



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización bromatológica, determinación de factores tóxicos de la almendra, y parámetros fisicoquímicos de la grasa de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

LAURA IRASEMA HERNÁNDEZ JIMÉNEZ



MÉXICO, D.F.

2014



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. Lucia Cornejo Barrera
1° SUPLENTE: QFB. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
2° SUPLENTE: Dra. Iliana Elvira González Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Anexos 1 de los laboratorios 4A y 4C del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edif. A, Facultad de Química, Cd Universitaria, México D.F.

ASESOR:



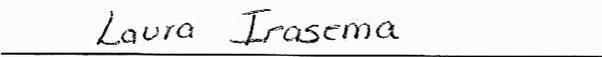
M en C Bernardo Lucas Florentino

ASESOR TÉCNICO:



Dr. Robert Bye Boettler

SUSTENTANTE:



Laura Irasema Hernández Jiménez

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	4
4. Antecedentes	
4.1 Oleaginosas	5
4.2 Calabaza hedionda (<i>Apodanthera undulata</i>)	5
4.3 Análisis proximal	9
4.4 Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ”	12
4.5 Factores tóxicos y antinutrimientales	13
4.6 Grasas y aceites	15
4.7 Refinación de una grasa vegetal	18
4.8 Factores fisicoquímicos para la caracterización de grasas y aceites	20
4.9 Perfil de ácidos grasos	22
5. Metodología	
5.1 Diagrama de flujo	24
5.2 Obtención de material biológico	25
5.3 Limpieza y descascarillado	25
5.4 Fraccionamiento de la almendra	25
5.5 Análisis proximal	25
5.6 Digestibilidad “ <i>in vitro</i> ”	36
5.7 Desengrasado	37
5.8 Determinación de factores tóxicos y antinutrimientales	38
5.9 Refinación de la grasa	50
5.10 Parámetros fisicoquímicos	53
5.11 Perfil de ácidos grasos	60

6. Resultados y discusión	
6.1 Caracterización bromatológica de la harina integral y desengrasada	65
6.2 Digestibilidad <i>“in vitro”</i>	66
6.3 Extracción de la fracción lipídica	67
6.4 Refinamiento del aceite	68
6.5 Factores tóxicos y antinutrimientales	69
6.6 Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo y refinado	70
6.7 Perfil de ácidos grasos	72
7. Conclusiones	77
8. Bibliografía	78

1. RESUMEN

En México existen especies cuya potencialidad como fuente de proteína y grasas es interesante; entre estas especies se encuentra la almendra de la calabaza hedionda (*Apodanthera undulata* A. Gray, de la familia Cucurbitaceae) que crece en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas. En las zonas que se consume, esta semilla podría formar parte de la dieta básica, como un complemento de la misma. No obstante, es necesario conocer su composición bromatológica, así como la presencia y concentración de los factores tóxicos más comunes en los recursos de origen vegetal.

Por lo que se evaluó nutricionalmente la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) con el fin de proponerla como una fuente alternativa en la alimentación y que no presente riesgos toxicológicos desde el punto de vista analítico. Se realizó la caracterización bromatológica de la almendra para conocer su potencial nutricional, en particular del contenido de proteína y grasa; así como la determinación de factores tóxicos que con más frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal. De igual forma se determinaron los parámetros fisicoquímicos y la determinación de perfil de ácidos grasos tanto de la grasa cruda, como del aceite refinado.

Los resultados obtenidos corroboran que la almendra es un alimento alto en grasa y proteína. En el caso de los factores toxicológicos analizados, estos no representan ningún efecto dañino a la salud. En cuanto a la grasa cruda y el aceite refinado son ricos en ácido oleico y linoleico, importantes en la alimentación, además de asegurar que el proceso de refinación no afecta el perfil de ácidos grasos. Por lo anterior la almendra de la calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) es un alimento apto para el consumo alimenticio.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la selección de plantas destinadas a la agricultura se ha acentuado hasta el extremo de que en la actualidad el hombre depende de unas cuantas decenas de especies vegetales que suministra el 90% de nuestros víveres. Dicha situación nos vuelve vulnerables al depender de algunas especies vegetales, a la vez de tener una dieta restringida.

Un factor importante e íntimamente relacionado con los alimentos, lo constituye el incremento poblacional. No obstante que se ha visto un notorio aumento en la disponibilidad de los alimentos, dicho incremento no ha sido proporcional al crecimiento poblacional. Esta situación se acentúa en la población de menores recursos económicos, como son las comunidades rurales, ya que consumen muchos alimentos no convencionales debido a la escasez de alimentos tradicionales.

Dentro de estos alimentos no convencionales se encuentra la familia botánica Cucurbitaceae. Se caracterizan por tener frutos de tipo baya, pepo o anfisarca, dentro de los cuales se encuentran semillas comestibles que, en su mayoría, son auténticas oleaginosas por su alto contenido de grasa y además un significativo nivel de proteína, como es el caso de la almendra de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***), que dada su frecuencia y afinidad hacia los ambientes perturbados; la planta no tiene problemas de supervivencia en la actualidad.

Por ello, aun cuando estos alimentos no convencionales tengan un consumo importante en algunas regiones, existe poca información respecto a su composición química, como lo son el aporte nutrimental, y los factores tóxicos, por lo que el presente proyecto tuvo la finalidad de evaluar nutricionalmente a la almendra de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***) con el fin de proponer una fuente complementaria alternativa en la alimentación y que no presente riesgos toxicológicos desde el punto de vista analítico.

Por tanto se realizó la caracterización bromatológica de la almendra para conocer su potencial nutricional, del cual se destacan su alto contenido de proteína y grasa; así como determinación de factores tóxicos que con más frecuencia se presentan en los alimentos de origen vegetal. De igual forma se determinaron los parámetros fisicoquímicos y el perfil de ácidos grasos, tanto del aceite crudo, como del refinado, para así conocer su potencial de uso.

3. OBJETIVOS

I. Objetivo general

Conocer la composición química y toxicología de la almendra de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***), así como los factores fisicoquímicos y perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y el aceite refinado con la finalidad de evaluar su potencial alimenticio.

II. Objetivos particulares

- Evaluar el valor bromatológico, toxico y digestibilidad “*in vitro*” de la semilla de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***).
- Realizar la extracción de la parte lipídica de la almendra de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***) con la finalidad de obtener la grasa cruda y la torta residual.
- Obtener el aceite refinado de la almendra de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***)
- Determinar los parámetros fisicoquímicos más comunes, de la grasa cruda y el aceite refinado de la almendra de la calabaza hedionda (***Apodanthera undulata***).
- Determinar el perfil de ácidos grasos de la grasa cruda y del aceite refinado

4. ANTECEDENTES

4.1 Oleaginosas

Las plantas oleaginosas constituyen uno de los grandes grupos de cultivos de mayor producción, investigación, experimentación y comercialización mundial; precisamente por ser plantas útiles, cuyas semillas, granos o frutos aportan gran valor nutrimental por su alto valor energético, ya que contienen un alto porcentaje de grasa y proteína de buena calidad. Son alimentos básicos para millones de personas pobres en los países en desarrollo, y hoy en día están adquiriendo una función todavía más importante como cultivos comerciales.

Diez son los cultivos que en la actualidad son los de mayor producción y cotizados en los mercados de todo el mundo: soya, canola, cártamo, algodón, girasol, olivo, maíz, lino, cacahuate y ajonjolí **(30,31)**.

4.1.1 Importancia

Las plantas oleaginosas constituyen uno de los grandes grupos de cultivos de mayor producción, investigación, experimentación y comercialización mundial; precisamente por ser plantas útiles, cuyas semillas, granos o frutos tienen un alto porcentaje de ácidos grasos y proteínas de alta calidad.

Las plantas oleaginosas son materia prima de primer orden para la industria aceitera, la alimentación animal y la fabricación de productos no comestibles. Son fundamentales en la cultura, la economía, la industria y el comercio mundial **(30,31)**.

4.2 Calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)

México es un país rico en recursos y en diversidad, con los climas más variados y dueño de un litoral extenso; por lo cual su capacidad para producir los más variados alimentos es enorme. No obstante, apenas se utilizan algunos de ellos debido a varias razones. En primer lugar se debe garantizar la inocuidad y su grado de aceptación de quien los consume; muchas especies, aunque contienen nutrimentos, contienen

también sustancias que resultan ser tóxicas. Otras especies son escasas o su disponibilidad es impredecible. De igual forma las necesidades y costumbres alimentarias de cada comunidad rural se relacionan con los recursos que tiene a su alcance en el lugar donde subsisten.

En México existen especies cuya potencialidad se encuentra en su buena fuente de proteína y grasa; sin embargo estos recursos no son aprovechados. Entre estas especies se encuentran las “almendras” (técnicamente son semillas) de la familia botánica Cucurbitaceae que incluye alrededor de 118 géneros y 825 especies. En México, está ampliamente representada, tanto por especies silvestres como cultivadas, las cuales constituyen una parte importante de la dieta básica tanto en las grandes ciudades, como en muchas regiones habitadas por población indígena. En los últimos años el conocimiento sobre las Cucurbitaceae mexicanas se ha visto enriquecido por una serie de trabajos de reciente publicación, que involucran, de manera importante, el aspecto florístico–taxonómico.

Los géneros nativos mejor representados en México son ***Cucurbita***, ***Sicyos***, ***Cyclanthera***, ***Apodanthera***, ***Echinopepon*** e ***Ibervillea*** (17).

Tabla 4.1. Análisis bromatológico de semillas de calabaza (g/100g muestra)

Planta nombre científico	Humedad	Cenizas	Grasa	Proteína	Fibra cruda	Hidratos de carbono ^c
<i>Cucurbita moschata</i> ^a	9.97±3.93	3.93±0.08	34.46±0.36	38.48±0.70	9.34±0.34	9.82
<i>Cucurbita moschata</i> ^b	--	4.1±0.08	35.87±0.41	40.10±0.73	9.73±0.35	10.20
<i>Cucurbita pepo</i> ^a	4.69±0.08	5.43±0.09	36.92±0.33	40.24±0.17	10.38±0.41	2.34
<i>Cucurbita pepo</i> ^b	--	5.69±0.11	38.74±0.34	42.23±0.18	10.88±0.43	2.45

Los valores obtenidos son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C.V. <5%

^aBase húmeda

^bBase seca

^cObtenido por diferencia
(Campos, 2006)

En este trabajo nos enfocaremos al estudio de la almendra de la calabaza hedionda (*Apodanthera undulata* A. Gray), también conocida como calabaza loca, calabaza amarga, calabacilla hedionda. Es una planta herbácea rastrera, perenne, monoica, áspera al tacto. Se extiende radialmente para formar matas, usualmente despidiendo un fuerte olor. El fruto es carnoso, de sabor amargo, con forma de un pequeño melón, de hasta 9 cm de largo y 5 cm de ancho, con frutos oblongo-elipsoides, verdes cuando inmaduros, amarillentos a anaranjados pálidos al madurar, epicarpo engrosado, mesocarpo carnoso-fibroso, blanquecino, de sabor muy amargo. Sus semillas son numerosas, aovado-elípticas, de 7 a 9 mm de largo y 5 a 7 mm de ancho, ápice truncado, base redondeada, lisas, el centro pardo claro a oscuro o rojizo (al menos al secar), los bordes bien definidos, de color crema (18).

En la **Figura 4.1** se ilustra la flor, hojas y fruto y en la **Figura 4.2** se muestran las semillas de la calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)



Figura 4.1. Flor, hojas y fruto de *Apodanthera undulata*



Figura 4.2. Semillas de *Apodanthera undulata*

Se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas y en E.U en Texas, Nuevo México y Arizona. Crece en matorrales xerófilos, así como también en pastizales, parcelas de cultivo abandonadas, y principalmente a orillas de caminos. Florece y fructifica de abril a octubre, aunque posiblemente este período pudiera extenderse a casi todo el año. Dada su frecuencia y afinidad hacia los ambientes perturbados, la planta no tiene problemas de supervivencia en la actualidad **(18)**.

Estas especies se consumen ocasionalmente en ciertas regiones de México, en Guanajuato la pulpa machacada de sus frutos se emplea para curar padecimientos urinarios, mientras que en Jalisco y Zacatecas sus semillas se consumen asadas o tostadas como botana y es por esa razón que se consume en baja proporción, siendo también discontinuo este consumo. Sin embargo, en las zonas consumidas, esta semilla podría formar parte de la dieta básica, como un complemento de la misma, de esta manera aumentando el consumo por dicha almendra **(16)**.

4.3 Análisis Proximal

Los alimentos se integran de tres principales grupos de componentes: los hidratos de carbono, las proteínas y las grasas; así como los derivados de los mismos. Hay además un grupo de elementos inorgánicos y un grupo diversificado de sustancias orgánicas presentes en proporciones relativamente pequeñas; estas incluyen sustancias como las vitaminas, las enzimas, los emulsificantes, los ácidos, los oxidantes, los pigmentos y los sabores. Hay también un componente siempre presente y muy importante: el agua. Todos estos compuestos están dispuestos de tal forma en los diferentes alimentos como para dar a estos su estructura, textura, sabor, color, y valor nutritivo **(25)**.

4.3.1 Humedad

Para el ser humano, la fuente más importante de agua está en todos los líquidos que ingiere, pero también la adquiere de diferentes alimentos. El agua es el principal componente de muchos alimentos, teniendo cada alimento su propio y característico contenido de este componente. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existen en dos formas generales: agua libre y agua ligada. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad y es estimada en la mayor parte de los métodos usados para el cálculo del contenido de agua. El agua ligada se halla en los alimentos como agua de cristalización o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos **(8,10)**.

El agua es el disolvente universal y gracias a esta característica tiene una infinidad de aplicaciones y de usos. Está implicada en muchas funciones como digestión, absorción, metabolismo, transporte, secreción, excreción, reproducción, lubricación de articulaciones, regulación de temperatura y reacciones bioquímicas que ocurren en nuestro cuerpo. De allí la importancia de determinar la calidad de agua que consume el ser humano **(22)**.

4.3.2 Hidratos de carbono

Los carbohidratos son un componente común en los alimentos, muy abundantes en la naturaleza, de fácil disponibilidad y baratos. Se encuentran en todas las formas de vida y se presentan en forma de azúcares, almidones y fibras. Sirven como almacén de energía, son combustibles e intermediarios metabólicos **(8,22)**.

Su valor energético es de considerar, ya que por cada gramo de hidratos de carbono se obtienen 4 kcal. Es una fuente de energía rápida para el organismo de tal forma que son necesarios para llevar a cabo funciones biológicas, los músculos e hígado pueden ocuparla para satisfacer demandas energéticas.

El almidón en los vegetales y el glucógeno en los animales son hidratos de carbono de almacenamiento que pueden ser utilizados rápidamente para formar glucosa, que es el combustible primario para liberar energía y llevar a cabo las funciones celulares **(22)**.

4.3.3 Grasas

Los aceites y las grasas son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos y básicamente les confieren las propiedades organolépticas y de nutrición. De forma general, la principal fuente de los aceites son las semillas oleaginosas, ya que las frutas y hortalizas contienen muy bajas concentraciones de lípidos, a excepción del aguacate, las nueces y las aceitunas **(22,29)**.

Las grasas están constituidas por átomos de carbono hidrogeno y oxígeno. Son una fuente importante de energía en la nutrición humana, pues cada gramo de lípidos genera 9 kcal. Esto se debe a su estructura química, que contienen una mayor proporción de átomos de carbono que las moléculas de hidratos de carbono y proteínas. Aportan ácidos grasos indispensables, influyen en gran medida sobre la sensación de saciedad tras la comida, transportan vitaminas liposolubles y hacen a los alimentos más apetitosos **(8,22)**.

4.3.4 Proteínas

Las proteínas juegan un papel fundamental en los sistemas biológicos. La diversidad funcional de las proteínas se debe especialmente a su composición química. Las proteínas son polímeros muy complejos, constituidos por 20 aminoácidos distintos, los aminoácidos se unen vía enlaces peptídicos, estos enlaces tienen parcialmente carácter de doble enlace, lo que incrementa la complejidad estructural de las proteínas **(8,22)**.

Las proteínas de la dieta humana proceden tanto de fuentes animales como vegetales, siendo las más importantes la carne, el pescado, la leche, los huevos, los cereales, las leguminosas, las semillas y los frutos en nuez. Cuando se consumen dichos alimentos, las proteínas son digeridas por enzimas hidrolíticas del tracto gastrointestinal y los aminoácidos liberados son absorbidos hacia la corriente sanguínea. Estos aminoácidos se utilizan en la síntesis de nuevas proteínas requeridas para el crecimiento, mantenimiento y reparación del cuerpo. Algunos de los aminoácidos requeridos se forman en el cuerpo a medida que se necesitan pero otros solo pueden obtenerse del alimento. A esos últimos se les conoce como aminoácidos indispensables y son arginina, lisina, treonina, triptófano, fenilalanina, metionina, histidina, leucina, isoleucina y valina **(24)**.

4.3.5 Fibra cruda

La fibra cruda constituye un índice de las sustancias presentes en los alimentos de origen vegetal resistentes a las enzimas del tracto intestinal del hombre. Es un residuo orgánico constituido fundamentalmente por celulosa, pectina, lignina, hemicelulosa, gomas y mucilagos, que constituyen junto con pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas, las estructuras celulares de los vegetales.

La fibra cruda se encuentra en verduras, cereales, leguminosas y en frutas, es responsable de la motilidad gastrointestinal con la reducción del tiempo de tránsito de los alimentos **(10)**.

4.3.6 Cenizas

Los seres vivos necesitan muchos minerales para sus procesos vitales y es importante reconocer que, al igual que proteínas, hidratos de carbono y grasas, no juegan papeles independientes en la nutrición humana, los minerales o nutrientes inorgánicos están interrelacionados y equilibrados unos con otros. Por ejemplo, el calcio y el fósforo participan en una relación definida en la formación de huesos y dientes **(24)**.

Todos los alimentos contienen elementos minerales formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos. La incineración para destruir toda la materia orgánica cambia su naturaleza; las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos carbonatos o reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros **(10)**.

El cuerpo animal requiere siete minerales en cantidades relativamente grandes, del orden de gramos: calcio, sodio, magnesio, potasio, fósforo y azufre y al menos siete en cantidades traza: cobalto, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno y zinc **(24)**.

4.4 Digestibilidad “*In vitro*”

La digestibilidad es una forma de medir el aprovechamiento de un alimento, que es la facilidad con que es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición.

La digestibilidad proteínica es uno parámetro utilizado para medir el valor nutricional debido a que no basta que la proteína se encuentre en altos porcentajes en el alimento sino que debe ser digerible para que pueda ser asimilada, y por consiguiente aprovechada por el organismo que lo ingiere.

Las proteínas de origen animal son más digeribles (95 a 100%) que las de origen vegetal (60 a 85%). Un decremento en la digestibilidad de las proteínas puede ser debido a su contenido de fibra, que actúa como una barrera física para la difusión

enzimática, además hace que el paso por el intestino sea más rápido por lo que disminuye el tiempo de absorción. La digestibilidad proteínica en las leguminosas también puede afectarse por factores tóxicos, los cuales disminuyen la absorción de la mucosa intestinal, así como factores antinutricionales que disminuyen la acción de las enzimas digestivas **(26)**.

4.5 Factores tóxicos y antinutrientales

Algunos alimentos, además de nutrimentos, contienen sustancias sin valor nutritivo de las cuales algunas pueden causar daños al organismo, en el caso de las plantas estas sustancias juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra sus depredadores naturales. Estas sustancias se pueden clasificar como:

Sustancias tóxicas: Son sustancias presentes en los alimentos capaces de producir a corto plazo, efectos dañinos, como una anomalía fisiológica, que no puede ser acentuada por una suplementación de nutrimentos; generalmente son xenobióticos de alto grado de toxicidad.

Sustancias antinutricionales: Disminuyen la disponibilidad o provocan una pérdida suplementaria de los nutrimentos esenciales, Estas sustancias provocan un desequilibrio, que se compensa por un aporte suplementario de los nutrimentos implicados, pero a largo plazo determinan la aparición de una patología particular **(5,20)**.

4.5.1 Ácido fítico

El ácido fítico es el éster hexafosfórico del ciclohexanol (ácido inositol hexafosfórico). Es una molécula altamente reactiva debido a que posee varios grupos fosfatos; la presencia de estos grupos facilita la formación de complejos con cationes.

El ácido fítico se considera un factor antinutricional debido a que su acción principal es la disminución de la biodisponibilidad de minerales divalentes como Ca, Co, Cu, Mg, Mo, Mn, Fe, y Zn con los que forma sales insolubles.

En cereales y leguminosas constituye aproximadamente entre 1% y 2% del peso de la semilla, incluso puede alcanzar cantidades de 3 a 6 % en algunos cereales. En cuanto a su localización en las leguminosas, este ácido está distribuido de manera uniforme en el cotiledón y asociado a estructuras proteínicas. En los cereales se encuentra en las capas externas como aleurona **(5,27)**.

El hombre no lo puede aprovechar porque el organismo no produce la enzima necesaria para hidrolizar el ácido fítico (fitasa) y liberar así el fósforo de este compuesto. Por otro lado el ácido fítico aumenta la pérdida de calcio y contribuye a la descalcificación del organismo, incluso con un aporte normal de calcio y vitamina D **(5)**.

4.5.2 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasa son sustancias antinutrimientales de naturaleza proteínica presentes en la mayoría de las leguminosas y cereales. Se caracterizan por inhibir la actividad de las proteasas, enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y péptidos permitiendo su asimilación, en este caso, específicamente de la tripsina. Dicha enzima es de suma importancia en la digestión de los humanos y animales monogástricos. Debido a la formación de un complejo enzima-inhibidor, el páncreas se ve estimulado a secretar en exceso enzimas proteolíticas debido a la falta de estas enzimas libres, lo que agranda e incrementa la demanda de la enzima por el órgano **(5,21)**.

Los inhibidores de tripsina son resistentes a las proteólisis, pero al ser sustancias de naturaleza proteínica existen numerosos métodos usados comúnmente para desnaturalizar o inactivar este tipo de sustancias, el más utilizado consiste en brindar un calentamiento adecuado al alimento que permita destruir o bien disminuir el efecto de los principales inhibidores de proteasas **(5)**.

Kakade et al; ha propuesto un método en el cual ha fijado un límite máximo permisible, de acuerdo a la actividad que presentan los inhibidores. Cuando la concentración de los inhibidores de tripsina sobrepasa las 10 UTI/mg (unidades de

tripsina inhibida), se considera al alimento no apto para alimentación humana, ya que no permite la adecuada biodisponibilidad de la proteína dietética **(21)**.

4.5.3 Saponinas

Las saponinas son glucósidos formados por sapogenina, que es un esteroide o un triterpeno enlazado a diversos azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos). Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal principalmente en hojas, raíces, tallos y flores **(15)**.

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. Tiene propiedades estornutatorias, irritan los ojos y la piel cuando se tiene contacto, son termorresistentes y forman complejos con el colesterol y otros hidroxiesteroles **(5,15)**.

Las saponinas crean lesiones gastrointestinales y producen hemólisis en diferentes tipos de glóbulos rojos. La hemólisis se define como la destrucción de los glóbulos rojos, que produce liberación de hemoglobina, el punto de ataque en la hemólisis es el colesterol de la membrana de los eritrocitos, al unirse a la saponina al colesterol se da lugar a la formación de canales en la membrana y/o una posible desnaturalización **(5)**.

4.6 Grasas y aceites

Las grasas comestibles son productos alimenticios cuyo componente principal es el glicerol triesterificado con ácidos grasos. Los lípidos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en el reino vegetal como en el reino animal, están constituidos por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque algunas veces también contienen en menor cantidad nitrógeno y fósforo. Tienen la particularidad de ser insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos como éter, cloroformo, hexano y otros disolventes no polares **(1,22)**.

Los ácidos grasos son compuestos de ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con un número par o impar de átomos de carbono, unidos por enlaces covalentes que forman ácidos grasos saturados, o con dobles enlaces, por lo general no conjugados, que forman ácidos grasos insaturados. Son una fuente importante de energía en la nutrición humana, pues cada gramo de lípidos genera 9 kcal. Forman parte de la estructura de las membranas celulares y de los sistemas de transporte de los nutrientes. Sirven como aislantes de impulsos eléctricos y térmicos, ya que al ser malos conductores de la temperatura la mantienen estables dentro del organismo **(22,29)**.

Se clasifican en función de su estructura química en tres grupos:

- Lípidos simples: Ésteres de ácidos grasos y alcohol. Grasas aceites y ceras.
- Lípidos compuestos: Moléculas integradas por una parte no lipídica y ácidos grasos, ambas partes unidos por enlaces covalentes; dentro de este grupo se incluyen los fosfolípidos, glucolípidos, esfingomielinas y lipoproteínas
- Lípidos derivados: Ácidos grasos libres, carotenoides, vitaminas liposolubles, esteroides y prostaglandinas.

Las grasas y aceites comestibles están formadas fundamentalmente por triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente triglicéridos. Las principales fuentes de grasa en la dieta son las carnes, los productos lácteos, el pollo, el pescado, los frutos secos, y las grasas y aceites vegetales. La mayoría de las verduras y frutas frescas contienen solo pequeñas cantidades de grasa. Constituye la fuente de energía más concentrada conocida, aportan ácidos grasos esenciales (que son precursores de importantes hormonas, prostaglandinas, entre otras). Influyen en gran medida sobre la sensación de saciedad tras la comida, transportan vitaminas liposolubles y hacen más apetitosos los alimentos aportándole propiedades sensoriales como textura y sabor **(22,29)**.

4.6.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son moléculas que contienen un grupo funcional carboxilo (-COOH) unido a una cadena alifática lineal de número par de carbono. Esta estructura les proporciona un carácter anfipático, donde el extremo carboxílico tiene características polares e iónicas y el otro extremo (-CH₃) tiene características apolares **(2,22,29)**.

Los ácidos grasos presentes en los aceites y grasas comestibles se clasifican por su grado de saturación en:

- Ácidos grasos saturados: Contienen solamente enlaces simples carbono-carbono, que se denominan saturados; y son los menos reactivos químicamente. El punto de fusión de estos ácidos grasos saturados aumenta con la longitud de la cadena. Este grupo está constituido principalmente con ácidos de 4 a 24 átomos de carbono. Los ejemplos más comunes son el ácido palmítico, butírico, láurico y esteárico **(29)**.
- Ácidos grasos insaturados: Estos ácidos contienen una o más insaturaciones o dobles enlaces carbono-carbono (C=C) a lo largo de la cadena alifática. 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. Cuando un ácido graso presenta un único doble enlace se le denomina monoinsaturado, como el ácido oleico y si contiene más de uno se le llama poliinsaturado, como el ácido linoleico, linolénico y araquidónico **(29)**.
- Ácidos grasos poliinsaturados: Dentro de este grupo los más interesantes son los ácidos linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, de cadena larga, que contienen respectivamente 2, 3, 4, 5 y 6 dobles enlaces. Los aceites de origen vegetal son las principales fuentes de ácidos linoleico y linolénico. El ácido araquidónico está presente en pequeñas cantidades en la manteca de cerdo, que contiene además cerca de un 10% de

ácido linoleico. Los aceites procedentes del pescado contienen grandes cantidades de una gran variedad de ácidos grasos de cadena larga con tres o más enlaces dobles, entre los que se incluyen los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico **(29)**.

4.7 Refinación de una grasa vegetal

Las grasas y aceites alimentarios proceden de plantas oleaginosas y fuentes animales. Las grasas de origen animal se obtienen normalmente por fusión o calentamiento de tejidos animales que permiten separarlos de las proteínas y de otros materiales naturalmente presentes. Este proceso de fundición puede realizarse con calor seco o con vapor. Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con disolventes o por medio de presión a la semilla **(1)**.

Los aceites y grasas obtenidos directamente tras la fundición o la extracción se denominan aceites y grasas “crudos” Contienen pequeñas cantidades de compuestos naturales que no son glicéridos como gomas, fosfátidos, proteínas, ácidos grasos libres, etc. Para eliminar estas sustancias y mejorar aspectos como estabilidad, color, turbidez, olor, sabor y otras características de importancia en un alimento, se realiza el proceso de refinación de la grasa cruda. No obstante, cabe señalar, que no todos los compuestos no glicéridos son materiales indeseables. Los tocoferoles, por ejemplo, desempeñan funciones importantes como: proteger al aceite de la oxidación y aportar vitamina E. El objetivo del procesado en este caso es tratar de preservar estas sustancias en el producto final **(3,29)**.

El proceso de refinación de un aceite se realiza para eliminar el contenido de ácidos grasos libres, proteínas, pigmentos y otras impurezas como fosfátidos y sustancias mucilaginosas. Es importante la reducción de ácidos grasos libres ya que son los causantes de la rancidez. Después de este proceso, el aceite es llamado “refinado” y tiene características y composición diferentes que el aceite “crudo” **(3,29)**.

Se pueden reconocer tres etapas básicas: desgomado, neutralización y blanqueo:

- **Desgomado**

El desgomado es el primer paso para la refinación. Los aceites crudos que poseen niveles relativamente altos de fosfátidos, sustancias mucilaginosas y otros compuestos hidrosolubles pueden ser desgomados antes de la neutralización, para eliminar la mayoría de estos compuestos. El proceso generalmente conlleva el tratamiento del aceite crudo con una cantidad limitada de agua para hidratar los fosfátidos y conseguir separarlos por centrifugación. El desgomado sirve además para obtener emulgentes naturales tan valiosos como la lecitina.

El desgomado es indispensable ya que los fosfátidos aun en concentraciones bajas se hidratan y precipitan, provocando mayor susceptibilidad a la oxidación y formación de espumas durante el calentamiento **(3,29)**.

- **Neutralización**

Generalmente el proceso de refinado se realiza sobre aceites vegetales para reducir el contenido en ácidos grasos libres y para eliminar otras impurezas como fosfátidos y proteínas y sustancias mucilaginosas. El proceso más importante de la refinación de una grasa, consiste en la neutralización, la cual se realiza normalmente con una solución alcalina. Se produce así una importante reducción de los ácidos grasos libres a través de su conversión en jabones solubles en agua. Después del refinado con álcali, la grasa o el aceite se someten a lavados con agua para eliminar el jabón residual.

Los aceites con un contenido bajo en fosfátidos pueden refinarse por medios físicos, por ejemplo, por arrastre de vapor, para eliminar los ácidos grasos **(8,13,29)**.

- **Blanqueo**

El término blanqueado se refiere al proceso de eliminación de compuestos que imparten color, para purificar aún más la grasa o aceite. Normalmente el blanqueado se realiza después del refinado o neutralización.

El método típico de blanqueado es por adsorción de las sustancias productoras de color en un material absorbente. El material más utilizado es tierra o arcilla de blanqueado activada con ácido, también llamada bentonita. Esta sustancia está

constituida principalmente por silicato aluminico hidratado. También se emplean la sílica gel y el carbón activado. Los pigmentos se absorben sobre la tierra o arcilla y, a continuación se separa del aceite por filtración.

Básicamente los principales pigmentos que se eliminan en esta etapa son las xantofilas, los carotenoides y las clorofilas **(8,13,29)**.

4.8 Factores fisicoquímicos para la caracterización de grasas y aceites.

Existe una gran variedad de análisis para evaluar a las grasas. Los resultados que nos dan los análisis son fundamentalmente sobre su composición, el origen e identificación de los aceites a través de sus atributos físicos y químicos, incluso indica el uso de las grasas.

- **Índice de acidez**

Es la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) necesario para neutralizar un 1 gramo de aceite. Se expresa generalmente como porcentaje de ácidos grasos calculados en términos de ácido oleico.

El índice de acidez es usado comúnmente como un indicador del grado al cual se han descompuesto los acilgliceroles del aceite por acción de las lipasas o por alguna otra causa, tales como el calor y la luz. Así mismo, como la rancidez es acompañada usualmente de una presencia relativamente alta de ácidos grasos libres, la determinación es usada como una indicación general de la condición y comestibilidad de los aceites **(7,10)**.

- **Índice de saponificación**

Es el peso en miligramos de KOH que se requieren para saponificar completamente 1 gramo de grasa. Este índice es inversamente proporcional al peso molecular de los ácidos grasos, por tanto, los ácidos grasos de bajo peso molecular tienen un alto índice de saponificación.

El índice de saponificación no es útil para la identificación como el índice de yodo, debido a que muchos aceites tienen índice de saponificación semejante. Pero es muy usado para detectar la posible adulteración de una grasa en particular con aceite de coco, aceite de nuez de coco y grasa de mantequilla, los cuales contienen una elevada porción de ácidos grasos de bajo peso molecular **(10)**.

- **Índice de yodo**

Es el número de gramos de yodo que son absorbidos por 100 gramos de grasa o aceite, 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 **(10,29)**.

- **Índice de refracción**

Está basado en la relación entre la velocidad de una onda luminosa en el aire y su velocidad en la sustancia grasa. En grasas y aceites es usada con frecuencia para dar idea sobre la identidad y pureza de las muestras, así como para seguir el curso de algunas reacciones. La relación entre el índice de refracción y la estructura y composición de los ácidos grasos y acilglicérolos puede resumirse en los siguientes puntos: **(28)**

- ✚ El índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta al crecer la cadena hidrocarbonada.
- ✚ El índice de refracción de grasas y ácidos grasos aumenta con el número de dobles enlaces en la molécula y al aumentar el grado de conjugación de éstos.
- ✚ El índice de refracción de los acilglicérolos simples es más alto que el del ácido graso correspondiente.

✚ El índice de refracción de los monoacilgliceroles es considerablemente más alto que el de los correspondientes triglicéridos.

- **Densidad o peso específico**

Es la relación entre el peso de un aceite y el peso del mismo volumen de agua se expresa en g/mL o g/cm³. El peso específico de los aceites vegetales es generalmente alrededor de 0.910 a 0.920 g/mL a 25°C. A medida que la temperatura aumenta, el peso específico del aceite o grasa desciende. Como los aceites y grasas son más ligeros que el agua, cuando las mezclas de agua y aceites o grasas se separan, el aceite o la grasa se sitúan por encima del agua. La densidad de los ácidos grasos y los acilgliceroles es mayor mientras menor sea su peso molecular y mayor su grado de insaturación **(13)**.

- **Punto de fusión**

El punto de fusión es la temperatura a la cual una grasa sólida se convierte en un aceite líquido. Los ácidos grasos, así como algunas grasas y aceites comunes, tienen valores de punto de fusión bien definidos. El punto de fusión es una propiedad física útil, ya que da idea sobre la identidad del compuesto. Los puntos de fusión de los ácidos grasos son directamente proporcionales a la longitud de la cadena hidrocarbonada y disminuyen al aumentar el grado de insaturación de los ácidos grasos **(23)**.

4.9 Perfil de ácidos grasos

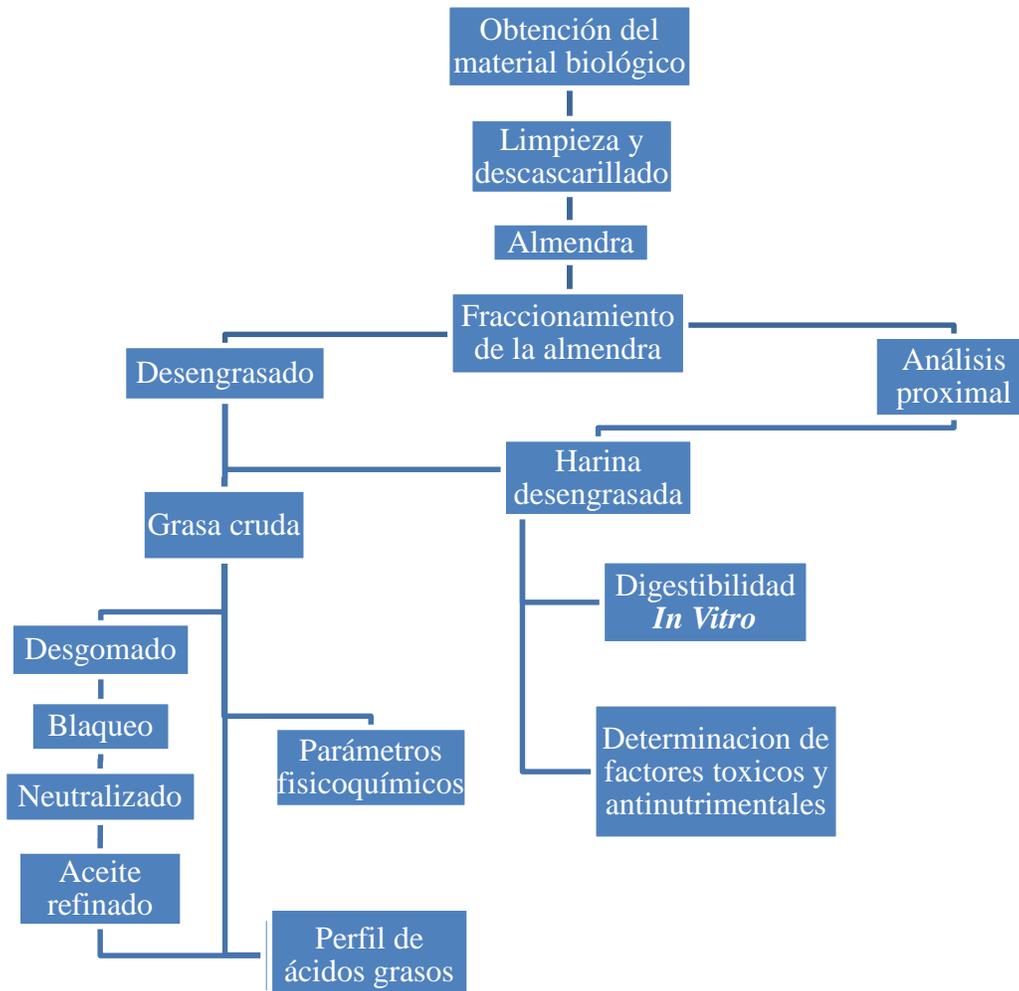
Se realiza un análisis de la muestra por cromatografía en fase gaseosa para identificar y cuantificar los ácidos grasos de un aceite, este análisis nos confirmará los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del aceite refinado o la grasa cruda. El método se basa en la separación y determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por el método de cromatografía gaseosa. Se realiza para grasas y aceites, que contengan ácidos grasos de 12 a 24 átomos de carbono.

En cromatografía de gases existen dos fases, una móvil y una estacionaria, la fase móvil es el gas acarreador, el cual arrastra la muestra a través 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. Cada compuesto, al salir de la columna, genera una señal en el detector, esta se procesa y genera un gráfico de separación de las sustancias. Los gráficos obtenidos se comparan con los obtenidos a partir de estándares comerciales, para identificar cada sustancia separada según el tiempo de retención.

La columna utilizada depende del equipo cromatográfico. Los detectores más utilizados son de ionización de flama y de conductividad térmica. El gas acarreador es un gas inerte, como el helio, el nitrógeno y el argón. Las temperaturas utilizadas pueden ser mayores a 210°C, principalmente si se trata de ácidos grasos de cadena larga **(3,6,14)**.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama general de trabajo



A continuación se da una explicación más detallada de cada uno de los pasos mostrados en el diagrama general de trabajo

5.2 Obtención del material biológico

Para la realización del proyecto se partió de la semilla integra de calabaza, de la especie *Apodanthera undulata* A. Gray.

- ✓ Procedencia: MÉXICO. ZACATECAS. Alrededor de Tlachichilla.
- ✓ Comercialización: Mercado Terán, Centro Comercial Agropecuario, Aguascalientes, AGUASCALIENTES.
- ✓ Parte: Semillas (Robert Bye 36548 & Edelmira Linares, 2010 Oct. 28)

5.3 Limpieza y descascarillado

El descascarillado se realizó separando la cascara de la almendra bajo un proceso manual, ya que debido a su alto contenido de grasa, y a que la cascara se encuentra adherida a la almendra no fue posible utilizar algún otro método.

5.4 Fraccionamiento de la almendra

El fraccionamiento de la almendra se realizó con un procesador de nivel doméstico de la marca Moulinex, modelo patentado, tipo 320, código 1-03, hecho en México por Visitor, S.A.

5.5 Análisis proximal

Tanto a la almendra como a la torta residual se le determinaron los siguientes parámetros bromatológicos: humedad, cenizas, grasa, fibra, proteína y carbohidratos asimilables (calculados por diferencia). Los cuales se realizaron de acuerdo a los métodos establecidos en el AOAC.

5.5.1 Determinación de humedad en estufa al vacío

▪ **Fundamento**

El método de secado se basa en la eliminación de agua libre en el alimento a temperaturas de 60 a 70°C, la determinación se realiza en una estufa de vacío, con el fin de abatir la temperatura de ebullición del agua **(11)**.

▪ **Material**

- Estufa con vacío LAB-LINE mod. 3620
- Balanza analítica Santorius
- Desecador de vidrio
- Charolas de aluminio

▪ **Procedimiento**

Se pone a peso constante la charola de aluminio en la estufa al vacío en donde se efectuara la determinación. Para el caso de charolas de aluminio, es suficiente colocarlas de 2 a 4 horas.

A continuación se pesa en la charola de aluminio a peso constante de 2 a 5 g, tratando de que presente la mayor superficie de evaporación e introducirla en la estufa que se encuentre entre 60 a 70°C. El tiempo de permanencia dentro de la estufa depende del material de que se trate, hasta peso constante

Realizar pesadas periódicas de las muestras, sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador donde permanecerán durante 15 minutos; para su posterior pesado en la balanza analítica; este último paso se repetirá hasta peso constante.

Se considera a peso constante una muestra cuando al pesarla en la balanza analítica solo se presente variación en la cuarta cifra decimal con respecto al valor anterior.

- **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 (en gramos)

P_f = peso de la charola con muestra después de secada (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)

5.5.2 Determinación de cenizas

- **Fundamento**

Es el producto de la eliminación del material orgánico a altas temperaturas (500°C), este residuo contiene el material inorgánico en forma de óxidos y sales **(11)**.

- **Material**

- Mufla THERMOLYNE, mod 1500
- Balanza analítica Santorius.
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio

- **Procedimiento**

Se ponen a peso constante los crisoles en la mufla a una temperatura de 500 °C, marcándolos con lápiz o cualquier sustancia que no se elimine en el proceso de incineración.

Pesar en el crisol a peso constante de 2 a 5 g de muestra y carbonizarla en una campana de extracción, a la flama de un mechero, hasta que no desprenda humo. Introducir el crisol a la mufla, la cual debe encontrarse entre 500 a 550°C. El tiempo de permanencia es muy variable, y depende del material que se esté trabajando.

Si después de la incineración se obtienen cenizas con manchas negras, es conveniente adicionarle unas gotitas de agua destilada a estas cenizas una vez que estén frías y volver a meter a la mufla, con el fin de obtener cenizas grisáceas o blancas homogéneas; lo que nos indica el punto final de esta determinación. Es conveniente dejar un poco el crisol antes de meterlo al desecador, para su posterior pesada en la balanza analítica.

- **Cálculos**

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

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

Donde:

Pf = peso del crisol con la muestra después de incinerada (en gramos)

Po = peso del crisol a peso constante (en gramos)

m = peso de la muestra (en gramos)

5.5.3 Determinación de grasa cruda

- **Fundamento**

La determinación del extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos, únicamente unos pocos de ellos tienen interés nutricional; aquellos que se encuentran en gran cantidad incluyen grasa verdadera, ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y provitaminas tales como son los carotenoides (11).

Se utilizó éter de petróleo para hacer la extracción.

- **Material y reactivos**

- Aparato de extracción Goldfish, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa de 22x80 mm
- Estufa de vacío LAB-LINE, mod. 3620
- Vasos de borde esmerilado, LABCONCO
- Éter de petróleo p. eb. 30 a 60 °C
- Balanza analítica

- **Procedimiento**

Para esta determinación es aconsejable trabajar con la muestra previamente seca; por lo cual a la muestra que se le haya determinado humedad, inmediatamente se trabaja en la determinación de grasa.

Dentro de un cartucho de celulosa se coloca de 2 a 5 g de muestra (dependiendo del contenido de grasa), se tapa con un pedazo de algodón. En este caso el cartucho de celulosa se coloca en el porta dedal y éste a su vez en el seguro metálico del aparato Goldfish; es un dispositivo comercial que consta de 6 unidades de extracción. A continuación se coloca aproximadamente 50 mL de solvente sobre el vaso de borde esmerilado, y este con la ayuda del anillo metálico con rosca se asegura al aparato de extracción.

Primero se abre la llave del agua para que circule ésta sobre los refrigerantes. Para el calentamiento en el aparato, se sube la parrilla hasta que esté en contacto con el vaso. Cuando se trabaja con éter, es conveniente colocar el control de calentamiento en intermedio. El período de calentamiento es variable, que va de 2 a 8 horas, dependiendo de la cantidad de grasa que contenga la muestra.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se bajan las parrillas de calentamiento, y se colocan los platillos de seguridad, se quita el anillo de rosca y se saca el porta dedal con el cartucho, sustituyéndose por el tubo recuperador volviéndose nuevamente a colocar el vaso para proceder a calentar, pero en este caso el disolvente quedará retenido en el tubo recuperador.

Una vez que el vaso esté libre de disolvente, se coloca en la estufa de vacío para la completa eliminación del disolvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipóide.

- **Cálculos**

Se debe tener los pesos del recipiente colector tanto antes como después del procedimiento de extracción. A esta determinación se le conoce como extracto etéreo.

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

Donde:

Pf = peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

Po = peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

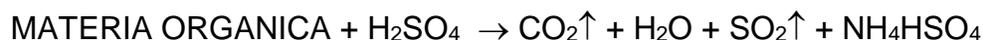
m = peso de la muestra seca (en gramos)

5.5.4 Determinación de proteína cruda

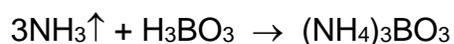
- **Fundamento**

El método empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos, es el método Kjeldahl y varias modificaciones se han desarrollado en la actualidad. El procedimiento consiste en la digestión que es una oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico, para formar dióxido de carbono, agua y liberar el nitrógeno como sulfato ácido de amonio, y en la destilación por la adición de lejía liberado como nitrógeno amoniacal y la titulación de este con ácido como se observa en las siguientes reacciones: **(11)**

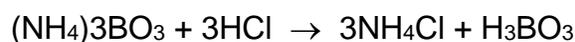
Digestión



Destilación



Titulación



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

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

Sales como sulfato de potasio o de sodio son comúnmente adicionadas para aumentar el punto de ebullición de la mezcla de digestión, sin embargo, la relación sal/ácido no debe ser muy alta, ya que se podría presentar la pérdida de amoníaco de la sal de amonio.

El amoníaco obtenido después de la digestión, es liberado por una gran variedad de métodos; siendo el más usado por acción de un álcali y atrapado el amoníaco liberado en una cantidad conocida de ácido valorado **(11)**.

▪ Material y reactivos

- Digestor TECATOR, mod. Ab-20/40
- Dispositivo de destilación TECATOR, Kjeltec Auto 1030 Analyzer.
- Tubos de digestión Tecator de 100 mL
- Mezcla digestiva (a)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de hidróxido de sodio al 40% (p/v)
- Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- ❖ Verde de bromocresol al 0.1% en metanol
- ❖ Rojo de metilo al 0.1% en metanol
 - Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

(a). Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada y una vez que esté bien disuelto, agregar 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4); a continuación adicionar con precaución 430 mL de ácido sulfúrico concentrado resbalando por la pared del recipiente. Agitar por aproximadamente 30 minutos

(b). Pesar 10 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 1 L; se adiciona agua y agitar hasta disolverlo, a continuación se adiciona 10 mL del indicador B (100 mg de verde de bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL del indicador de rojo de metilo (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de metanol). Se ajusta el color a un tono rojizo grisáceo con ácido o álcali según se requiera y se afora a 1 L con agua destilada.

▪ Procedimiento

Pesar de 10 a 100 mg de muestra (de acuerdo al contenido de proteína esperado) y colocarlos en el tubo de digestión, agregar aproximadamente 0.5 g de sulfato de sodio o potasio y 3 mL de mezcla digestiva; colocar el tubo en el digestor a una temperatura menor de 340°C por un espacio de 15 minutos y retirar los tubos del digestor y dejar que se enfríen para adicionarle 1.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y colocarlos nuevamente en el digestor que se encuentra a una temperatura de

370°C. Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión es translúcida con un ligero tono verde-azuloso. Una vez efectuada la digestión se deja enfriar y se procede a realizar la destilación.

Se le agregan al tubo de digestión 25 mL de agua destilada y se coloca en el destilador, descargando NaOH al 40%, El destilado se recibe en un recipiente que contenga 50 mL de ácido bórico, y la destilación se continúa hasta completar 100 a 125 mL. Una vez completada la destilación se continúa con la titulación del amoníaco atrapado en el ácido bórico con HCl 0.01N, hasta un vire de color verde esmeralda a un rosa claro.

- **Cálculos:**

Para realizar los cálculos es conveniente correr un blanco, donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa; trabajándolo de la misma forma que las muestras.

$$\%N_2 = \frac{(P - B) \times N \times meq \times 100}{m}$$

$$\%Proteína = \%N_2 \times F$$

Donde:

P = mL de la titulación de la muestra

B = mL de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq = miliequivalente de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra (en gramos)

F = factor de conversión (6.25)

Con respecto al factor de conversión se debe aclarar que este depende de cada tipo de muestra, el cual está relacionado al contenido de nitrógeno de la proteína en estudio.

5.5.5 Determinación de fibra cruda

▪ **Fundamento**

Dentro del interés analítico de un alimento, podemos dividir los hidratos de carbono de origen vegetal en dos partes: por un lado los hidratos de carbono no estructurales como son los almidones, azúcares y fructosanas; y por otro lado los hidratos de carbono estructurales, tales como la celulosa y hemicelulosa, que corresponden a lo que se denomina fibra cruda.

Por definición de acuerdo al método Weende, la fibra cruda es la pérdida por ignición del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico al 1.25% e hidróxido de sodio al 1.25% bajo condiciones bien especificadas, de una muestra previamente desengrasada.

Para la determinación de fibra de una muestra es necesario trabajar con una muestra desengrasada y someterla a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble para que por diferencia se calcule el contenido de hidratos de carbono no degradables **(11)**.

▪ **Material y reactivos**

- Aparato de digestión LABCONCO
- Embudo Buchner con malla metálica tipo California
- Vasos de Berzelius de 600 mL
- Estufa de vacío LAB-LINE, Mod. 3620
- Mufla THERMOLYNE, Mod. 1500
- Crisol de porcelana a peso constante
- Solución de H₂SO₄ al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Antiespumante (emulsión SIGMA-B)
- Alcohol etílico
- Silicato de aluminio (limpio y calcinado)

- **Procedimiento:**

Se pesan de 3 a 5 g de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de Silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. A continuación adicionar 200 mL de H₂SO₄ al 1.25% hirviendo, y unas gotas de antiespumante y colocarlo inmediatamente en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente; digerir por espacio de 30 minutos exactos. Después de dicho período, vaciar el contenido sobre un Buchner con malla metálica de 200 mesh (embudo tipo California) y realizar la filtración con ayuda de vacío; lavar el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL). Una vez lavado el residuo transferir nuevamente al vaso Berzelius, se le adicionan unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH 1.25% que este hirviendo y colocar inmediatamente en el aparato de digestión por exactamente 30 minutos. Transcurrido el tiempo filtrar en el mismo Buchner california y lavar el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 mL), hasta eliminar el álcali y quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido. Por último adicionar al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se transfiere de forma cuantitativa en un crisol de porcelana (a peso constante). Colocarlo en la estufa de vacío para su secado (aprox. 4 a 8 horas) y después pesar. A continuación se carboniza y se introduce en la mufla para su incineración, hasta peso constante.

- **Cálculos:**

Ya que se requiere de trabajar con muestras previamente desengrasadas, es recomendable usar la muestra a la que se le determino humedad y grasa; por lo cual el peso de la muestra, será el referido a peso inicial previo de las anteriores determinaciones

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

Donde:

Ps = peso crisol con residuo después de secado (en gramos)

Pc = peso crisol con residuo después de calcinado (en gramos)

m = peso de muestra (en gramos)

5.6 Digestibilidad “In vitro”

▪ Fundamento

Una primera evaluación predictiva de la calidad de una fuente proteínica, lo constituye la proporción de aminoácidos que son factibles de ser liberados, por acción del sistema enzimático “in vitro” que simule la acción de enzimas digestivas.

Durante la digestión de las proteínas por proteólisis son liberados protones de enlace peptídico; por lo tanto, el cambio en el pH estará directamente relacionado a la digestibilidad de la proteína, mientras más bajo sea el pH, más digerible será la proteína **(11)**.

▪ Material y reactivos

- Parrilla de agitación magnética CORNING
- Potenciómetro CORNING
- Vasos de doble camisa
- Baños de recirculación con agitación a 37°C y 54°C LAB- LINE INSTRUMENT conectados por mangueras.
- Solución A. Disolver 227,040 BAEE unidades de Tripsina (SIGMA T-0134) **(1)**, 1860 BAEE unidades de α -quimiotripsina (SIGMA C-4129) **(2)**, 0.0520 unidades de peptidasa L-Leucina β -naftalina (SIGMA P-7500) **(3)**, en 10 mL de agua.
- Solución B: Disolver 65 unidades de caseína de proteasa bacterial (SIGMA P-5147)**(4)**, en 10 mL de agua

- **Procedimiento**

Se parte de 10 mg de nitrógeno de la proteína (caseína) o muestra según sea el caso, a la cual se le añaden 10 mL de agua destilada en agitación a una temperatura de 37°C durante 1 hora, a continuación se mide el pH el cual se ajusta a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH 0.1N según sea necesario. Inmediatamente se le adiciona 1 mL de solución A, la cual debe permanecer 10 min exactamente en agitación a una temperatura de 37°C, transcurrido el tiempo, se añade 1mL de solución B, permaneciendo en agitación 9 minutos a una temperatura de 55°C. Al término, se coloca la muestra a 37°C durante 1 minuto y a los 20 minutos exactos de haber adicionado la solución A, se mide el pH.

El pH para la caseína control o referencia deberá ser de 6.42 ± 0.05 y sólo hasta que se obtiene este pH en la caseína de referencia, se podrá realizar la determinación de las muestras a ensayar.

- **Cálculos**

El % de digestibilidad se obtiene al sustituir el pH en la siguiente fórmula:

$$\%Digestibilidad = 234.84 - 22.56(pH)$$

5.7 Desengrasado

- **Fundamento**

El desengrasado de la muestra se realiza con un dispositivo tipo Soxhlet de capacidad para procesar aproximadamente 1 kg de material, ya que es más eficaz y con mayor capacidad, la extracción se realiza con hexano Q.P. Obteniéndose la muestra desengrasada y la grasa bruta por otro lado. El extracto hexanólico se refiere al conjunto de las sustancias extraídas con hexano. Incluye además de los ésteres de los ácidos grasos con el glicerol a los fosfolípidos, las lecitinas, los esteroides, las ceras, los ácidos grasos libres, los carotenoides, la clorofila y otros pigmentos **(10)**.

- **Material y reactivos**
 - Dispositivo tipo Soxhlet
 - Costalito de tela de manta
 - Rotavapor
 - Hexano (Q.P)

- **Procedimiento**

El desengrasado se llevó a cabo por el método Soxhlet, para el cual se montó el dispositivo adecuado, en donde se colocó la almendra fraccionada en un costal de tela de manta y fue insertado en el dispositivo (con capacidad de 1 kg). Para llevar a cabo la extracción de la grasa cruda se ocupó un rango de temperatura de 55 a 60°C utilizando hexano (Q.P) como disolvente, el procedimiento tuvo una duración aproximada de 30 horas.

Transcurrido el tiempo se dejó enfriar el dispositivo y se retiró el costal con la muestra desengrasada, dicha muestra se entendió en charolas para evaporar el disolvente durante 24 horas. Después de este paso se muele la muestra para obtener una harina fina, a esta harina se le realizó el análisis bromatológico. En el caso del disolvente presente en el matraz receptor se recuperó con el rotavapor, obteniendo así el aceite crudo, al cual se le insufló nitrógeno y se almaceno en congelación, con la finalidad de evitar autoxidación, hasta su posterior uso.

5.8 Determinación de factores tóxicos y antinutrimientales

5.8.1 Determinación de ácido fítico

- **Fundamento**

Este método emplea una columna de intercambio iónico, con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. A su vez la determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo

FeCl₃-ácido sulfosalicílico (reactivo de Wade) debido al enlace del Fe (III) con el ácido fítico (9).

▪ **Material y reactivos**

- Resina de intercambio iónico
- Fibra de vidrio
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star
- Centrifuga Sorvall RC5C Plus
- Agitador mecánico tipo vortex LAB-LINE
- Tubos de centrifuga de 15 mL
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10uv Scanning
- HCl 0.65N
- NaCl 0.1N
- Jeringas de 3 mL
- Parrilla de agitación múltiple Wisestir
- Solución estándar. Prepara una solución concentrada de ácido fítico que contenga 1 mg de ácido fítico por mililitro: pesar exactamente 0.080 g de sal de fitato de sodio, considerando la pureza y humedad del reactivo y aforar con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL. A partir de la solución concentrada preparar las soluciones de los estándares de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL.
- Reactivo de Wade. Pesar 0.03 g de FeCl₃ * 6H₂O y 0.3 g de ácido sulfosalicílico, y disolverlos en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL. El reactivo debe ser preparado en el momento de hacer la determinación espectrofotométrica, y una vez adicionado a las muestras debe leerse en menos de 30 minutos.

▪ **Procedimiento**

- a) Preparación de las columnas de intercambio iónico.

Pesar aproximadamente 0.5 g de resina de intercambio aniónico e hidratarla con 0.6 mL de agua desionizada. Al mismo tiempo preparar las columnas utilizando jeringas de 3 mL e introduciéndole en el fondo de la misma un tapón de fibra de vidrio (cuidando de no poner en exceso) y colocarla sobre un soporte. Agregarle a la columna la resina

hidratada cuidando que quede asentada uniformemente. Una vez que la resina este bien empacada en la columna, adicionarle 15 mL de NaCl 0.7N y posteriormente lavar con 30 mL de agua desionizada, cuidando de dejar líquido suficiente (aproximadamente 0.5 cm de altura arriba de la resina empacada) para que no se seque la resina y quede lista para usarse.

b) Extracción de ácido fítico.

Pesar 1 g de muestra (el cual debe contener menos de 5% de grasa), se coloca dentro de un vaso de precipitado de 50 mL y se le adiciona 20 mL de HCl (0.65N), el pH de la suspensión debe de estar entre 0 y 1. Esto es necesario para disociar al fitato de complejos con minerales y proteínas. Se somete a agitación vigorosa durante 2 horas a temperatura ambiente y el extracto obtenido se transfiere cuantitativamente a unos tubos para centrifugarlos a 12000 r.p.m. a temperatura ambiente por 30 minutos, una vez transcurrido ese tiempo se colecta el sobrenadante.

c) Purificación por columna de intercambio iónico.

Se toma una alícuota de los sobrenadantes colectados y se diluye con agua desionizada para disminuir la concentración total del anión. Se recomienda la dilución de 1:25 para alimentos que contengan 1% o más de ácido fítico, la dilución de 5:25 en caso contener menos. Se ajusta el pH de la alícuota diluida a 6 con NaOH 1N. Posteriormente tomar 10 mL de la alícuota diluida y transferir cuantitativamente a la columna (previamente preparada). Lavar con 15 mL de NaCl 0.1N (para eliminar el fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol) y desechar el agua de lavado. Eluir el fitato con 15 mL de NaCl 0.7N y colectar el extracto purificado.

d) Determinación espectrofotométrica.

Se toma 3 mL de agua desionizada (utilizada como blanco), y 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio conteniendo de 5 a 50 µg/mL en agua desionizada), además, 3 mL de los extractos purificados a través de la columna, los cuales fueron previamente ajustados a pH 3 y se les adiciona 1 mL de reactivo de

Wade, se somete a agitación en un vortex por 5 segundos y se lee la absorbancia a 500 nm.

Se utiliza una celda con agua desionizada para calibrar el espectrofotómetro en cero, se lee la absorbancia del blanco, las muestras problema y los estándares, a cada una de estas se le resta por separado el blanco para así obtener la absorbancia corregida respectiva. Realizar la curva patrón, regresión lineal. Interpolar los datos y obtener la concentración de ácido fítico presente en las muestras.

▪ Cálculos

- ❖ Obtener el promedio de la absorbancia del blanco.
- ❖ Hacer la curva de calibración: μg de ácido fítico sobre mililitro vs absorbancia corregida.
- ❖ Absorbancia corregida= Absorbancia blanco – Absorbancia muestra

$$\frac{g \text{ muestra}}{mL \text{ NaCl}} = \left(\frac{g \text{ muestra}}{20 \text{ mL HCl}} \right) \left(\frac{1 \text{ mL HCl}}{25 \text{ mL H}_2\text{O}} \right) \left(\frac{10 \text{ mL H}_2\text{O}}{15 \text{ mL NaCl}} \right)$$

$$\frac{\mu\text{g} \text{ á. fítico}}{mL \text{ NaCl}} = \frac{\text{Absorbancia corregida} - b}{\text{pendiente}}$$

$$\% \text{ á. fítico} = \left(\frac{\mu\text{g} \text{ á. fítico}}{mL \text{ NaCl}} \right) \left(\frac{1g}{1000000 \mu\text{g}} \right) \left(\frac{mL \text{ NaCl}}{g \text{ muestra}} \right) * 100$$

5.8.2 Determinación de inhibidores de tripsina

▪ Fundamento

La técnica es la utilizada por Kakade y colaboradores, la cual se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso (solución de NaOH 0.01N), de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto directo o diluido se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá coloración, al

ser hidrolizado por la enzima, la cual se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm donde la coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra **(12)**.

▪ **Material y reactivos**

- Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star
- Parrilla de calentamiento y agitación múltiple Wisestir
- Agitador mecánico vortex LAB-LINE
- Baño regulador de temperatura GRANT
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10uv Scanning
- Papel filtro Whatman #1
- NaOH 0.01N.
- HCl 0.001N.
- Hidroximetil-amino-metano (TRIS).
- Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA)
- Solución amortiguadora para TRIS (6.05 g de TRIS (hidroximetil-amino-metano P.M. 121.14) y 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 900 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 8.2 y se afora a 1 L).
- Solución α -N benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida-HCl (BAPNA) (100 mg de BAPNA se disuelven en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluye a 250 mL con amortiguador TRIS previamente calentado a 37°C) PREPARADA EL MISMO DIA Y CUANDO ESTE EN USO DEBE MANTENERSE A 37°C.
- Solución estándar de tripsina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pesar con mucha exactitud 4 mg de tripsina bovina y se disuelve en 200 mL de HCl 0.001). Debe ser almacenada en refrigeración donde puede durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.
- Ácido acético al 30% (30 mL de ácido acético en 100 mL de agua desionizada)

▪ **Procedimiento**

a) Preparación del extracto

Se pesa 1 g de muestra finamente molida y desengrasada y se le adiciona 45 mL de NaOH 0.01N se ajusta el pH de ésta suspensión a 9.6 ± 0.2 y se afora con agua a 50 mL. Se transfiere a un vaso de precipitados y se agita la suspensión mecánicamente por espacio de dos horas y media a 300 rpm. Después de dicho tiempo se deja media hora en reposo, y por simple decantación se separa el sobrenadante eliminando el residuo insoluble. El sobrenadante se diluye hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60% (esto es indispensable para reducir la desviación estándar relativa).

b) Determinación de la actividad

A continuación en el cuadro siguiente se observa cómo se trabajó una serie de tubos para determinar la actividad inhibitoria de la muestra

Clave	Extracto (mL)	Agua (mL)	Tripsina (mL) a 37°C	Ácido Acético 30% (mL)		BAPNA (mL) a 37°C		Ácido Acético 30% (mL)
B1	1.8	0.2	2	1	Baño a 37°C 10 min. exactos	5	Baño a 37°C 10 min. exactos	--
1	1.8	0.2	2	--		5		1
B2	1.4	0.6	2	1		5		--
2	1.4	0.6	2	--		5		1
B3	1	1	2	1		5		--
3	1	1	2	--		5		1
B4	0.6	1.4	2	1		5		--
4	0.6	1.4	2	--		5		1
B5	0	2	2	1		5		--
5	0	2	2	--		5		1

Mezclar perfectamente el contenido de los tubos después de cada adición.

La reacción enzimática se detiene por la adición del ácido acético al 30%; si se enturbia o forma un precipitado, se filtra el contenido a través del papel filtro Whatman #1.

La lectura de cada tubo se realiza en el espectrofotómetro a 410 nm. Previamente se ajustó a 100% de transmitancia con el respectivo blanco de cada dilución.

▪ Cálculos

Una unidad de tripsina (U.T.) es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción descritas por Kakadé y colaboradores. La actividad de los inhibidores de tripsina se expresa en términos de Unidades de Tripsina inhibida (U.T.I.) la lectura de absorbancia (A), puede ser transformada directamente en unidades de tripsina: $U.T. = A \cdot 100$

Ya que se tiene una serie de diluciones, se tendrá a su vez una serie de valores de U.T, es conveniente determinar el % de inhibición para lo cual se toma como referencia el tubo 3 que es el contiene 1 mL de extracto. Si el % de inhibición no cae dentro del rango de 40 a 60% de inhibición es necesario hacer un ajuste del extracto para que cumpla este requisito.

$$\%Inhibicion = \frac{R - A_3}{R} * 100$$

Donde:

R= U.T. de la referencia (tubo con 0.0 mL de extracto).

A₃= U.T.I. del tubo 3 (tubo con 1.0 mL de extracto).

Para obtener los valores correspondientes de U.T.I. se restan los valores de U.T. al dato de referencia y posteriormente se puede calcular el valor de U.T.I. /mL de cada una de las alícuotas.

$$U.T.I. = R - U.T.$$

Donde:

R= valor de unidades de tripsina de la referencia.

U.T = Unidad de tripsina de cada tubo de la muestra analizada.

Cuando se grafica la actividad inhibitoria (U.T.I. /mL) vs mL de extracto de prueba se observa una correlación lineal negativa de donde se puede obtener el valor extrapolado que corresponde al valor cero de la solución inhibitoria.

Este valor extrapolado, es el más cercano a la actividad inhibitoria real o verdadera (si se refiere uno al inhibidor de soya del tipo Kunitz).

Si la correlación lineal no es satisfactoria ($r < 0.9$), se puede trabajar con un valor promedio de la serie de alícuotas y reportar en U.T.I./mL.

$$U.T.I./mL = UTI/mL \text{ de extracto.}$$

Es conveniente reportar en unidades de tripsina inhibida con respecto a 1 mg de muestra:

$$U.T.I./mg \text{ de muestra} = B * F * N$$

Donde:

B= Valor extrapolado o promedio en U.T.I. /mL.

F= Factor de dilución, el cual depende de las diluciones realizadas. Cuando se tiene el extracto directo F=1

N= Concentración de la muestra mL/mg de muestra.

5.8.3 Determinación de saponinas

▪ Fundamento

La detección de saponinas en extractos de plantas se lleva a cabo con una técnica de diluciones seriadas en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la hemólisis de los glóbulos rojos de la sangre de humano.

El método de microtitulación es rápido y requiere de una mínima cantidad de muestra. Se necesita sensibilizar los glóbulos rojos lavados con una solución de tripsina, ya que la sensibilidad de los eritrocitos se mejora considerablemente con este tratamiento **(19)**.

▪ Material y reactivos

- Extractor de grasa Goldfish, LABCONCO
- Cartuchos de celulosa Whatman 22 x 88 mm
- Rotavapor Buchi 461 Water Bath
- Centrifuga EPPENDORF 5702
- Incubadora bacteriológica Precision Gravity Convection Incubator 2EG
- Espectrofotómetro COLEMAN, Junior II-A
- Tubos de centrifuga de 15 mL con graduación
- Jeringa de 5 o 10 mL
- Microtiter kit (Cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Filtro de vidrio poroso
- Solución de metanol (RA) y agua destilada al 85% (v/v)
- Sangre humana "O" (de género masculino, desfibrinada y lavada)
- Solución anticoagulante (a)
- Solución salina al 0.9%
- Tripsina de páncreas de porcino al 0.1%
- Solución de 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:

Sol. Heparina: Sangre = 15 a 20_ UI: 1 mL de sangre.

Sol. Citrato: Sangre = 0.1 mL: 1 mL de sangre.

Sin embargo si la sangre no se va a utilizar de inmediato y se desea trabajar en refrigeración por unos días, lo más conveniente es usar como solución anticoagulante, la solución ELSEVER, en la siguiente proporción; 1:1.

- (b) Se usa tripsina de páncreas de porcino 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 (saponinas tipo esteroidal) y un extracto de quillaza (saponina tipo triterpenoide).

▪ **Procedimiento**

a) Preparación del extracto

Una vez que se tiene la muestra molida y desengrasada se pesan 7.5 g en el cartucho de celulosa, se coloca en el 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 aproximadamente de 65°C, la muestra se redisuelve con solución salina 0.9% y se filtra con ayuda del vacío para aforar a 100mL con la misma solución. Si no se realiza la determinación de inmediato, el extracto se debe congelar para evitar contaminación.

b) Preparación del paquete de eritrocitos

Extraer la sangre humana, aproximadamente 5 mL, empleando en set de recolección de sangre, que contenga anticoagulante. Se agito suavemente para la completa homogeneización de la sangre con la solución (no interrumpir hasta el momento de diluirla).

La sangre con anticoagulante se trasvasa a tubos de centrifuga para lavarla (3 veces) con solución salina 0.9%, la relación sangre: solución es de aproximadamente 1:5.

Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. Después del último lavado se mide en el tubo de centrifuga, la cantidad del paquete de eritrocitos y se diluyen el 4% para lo cual se agregan por cada 1 mL de glóbulos rojos 24 mL de solución salina al 0.9%.

c) Sensibilización de eritrocitos

A la solución al 4% de eritrocitos, se agregó por cada 10 mL de solución, 1 mL de solución de tripsina al 0.1% en solución salina, fueron colocados en una incubadora durante 1 hora a 37°C y al término de este tiempo la solución de eritrocitos se distribuyó nuevamente en tubos graduados para centrífuga y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos con el fin de eliminar la tripsina. Finalmente se sometieron los eritrocitos a 3 lavados con solución salina al 0.9% de la misma manera mencionada en el lavado de la sangre.

Después del último lavado el paquete de eritrocitos fue llevado a una suspensión al 5% con solución salina al 0.9%, para lo cual se consideró que por cada 1 mL de eritrocitos se agregaron 24 mL de solución salina.

d) Ajuste de la suspensión de eritrocitos

Se tomó 1 mL de la suspensión de eritrocitos y se agregaron 4 mL de solución salina 0.9% en una celda de vidrio, midiéndose inmediatamente el valor de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm utilizando un adaptador de celdas que permitiera el paso de 1 cm² de luz, (el espectrofotómetro fue ajustado a 100% de transmitancia utilizando como blanco solución salina al 0.9%). La lectura apreciada fue de 25 ± 1% de transmitancia, considerándose adecuada para la determinación. (El valor de % de transmitancia debió estar en el rango de 24 a 29% T)

e) Microtitulación

En las placas tipo "U" se colocaron, en cada pozo de cada hilera 50 µL de solución salina al 0.9% con un pipetero de gota (es necesario evitar tocar las paredes de los pozos).

Posteriormente se llenó el microdilutor con 50 µL del extracto y se procedió a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra (ocupando 2 hileras), después se llenó el microdilutor con 50 µL de extracto de referencia y se realizaron 12 diluciones sucesivas. (Ocupando 1 hilera).

Finalmente en cada pozo se colocaron 50 μL de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada. Las placas se rotaron en forma circular y se introdujeron a la incubadora a 37°C por 1 hora.

f) Lectura de placas

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colocó la placa en el dispositivo de lectura y se reportó la máxima dilución que se presentó hemólisis.

▪ **Cálculos**

Las unidades asignadas en el método se definieron como unidades hemolíticas por g de muestra (U.H/mg de muestra), lo cual se explica de la siguiente forma.

La mezcla de saponinas triterpenoide y esteroide (1:1) tienen una concentración de 0.5% en la solución estándar, si en la microtitulación se toman 0.005 mL, se tiene entonces una concentración de 0.25 mg de saponina en dicho volumen. En una dilución seriada se tiene la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de extracto}/_{2^t}$$

Donde: t = título de la hemólisis

Si la solución estándar de saponinas tiene un valor promedio de 8 para el título 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 1 μg del estándar de saponinas es equivalente a 10 Unidades Hemolíticas (U.H.).

El cálculo para las muestras es: La concentración del extracto de la muestra para todos los casos es de 75 mg/mL, en 0.05 mL tenemos 3.7 mg; para un título de hemólisis con valor de 1 se tiene la siguiente concentración:

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

Por definición se obtiene las Unidades Hemolíticas por mg de muestra (U.H. /mg de muestra).

$$10 \text{ U.H.} / 1.87 \text{ mg de muestra} = 5.3 \text{ U.H.} / \text{mg de muestra}$$

5.9 Refinación de la grasa

La refinación de una grasa o aceite cruda se realiza para eliminar sustancias indeseables, como ácidos grasos libres, gomas, pigmentos, proteínas y productos de degradación. Este proceso mejora las características del aceite, para obtener un aceite agradable para consumo **(3,29)**.

5.9.1 Desgomado

▪ Fundamento

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 **(3,29)**.

▪ 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 (H₃PO₄) al 0.1%

▪ Procedimiento

Se calentó el aceite crudo con agitación suave, se añadió 3 % de H₃PO₄ 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.

5.9.2 Neutralización

▪ Fundamento

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 (29).

▪ 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 mL de la misma. 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.

5.9.3 Blanqueo

▪ Fundamento

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 **(3,29)**.

▪ 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 Whatman #52 y vacío.

5.10 Parámetros fisicoquímicos

5.10.1 Densidad

▪ Fundamento

Se fundamenta en la determinación de la masa por unidad de volumen expresada en g/cm^3 , a una temperatura dada. La densidad relativa es la densidad de una sustancia con respecto a la densidad del agua, bajo las mismas condiciones (10,13).

▪ Material y reactivos

- Picnómetro de 10 mL
- Termómetro de mercurio
- Baño de temperatura controlada GRANT Mod. SE-10
- Estufa de vacío
- Balanza analítica Extend Sartorius
- Etanol
- Agua destilada
- Mezcal 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 a 10 minutos en 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°C durante 30 minutos para secarlos 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 ± 0.5 °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.

▪ **Cálculos**

La densidad relativa del aceite se calcula dividiendo la densidad del aceite entre la densidad del agua, obtenidas a la misma temperatura (25 °C)

5.10.2 Índice de Saponificación

▪ **Fundamento**

El aceite se saponifica calentándolo con un exceso de álcali cáustico alcohólico. La cantidad de álcali consumida se calcula valorando por retroceso con ácido clorhídrico.

El índice de saponificación es inversamente proporcional a la medida de los pesos moleculares de los ácidos grasos de los glicéridos presentes en el aceite o grasa **(10)**.

▪ **Material y reactivos**

- Parrilla de calentamiento
- Refrigerante
- Probeta graduada de 50 mL
- Matraces de bola de fondo plano de 250 mL
- Matraz aforado de 1 L
- Mortero

- Oxido de calcio
- Etanol
- Ácido clorhídrico 0.5 N
- Solución indicadora de fenolftaleína al 1% p/v en metanol
- Solución etanólica de KOH (Se trituro 40 g de KOH en un mortero junto con 45 g de CaO y se mezcló. De 1 L de etanol, se añadió 100 mL a la mezcla en el mortero y transferir cuantitativamente la mezcla con ayuda de varias porciones de etanol a un matraz aforado. Se agregó el etanol restante al matraz y se aforo a un litro, se agito vigorosamente durante 5 min y se invirtió el matraz dejando reposar la solución, se repitió la agitación varias veces durante el día, se dejó reposar durante toda la noche. Al día siguiente se filtró la solución para eliminar el CaO y se guardó en un frasco con tapón de vidrio).

▪ Procedimiento

Montar un equipo de reflujo en la campana, colocar en el matraz de bola de fondo plano con boca esmerilada 0.5 g de grasa y adicionar 50 mL de solución etanólica de KOH. Llevar a ebullición suave y mantener aproximadamente por 30 min. Se dejó enfriar y se tituló con HCl 0.5 N usando fenolftaleína (0.1%) como indicador. Se llevó a cabo un blanco bajo las mismas condiciones que la muestra.

▪ Cálculos

$$\text{Índice de Saponificación} = \frac{28.05 \times (B - S)}{\text{g de muestra}}$$

Donde:

B= ml de HCl 0.5N gastados en blanco

S= ml de HCl 0.5N gastados en muestra

28.05= 56.1 (P.M. de KOH) x 0.5N

5.10.3 Índice de Acidez

▪ Fundamento

La acidez titulable es una medida del contenido de ácidos grasos libres en una muestra. Dicho dato es indispensable para llevar un adecuado proceso de neutralización, además sirve como prueba de pureza y en ocasiones permite deducir reacciones de degradación que se hayan producido **(7)**.

▪ 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, hasta obtener una coloración levemente rosada. Se pesó con balanza analítica de 1 a 10 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

$$\text{Índice de Acidez} \left(\frac{\text{mg KOH}}{\text{g de muestra}} \right) = \frac{\text{ml KOH} \times 0.1 \text{ N} \times 56.1}{\text{g de muestra}}$$

Donde:

0.1 N = Normalidad del KOH

56.1 = Masa molecular de KOH

5.10.4 Índice de Refracción

▪ Fundamento

Es una constante física para medir el fenómeno mediante el cual, cuando un rayo de luz monocromática pasa a través de una sustancia transparente a otra de diferente densidad, éste se desvía o refracta, excepto cuando penetra perpendicularmente a la superficie que separa ambas sustancias. El índice de refracción de una sustancia dada con la longitud de onda del rayo de luz refractado **(13,28)**.

▪ Material y reactivos

- Refractómetro Bausch & Lomb

▪ Procedimiento

Se emplea un refractómetro, se realiza la prueba de 20 a 25°C para aceites y a 40°C para grasas.

Colocar la muestra en los prismas del refractómetro de campo, adecuadamente calibrado. Cierre la tapa, suavemente, la muestra debe cubrir completamente la superficie del prisma.

Mirar la escala a través de la “mirilla”. Leer en la escala, en la intersección de los campos. En caso de que la separación de los campos no sea clara, ajustar moviendo la base del objetivo.

Eliminar la muestra del prisma, utilizando un papel suave.

5.10.5 Punto de Fusión

▪ Fundamento

Las grasas y aceites naturales, no tienen punto de fusión neto y definido, este procedimiento lo realiza gradualmente pasando de un estado sólido a uno líquido. Por tal razón, el punto de fusión dependerá de las condiciones en que se realice la solidificación de la muestra **(10,13,28)**.

- **Material y reactivos**

- Capilares de vidrio (1mm de diámetro interno)
- Termómetro graduado de -10 a 100°C

- **Procedimiento**

Se llenó el capilar con la muestra hasta tener una columna de aproximadamente 1.5 cm de longitud. Se cerró el capilar a la flama cuidando de no quemar la muestra. Se guardó en condiciones de congelación (-4 a -10°C) durante 16 horas.

Se tomó el capilar con sumo cuidado y se sujetó al termómetro de tal forma que el fondo de la columna con muestra coincidió con el bulbo del termómetro. Se suspendió en un recipiente a la mitad de agua con hielo. Como no se tenía una idea aproximada del punto de fusión de la muestra, se comenzó la determinación a -10°C por debajo del mismo. La temperatura comienza a disminuir gradualmente, sin necesidad de calentamiento. Se tomó como punto de fusión la lectura en el termómetro en la cual la muestra pasa de sólido a líquido. Generalmente, éste no es un punto en la escala, sino más bien un rango, en donde se reporta el rango observado.

5.10.6 Índice de Yodo

- **Fundamento**

Los ácidos grasos insaturados presentes en la grasa, se unen mediante sus dobles enlaces a una cantidad definida de monobromuro de yodo (reactivo de Hanus), el cual es añadido en exceso. La cantidad de halógeno restante se titula con solución valorada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y por diferencia con un blanco se obtiene la cantidad de monobromuro de yodo absorbido por la muestra **(10,29)**.

- **Material y reactivos**

- Matraces Erlenmeyer con tapón de vidrio de 250 mL.
- Buretas graduadas de vidrio de 50 mL.
- Balanza analítica.

- Ácido acético glacial
- Yodo
- Tiosulfato de sodio 0.1 N (a)
- Solución de yoduro de potasio al 15% p/v
- Solución de almidón al 1% p/v.
- Cloroformo.
- Ácido clorhídrico 1N.
- Dicromato de potasio.

(a) Preparación de solución de tiosulfato de sodio 0.1N. Disolver 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada. Llevar a ebullición moderada y mantener durante 5 minutos. Transferir en caliente a un frasco contenedor (de preferencia ámbar) previamente limpiado con mezcla crómica y enjuagado con agua destilada hervida. Guardar en la oscuridad en un lugar templado.

Nota: no regresar residuos de reactivo al frasco

Para valorar el tiosulfato se pesó en una balanza analítica 0.2000 a 0.2300 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (secado a 100°C durante 2 horas) en un matraz Erlenmeyer, se disolvió 80 mL de agua destilada junto con 2 g de KI y se añadió 20 mL de HCl 1N y se guardó inmediatamente en la oscuridad durante 10 minutos. Se tituló con la solución de tiosulfato, añadiendo unas gotas de solución indicadora de almidón al 1% hacia el final de la valoración. Calcular la normalidad de la solución de tiosulfato la cual debe ser cercana a 0.1N.

▪ Procedimiento

Se pesó 0.25 g de aceite en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio y se disolvió en 10 mL de cloroformo (CHCl_3), con la bureta graduada se añadió 25 mL de solución de Hanus y se dejó reposar en la oscuridad durante 30 minutos, con agitación ocasional. Para resultados más precisos, es conveniente cumplir con los mismos tiempos de drenado de bureta y estancia en la oscuridad en todas las determinaciones.

Se añadió 10 mL de la solución al 15% de KI; y se agitó vigorosamente y añadir 100 mL de agua destilada recientemente hervida y enfriada, cuidando de lavar cualquier residuo que quede en el tapón de vidrio. Se tituló con solución de tiosulfato 0.1N hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca, se añadió unas cuantas gotas de solución de almidón al 1% y se continuo titulando hasta que el color naranja de la solución desaparezca. Hacia el final de la titulación, se tapó el matraz y se agitó vigorosamente para que el yodo remanente en solución en CHCl_3 sea también titulado.

Se llevó a cabo 2 blancos bajo las mismas condiciones.

- **Cálculos**

$$\text{Indice de yodo} = \frac{(B - S) \times N \times 12.69}{g \text{ de muestra}}$$

Donde:

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

12.69= miliequivalentes de yodo

5.11 Perfil de ácidos grasos

- **Fundamento**

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 (23).

▪ 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 Perkin Emer Auto System HP 5890 con detector de ionización de flama
- Columna capilar Supelco 24136 OMEGAWAX 250, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m
- Jeringa de inyección para cromatógrafo de 1 mL
- Indicador verde de bromocresol 0.05% en metanol
- Solución de KOH 10% p/v en metanol
- Solución de HCl 1:1 con 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: Mirístico C14, Palmítico C16, Esteárico C18, Oleico C18:1, Linoleico C18:2, Linolénico C18:3)

▪ Procedimiento

Se lavó todo el material de vidrio 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 10% en metanol y 2 mL de trifluoruro de boro, se agitó en el vortex y se colocó en baño maría a temperatura de ebullición durante 15 minutos y posteriormente se dejó enfriar. Se añadieron dos gotas del indicador y lentamente 2 mL de hexano, se agito y con frecuencia se introdujo el fondo del tubo en agua hirviendo, se dejó enfriar. Se agregaron 5 mL de HCl 1:1 con metanol, se agito en el vortex y se puso de nuevo en el baño maría durante 10 minutos, se dejó enfriar. Se adicionaron 10 mL de agua destilada y 5 mL de hexano. Se agitó en 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 micropipeta 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 cromatógrafo de gases.

Condiciones del cromatógrafo

- ✓ Temperatura de inyector: 200°C
- ✓ Temperatura de detector: 220°C
- ✓ Presión del gas: 10 PSI

En la **Figura 5.1** se observan las condiciones de tiempo y temperatura establecidas para el perfil de las muestras de aceite refinado y grasa cruda.

- ✓ Temperatura inicial: 70°C
- ✓ Rampa de temperatura #1: 12°C/min de 70°C a 170°C
- ✓ Rampa de temperatura #2: 0.6°C/min de 170°C a 200°C
- ✓ Rampa de temperatura #3: 6°C/min de 200°C a 240°C
- ✓ Temperatura final: 240°C por 5 minutos

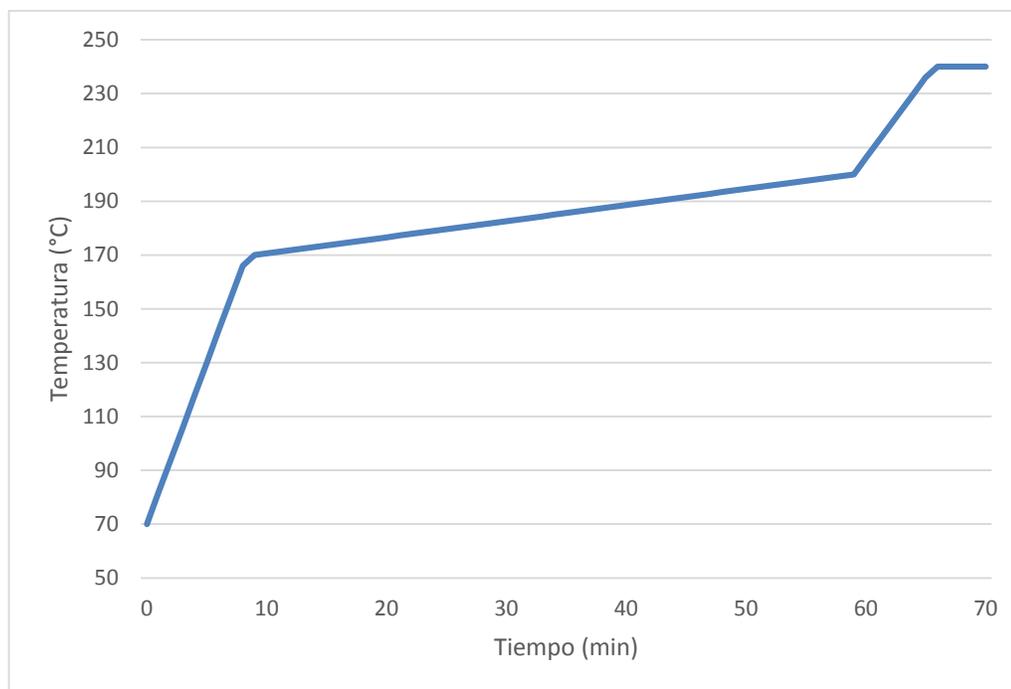


Figura 5.1. Rampa Tiempo vs Temperatura de la corrida cromatográfica

Obtención del cromatograma de estándares de ácidos grasos.

En la **Figura 5.2** se muestra el cromatograma obtenido de los estándares de ácidos grasos, en las condiciones antes mencionadas.

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

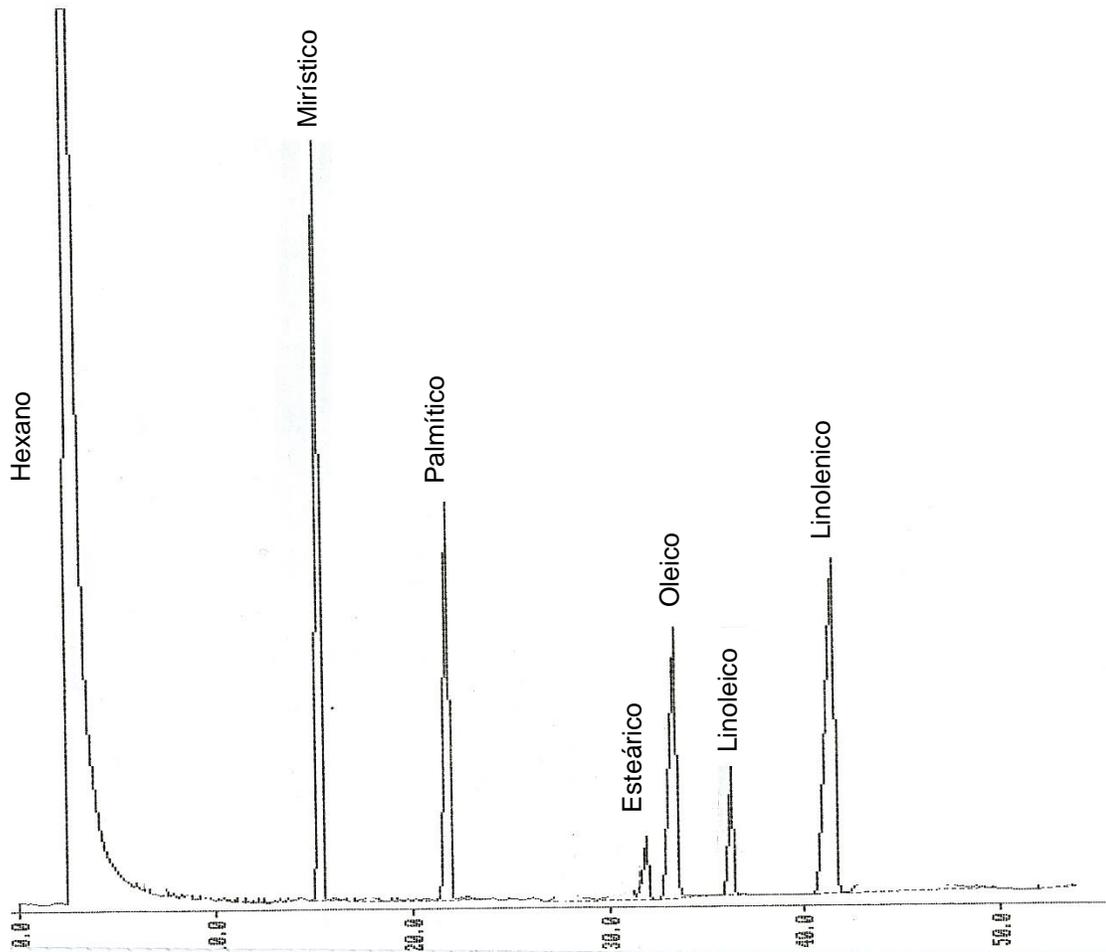


Figura 5.2. Cromatograma de estándares de ácidos grasos

- 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.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Caracterización bromatológica de la harina integral y desengrasada

En la **Tabla 6.1** se presentan los resultados obtenidos de la harina integral y de la harina desengrasada de la almendra, tanto en base húmeda como en base seca. Cabe mencionar que las determinaciones analíticas presentaron un coeficiente de variación menor al 5%.

De los resultados obtenidos, se observa que la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) presenta un alto contenido de proteína y grasa como era de esperarse, por lo que se puede señalar a la almendra de calabaza hedionda como fuente importante de proteína y grasa. Cuando ésta se desengrasa, el contenido de grasa se reduce a menos del 1%, concentrándose la proteína hasta un nivel de 77.90%, por lo cual se puede considerar a la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) como un aislado proteínico con posible uso en la alimentación animal y humana, ya que posee un porcentaje arriba del 75%.

Tabla 6.1. Caracterización bromatológica de la almendra de la calabaza (*Apodanthera undulata*) (g/100g de muestra)

	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	Fibra	Hidratos de carbono ^c
Harina integral^a	4.94 ± 0.02	3.04 ± 0.04	42.72 ± 0.19	38.99 ± 1.64	2.61 ± 0.13	7.69
Harina integral^b	--	3.20 ± 0.04	44.96 ± 0.26	41.02 ± 1.73	2.75 ± 0.14	8.07
Harina desengrasada^a	4.24 ± 0.12	5.31 ± 0.02	77.90 ± 0.16	0.57 ± 0.02	2.21 ± 0.10	9.77
Harina desengrasada^b	--	5.54 ± 0.02	81.35 ± 0.24	0.59 ± 0.02	2.31 ± 0.11	10.20

Los valores obtenidos son el promedio ± desviación estándar de un triplicado con un C.V. <5%

^aBase húmeda

^bBase seca

^cObtenido por diferencia

En la **Figura 6.1** se hace una comparación de los resultados obtenidos del análisis bromatológico de la Calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) con otras almendras de la misma familia, reportados en la **Tabla 4.1** (pág 6), se puede observar que en esta especie se encuentran en mayor proporción la grasa y la proteína, y con ello se confirma que la almendra estudiada se encuentra dentro de lo que se esperaba, por lo que se puede considerar con un alto potencial alimenticio.

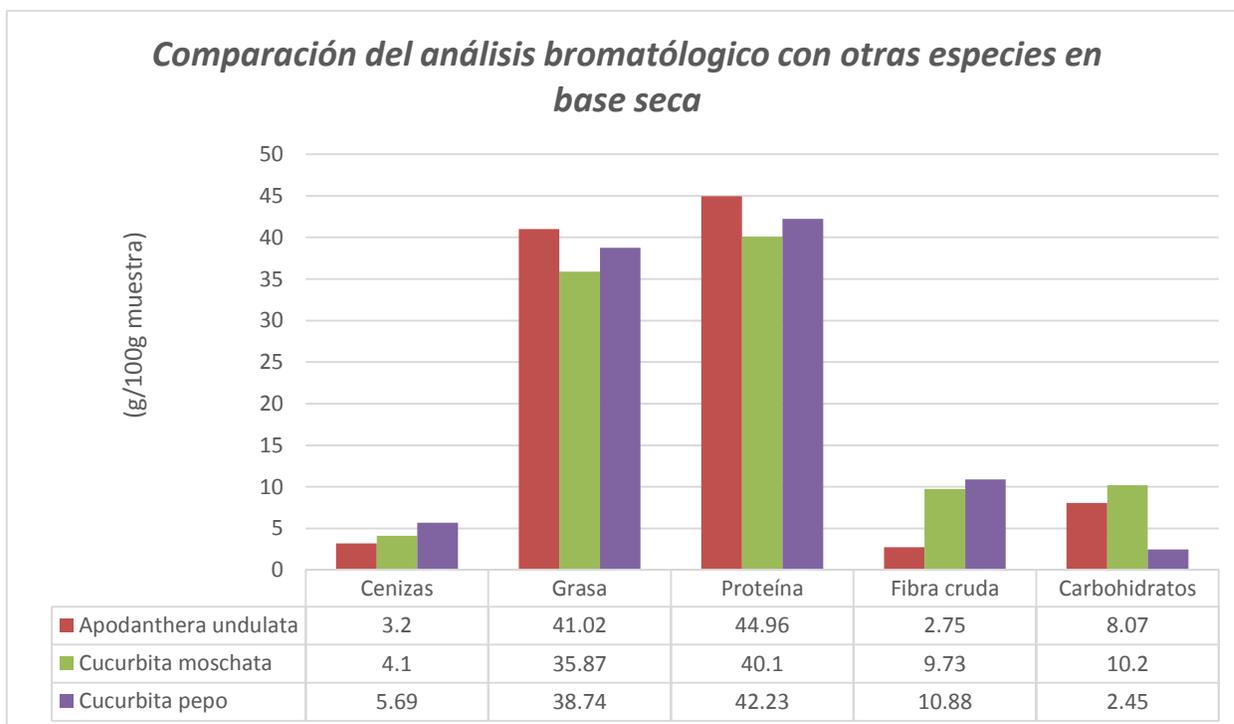


Figura 6.1. Presentación de barras de la comparación del análisis bromatológico entre la especie estudiada, *Apodanthera undulata* y otras especies de la misma familia, en base seca.

6.2 Digestibilidad “*in vitro*”

En el caso de la digestibilidad “*in vitro*” es un parámetro nutritivo, el cual es un indicador que predice la biodisponibilidad de la proteína, por ello se puede decir que la proteína de la almendra es de adecuada digestibilidad, dándonos un valor de 78.88% de digestibilidad.

En la **Tabla 6.2** se hace una pequeña comparación con el rango de este parámetro en los alimentos de origen vegetal, observándose que la almendra en estudio tiene una buena biodisponibilidad.

Tabla 6.2. Digestibilidad “in vitro”

Muestra	% Digestibilidad
Vegetales	60-70 ^a
Almendra	78.88 ± 2.05 ^b

^aRango de digestibilidad de las proteínas vegetales

^bSe muestran el valor promedio ± desviación estándar (n=3)

6.3 Extracción de la fracción lipídica

En la **Tabla 6.3** se muestra el rendimiento del aceite obtenido por medio de la extracción lipídica usando como disolvente hexano. Por otro lado se recuperó 472.9 g de harina desengrasada al finalizar la extracción.

Tabla 6.3. Rendimiento de aceite de almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)

Peso de la Almendra a extraer	Volumen de la grasa obtenida	Rendimiento
874.6 g	420 mL	48.02%

Comparando la almendra estudiada con los rendimientos de grasa de algunas oleaginosas más comunes en la **Tabla 6.4**, se puede observar que la almendra tiene un rendimiento alto de grasa, lo cual nos indica que puede ser aprovechada como una fuente importante de este componente y considerada como una autentica oleaginosa.

Tabla 6.4. Rendimientos medios en aceites de semillas oleaginosas comunes

Rendimientos medios en aceites de semillas oleaginosas comunes (%)^a	
Maíz	16
Algodón	34
Palma	45
Girasol	25
Sésamo	47
Cacahuete	35
Cártamo	28

^aSe han determinado los rendimientos por prensado mecánico.
(Morales, 2013)

6.4 Refinamiento del aceite

Para realizar el proceso de refinación se partió de 300 mL de aceite de grasa cruda y durante el desgomado se llegó a 273 mL de aceite de almendra. Después se realizó la neutralización donde se obtuvo 269 mL de aceite y finalizamos con el blanqueo en el cual se llegó a 174 mL de aceite de almendra refinado. Recuperando aproximadamente un 58 % de aceite; cabe mencionar que este proceso se realizó a nivel de laboratorio, donde existe una pérdida significativa por la cantidad pequeña de muestra que se trabajó, ya que se queda adherida una importante fracción lipídica al material de trabajo.

Dichos procesos se realizan para eliminar aromas, colores y sustancias indeseables, entre ellas están los ácidos grasos libres, fosfolípidos, productos de degradación y de oxidación.

En la **Figura 6.5** se ilustra en presentación de barras el rendimiento del proceso de refinación de la grasa de la almendra de calabaza hedionda, donde se puede ver como de un 100% de grasa cruda con la que se comienza el proceso, se termina con un 58%, por lo que se ve que existe gran pérdida de aceite al realizar el proceso de refinación a nivel laboratorio. Se observa que en la etapa donde se registra una mayor

pérdida fue durante el blanqueo, con una pérdida del 32% del total del aceite refinado. Dicha pérdida se debe a que el material con el cual se realiza el blanqueo (carbón activado); es un material muy inespecífico, por lo que absorbe parte del aceite.

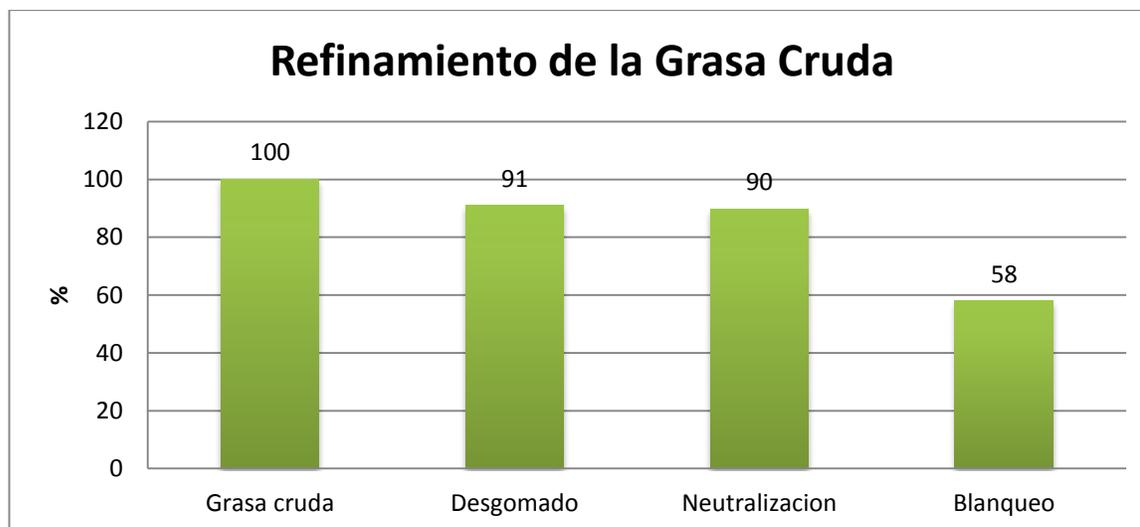


Figura 6.2. Presentación de barras del Rendimiento del proceso de refinado.

6.5 Factores tóxicos y antinutricionales

Con respecto a la determinación de los factores tóxicos y antinutricionales que potencialmente pueden estar presentes en la muestra, se reportan en la **Tabla 6.5**. Cabe mencionar que los datos obtenidos no se pueden comparar, ya que no hay información en este aspecto en la bibliografía para esta especie vegetal.

Tabla 6.5. Factores tóxicos y antinutricionales en la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)

Factor ^a	Unidades	Harina desengrasada
Ácido fítico	g/100g muestra	2.64 ± 0.02
Inhibidores de tripsina	UTI/mg de muestra	2.41 ± 0.08
Saponinas	Unidades de hemólisis/mg de muestra (U.H./mg de muestra)	Negativo

^aValor promedio de la realización por triplicado ± su desviación estándar

En la determinación de ácido fólico no existe ningún riesgo a la salud, ya que la concentración se encuentra dentro del rango que normalmente contienen los cereales y leguminosas convencionales.

Con respecto a los inhibidores de tripsina el valor encontrado en la muestra fue de 2.41 UTI/mg de muestra, valor abajo del límite máximo permitido (10 UTI/mg) para fines alimenticios, además que estos factores tóxicos son termolábiles, por lo que es posible disminuir estos factores, después de un adecuado tratamiento de calor.

Para el caso de la determinación de saponinas, los resultados estuvieron abajo del límite de detección del método aplicado, por lo que no representa ningún problema de toxicidad.

En general la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) no contiene valores significativos de los tóxicos mayormente encontrados en estas almendras, por lo que con los parámetros analizados se puede considerar un alimento sin ningún riesgo de toxicidad.

6.6 Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo y refinado

En la **Tabla 6.6** se presentan los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos de la grasa cruda y aceite refinado, haciendo una comparación con los rangos para el grupo de oleico-linoleico, en donde se encuentra la mayoría de los aceites vegetales comestibles como son el algodón, soya, cártamo, entre otros.

Tabla 6.6. Parámetros fisicoquímicos del aceite crudo y refinado de la almendra de calabaza (*Apodanthera undulata*)

Parámetro	Grasa cruda^(a)	Aceite refinado^(a)	Grupo oleico-linoleico^(b)
Gravedad específica (25°C)	0.917 ± 0.000	0.920 ± 0.001	0.909-0.920
Punto de fusión (°C)	0 a 10	0 a 7	-5 a 29
Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite)	215.61 ± 2.20	208.28 ± 2.70	170 a 265
Índice de refracción (25°C)	1.490 ± 0.00	1.493 ± 0.00	1.436-1.474
Índice de acidez (% ác Oleico)	5.48 ± 0.06	1.63 ± 0.01	0.5
Índice de Yodo (gl/100g de aceite)	106.19 ± 0.96	107.88 ± 0.75	75 a 150

^(a)Valor promedio de la determinación realizada por triplicado ± su desviación estándar.

^(b) (Swern, 1979)

De los valores obtenidos para el índice de refracción y densidad, se observan valores altos, lo que indica que se tiene una cantidad considerable de ácidos grasos insaturados, ya que mientras mayor sea el índice de refracción y la densidad, mayor será el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes.

En el caso del índice de acidez el resultado para la grasa cruda era de esperarse, ya que los valores de índice de acidez para el grupo oleico-linoleico toman en cuenta a los aceites comestibles que han pasado por una fase de neutralización de los ácidos grasos libres. Con respecto al resultado obtenido para el aceite refinado, se considera que aún existen ácidos grasos libres que pueden afectar en la degradación del aceite, aunque cabe mencionar que hubo una considerable disminución de dicho parámetro después de la refinación del aceite.

Para otro de los parámetros más importantes como lo es el índice de saponificación, se sabe que es inversamente proporcional a la medida de los pesos moleculares de los ácidos de los glicéridos presentes en el aceite y grasa, por lo tanto

se puede decir que los ácidos grasos presentes tanto en la grasa cruda como en el aceite refinado son de cadena larga, ya que entran dentro del grupo oleico-linoleico.

El índice de yodo nos indica en cierta forma el % de ácidos grasos insaturados presentes en la grasa, estos en proporción a las grasas del grupo oleico-linoleico. Se observa que tanto la grasa cruda, como el aceite refinado se encuentran dentro de dicho grupo, esto nos indica que se podría usar con fines comestibles, si exclusivamente se tomaran en cuenta estos parámetros fisicoquímicos.

6.7 Perfil de ácidos grasos

Después de la derivatización de las muestras y la posterior inyección de los esteres 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, ver **Figura 5.2** (pág 64), y a continuación en las **Figuras 6.3** y **6.4** se muestran los cromatogramas de las grasa cruda y aceite refinado de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*), respectivamente.

Los ácidos grasos fueron cuantificados en base al área de los picos de cada cromatograma.

En la **Tabla 6.7** se muestran los resultados donde se puede ver que existe poca variación en los porcentajes de ácidos grasos antes y después del proceso de refinado. De igual forma nos indica que tanto el aceite refinado como la grasa cruda son ricos en ácido oleico y linoleico, ambos ácidos grasos de suma importancia en la alimentación animal y humana, y confirma los resultados obtenidos en las pruebas fisicoquímicas, que indican que el aceite refinado entra en el rango del grupo oleico-linoleico.

○ Grasa Cruda

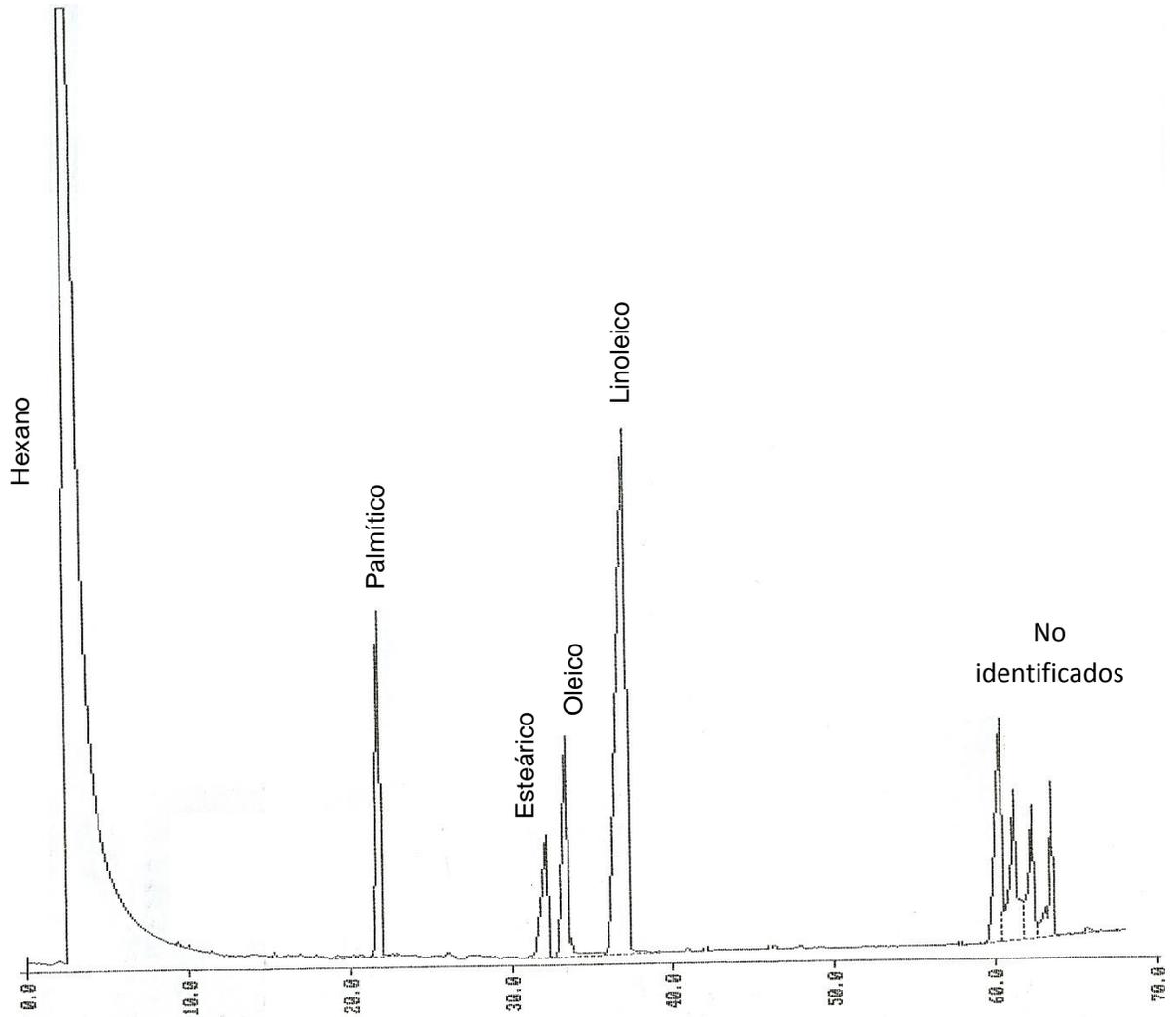


Figura 6.3. Cromatograma de la grasa cruda

- Aceite refinado

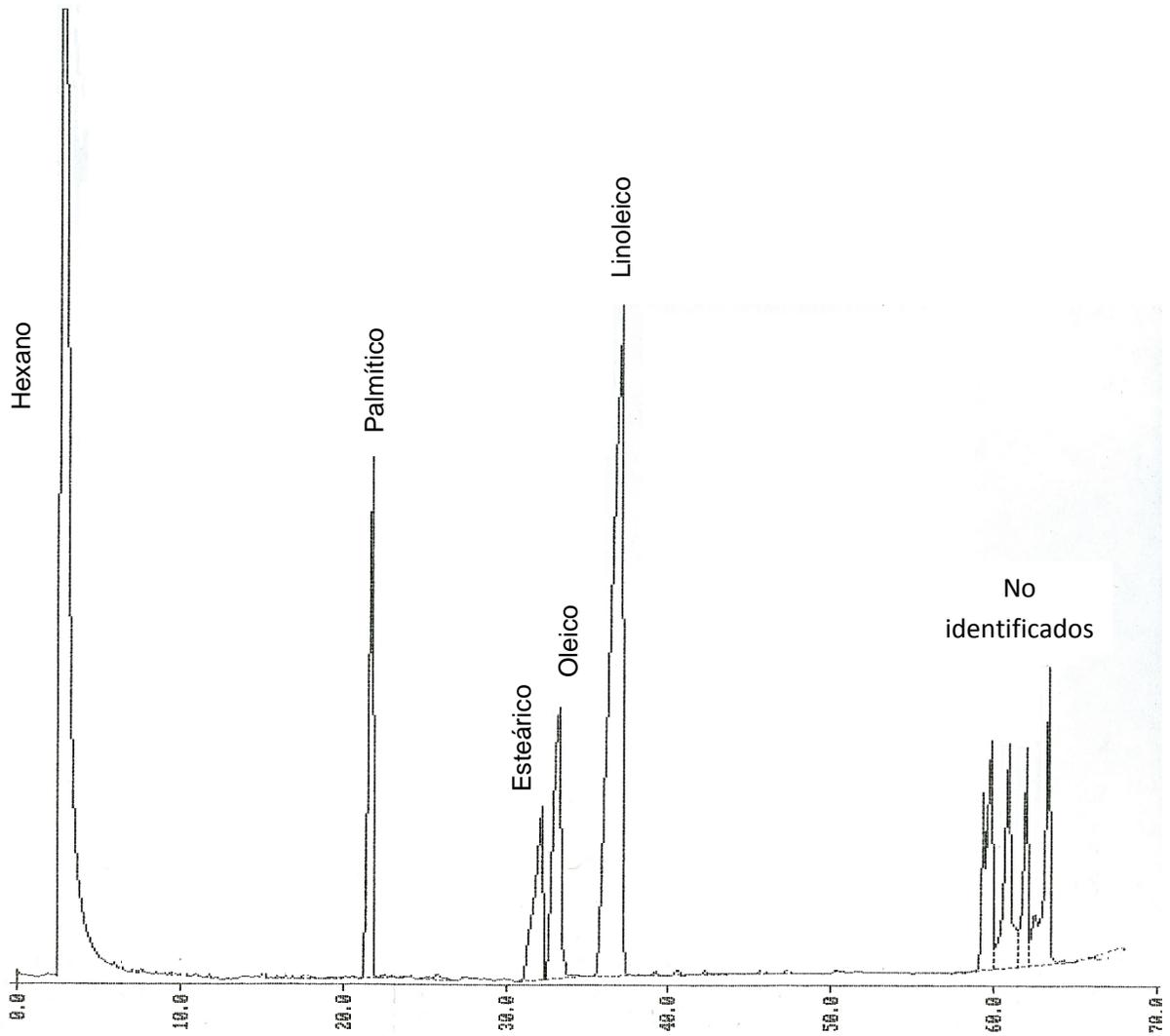


Figura 6.4. Cromatograma del aceite refinado

Tabla 6.7. Porcentaje de ácidos grasos en la grasa cruda y el aceite refinado de la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)

Ácido Graso	Grasa cruda (%)	Aceite refinado (%)
Palmítico	10.33	10.37
Esteárico	5.64	7.10
Oleico	11.09	11.61
Linoleico	42.03	42.41

Haciendo una comparación, como se ilustra en la **Figura 6.5**, de los resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos de la calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*) con un estudio previo realizado de la misma almendra, **Tabla 6.8** (Bemis, 1967), se puede confirmar que contiene los ácidos grasos y el porcentaje esperados. Cabe mencionar que, en la muestra estudiada, no se logró la identificación del ácido graso punícico ya que no se contaba con el estándar respectivo. Se sabe que el ácido punícico es un ácido graso poliinsaturado, ácido linolénico conjugado, con tres dobles enlaces conjugados, 18:03 (N-5), es similar a los ácidos linoleicos conjugados. Con base en lo anterior sería conveniente realizar un estudio a profundidad del porcentaje faltante en la composición de la almendra, para poder asegurar su uso alimenticio.

Tabla 6.8. Composición del aceite en la almendra de calabaza hedionda (*Apodanthera undulata*)

Ácido graso	%
Palmítico	13
Esteárico	4
Oleico	11
Linoleico	42
Linolénico	Trazas
Punícico	30

(Bemis et al. 1967)

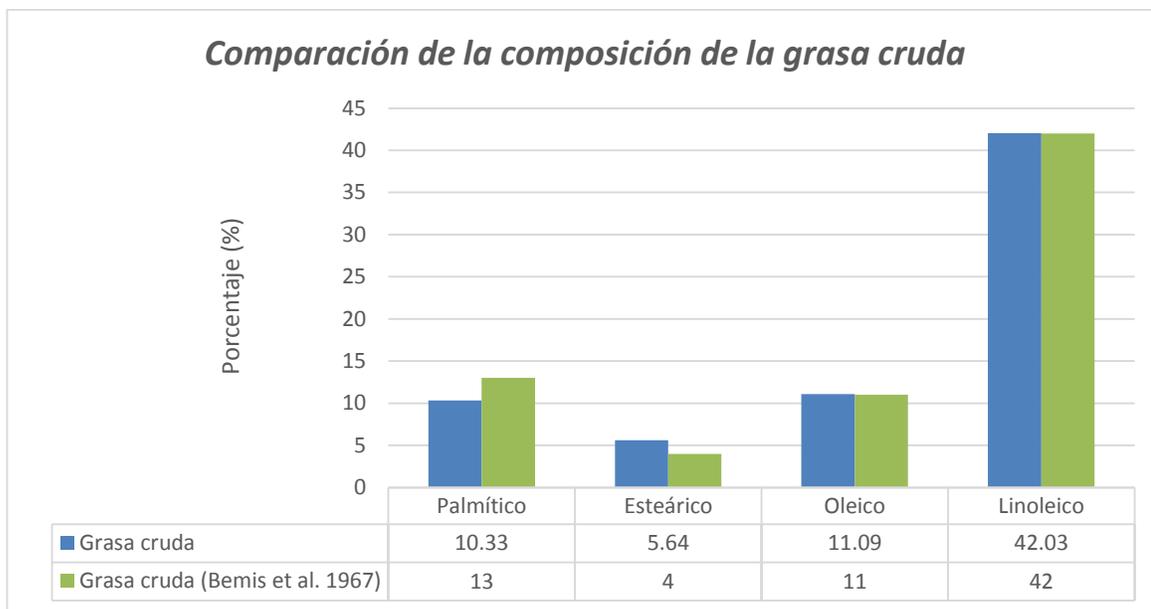


Figura 6.5. Presentación de barras de la comparación de la grasa cruda

7. CONCLUSIONES

- ❖ La parte bromatológica de la almendra de la calabaza hedionda *Apodanthera undulata*, corrobora que es un alimento alto en grasa y proteína, por lo que se puede considerar a la almendra como una semilla oleaginosa y de igual forma la torta residual puede ser considerado un auténtico concentrado proteínico (>50% proteína)
- ❖ La digestibilidad de la fracción proteínica de la almendra analizada es buena para ser una proteína de origen vegetal.
- ❖ En cuanto a la parte toxicológica se observó que de los factores tóxicos analizados, estos no representan ningún riesgo a la salud para ser consumida la almendra.
- ❖ El rendimiento de la grasa obtenido a partir de la almendra de calabaza hedionda por extracción con hexano (48.02%) es adecuado para ser aprovechado en la industria de grasas y aceites.
- ❖ En el caso de los parámetros fisicoquímicos en la grasa cruda y el aceite refinado de la almendra de calabaza hedionda los valores caen dentro del grupo oleico-linoleico a excepción del índice de acidez, esto puede ser debido a que el proceso de refinado se realizó a nivel laboratorio.
- ❖ El proceso de refinado no afecto la composición de los ácidos grasos, de la grasa cruda, que tienen un alto contenido en ácidos grasos insaturados, como es el caso del oleico (11%) y el linoleico (42%). Además de que la grasa cruda y el aceite refinado tienen parámetros fisicoquímicos dentro del rango del grupo oleico-linoleico.
- ❖ La almendra y el aceite refinado pueden ser utilizados sin riesgo en la alimentación animal y humana; sin embargo, en el caso del aceite hacen falta más estudios, principalmente a que ácidos grasos corresponden los no identificados (>30%), y para mejorar algunas características sensoriales, como el color, el sabor y el olor, que pueden resultar desagradables para el consumo humano.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Astiasarán, A. I y Martínez, H. J. Alimentos. Composición y propiedades. Mc Graw Hill Interamericana, 2ª Edición. Madrid, (2000). pp. 109-119.
- 2) Bemis, W; Moran, M; Berry, J; and Deutschman Jr, A. Composition of *Apodanthera undulata* oil. Canadian Journal of Chemistry. (1967). 45, 2637
- 3) Badui, S. Química de alimentos. 3ª Edición. Ed. Alhambra México, D.F, (1994). pp. 233-238.
- 4) Campos, H. R. Evaluación nutrimental y toxicológica de algunas plantas cultivables y silvestres mexicanas. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, México, D.F, (2006). pp. 9-10.
- 5) Derache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones Omega, Barcelona, (1990). pp. 24, 109-132, 233-247, 255-258.
- 6) Eder, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. Institute of Nutrition Physiology, Technical University of Munich, D-85350 Freising, Germany, (1995). pp. 114-129.
- 7) Edgan, H., Kirk, R, S, Sawyer, R. Análisis químico de alimentos de Pearson; Editorial Continental, S.A. de C.V. México, D.F. (1991). pp. 519-537.
- 8) Fennema, O. R. Química de los alimentos. Editorial ACRIBA, S.A. 2ª Edición. Zaragoza, (2000). pp. 21-22, 188, 270-277, 358-359, 384-385.
- 9) Frühbeck, G. et al. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. Department of Human Physiology, School of Medicine, Univesity of Navarra, Pamplona, (1995). pp. 206-212.
- 10) Hart, F. y Johnstone, H. Análisis moderno de los alimentos. Editorial ACRIBA, S.A. Zaragoza, (1984). pp. 1-21, 343-357.
- 11) Helrich, K. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. 15th, Vol. I and II, (1990). pp.16, 60, 249, 1097.
- 12) Kakade, M, L. Rackis, J.J. Mcghee, J.E. and Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. Cereal Chemistry, (1974). 51, 376-382
- 13) Lawson, H. Aceites y grasas alimentarias. Tecnología, utilización y nutrición. Editorial ACRIBA, S.A. Zaragoza, (1994). pp. 3-37, 49-57.

- 14) Less, R. Análisis de los alimentos. Métodos analíticos y de control de calidad. Editorial ACRIBA, S.A. 2ª Edición. Zaragoza, (1999). pp. 241-244, 249-253.
- 15) Lindner, E. Toxicología de los Alimentos. Editorial ACRIBA, S.A. 2ª Edición. Zaragoza, (1995). pp. 5-13
- 16) Lira, R. Cucurbitaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 92. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, (2001). pp. 1-10
- 17) Lira, R. Rodríguez, C. Alvarado, J. Rodríguez, I. Castejón, J & Domínguez, A. Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. Acta Botánica Mexicana, núm.42. (1998). pp. 43-77
- 18) Lira, R & I. Rodríguez-Arévalo. Catálogo de la familia Cucurbitaceae de México. UNAM. **Informe final** SNIB-CONABIO proyecto DS002. México D. F. (2006). pp. 13-20
- 19) Lomelí, L. “Evaluación nutritiva y toxicológica de la flor de moringa (*Moringa oleífera*) consumida en el municipio de Santa María Colotepec. Oaxaca.” Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, México, D. F, (2009). pp. 76–82.
- 20) López, E. M. “Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética”. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, México, D.F, (2000). pp. 28-33.
- 21) Martínez, B y Rincón, F. Inhibidores de tripsina II: Efectos del proceso y métodos de determinación. Alimentaria. (1997). pp. 15-20
- 22) Mendoza, M. E y Calvo, C. M. Bromatología, composición y propiedades de los alimentos. Editorial Mc Graw Hill, 1ª Edición. México D.F, (2010). pp. 23-24, 33-34, 55-57, 67-72.
- 23) Morales, C. M. “Obtención, caracterización fisicoquímica y evaluación biológica de la grasa cruda y el aceite refinado de la semilla de colorín (*Erythrina americana*)”. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, México, D.F, (2013). p. 43.
- 24) Osborne, D.R. y Voogt, P. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Editorial ACRIBA, S.A. Zaragoza, (1986). pp. 5-25.

- 25) Potter, N. La ciencia de los alimentos. EDUTEX, S.A. México, D.F, (1973). p. 41
- 26) Rodríguez, R. B. "Evaluación bromatológica y determinación de los factores tóxicos naturales en el grano de frijol gordo (*Phaseolus polyanthus*) verde y seco, consumidos en el municipio de Cuetzalan, Puebla." Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México, D.F, (2010). pp.14-15.
- 27) Sotelo, A. Mendoza, J y Argote, R. Contenido de ácido fítico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. Journal of the Mexican Chemical Society. (2002). 46, 301-306
- 28) Swern, D. Bailey's Industrial oil and fat products. John Wiley & Sons, 4a edición. Vol. 1, (1979). pp. 186-189.
- 29) Ziller. S. Grasas y aceites alimentarios, Acriba, S.A., 7ª Edición, Zaragoza, España, (1996) pp. 1-14, 31-38.

Páginas de internet:

- 30) Las Oleaginosas. Comité Nacional Sistema-Producto Oleaginosas de SAGARPA (En línea) en: http://www.oleaginosas.org/cat_57.shtml#40 (Último acceso el 28 de Enero de 2014)
- 31) Oleaginosas y Leguminosas. FAO (En línea) en: <http://www.fao.org/ag/ags/gestion-poscosecha/oleaginosas-y-leguminosas/es/> (Último acceso el 28 de enero de 2014)