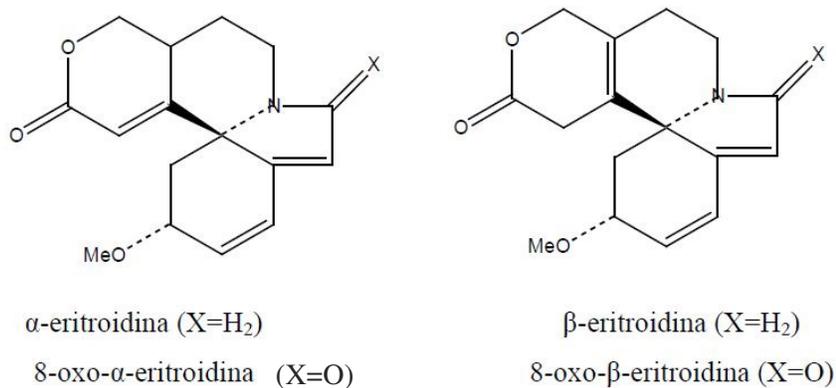


Figura 5. Estructura de las moléculas de eritroidina.

Los alcaloides son sustancias nitrogenadas alcalinas (de ahí su nombre, “álcali”), heterocíclicas, con estructura molecular compleja, de origen vegetal y que generalmente presentan propiedades farmacológicas como analgésicos y anestésicos. Proceden del metabolismo de los aminoácidos. Las moléculas que corresponden a estos criterios se les llaman Alcaloides Verdaderos. Aquellas que cumplen parcialmente se les consideran pseudo-alcaloides o protoalcaloides y generalmente no tienen el átomo de nitrógeno incluido en el anillo del heterociclo, como la efedrina y la colchicina.

Son sólidos cristalinos, se encuentran como sales de ácidos orgánicos, son activos ópticamente. Sus sales son solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos y en su forma básica, son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Fácilmente se detecta su presencia por los precipitados que dan al reaccionar con los siguientes reactivos: tetrayodo mercuriato de potasio, triyoduro, yodoplatinatos, tetrayodo bismutito de potasio, etc.

- **4.3 LÍPIDOS** ^(3,22,31)

Los lípidos son un grupo de compuestos constituidos generalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque en ocasiones también contienen fósforo y nitrógeno. Se caracterizan por ser en su mayoría, solubles en disolventes orgánicos y poco o nada solubles en agua. Desempeñan múltiples funciones en el organismo, son la fuente energética más importante (cada gramo produce 9 kcal), son parte estructural de membranas celulares y de los sistemas de transporte de nutrientes; algunos son vitaminas, hormonas, pigmentos, otros ayudan al crecimiento y a mantener saludable el organismo; forman el tejido adiposo que sirve de reserva energética, además de ayudar a mantener estable la temperatura del organismo.

Pueden dividirse en:

- Lípidos simples: Ésteres de ácidos grasos y alcoholes. Grasas, aceites y ceras.

- Lípidos compuestos: Lípidos simples conjugados a moléculas no lipídicas. Fosfolípidos, Glucolípidos, Lipoproteínas.
 - Compuestos asociados: Ácidos grasos, pigmentos, vitaminas liposolubles, esteroides e hidrocarburos.
- 4.3.1 GRASAS Y ACEITES^(3,22)

Las grasas y los aceites son considerados lípidos simples, están constituidos por triacilgliceroles (triglicéridos), triésteres del glicerol con tres ácidos carboxílicos de cadena larga. Se encuentran en los alimentos, principalmente en tejidos animales y semillas oleaginosas; en frutas y verduras se presentan en bajas concentraciones. Contribuyen a las propiedades sensoriales de los alimentos, principalmente a la textura, como la cremosidad de la mantequilla, el derretido del chocolate y la textura crujiente de las papas fritas. Son de vital importancia en la dieta, ya que nos proporcionan ácidos grasos importantes para el desarrollo y mantenimiento del organismo.

- 4.3.2 ÁCIDOS GRASOS^(3,5)

Los ácidos grasos son moléculas que contienen un grupo funcional carboxilo (-COOH) unido a una cadena alifática lineal de número par de carbonos. Esta estructura les proporciona un carácter anfipático, donde el extremo carboxílico tiene características polares y iónicas, y el otro extremo (-CH₃) tiene características apolares. El número de carbonos en los ácidos grasos puede ir desde 4 (como el ácido butírico) hasta 36 (como los que se encuentran en el cerebro), aunque los que se encuentran más comúnmente en la naturaleza contienen entre 12 y 24 átomos de carbono. Generalmente se encuentran esterificados formando los triacilgliceroles; la hidrólisis de una grasa o un aceite, produce glicerol y tres ácidos grasos.

Se pueden dividir en dos grandes grupos, dependiendo de si la cadena alifática está formada por enlaces sencillos o si contiene enlaces dobles.

- 4.3.3 ÁCIDOS GRASOS SATURADOS^(3, 5,22)

Los ácidos grasos saturados son aquellos que tienen la cadena de carbonos, saturada de hidrógenos, sin ningún doble enlace, únicamente enlaces simples.

Este grupo está constituido principalmente con ácidos de 4 a 24 átomos de carbono. El punto de fusión es proporcional al peso molecular, mientras que la solubilidad en agua es inversamente proporcional al mismo. Una gran parte de estos ácidos grasos se presentan en forma de sólidos (por su alto punto de fusión) y son más comunes en las grasas de origen animal.

Los ejemplos más comunes son el ácido palmítico (que se encuentra en los lípidos de la palma), el ácido butírico (presente únicamente en la leche), el ácido láurico y el ácido esteárico.



Figura 6. Estructura del ácido esteárico.

- 4.3.4 ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS^(3,5,22)

Estos ácidos grasos contienen una o más insaturaciones o dobles enlaces carbono-carbono (C=C) a lo largo de la cadena alifática. Son muy abundantes en los aceites vegetales y marinos.

Como consecuencia de su estructura, el punto de fusión es más bajo que el de los ácidos grasos saturados. Debido a la presencia de dobles enlaces, estos compuestos tienen una gran reactividad química, y son propensos a transformaciones oxidativas y de isomerización.

Aquellos que contienen sólo una insaturación se les llama monoinsaturados, como el ácido oleico y el palmitoleico. Los que contienen dos o más insaturaciones se les llama poliinsaturados, como el ácido linoleico, linolénico y araquidónico.

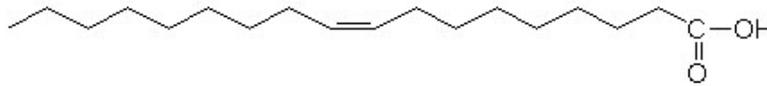


Figura 7. Estructura del ácido oleico.

- 4.3.5 ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES^(5,31)

Algunos ácidos grasos son considerados esenciales o indispensables. Se les llama de esta manera porque el organismo del ser humano no es capaz de sintetizarlos por sí mismo, y requiere de un consumo continuo ya que es indispensable para el funcionamiento y crecimiento normal de los tejidos. Dentro de estos ácidos se encuentran el ácido linolénico y ácido linoleico, que es precursor del ácido araquidónico, importante en la formación de membranas celulares. Además, los ácidos grasos esenciales son importantes para el crecimiento, y el mantenimiento de la piel, del pelo y del sistema reproductivo, así como la regulación del metabolismo del colesterol.

- 4.3.6 FACTORES FÍSICOQUÍMICOS^(20,21,31)

Entre los análisis que se realizan a los alimentos, existe una gran variedad para evaluar a las grasas. Los resultados de estos análisis proporcionan información importante acerca de la calidad, su composición, el origen e incluso el uso que puede dársele a la grasa en cuestión.

Índice de acidez: es la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) necesario para saponificar los ácidos grasos libres presentes en 1 gramo de grasa. Se expresa generalmente como porcentaje de ácidos grasos calculados en términos de ácido oleico.

Este índice es indicador de los ácidos grasos libres, los cuales se han desprendido de los acilglicérols por acción enzimática u oxidativa. Es también indicador de la rancidez del aceite, la cual va muy unida a la presencia relativamente alta de ácidos grasos libres, así como de su calidad y estabilidad.

Índice de saponificación: es el peso en miligramos de KOH que se requiere para saponificar completamente 1 gramo de grasa. Este índice es inversamente proporcional al peso molecular de los ácidos grasos, por lo tanto, los ácidos grasos de bajo peso molecular tienen un alto índice de saponificación. La alteración o cambio de este índice puede ser indicativo de adulteración de una grasa en particular.

Índice de yodo: es el número de gramos de yodo que son absorbidos por 100 gramos de lípidos, y es una medida del promedio de insaturaciones que contienen las grasas. Así, los aceites se pueden clasificar en aceites secantes (se secan formando una película firme), aceites semisecantes (forman películas pero con gran lentitud) y aceites no secantes (no secan ni forman películas). Al igual que el índice de saponificación, la alteración en los valores de este índice puede ser indicativo de adulteración de una grasa.

Índice de refracción: es la relación que existe entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso, de una longitud de onda determinada, que pasa del aire a la sustancia en examen. Cuando un haz de luz que se propaga por un medio e ingresa a otro distinto, una parte del haz se refleja mientras que la otra sufre una refracción, que consiste en el cambio de dirección del haz. En las grasas se utiliza para identificar una muestra y como prueba de pureza de la misma, ya que cada grasa o ácido graso tiene un índice de refracción único. Existe una relación entre los ácidos grasos y el índice de refracción: el aumento en el índice es proporcional al aumento de la cadena alifática de los ácidos grasos; también es proporcional al número de dobles enlaces en la molécula.

Densidad o peso específico: es la relación de la masa de una sustancia con el volumen ocupado por esa masa, se expresa en g/mL o g/cm³. Debido a que el volumen de un líquido varía con respecto a la temperatura, es importante especificar la temperatura a la cual se hace esta determinación. En grasas y aceites se utiliza la “densidad relativa”, que se refiere a la densidad del aceite pero relativa a la densidad del agua en las mismas condiciones de temperatura (para

una grasa o aceite, la densidad siempre es menor que la del agua pura (1.0000 g/mL). La densidad está también relacionada con el grado de insaturación de los aceites.

Punto de fusión: se refiere a la temperatura o rango de temperatura en la que la sustancia cambia de un estado sólido a un estado líquido. Los ácidos grasos, así como algunas grasas y aceites comunes, tienen valores de punto de fusión bien definidos. Es un factor importante en la elaboración de alimentos, y es un indicativo de la identidad del compuesto, El punto de fusión disminuye en base al aumento de insaturaciones de los ácidos grasos, y aumenta entre mayor sea la longitud de la cadena hidrocarbonada de los mismos.

- **4.4 PRODUCCIÓN DE GRASAS Y ACEITES** ^(3,9,20,25)

De manera comercial, existen diferentes maneras de obtener las grasas y aceites a partir de muchas materias primas: las grasas animales se obtienen del tejido adiposo por procesos térmicos de los animales sacrificados; los aceites vegetales se producen a partir de las semillas de algunas plantas, por medio de prensas o por extracción con disolventes. Estas grasas y aceites son llamados “crudos” y contienen gran cantidad de impurezas y compuestos distintos a los lípidos como gomas, fosfátidos, proteínas, ácidos grasos libres, etc. Para eliminar estas sustancias y mejorar aspectos como color, turbidez, olor, sabor, y otras características de importancia en un alimento, se realiza la refinación de la grasa cruda. Después de este proceso, el aceite es llamado “refinado” y tiene características y composición diferentes que el aceite “crudo”.

- **4.4.1 EXTRACCIÓN DE LA GRASA** ⁽²⁰⁾

En el caso de las semillas, la grasa puede obtenerse de maneras distintas. En cualquier caso, la semilla se limpia, se descascarilla y se tritura. Posteriormente se puede hacer el desengrasado por medios mecánicos, como es el prensado, o por medios químicos, como la extracción con disolventes.

Para la extracción con disolventes, se calienta la muestra con disolvente, y se extrae de forma continua. A la mezcla de aceite con disolvente se le llama “miscela”, es sometida a una destilación con temperaturas inferiores a las 110° C para separar el aceite crudo del disolvente.

En la industria alimenticia se usa el hexano como medio de extracción, ya que es un disolvente de características bien definidas: de baja explosividad, de menor toxicidad y puede ser fácilmente separado por destilación a temperatura de 60°C, eliminándose casi por completo los residuos de disolvente.

- 4.4.2 REFINACIÓN DE ACEITES ^(3,18,25)

La refinación de los aceites comprende todos aquellos procesos en los que se eliminan compuestos diferentes a los triacilglicerolos que componen un aceite, y que proporcionan características poco deseables para un producto final comercial. Se pueden reconocer tres etapas básicas: desgomado, neutralización y blanqueo.

- **Desgomado** ^(3,18, 20)

El primer paso para la refinación es el desgomado. Consiste en la extracción de fosfátidos, sustancias mucilaginosas y otros compuestos hidrosolubles por medio de un lavado con agua y algún ácido, como el fosfórico, para ayudar a una mejor hidratación y solubilidad de los compuestos. Posteriormente, se separa la mezcla por centrifugación.

El desgomado es indispensable ya que las sustancias eliminadas en esta etapa provocan mayor susceptibilidad a la oxidación, problemas en el almacenamiento y formación de espumas durante el calentamiento.

En esta etapa se obtienen aceites con menor viscosidad, sin sólidos en la superficie y sin turbidez.

- **Neutralización** ^(11,18,20,31)

El aceite es tratado con un álcali para saponificar los ácidos grasos libres, aunque también se reducen los monoacilglicéridos y los restos de fosfátidos que pudieran quedar después del desgomado. De esta manera, se obtienen jabones solubles en agua que son fácilmente eliminados por centrifugación, y el jabón que haya quedado acumulado se elimina con 1 o 2 lavados de agua, eliminado también por centrifugación.

Cuando el aceite contiene muchos ácidos grasos libres, se forma una pasta difícil de separar, por lo que se pueden emplear otros métodos como un sistema de destilación por arrastre de vapor con vacío y altas temperaturas (250 °C).

El índice de acidez de un aceite refinado generalmente debe ser menor al 0.5% en términos de ácido oleico.

- **Blanqueo** ^(1,18,20, 25, 31)

El blanqueo consiste en eliminar los compuestos que imparten color al aceite utilizando diversos agentes adsorbentes como carbón activado y tierras blanqueantes como pueden ser los derivados de la bentonita $Al_4Si_8O_{20}(OH)_4 \cdot n(H_2O)$, para después retirar estos elementos por filtración.

El carbón activado a pesar de ser el agente decolorante más efectivo para los aceites, presenta ciertos inconvenientes, retiene gran cantidad de aceite y es difícil de eliminar por completo. Los principales pigmentos que se eliminan en esta etapa son las xantofilas, los carotenoides y las clorofilas.

- **4.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS** ^(1,4,20,30)

Para conocer la composición de ácidos grasos de un aceite, se realiza un análisis de la muestra con cromatografía que, además, nos ratifique o confirme los resultados de los parámetros fisicoquímicos del aceite refinado o grasa cruda en cuestión. El método se basa en la separación y determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por el método de cromatografía gaseosa. Es

aplicable para grasas y aceites vegetales y animales, que contengan ácidos grasos de 12 a 24 átomos de carbono.

En la cromatografía de gases existen dos fases, una móvil y una estacionaria. En este caso, la fase móvil es el gas acarreador, el cual sirve para llevar la muestra a lo largo de la columna, donde se encuentra la fase estacionaria. Los componentes de la muestra se separan de la fase móvil y quedan retenidos en la fase estacionaria en diferentes tiempos, según la afinidad del compuesto. Al salir de la columna, cada compuesto genera una señal en el detector. La señal que se produce es procesada y se genera un gráfico de separación de las sustancias. Este gráfico se compara con los gráficos obtenidos a partir de estándares comerciales, para identificar cada sustancia separada según el tiempo de retención.

El tipo de columna utilizada dependerá del equipo cromatográfico utilizado. Los detectores más comunes son de ionización de flama y de conductividad térmica. El gas acarreador es un gas inerte, los más usados son el helio, el nitrógeno y el argón. Las temperaturas utilizadas pueden ser mayores a 210°C, sobre todo si se trata de ácidos grasos de cadena larga (más de 20 carbonos).

- **4.6 ENSAYO BIOLÓGICO** (7, 17, 19,26)

Un ensayo biológico consiste en evaluar uno o varios efectos de un agente físico o químico sobre un organismo vivo, bajo condiciones establecidas y controladas. Los efectos se observan en reacciones del organismo tales como crecimiento, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos, muerte, proliferación, etc. Estas reacciones son influidas también por el tipo de organismo utilizado y las condiciones del sistema en el que se desarrolla el experimento.

Elegir un organismo de prueba adecuado para un bioensayo dependerá del efecto que se desea evaluar y de las características del organismo. Es importante asegurar que la respuesta de una población expuesta a cierto agente se deba al efecto de éste y no a las variaciones de la sensibilidad de los organismos o a las fallas operacionales en el desarrollo del método. Por lo general, se utilizan

organismos criados en laboratorios que cumplen con características estandarizadas y conocidas que reduzcan las variaciones intrínsecas debidas a la variabilidad intraespecie.

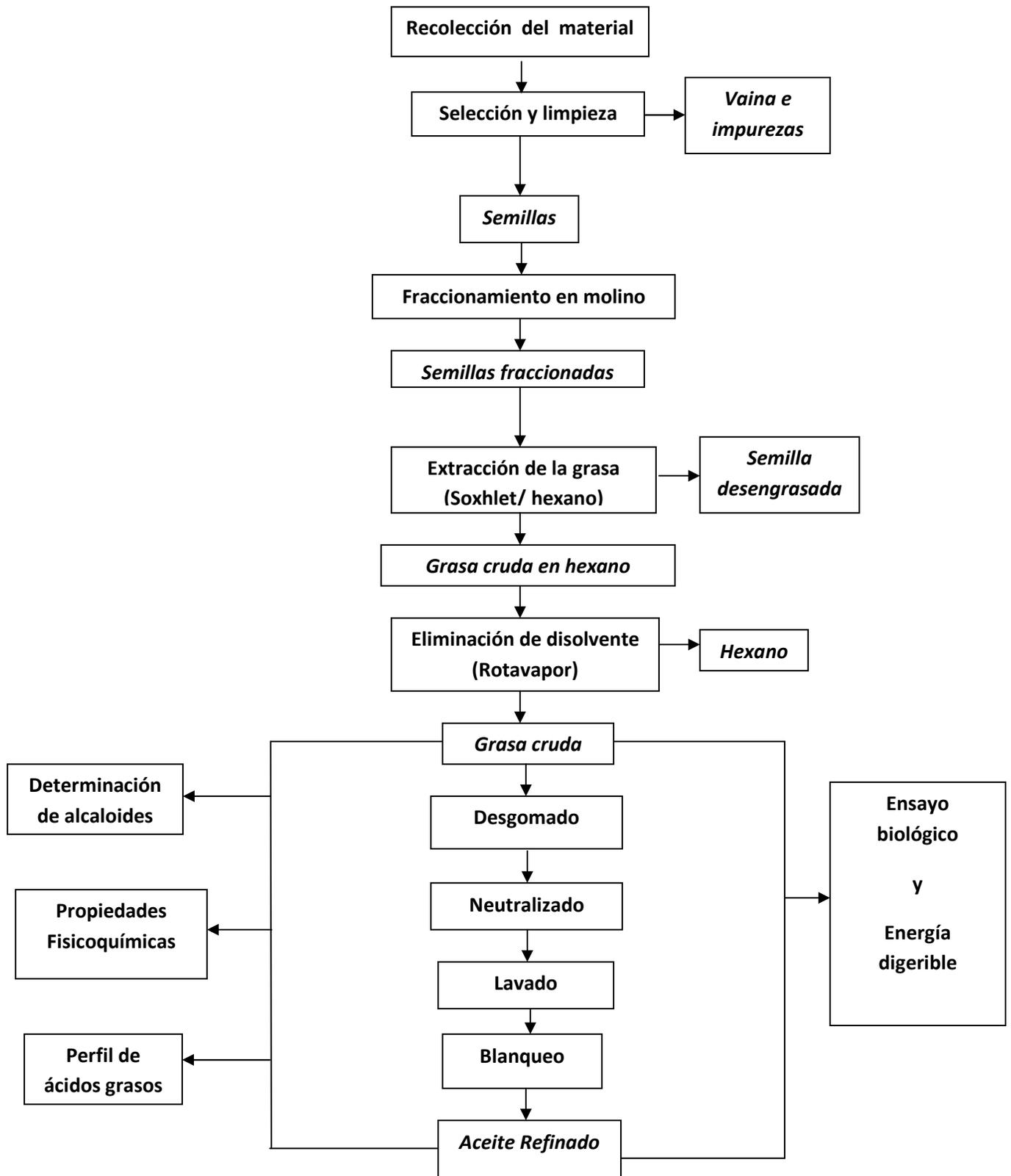
Para la elaboración de un bioensayo se deben tomar en cuenta los principios básicos del diseño de experimentos. Esto implica un número razonable de repeticiones, aleatorización, y un control para lograr una estimación válida.

Los bioensayos son una importante herramienta para la evaluación de la calidad y toxicidad de un alimento porque los resultados pueden ser indicativos y trasladables para otras poblaciones similares de seres vivos.

Entre los ensayos biológicos más usados en el campo alimentario se encuentra la Relación de Eficiencia Proteica (REP), que mide la relación entre el peso corporal y la cantidad de proteína ingerida. Los valores obtenidos generalmente se ajustan, tomando en cuenta el valor experimental de la caseína, y el valor de la proteína estándar, en este caso es de 2.5. Este experimento se realiza con ratas Wistar o Sprague Dawley, recién destetadas, cuyo peso tenga una diferencia no mayor a 10 g entre cada rata. Se les suministra una dieta con el 10 % de proteína, por un lapso de 28 días, teniendo como referente una dieta con 10% caseína. Para el análisis estadístico de los resultados se hace un análisis de varianza (ANOVA).

5. METODOLOGÍA

5.1 DIAGRAMA DE FLUJO



- **5.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

El material fue recolectado de los árboles de *Erythrina americana* ubicados en la Facultad de Ingeniería y la Facultad de Química en el campus de Ciudad Universitaria, y algunas localidades del sur de la Ciudad de México.

- **5.3 LIMPIEZA Y SELECCIÓN DE LAS SEMILLAS**

La limpieza se llevó a cabo de manera manual, retirando las semillas de las vainas y cualquier otra impureza como ramas, hojas, insectos, semillas dañadas, entre otros. Es importante que la semilla se encontrara libre de gorgojos.

Se eligieron sólo las semillas que tuvieran un color rojo-anaranjado brillante, con superficie lisa. Se descartó cualquier semilla que tuviera coloración café o negra, que estuviera quebrada y/o con agujeros en la superficie.

- **5.4 FRACCIONAMIENTO**

Se utilizó un molino Thomas-Wiley modelo 4, con una malla de 4 mm para obtener la semilla fraccionada.

- **5.5 EXTRACCIÓN DE LA GRASA**

Debido a que un solo equipo resultaba insuficiente para la cantidad de semilla a desengrasar, se requirieron tres equipos a condiciones distintas para la extracción de la grasa.

- ✓ Dispositivo tipo Soxhlet. Lab. 111 Departamento de Farmacia. Edificio E. Facultad de Química. UNAM.
 - Capacidad: 1.3 kg
 - Extracción exhaustiva
 - Temperatura 31°C
 - Disolvente: Hexano Q.P.

- ✓ Equipo Soxhlet. Lab. 323 Departamento de Alimentos y Biotecnología. Edificio E. Facultad de Química. UNAM.
 - Capacidad: 10 L
 - Extracción exhaustiva
 - Temperatura 41- 52°C
 - Disolvente: Hexano Q.P.

- ✓ Equipo de extracción sólido-líquido. Laboratorio de Ingeniería Química. Facultad de Química. UNAM.
 - Capacidad: 2.5 kg
 - Extracción tipo Soxhlet, exhaustiva.
 - Temperatura 65°C
 - Disolvente: Hexano Q.P.

Toda la grasa obtenida en las extracciones se mezcló de forma homogénea. El disolvente se recuperó con un rotavapor a 60°C y posteriormente la grasa se colocó en charolas para eliminar en su totalidad las trazas de disolvente.

A la grasa se le insufló nitrógeno para eliminar la mayor cantidad de aire y evitar la presencia de oxígeno que pudiese provocar reacciones de oxidación en los lípidos; además se almacenó a temperatura de congelación (-15°C) para evitar degradación.

• 5.6 REFINACIÓN DE LA GRASA

Fundamento. ^(3,20, 31)

Este proceso se lleva a cabo en grasas y aceites crudos para eliminar sustancias indeseables tales como ácidos grasos libres, gomas, pigmentos, proteínas y productos de degradación. Además mejora las características sensoriales para obtener un aceite agradable a los consumidores. La refinación de la grasa se llevó a cabo en tres etapas: desgomado, neutralización y blanqueo.

○ 5.6.1 DESGOMADO

Fundamento. ^(25,31)

Los aceites crudos tienen en su composición fosfátidos, proteínas, sustancias mucilaginosas y gomas. Estos compuestos se encuentran en el aceite en su forma anhidra, en su forma hidratada son insolubles y precipitan. Utilizando ácido cítrico o fosfórico se obtienen mejores resultados en el desgomado.

Material y reactivos.

- ✓ Vaso de precipitados de 1000 mL
- ✓ Agitador magnético de 2 pulgadas
- ✓ Termómetro de mercurio
- ✓ Probeta graduada de 25 mL.
- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5702
- ✓ Solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 0.1%

Procedimiento.

Se calentó el aceite crudo con agitación suave, se añadió 3 % de H_3PO_4 0.1% con respecto al volumen de aceite a refinar. Se elevó la temperatura de la mezcla a 69°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 4000 revoluciones por minuto (r.p.m.) por 15 minutos a temperatura ambiente. Se separó por decantación el aceite del precipitado formado.

○ 5.6.2 NEUTRALIZACIÓN

Fundamento. ^(11,31)

El aceite es tratado con un álcali para saponificar los ácidos grasos libres. De esta manera, se obtienen jabones solubles en agua que son fácilmente eliminados por centrifugación, y el jabón que haya quedado acumulado se elimina con 1 o 2 lavados de agua caliente.

Material y reactivos.

- ✓ Vaso de precipitados de 1000 mL
- ✓ Agitador magnético de 2 pulgadas
- ✓ Termómetro de mercurio
- ✓ Probeta de 500 mL
- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5702 (Neutralización)
- ✓ Centrífuga Soruall RC-5B (Lavado)
- ✓ Solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1N
- ✓ Agua destilada

Procedimiento.

Previamente se tomó una muestra del aceite desgomado y se determinó la cantidad de sosa 0.1N necesaria para neutralizar 1 mL de aceite desgomado. A partir del resultado obtenido y con respecto al volumen de aceite desgomado, se añadió el volumen necesario de la solución de NaOH 0.1N más un exceso de 10% de la misma, para la neutralización del aceite. Se calentó con agitación mínima en una parrilla a 52°C por 5 minutos. Durante este paso se puede formar una emulsión, sin embargo, un simple cambio de temperatura favorece la ruptura de la misma. Posteriormente se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el aceite por decantación.

Para el lavado se agregó 10% de agua destilada caliente (80°C) con respecto al volumen de aceite y se calentó a 83°C por 5 minutos en una parrilla con agitación moderada. Después se centrifugó en una a 8000 r.p.m. a 20 minutos a 20°C. Se recuperó el aceite por decantación, con sumo cuidado para evitar cualquier residuo de agua jabonosa.

○ 5.6.3 BLANQUEO

Fundamento. ^(3,25,31)

El blanqueo consiste en eliminar las sustancias que imparten color al aceite como es el caso de clorofilas y antocianinas, utilizando diversos agentes adsorbentes

como es el caso del carbón activado, arcillas derivadas de bentonita o tierras blanqueantes.

Material y reactivos.

- ✓ Vaso de precipitados de 1000 mL
- ✓ Agitador magnético de 2 pulgadas
- ✓ Termómetro de mercurio
- ✓ Parrilla de calentamiento y agitación múltiple
- ✓ Matraz Kitasato de 1000 mL
- ✓ Embudo Büchner
- ✓ Papel filtro Whatman #52
- ✓ Carbón activado granulado

Procedimiento.

Se agregó 2.5 % de carbón activado granulado con respecto al volumen de aceite neutralizado. Se calentó a 90°C por 5 minutos en una parrilla con agitación. Aún caliente, se filtró dos veces con doble papel filtro Watman #52 y vacío.

• **5.7 FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS**

○ 5.7.1 DENSIDAD

Fundamento. ⁽¹⁶⁾

Determinación de la masa por unidad de volumen, bajo una temperatura dada. La densidad relativa es la densidad de una sustancia con respecto a la densidad del agua, bajo las mismas condiciones.

Material y reactivos.

- ✓ Picnómetro de 10 mL
- ✓ Termómetro de mercurio
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Baño de temperatura controlada GRANT Mod. SE-10

- ✓ Estufa de vacío
- ✓ Mezcla crómica
- ✓ Etanol
- ✓ Agua destilada

Mezcla crómica: Se pesó en la balanza analítica 6.0 g de dicromato de potasio. Se pulverizó en un mortero y se pasó a un vaso de precipitados de vidrio. El mortero fue lavado con muy poca agua destilada para evitar pérdidas. El dicromato de potasio fue disuelto con agua destilada, la mínima necesaria. El vaso de precipitados con la solución se colocó en un baño de hielo, en la campana de extracción. Con suma precaución se añadieron 200 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando constantemente. Finalmente se enfrió por un lapso de 5-10 minutos en el hielo. La mezcla crómica se envasó en frasco ámbar de vidrio con tapa, fue etiquetado y colocado junto con los ácidos.

Procedimiento.

Para medir la densidad de agua, se lavó el picnómetro con la mezcla crómica. Después se lavó repetidamente con agua destilada. Se metió a la estufa de vacío a 75° durante 30 minutos para secarlo y al término se colocó en un desecador.

Se hirvió agua destilada y se enfrió a 20 °C. Se llenó el picnómetro y se introdujo en un baño maría a $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Después de este tiempo, se ajustó el nivel del capilar, se secó cuidadosamente con papel absorbente y se pesó en la balanza analítica.

El picnómetro se lavó varias veces con etanol, se secó y se pesó. La densidad del agua se calculó por diferencia.

Para el aceite se llevó a cabo el mismo procedimiento. La densidad relativa del aceite se calcula dividiendo la densidad del aceite entre la densidad del agua, obtenidas a la misma temperatura (25°C).

○ 5.7.2 PUNTO DE FUSIÓN

Fundamento. ⁽¹⁶⁾

Es la temperatura a la cual una grasa o aceite sólido, funde completamente, se convierte en líquido.

Material y reactivos.

- ✓ Capilares de vidrio con diámetro interno de 1mm
- ✓ Mechero Bunsen
- ✓ Lente de aumento
- ✓ Termómetro de mercurio graduado de -10°C a 100 °C
- ✓ Baño de hielo a -5°C
- ✓ Ultracongelador REVCO

Procedimiento.

Se llenó el capilar con la muestra de aceite, obteniendo una columna de 2 cm de longitud, sin burbujas. Se cerró el capilar con la flama de un mechero, sin quemar la muestra. El capilar sellado se guardó en el ultracongelador a -50°C por 30 minutos. Con cuidado se tomó el capilar y se colocó junto al bulbo del termómetro dentro del baño de hielo. Se observó con el lente de aumento el cambio de la muestra en el capilar. El punto de fusión del aceite correspondió al rango de temperatura en el que el aceite se volvió traslucido.

○ 5.7.3 ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Fundamento. ⁽¹⁸⁾

Está basado en la relación entre la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en la muestra grasa. Es muy útil con fines de identificación, comprobación de pureza y observación del progreso de reacciones como la hidrogenación catalítica.

Material y reactivos.

- ✓ Refractómetro de Abbé OPL No. 2154
- ✓ Lámpara de sodio
- ✓ Termómetro de mercurio graduado de -10 °C a 100 °C
- ✓ Bomba para agua
- ✓ Baño de agua
- ✓ Mangueras

Procedimiento.

Se conectó el baño de agua al refractómetro por medio del juego de mangueras y la bomba de agua. Se hizo circular el agua a temperatura de 20 °C a través del prisma del refractómetro. Se colocaron unas gotas de aceite en el prisma, se extendió la muestra con una varilla de vidrio y se dejó en reposo por unos minutos para que la muestra tomara la temperatura de 20 °C.

El refractómetro se colocó frente a la lámpara de sodio y se observó por el ocular. Se ajustó hasta ver el campo de visión dividido en una mitad luminosa y otra oscura. Se anotó la lectura en la escala del índice de refracción.

○ 5.7.4 ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

Fundamento. ^(20,25)

Los ácidos grasos son saponificados con una solución de KOH añadida en exceso, obteniéndose glicerol y las sales respectivas de los ácidos grasos. El KOH sin reaccionar es titulado con una solución de HCl y por diferencia con un blanco se determina la cantidad necesaria de potasa para saponificar la muestra.

Material y reactivos.

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Buretas graduadas de 50 mL.
- ✓ Condensador o tubo refrigerante
- ✓ Canastilla de calentamiento
- ✓ Soporte universal

- ✓ Anillo metálico
- ✓ Pinzas de tres dedos
- ✓ Fibra de vidrio
- ✓ Solución etanólica de hidróxido de potasio
- ✓ Ácido clorhídrico 0.5N
- ✓ Solución metanólica indicadora de fenolftaleína al 1% p/v

Solución etanólica de KOH: se pesaron 40 g de KOH granulado y 45 g de óxido de calcio en la balanza analítica. Se pulverizaron ambos compuestos en un mortero. Se transfirió la mezcla de manera cuantitativa con ayuda de porciones etanólicas a un matraz aforado de 1 litro. Se añadió etanol suficiente para aforar. Y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Esta operación se repitió a lo largo del día, se dejó reposar durante toda la noche. Al siguiente día se filtró la solución.

Solución metanólica indicadora de fenolftaleína al 1% p/v: Se pesó 1 g de fenolftaleína en la balanza analítica. Se disolvió en 20 mL de metanol. Se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL. Se llevó al aforo con metanol.

Procedimiento.

En la balanza analítica se pesaron 5.0 ± 0.01 gramos de muestra en un matraz de fondo plano. Se añadió con bureta 50 mL de la solución de KOH. Se colocó el matraz en reflujo a 70 °C por 60 minutos. Se dejó enfriar y se tituló con HCL 0.5 N usando fenolftaleína al 1% como indicador. Se hizo un blanco bajo las mismas condiciones.

Cálculos.

$$IS = \frac{28.5 \times (B-S)}{g \text{ de muestra}}$$

IS= Índice de saponificación

B = Volumen de HCL 0.5N gastados en el blanco

S= Volumen de HCL 0.5N gastados en la muestra

28.5= masa molecular de KOH x 0.5N

○ 5.7.5 INDICE DE ACIDEZ

Fundamento. ^(20,30)

El índice de acidez mide el contenido de ácidos grasos libres, dato indispensable para la neutralización, además de servir como prueba de pureza, y en ocasiones, como indicativo de reacciones de degradación que se hayan producido.

Material y reactivos.

- ✓ Matraces Erlenmeyer de 125 mL
- ✓ Bureta graduada de 50 mL
- ✓ Etanol
- ✓ Solución indicadora de fenolftaleína al 1%
- ✓ Hidróxido de potasio 0.1N

Procedimiento.

Se neutralizó etanol con KOH 0.1N, usando fenolftaleína como indicador. Se pesó con balanza analítica 1.0 ± 0.1 g de la muestra de aceite en el matraz Erlenmeyer y se le agregó etanol neutralizado. Se llevó a cabo la titulación con KOH 0.1 N agitando constantemente, hasta observar el vire de color amarillo a rojo cereza.

Cálculos.

$$\text{Índice de acidez} \left(\frac{\text{mgKOH}}{\text{g muestra}} \right) = \frac{\text{mL KOH} \times 0.1 \text{ N} \times 56.1 \text{g}}{\text{gramos de muestra}}$$

$$56.1 = \text{masa molecular del KOH}$$

○ 5.7.6 ÍNDICE DE YODO

Fundamento. ^(20,21, 30)

Dentro de los ácidos grasos existen aquellos que contienen dobles enlaces, también llamados insaturados. Estos dobles enlaces dan la posibilidad de unión a

una cierta cantidad de halógeno, en este caso monobromuro de yodo, también conocido como Reactivo de Hanus. Este reactivo se añade en exceso en la determinación, de tal manera que el halógeno que no reacciona al final es titulado con una solución de tiosulfato de sodio, para obtener por diferencia la cantidad de monobromuro de yodo adsorbido por la muestra de aceite.

Material y reactivos.

- ✓ Matraces para yodo con tapón de vidrio de 250 mL
- ✓ Buretas graduadas de vidrio de 50 mL
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Acido acético glacial
- ✓ Monobromuro de yodo (reactivo de Hanus)
- ✓ Tiosulfato de sodio 0.1 N
- ✓ Solucion de yoduro de potasio al 15% p/v
- ✓ Solucion de almidón al 1% p/v
- ✓ Cloroformo
- ✓ Ácido clorhídrico 1N
- ✓ Dicromato de potasio

Solución de tiosulfato de sodio 0.1N: Se disolvieron 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pentahidratado en un litro de agua destilada. Se llevó a ebullición moderada por 5 minutos y después se vació en un frasco de vidrio color ámbar previamente lavado con mezcla crómica y agua. Se guardó en la oscuridad en un lugar templado.

Para la valoración de la solución, se pesaron 0.20 ± 0.01 gramos de dicromato de potasio, previamente secado a 100°C por 2 horas en estufa. Se disolvió en 80 mL de agua destilada el dicromato de potasio junto con 2 g de yoduro de potasio. Se añadieron 20 mL de HCl 1N e inmediatamente se puso en total oscuridad durante 10 minutos. Se tituló con la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, usando como indicador la solución de almidón. Se calculó la normalidad exacta de la solución de tiosulfato de sodio.

Solución de Yoduro de potasio al 15% : Se pesaron 15 g de yoduro de potasio y se disolvieron en agua destilada. Se aforó a 100 mL.

Procedimiento.

Se pesaron 0.25 ± 0.1 g de aceite en un matraz para yodo con tapón de vidrio y se disolvió la muestra con 10 mL de cloroformo. Se añadieron con bureta 25 mL de reactivo de Hanus, se tapó e inmediatamente se colocó en oscuridad total durante 30 minutos con agitación ocasional. Se añadieron 10 mL de la solución de yoduro de potasio y se agitó vigorosamente. Después se agregaron 100 mL de agua destilada recién hervida y fría, cuidando de lavar cualquier residuo del tapón de vidrio. Se tituló con la solución valorada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón cuando la coloración amarilla casi desaparece, se continuó titulando hasta que el color naranja casi desapareció. Antes del final de la titulación se agitó vigorosamente para que todo el yodo remanente fuera valorado. Se hicieron 2 blancos bajo las mismas condiciones.

Cálculos.

$$\text{Índice de Yodo} = \frac{(B - S) \times N \times 12.69}{\text{gramos de muestra}}$$

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

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

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

12.69= miliequivalentes de yodo

• 5.8 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALCALOIDES

Fundamento. ^(13,28,30)

Los alcaloides son sustancias nitrogenadas, heterocíclicas, con estructura molecular compleja, alcalinas (de ahí su nombre, "álcali"), de origen vegetal y que presentan propiedades farmacológicas. Se presentan como sólidos cristalinos, se encuentran como sales de ácidos orgánicos, son activos ópticamente. Sus sales son solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos y en su forma básica, son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos.

Material y reactivos.

- Embudos de separación de 250 mL
- Probetas graduadas de 25 mL y 50 mL
- Vasos de precipitados de 100 mL, 150 mL y 250 mL
- Matraces bola de fondo plano
- Pipeta volumétrica 10 mL
- Microbureta de vidrio de 5 mL
- Soporte universal
- Pinzas de 3 dedos
- Potenciómetro
- Rotavapor
- Ácido sulfúrico al 2%
- Agua destilada
- Hexano
- Agua desionizada
- Amoníaco concentrado
- Cloroformo
- Sulfato de sodio anhidro
- Solución saturada de Sulfato de sodio
- Mezcla etanol-cloroformo (3:2)
- Solución de Ácido sulfúrico 0.01 N
- Rojo de metilo 0.1%
- Solución de NaOH para determinación de alcaloides.

Solución de NaOH para determinación de alcaloides: Se pesó la cantidad necesaria para la solución (5 g aproximadamente). Se disolvió en 300 mL de agua destilada y se calentó en una parrilla. Se preparó una solución de Cloruro de bario con 2-3 g disueltos en 25-30 mL de agua destilada y también se calentó. Las dos soluciones se mezclaron en caliente, se dejó enfriar y se filtró por decantación. La solución se aforó a un litro con agua recién hervida y fría.

Para la valoración de la solución de Hidróxido de sodio para determinación de alcaloides, se midieron exactamente 25 mL de la solución con pipeta volumétrica. Se añadió 50 mL de agua destilada hervida y fría, y dos gotas de indicador anaranjado de metilo (0.1%). Se tituló con solución valorada de HCl 0.1N. Se realizó un blanco en las mismas condiciones.

Procedimiento.

Se pesaron 25 g de grasa en un vaso de precipitados y se agregó 25 mL de solución de ácido sulfúrico 2%. Se trasvasó a un embudo de separación, cuidando de no agitar fuerte, recuperando la fase acuosa. Se añadió otra porción de 25 mL de H₂SO₄ al 2% al vaso de precipitados para lavar los residuos de muestra, se trasvasó al embudo con grasa y se repitió la operación. Se realizaron 2 lavados con porciones de 25 mL de agua destilada de la misma manera que con el ácido sulfúrico. Las fases acuosas fueron recuperadas juntas y se pasaron a otro embudo de separación para realizar 2 lavados con porciones de 20 mL de hexano. Nuevamente se recuperó la fase acuosa que fue alcalinizada con amoníaco concentrado hasta un pH de 9.5±0.2. Con ayuda de un embudo de separación se hicieron 3 extracciones con porciones de 50 mL de cloroformo. Se recuperó la fase orgánica en un vaso de precipitados con 5 g de Na₂SO₄ anhidro. La fase acuosa se extrajo con 3 porciones de 50 mL de la mezcla etanol-cloroformo (3:2). Se recuperó la fase orgánica en otro vaso de precipitados con 5 g de Na₂SO₄ anhidro.

Se trasvasó la fase orgánica de cloroformo a un matraz bola de fondo plano, separando por decantación el Na₂SO₄ anhidro. Se destiló el cloroformo a sequedad en el rotavapor. Posteriormente, se destiló en el mismo matraz la fase orgánica de etanol-cloroformo, también a sequedad.

El residuo (alcaloides) se resuspendió del matraz en exactamente 10 mL de H₂SO₄ 0.01N añadidos con bureta en dos porciones de 5 mL, se colocó el tapón de vidrio, se agitó fuertemente y se trasvasó a un matraz erlenmeyer. Se realizó un lavado del matraz bola con 10 mL de agua desionizada para no perder muestra. Por último, se adicionaron 5 gotas de indicador rojo de metilo 0.1% y se

tituló con microbureta y la solución de NaOH 0.1N valorada. Se realizó un blanco en las mismas condiciones.

• 5.9 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Fundamento. ^(4,20)

Se basa en la separación de los ésteres metílicos derivatizados de los ácidos grasos contenidos en una muestra lipídica por el método de cromatografía de gases y su posterior cuantificación para conocer la composición porcentual del aceite o grasa en cuestión.

Material y reactivos.

- ✓ Tubos de ensaye con tapón de rosca
- ✓ Pipetas pasteur
- ✓ Micropipeta
- ✓ Pipetas volumétricas
- ✓ Parafilm
- ✓ Baño de temperatura controlada GRANT Mod. SE-10
- ✓ Vortex
- ✓ Cromatógrafo de gases Perkín Emer Auto System HP 5890 con detector de ionización de flama
- ✓ Columna capilar Supelco 24136 OMEGAWAX 250 , 30m x 0.25 mm, 0.25µm
- ✓ Jeringa de inyección para cromatógrafo de 1 mL
- ✓ Solución de KOH 5% p/v en metanol
- ✓ Solución de HCl 10% v/v en metanol
- ✓ Hexano grado cromatográfico
- ✓ Trifluoruro de bromo
- ✓ Gas nitrógeno
- ✓ Gas helio (gas acarreador)
- ✓ Gas hidrógeno (para el detector de ionización de flama)
- ✓ Aire gas de alta pureza 99.99% (para el detector de ionización de flama)

- ✓ Estándares de referencia SIGMA (Ácidos grasos : Palmítico C16, Esteárico C18, Oleico C18:1, Linoleico C18:2, Linolénico C18:3, Araquidónico C20:4)

Procedimiento.

Se lavó todo el material de vidrio primero con agua y jabón, después con mezcla crómica y por último con agua destilada.

➤ **Obtención de ésteres.**

Se pesaron 20 miligramos de la muestra, en un tubo de ensaye con tapón de rosca. Se le añadieron 5 mL de KOH al 5% en metanol, se agitó en el vortex y se colocó en baño maría a temperatura de ebullición durante 20 minutos y posteriormente se dejó enfriar. Se agregaron 5 mL de HCl al 10% en metanol y 2 mL de trifluoruro de bromo, se agitó en el vortex y se puso de nuevo en el baño maría durante 20 minutos. Se dejó enfriar. Se adicionaron 10 mL de agua destilada y 5 mL de hexano. Se agitó con el vortex durante 1 minuto y se recuperó la fase orgánica. Se realizaron otras dos extracciones con 5 mL de hexano cada una.

Se evaporó casi a sequedad el hexano en un baño maría a 60 °C y venteando con gas nitrógeno. Se resuspendió el residuo en 1 mL de hexano.

En el caso de los estándares, se tomaron 10 microlitros de ácido graso con microbureta y se realizó el mismo procedimiento.

➤ **Inyección de la muestra.**

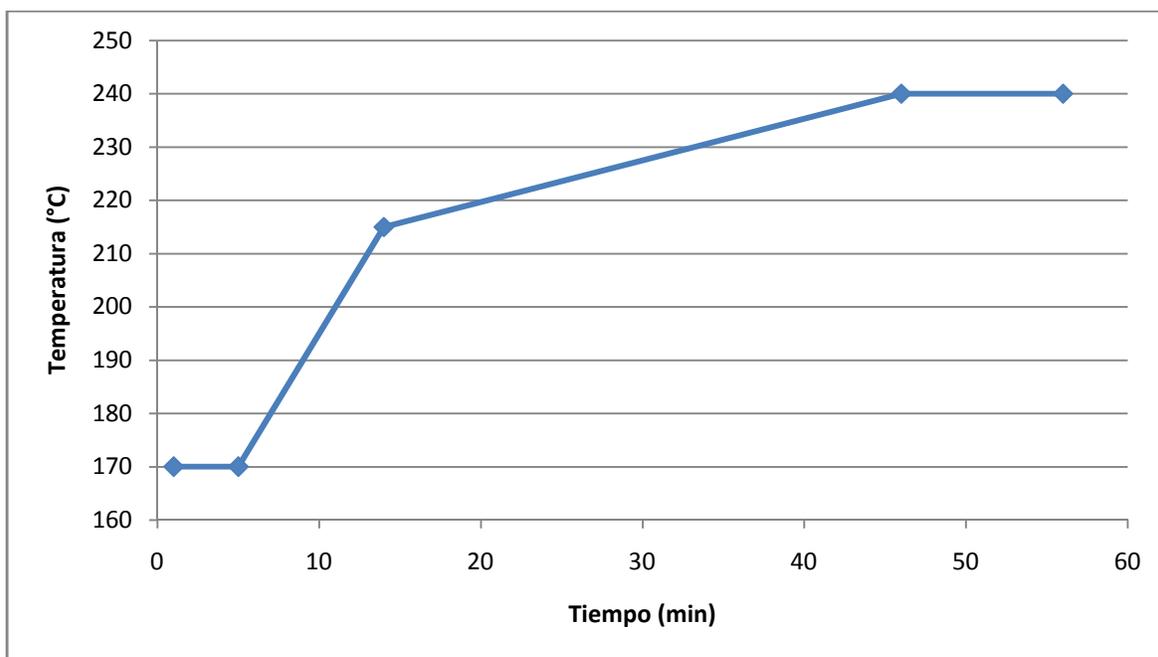
La esterificación de cada muestra y estándar se llevó a cabo por triplicado. De cada esterificación se realizó una inyección de 2 microlitros al cromatografo de gases.

➤ Condiciones del cromatógrafo

En la Gráfica 1 se observan las condiciones de tiempo y temperatura establecidos para el perfil de las muestras de aceite refinado y grasa cruda.

- Temperatura inicial : 170°C por 5 minutos
- Rampa de temperatura #1 : 5°C/min de 170°C a 215°C
- Rampa de temperatura #2: 0.8°C/min de 215°C a 240°C
- Temperatura final: 240°C por 10 minutos

Gráfica 1. Rampa Tiempo vs Temperatura de la corrida cromatográfica



➤ Obtención del cromatograma de estándares de ácidos grasos.

En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido de los estándares de ácidos grasos, en las condiciones de presión y temperatura antes mencionadas.

Los tiempos de retención de cada ácido graso sirven como referencia para las muestras de aceite refinado y grasa cruda.

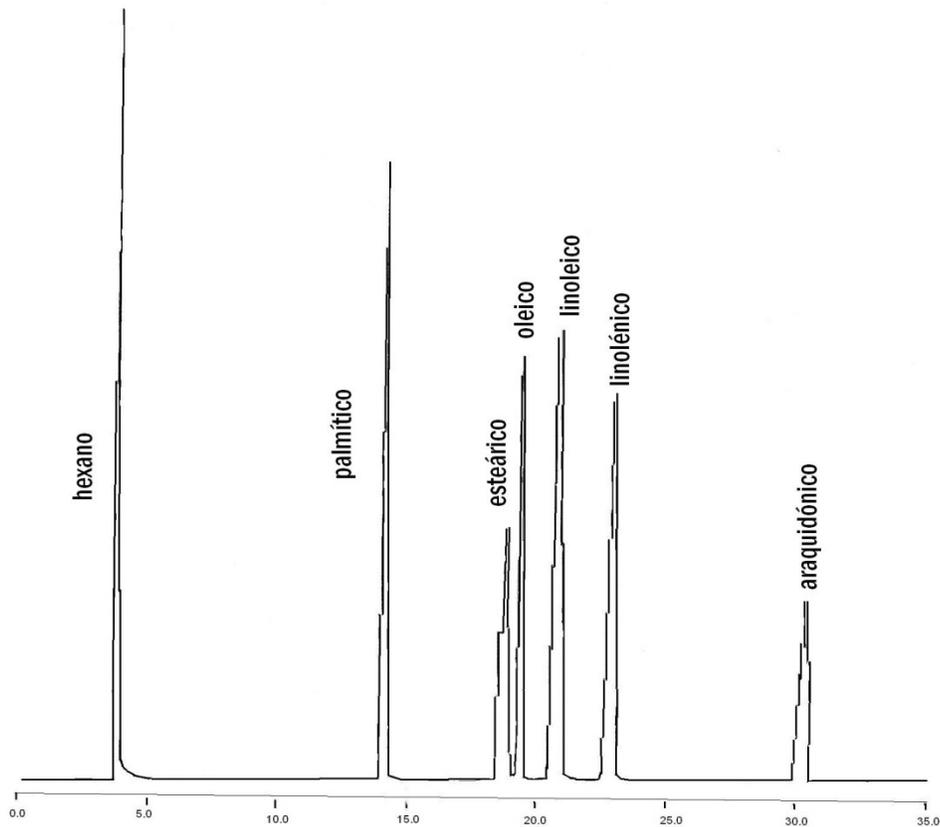


Figura 8. Cromatograma de estándares de ácidos grasos.

Cálculos.

$$\text{Porcentaje de ácido graso} = \frac{P_i}{\sum P_i} \times 100$$

P_i = área del pico correspondiente al ácido graso.

$\sum P_i$ = suma de las áreas de todos los picos del cromatograma.

• 5.10 ENSAYO BIOLÓGICO

Fundamento. ^(17, 19,26)

La Relación de Eficiencia Proteica (REP) es un ensayo biológico de balance de peso corporal para obtener la eficiencia proteínica del material a ensayar. En el caso de la evaluación de la grasa, el experimento se realiza con dietas

isoproteicas, que contengan el mismo componente proteínico, con la variante de la fracción lipídica. En la Tabla 1 se presenta la composición de las dietas a ensayar.

Tabla 1. Composición de las dietas para el ensayo biológico REP (%).

Ingrediente	Dieta Control	Dieta Aceite Refinado	Dieta Grasa Cruda
Aceite de maíz, marca Maceite	6		
Grasa vegetal, marca Aurrera	8		
Aceite Refinado de Colorín		14	
Grasa Cruda de Colorín			14
Caseína, Cat. No. 960128 marca MPBiomedicals	11.2	11.2	11.2
Sacarosa, Marca Soriana	22	22	22
Glucosa anhidra, Marca Droguería Cosmopolita	20	20	20
Dextrina, marca Maizena	25	25	25
Mezcla de sales, Cat. No.902842 marca MPBiomedicals	4	4	4
Mezcla de vitaminas, Cat. No. 904654 marca MPBiomedicals	2	2	2
Celulosa, Marca Teklad Test Diets	1.4	1.4	1.4
Solución de colina 50% p/v	0.4	0.4	0.4

Elaboración de las dietas.

Se pesaron los ingredientes. Todos los polvos se pasaron por un tamiz # 20. La grasa vegetal se calentó a fuego bajo para obtener una consistencia líquida. Se mezclaron los polvos (excepto la mezcla de vitaminas). Posteriormente, se añadió la grasa vegetal caliente y el aceite de maíz, para la dieta control, y los aceites crudos y refinados para las dietas correspondientes. Por último, se añadieron las vitaminas y la solución de colina al 50%. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de higiene, ya que es indispensable que las dietas estén libres de cualquier microorganismo o compuesto que pueda causarle una infección a las ratas. Las dietas se guardaron en frascos limpios con tapa, a temperatura de refrigeración (4 °C).

Procedimiento para el Ensayo de REP.

El ensayo biológico se realizó con 18 ratas macho, cepa Sprague Dowley, recién destetadas, donde la diferencia de peso de la camada fue menor a 10 gramos.

Las ratas fueron pesadas y distribuidas por el método de culebra japonesa. Se dividieron en tres lotes, de seis ratas cada uno, considerando la distribución por peso. Las ratas se colocaron en jaulas individuales, con alimento y agua a libre consumo, a una temperatura promedio de 24 °C, humedad relativa de 30-35%, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, durante 28 días. Cada tercer día fueron registrados el peso corporal y el alimento consumido por cada rata.

Al término del experimento, se calculó el REP y el REP ajustado.

Cálculos.

$$REP_i = \frac{\Delta P_i}{\sum AI_i \times F}$$

$$REP_{exp} = \frac{\sum_{i=1}^n REP_i}{n}$$

$$REP \text{ ajustado} = REP_{exp} \times \frac{REP_{caseína \text{ ref}}}{REP_{caseína \text{ exp}}}$$

REPi= Relación de eficiencia proteica individual

Δ Pi= Incremento de peso de la rata

Σ AI i= Alimento ingerido por la rata

n = número de individuos (6)

F= Porcentaje de proteína de la dieta /100

REP_{exp}= Valor de REP obtenido del bioensayo

REP_{caseína ref}= Valor de la caseína de referencia (2.5)

REP_{caseína exp}= Valor de la caseína experimental

• 5.11 DETERMINACIÓN DE ENERGÍA DIGERIBLE

Fundamento. ⁽⁸⁾

Se basa en la determinación de la densidad o contenido calórico de las muestras de las dietas evaluadas (energía ingerida), así como de las heces de las ratas (energía fecal) recolectadas en la última semana de ensayo biológico de REP, para obtener el porcentaje de energía digerible por el animal.

Material y Reactivos.

- Balanza analítica
- Estufa de secado
- Mecha de algodón de 75 mm de longitud
- Crisoles de acero inoxidable con diámetro de 1 pulgada
- Mango compactador metálico
- Bomba calorimétrica GALLENKAMP, mod CBB-330-010 L.
- Ácido benzoico, estándar certificado para valor calórico.
- Gas oxígeno

Procedimiento.

Se pesaron entre 0.6 y 0.7 gramos de muestra triturada en un crisol, puesto previamente a peso constante, junto con la mecha de algodón. Se compactó la muestra con el mango metálico, cuidando que una parte de la mecha quedará dentro de la muestra, ya que ésta es la conexión entre el alambre de ignición de la bomba calorimétrica y la muestra. Con mucho cuidado se retiró el material no compactado y se pesó para obtener el peso de la muestra.

El crisol fue colocado en la bomba y se introdujo la mecha en el alambre de ignición. Posteriormente, se cubrió con el capuchón metálico de la bomba y se cerró para que quedara completamente sellado. El sensor del termopar se colocó al último en el lugar indicado para este fin en el capuchón.

Con un suministro de oxígeno a una presión mínima de 30 bars, se abrió la válvula de pasó, obteniendo una presión de 25 bar dentro de la bomba. Cuando ya se tuvo la presión necesaria, se cerró la válvula y se ajustó el galvanómetro a cero. Después de 10 segundos con las condiciones fijas, se oprimió el botón de ignición. Se tomó lectura máxima obtenida en el galvanómetro.

Después de tomar la lectura, se abrió la válvula de salida, se desconectó el termopar y se retiró el capuchón. Se cerró la válvula de salida y se enfrió el capuchón hasta temperatura ambiente con un baño de hielo para proceder con la siguiente muestra. Se hizo un triplicado por cada muestra.

Para la curva patrón, se llevó a cabo el mismo procedimiento, con mínimo 5 muestras con pesos diferentes en escala de de 0.1 a 0.7 gramos de ácido benzoico.

Cálculos.

Para realizar los cálculos es necesario saber que:

$$1 \text{ g de ácido benzoico} = 26,454.3 \text{ Joules} = 26.45 \text{ kJ} = 6.317 \text{ kcal.}$$

La curva estándar se obtiene graficando el contenido calórico (absisas) vs lectura del galvanómetro (ordenadas).

Por interpolación se obtiene la densidad o contenido calórico de cada muestra.

Cálculos.

$$CCD \times AI_i = EI_i$$

$$CCF \times HI = EFi$$

CCD= Contenido calórico de la dieta por gramo de muestra

AI_i= Alimento ingerido por individuo en gramos

EI_i= Energía Ingerible individual

CCF= Contenido calórico de las heces por gramo de muestra

HI= Heces excretados por individuo en gramos

EF_i= Energía Fecal individual

$$\%EDI = \frac{EI_i - EFi}{EI_i} \times 100$$

$$\%ED = \frac{\sum_{i=1}^n \%EDI}{n}$$

%EDI= Por ciento de Energía Digerible individual

EI_i= Energía Ingerible individual

EF_i= Energía Fecal individual

n = Número de individuos (6)

%ED= Por ciento de Energía Digerible

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

• 6.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE

A continuación se presenta el rendimiento del aceite obtenido por medio de extracción usando como disolvente hexano.

Tabla 2. Rendimiento de aceite de semilla de colorín.

Peso de colorín a extraer	Peso de grasa obtenida	Rendimiento
80 kg	12 kg	15%

Comparando el rendimiento obtenido con auténticas oleaginosas como coco, palma o sésamo, tiene un rendimiento bajo. Sin embargo, es suficiente para ser aprovechado, como el caso otros recursos naturales con un contenido de grasa alrededor del 15%, como el maíz.

Tabla 3. Rendimientos medios en aceites de semillas oleaginosas comunes (%)^{a (2)}

Maíz.....	16
Algodón.....	34
Palma.....	45
Girasol.....	25
Soya.....	18
Sésamo.....	47
Cacahuete.....	35
Cártamo.....	28

^a Se han determinado los rendimientos por prensado mecánico, a excepción de la soya que se sometió a extracción con disolvente.



Figura 9. Grasa extraída de la semilla de colorín.

La grasa cruda obtenida presentó un color anaranjado, turbidez y un olor característico penetrante. En la Figura 9 se aprecia una muestra de la grasa de colorín, antes de ser sometida al proceso de refinado.

- **6.2 PROCESO DE REFINADO**

Desgomado

Los cambios en esta etapa fueron:

- Antes: el aceite se mostraba demasiado viscoso, de color anaranjado opaco, turbio y con sólidos en la superficie, de olor penetrante.
- Después: se obtuvo un aceite con menor viscosidad, sin sólidos en la superficie, sin turbidez, y disminuyó el olor característico.
- Residuos: se formó una pasta color café viscosa, de olor desagradable.

Neutralización

Los cambios en esta etapa fueron:

- Antes: color anaranjado opaco, sin turbidez, olor característico.
- Después: color anaranjado brillante, translúcido. Menor olor.
- Residuos: se formó un precipitado blanco abundante.

Blanqueo

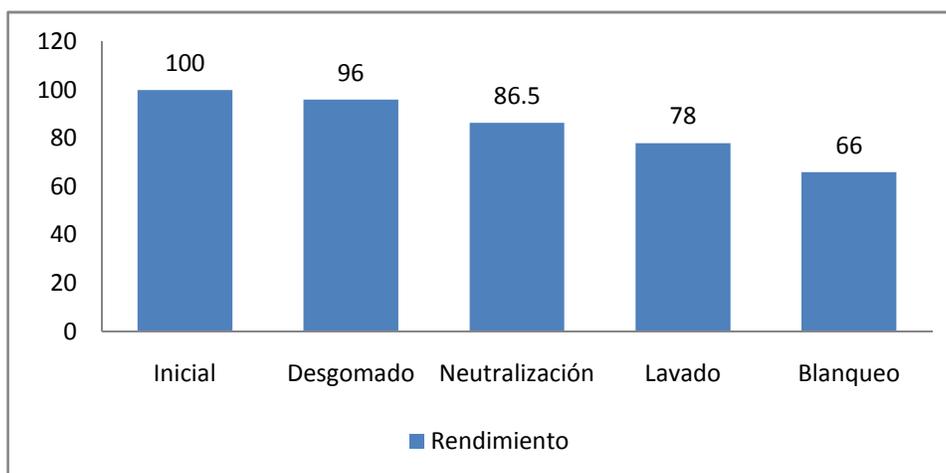
Los cambios en esta etapa fueron:

- Antes: color anaranjado brillante, traslucido. Olor característico.
- Después: color amarillo oscuro, traslúcido. Disminución del olor.
- Residuos: tierras blanqueantes coloreadas.

Tabla 4. Rendimiento del aceite de colorín en el proceso de refinación.

	Volumen inicial	Volumen final	Rendimiento
Aceite	1000 mL	660 mL	66%

Gráfica 2. Rendimiento del proceso de refinado



El rendimiento del aceite durante el proceso de refinación fue de un 66% (Tabla 4). En la Gráfica 2 se observa que la etapa en la que se reportó una mayor pérdida fue durante el blanqueo, con una pérdida del 12% del total de aceite refinado. Esto debido principalmente a que el carbón activado es muy adsorbente, por lo que adsorbe no sólo las sustancias coloridas sino también una gran cantidad de aceite. El papel filtro utilizado para la filtración también retiene cantidades considerables de aceite.

El proceso de refinado, además de mejorar algunas propiedades sensoriales del mismo, como el olor, sabor y color, también sirvió para disminuir la cantidad de alcaloides presentes en la grasa cruda.

- **6.3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS**

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo y refinado de la semilla de colorín.

Parámetro	Aceite Crudo	Aceite Refinado	Grupo oleico-linoleico^(11,15)
Punto de Fusión (°C)	0.2 a 0.8	0.2 a 0.4	-5 a 29
Densidad Relativa (25°C/25°C)	0.915 ± 6x10 ⁻⁴	0.919 ± 0.001	0.909-0.920
Índice de acidez (% ácido oleico)	1.87 ± 0.24	0.20 ± 0.007	Máx. 0.5
Índice de Saponificación (mg KOH/g muestra)	191.34 ± 0.55	190.42 ± 1.13	181 - 197
Índice de refracción (20°C)	1.4694 ± 9x10 ⁻⁶	1.4684 ± 3x10 ⁻⁵	1.463 - 1.474
Índice de Yodo (Hanus) (g yodo/ g muestra)	112.93 ± 0.97	115.19 ± 0.25	81 - 136

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del aceite crudo y refinado de la semilla de colorín, los cuales fueron comparados con los rangos para el grupo oleico-linoleico. Se muestran los valores medios de cada determinación, así como su desviación estándar.

Los valores obtenidos para cada parámetro fisicoquímico se encuentran dentro del rango del grupo oleico-linoleico, que corresponde al grupo donde se encuentran los aceites comestibles.

- **6.4 DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES**

La determinación cuantitativa de alcaloides mostró los siguientes resultados:

Tabla 6. Alcaloides en grasa y aceite refinado de *Erythrina americana*

Alcaloides (mg β - eritroidina/ 100 g muestra)	
Grasa Cruda	5.37
Aceite refinado	0.31

Ahora bien, para alimentos de consumo humano que contienen alcaloides, como sería el caso del aceite de colorín, no hay suficiente información disponible y son sustancias de alto riesgo; para lo cual se tomó como referencia lo establecido para glicoalcaloides en papa, donde se marca como Límite Máximo Permitido de 20 mg de total de glicoalcaloide por 100 gramos de papa.

Antes del proceso de refinado, la grasa cruda tuvo un contenido significativo de alcaloides; sin embargo, puede observarse que después del proceso de refinado hubo una reducción de más de 10 veces el contenido de estos compuestos, obteniéndose un aceite refinado lo suficientemente bajo en alcaloides como para no ser considerado de riesgo en su ingesta.

• 6.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Después de la derivatización de las muestras y la posterior inyección de los ésteres obtenidos en el cromatógrafo de gases en las condiciones de temperatura y presión establecidas para el experimento, se obtuvieron los cromatogramas siguientes.

La identificación de los ácidos grasos se realizó en base a los tiempos de retención del cromatograma de estándares y en las figuras 10 y 11 se presentan los cromatogramas de la grasa cruda y aceite refinado de colorín, respectivamente.

Los ácidos grasos fueron cuantificados en base al área de los picos de cada cromatograma. En la tabla 7 se muestran los resultados.

○ Grasa cruda

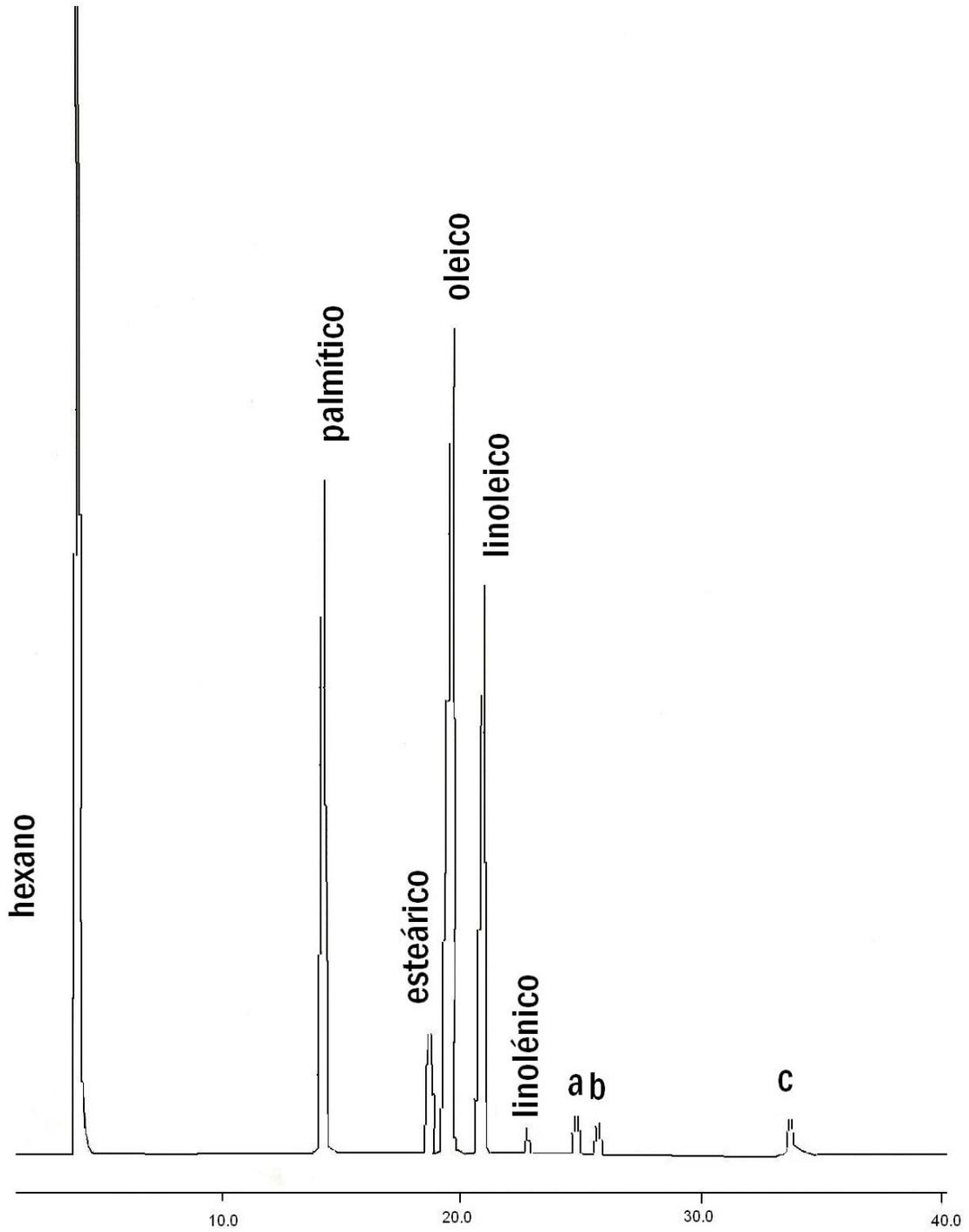


Figura 10. Cromatograma de la grasa cruda.

○ Aceite Refinado

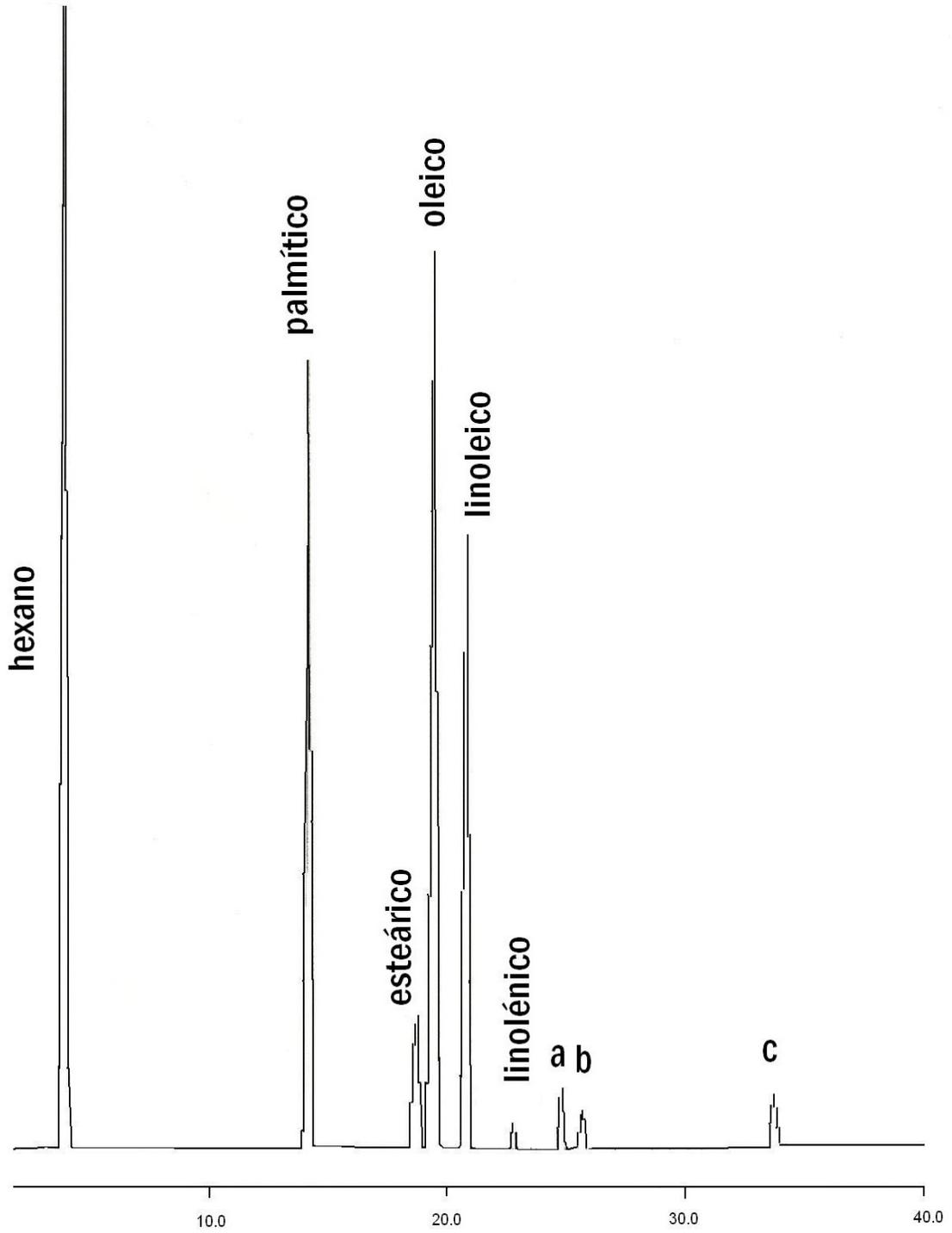


Figura 11. Cromatograma del aceite refinado.

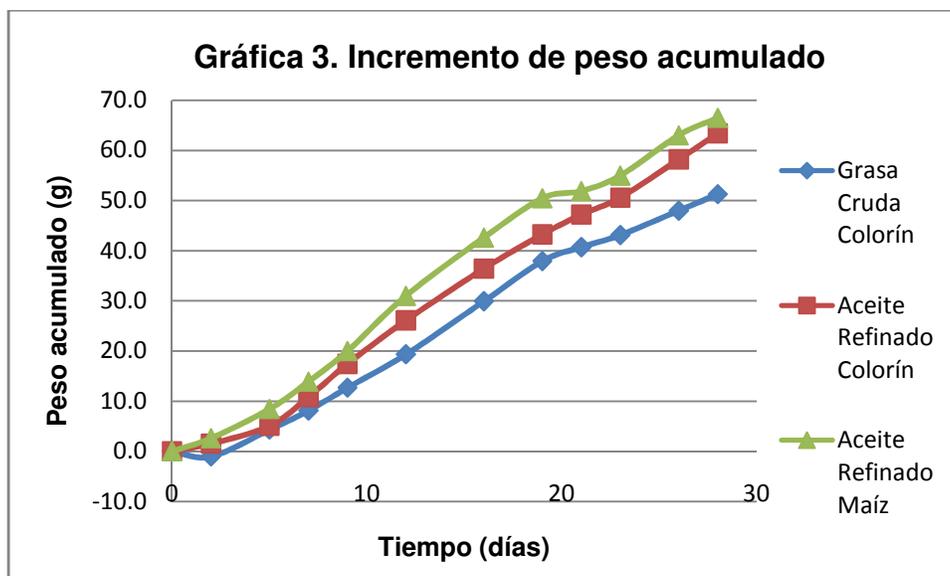
Tabla 7. Porcentaje de ácidos grasos en la grasa cruda y el aceite refinado de colorín.

Acido graso	Grasa Cruda	Aceite Refinado
Palmítico	17.31	16.92
Esteárico	6.29	6.38
Oleico	45.27	45.37
Linoleico	23.43	22.73
Linolénico	0.67	0.80
a	1.96	2.05
b	1.63	2.02
c	3.12	3.73

La Tabla 7 muestra la poca variación en los porcentajes de ácidos grasos antes y después del proceso de refinado. El perfil de ácidos grasos indica que tanto el aceite refinado como la grasa cruda son ricos en ácido oleico y ácido linoleico, ambos de vital importancia en la nutrición animal y humana, y confirma los resultados obtenidos en las pruebas fisicoquímicas, que colocaron al aceite refinado en el rango del grupo oleico-linoleico.

○ **6.6 ENSAYO BIOLÓGICO Y ENERGÍA DIGERIBLE**

La Gráfica 3 muestra el promedio del incremento de peso acumulado para cada dieta probada en el ensayo biológico. Se observa que en todas hay una tendencia lineal al incremento; sin embargo, la dieta hecha con Grasa Cruda de Colorín se encuentra por debajo de la dieta control (Aceite de Maíz) y la dieta con Aceite Refinado de Colorín.



A partir de los resultados obtenidos del ensayo biológico y la determinación de energía digerible se realizó un análisis estadístico de varianza ANOVA de una sola vía al 95 % de confianza, acoplado a la prueba de rangos múltiples de medias DUNCAN, con el paquete de programación estadístico STATGRAPHICS ver: 5.1.

**Tabla 8. Resultados del ensayo biológico (REP)
Y porcentaje de Energía Digerible.**

Lote de animales	REP	%ED
alimentados con dieta:		
Aceite de Maíz (Referencia)	3.16 ± 0.1846 ^a	95.2441 ± 0.9631 ^a
Grasa cruda	2.44 ± 0.1509 ^b	93.6088 ± 1.4299 ^b
Aceite refinado	2.61 ± 0.1928 ^b	95.1449 ± 0.8797 ^a

Letra diferente dentro de la columna indica diferencia significativa estadística ($\alpha=0.05$).

El análisis indicó que, para el ensayo biológico REP, no hubo diferencia significativa entre las dietas de Grasa Cruda y Aceite Refinado de Colorín, pero ambas dietas presentaron diferencia significativa al ser comparadas contra la dieta de Aceite de Maíz. Esto indica que, a pesar de que todas las dietas tenían el

mismo contenido de proteína (caseína), el tipo de grasa utilizado afectó la eficiencia proteínica.

No se vio reflejada una mayor eficiencia proteínica con la dieta de Aceite Refinado, a pesar de que el proceso de refinamiento tenía como propósito mejorar la calidad del aceite y en consecuencia, mejorar el aprovechamiento de la dieta. Sin embargo, si se observa una REP mayor para la dieta de Aceite Refinado en comparación con la dieta de Grasa Cruda.

En cuanto a la energía digerible, se realizó también el análisis estadístico, el cual indicó una diferencia significativa únicamente en la dieta de Grasa Cruda, con respecto a las dietas de Aceite Refinado de Colorín y la dieta control de Aceite de Maíz. Por tanto, se puede mencionar que el proceso de refinado mejoró la disponibilidad energética del aceite, lo que posiblemente influyó en un mayor incremento de peso, al contrario de la dieta de Grasa Cruda.

El bioensayo confirma que el aceite refinado puede tener fines alimenticios, en base a los resultados obtenidos con los parámetros fisicoquímicos y el perfil de ácidos grasos, que confirma que se encuentra dentro del grupo oleico-linoleico que corresponde a los aceites comestibles.

En cuanto a la posible toxicidad de los alcaloides de *Erythrina americana*, se observó en los individuos tratados con la dieta de Grasa Cruda un aumento en el consumo de agua y ansiedad, características atribuidas a un mayor contenido de alcaloides y que no fueron vistas en los lotes alimentados con dieta de Aceite Refinado y la dieta control de Aceite de Maíz (ambas consideradas no tóxicas por su bajo o nulo contenido de alcaloides).

7. CONCLUSIONES

- El rendimiento de grasa obtenido a partir de la semilla de colorín por extracción con disolvente (15%), a pesar de no ser un valor alto, es suficiente para ser aprovechado en la industria alimentaria.
- El proceso de refinado no afectó la composición de ácidos grasos en el aceite y, por el contrario, aumentó la disponibilidad energética del aceite y redujo más de 10 veces la cantidad de alcaloides presentes en la grasa cruda. Puede considerarse un método efectivo de destoxificación de grasas con alcaloides.
- Tanto el aceite refinado como la grasa cruda, tienen alto contenido en ácidos grasos insaturados, como es el caso del oleico (45 %) y el linoleico (23%). Además, el aceite refinado tiene parámetros fisicoquímicos dentro del rango del grupo oleico-linoleico y el bioensayo mostró que es una buena fuente de ácidos grasos indispensables, pero no puede equipararse la calidad nutritiva con la del aceite de maíz, ya que es menor.
- El aceite refinado puede ser utilizado sin riesgo en alimentación animal; sin embargo, para ser utilizado en la alimentación humana hacen falta más estudios, en especial para mejorar algunas características sensoriales, como el olor y el sabor, que pueden resultar desagradables para el consumo humano.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Applewhite, T. *Bailey's Industrial oils and fat products*. Volumen 3. Ed. Jhon Wiley & Sons. New York. Pág 352-423. (2005)
2. Bailey, A. *Aceites y grasas industriales*. 2° Edición. Ed. Reverté. Barcelona. Pág. 423 (1984)
3. Badui, S. *Química de los alimentos*. 3° Edición. Ed. Alhambra. México, D.F. Pág. 233-237 (1993).
4. Boekenoogen, H.A. *Analysis and characterization of oils, fats and fat products*. Volumen 1. Ed. Jhon Wiley & Sons. New York. Pág. 86-92 (1964)
5. Boyer, R. *Conceptos en bioquímica*. Ed. International Thomson. México, D.F. Pág. 238-246 (1999).
6. Bruneton, J. *Plantas Tóxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pág. 269, 270, 275, 505, 506. (2001)
7. Castillo, G. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Ed. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México, D.F. Pág. 99-102 (2004).
8. Díaz, M. *Variaciones en la composición bromatológica y contenido de factores antinutricionales y alcaloides durante el proceso de germinación de las semillas de **Erythrina americana***. Tesis Licenciatura UNAM. México, D.F. Pág. 1,4-5, 8,15-16 (2005)
9. Dirección General de Economía. *El mercado de oleoginosas*. Primera edición. México, D.F. Pág. 11-15, (1973).
10. Fennema, R.O. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pág. 315-317, 367-371, (1993)
11. Formo, M., Jungerma, E., Norris, F. and Sonnatag, I. *Bailey's Industrial oils and fat products*. Volumen I. Ed. Jhon Wiley & Sons. New York. Pág. 352-423. (1979)
12. Fraile, M.E., García, M.D., Martínez, A., Slomianski, R. *Nutritivas y apetecibles: Conozca las leguminosas comestibles. Parte 1. Hojas, vainas y Semillas*. Revista ContactoS (México) No. 66, 27-35 (2007)

13. García, R., Soto, R.M., Martínez, M. *Toxicidad de los extractos de las semillas de **Erythrina americana***. Revista Ciencia Ergo Sum. (México). Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca. Vol. 7, No. 2, 166-170 (2000)
14. Graciani, E. *Los aceites y grasas: composición y propiedades*. 1ª Edición. Ed. A. Madrid Vicente. Madrid, Pág. 182 (2006)
15. Hart, L. *Análisis moderno de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. Pág. 343-356. (1998)
16. Hein, M., Arena, S. *Fundamentos de Química*. Ed. Thomson Learning. México, D.F. Pág. 34, 35, 306-308, 540-544, 568,572 (2003)
17. Helrich, K. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15ª edición. Vol. 2. AOAC. Virginia. Pág. 777-781, 1095-1096. (1990)
18. Lawson, H. *Aceites y grasas alimentarias*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pág. 29, 30, 35, 36, 207, 208, 213, 214, 283-287. (1994)
19. López, P., Guzmán, F., Contreras, E., Román, A. *Evaluación biológica de la calidad proteica de diferentes variedades de Cebada (**Hordeum sativum Jess**)*. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo. (2005).
20. Madrid, A. *Producción, análisis y control de calidad de aceites y grasas comestibles*. Ed. A. Madrid Vicente. Madrid. Pág. 38-39,49-53,133-137,141-144, 284-292. (1988)
21. Madrid, A., Cenzaño, I., Madrid, I. *Manual de aceites y grasas comestibles*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pág. 13-19 (1997)
22. McMurry, J. *Química orgánica*. 5ª Edición. Ed. International Thomson. México, D.F. Pág. 65-66, 1118-1122, (2004).
23. Niembro, A. *Árboles y arbustos útiles de México. Naturales e introducidos*. Ed. Limusa. México, D.F. Pág. 89 (1987)
24. Orozco, C. *Especies nativas del jardín botánico regional de Cadereyta "Ing. Manuel González de Cosío"*. Publicación del Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Querétaro, CONCYTEC. Querétaro Pág. 22,34 (1987)

25. Patterson, H. *Bleaching and Purifying Fats and Oils. Theory and Practice*. AOCS. Illinois. Pág. 1-60 (1992)
26. Poucell, C. *Análisis proximal y factores tóxicos naturales del frijol Comba (**Phaseolus lunatus**) y Peruano (**Phaseolus vulgaris**), crudos y cocidos, así como evaluación nutritiva de los frijoles cocidos, consumidos en San Miguel Totolapan, Guerrero*. Tesis Licenciatura UNAM. México, D.F. Pág. 11-14,17,18,20, 45,46, 52-57 (2010)
27. Ramos, L. *Evaluación Nutricional y Toxicológica del ejote destoxificado de **Erythrina americana** (colorín) para alimentación animal*. Tesis Licenciatura UNAM. México, D.F. Pág. 5, 7,8, 10-15, 16,17. (2009)
28. Sánchez, S., Soto, R.M., Kite, G., García, M.R. *Identificación de alcaloides en las inflorescencias de **Erythrina americana** Miller*. Revista Chapingo, Serie Horticultura, 7 (1) 37-48 (2001)
29. Torres, V. *Validación de la técnica de alcaloides totales y estudios de citotoxicidad por titulación en colorín (**Erythrina americana**)*. Tesis Licenciatura UNAM. México, D.F. Pág. 1-2, 4-5 (2006)
30. Zárate, A. *Caracterización bromatológica y determinación de factores tóxicos de la semilla de napahuite (**Trichilia hirta**)*. Tesis Licenciatura UNAM. México, D.F. Pág. 7-14, 51-60, 70 (2003)
31. Ziller, S. *Grasas y aceites alimentarios*. Ed. Acribia. Zaragoza. Pág. 2-39 (1996)