

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE
GASES DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LA SEMILLA DEL
TOTUMO (*Crescentia cujete L.*)

JUAN CARLOS MUÑOZ MUÑOZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYAN
2008

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE
GASES DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LA SEMILLA DEL
TOTUMO (*Crescentia cujete L.*)

JUAN CARLOS MUÑOZ MUÑOZ

Trabajo de grado

Requisito parcial para optar el título de químico

DIRECTOR

OLGA LUCIA HOYOS SAAVEDRA, Ph.D

ASESOR

TANIA MILENA GUTIERREZ, Mg. Sc.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN

2008

NOTA DE ACEPTACION

Directora: Olga Lucía Hoyos S. Ph.D.

Jurado: Fernando Jose Hernandez B. Mg. Sc.

Jurado: Edier Humberto Pérez Mg. Sc.

Fecha de sustentación: Popayán, 22 de octubre 2008

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme su apoyo desde el momento en que decidí tomar este rumbo. Especialmente a Claudia, mi hermana quien estuvo a mi lado siempre como una amiga, como un apoyo.

A mi directora de tesis, la doctora Olga Lucía Hoyos, por su paciencia, por transmitirme sus conocimientos con humildad, por su colaboración incondicional en todo momento, tanto a nivel personal como académico, además de seguir todo el desarrollo experimental de este proyecto y por brindarme su amistad.

A la Mg. Tania Milena Gutiérrez, por su asesoría en el desarrollo de este trabajo, además de brindarme conocimientos y soluciones a cada inconveniente presentado.

A mis jurados, el Mg Fernando Hernández por sus observaciones, aportes y aclaraciones a cerca de este trabajo. Al Mg. Edier Pérez por colaborar como jurado de tesis y por las correcciones realizadas a mi anteproyecto y el tiempo dedicado para ello.

A los profesores del grupo de investigación en Química de Productos Naturales: Dr. Jaime Martín F, Dr. Alberto Lenis y el Dr. Ricardo Benítez, por permitirme ingresar al grupo de investigación donde se desarrollan trabajos con calidad y distinción. Además por la buena voluntad al colaborar con la participación en los diferentes eventos como seminarios y encuentros de semilleros de investigación.

Al ingeniero Jordan Alegría por su colaboración y motivación para encaminarme a realizar este trabajo, además de transmitir sus ideas y soluciones a todos los inconvenientes presentados al inicio del proyecto.

Al Mg. Fernando Hernández por su cooperación con los equipos que requería para el trabajo en la unidad de análisis industriales.

A las personas que conocí en el transcurso de la carrera que han formado parte importante en mi vida y agradezco haberlos conocido: Yohana Ortiz, Jorge Ortega, Andrés Yanza, Carlos Miller Campo y Alexander Cadena.

A los profesores del departamento de química por transmitirme sus conocimientos y algunos, el permitirme ser más que un estudiante, un compañero y un colega.

A la universidad del Cauca por brindarme la formación académica necesaria para esta etapa.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	12
1. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO.....	14
1.1 CARACTERISTICAS DEL FRUTO DEL TOTUMO (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	14
1.1.1. Utilidades del fruto del totumo.....	15
1.1.2. Cultivo del totumo en la región del Patía.....	16
1.1.3. Importancia ecológica.....	17
1.1.4. Cosecha del fruto	17
1.1.5. Estudios realizados al fruto de Totumo.....	18
1.2 ACEITES VEGETALES.....	21
1.2.1. Características de un aceite vegetal.....	23
1.2.2. Usos o aplicaciones de los aceites.....	28
1.3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN ACEITES Y OTROS PARAMETROS DE CALIDAD.....	30
1.3.1 Cromatografía de gases y análisis de aceites vegetales y grasas.....	32
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo General.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. METODOLOGIA.....	37
3.1 REACTIVOS.....	37
3.2 EQUIPOS.....	38
3.3 MATERIA PRIMA Y MUESTREO.....	38
3.4 TOMA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	39
3.4.1 Recolección de los frutos.....	39
3.4.2 Toma de muestras.....	39
3.4.3 Características físicas del fruto del totumo.....	40
3.5 CARACTERIZACION DE LA SEMILLA DEL TOTUMO Y SU ACEITE.....	40
3.5.1 Tratamiento de la semilla.....	41

	Pág.	
3.5.2	Análisis Físicoquímico de la Semilla.....	42
3.5.3	Extracción del Aceite de la semilla del totumo.....	42
3.5.4	Análisis físicoquímico del aceite extraído de la semilla del totumo.....	43
3.6	IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS DEL ACEITE DE LA SEMILLA DEL TOTUMO.....	44
3.6.1	Estandarización de la técnica analítica.....	44
3.6.2.	Inyección de las muestras en el Cromatógrafo de Gases.....	47
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1.	TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRA.....	49
4.1.1.	Recolección y Selección.....	49
4.1.2.	Caracterización física.....	50
4.1.3.	Rendimientos de despulpado.....	51
4.1.4.	Características de la semilla.....	53
4.2.	CARACTERIZACION DE LA SEMILLA DEL TOTUMO Y SU ACEITE.....	56
4.2.1.	Características físicoquímicas de la semilla.....	56
4.2.2.	Caracterización físicoquímica del aceite extraído de la semilla del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	58
4.3.	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ÁCIDOS GRASOS MAYORITARIOS DEL ACEITE EXTRAÍDO DE LA SEMILLA DEL TOTUMO.....	66
4.3.1.	Determinación del flujo optimo.....	66
4.3.2.	Curva de Calibración.....	68
4.3.3.	Estimación de la concentración de los ácidos grasos de interés presentes en el aceite extraído de la semilla del totumo por Cromatografía de Gases.....	75
4.4	POSIBLES APLICACIONES DE UTILIDAD PARA EL ACEITE EXTRAÍDO DE LA SEMILLA DEL TOTUMO.....	81
5.	CONCLUSIONES.....	83
6.	RECOMENDACIONES.....	86
7.	ANEXOS.....	87

	Pág.	
7.1	FORMULAS ESTADISTICAS.....	87
7.2	CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LOS ESTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	88
	7.2.1. Rango de linealidad.....	89
	7.2.2. Precisión.....	91
	7.2.3. Exactitud.....	94
7.3.	SENSIBILIDAD.....	95
	7.3.3. Determinación de la sensibilidad (Limite de detección LOD y limite de cuantificación LOQ).....	97
7.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	98
7.	DETERMINACION DE LA PRESICION DEL MÉTODO DE ACIDEZ Y SAPONIFICACION.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	a) Árbol de totumo.....	14
	b) Fruto de totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	14
	c) Hojas del árbol de totumo.....	14
Figura 2	Diferencia entre la consistencia entre un aceite vegetal y una grasa animal.....	24
Figura 3	a) Triglicérido: glicerol unido a tres ácidos grasos dos insaturados y un saturado.....	25
	b) Ácidos grasos de importancia y más predominantes en aceite vegetales.....	25
Figura 4	Recolección de los frutos de totumo.....	40
Figura 5	a) Extracción soxhlet con solvente n-hexano.....	43
	b) Aceite extraído.....	43
Figura 6	Forma y tamaño de los frutos recolectados en los muestreos correspondientes.....	51
Figura 7	a) Cáscara.....	52
	b) Pulpa del fruto.....	52
	c) Semilla húmeda.....	52
	d) Semilla seca.....	52
	e) Características de una semilla.....	57
Figura 8	Proceso de despulpado del fruto para la obtención de la semilla.....	53
Figura 9	Aceite extraído de la semilla del totumo.....	58
Figura 10	Cromatograma de patrón-mezcla de esteres metílicos inyectado en una columna HP-INNOWAX, y flujo de gas He de 1.2 mL/min.....	68
Figura 11	Cromatograma de patrón interno de éster metílico el ácido nonadecanoico inyectado en una columna HP-INNOWAX, y flujo de gas He de 1.2 mL/min.....	69
Figura 12	Cromatograma de los esteres metílicos de interés y mayoritarios el aceite de la semilla del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	78
Figura 13	Curvas de calibración.....	88
Figura 14	Curvas para determinación de LOD y LOQ.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Composición de ácidos grasos de aceites vegetales.....	29
Tabla 2	Parámetros para algunos aceites más utilizados.....	31
Tabla 3	Algunos tiempos de retención de ácidos grasos y metil esterres (FAME).....	34
Tabla 4	Muestreo de productos a granel (Norma ISO 874).....	40
Tabla 5	Análisis químico de la semilla del totumo.....	42
Tabla 6	Análisis fisicoquímico del aceite extraído de la semilla del totumo.....	44
Tabla 7	Detalles de recolección y selección de los frutos.....	50
Tabla 8	Características físicas del fruto del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	51
Tabla 9	Características físicas de las fracciones del fruto del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	52
Tabla 10	Rendimiento de despulpado del fruto de totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	54
Tabla 11	Características físicas de las semillas del fruto del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	55
Tabla 12	Comparación de la composición química de la semilla del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>), Patía (Cauca) con los reportados en Honduras (contenidos por 100 g de fruto).....	56
Tabla 13	Rendimiento en la extracción del aceite de la semilla de totumo.....	58
Tabla 14	Contenido de aceite de algunas semillas oleaginosas.....	59
Tabla 15	Comparación de los parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la semilla del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	60
Tabla 16	Comparación algunos parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la semilla del totumo con aceites comerciales reconocidos.....	62
Tabla 17	Parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la variedad analizada en Honduras de la especie <i>Crescentia cujete L.</i>	65
Tabla 18	Parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la variedad analizada en Tailandia ²⁶ de la especie <i>Crescentia cujete L.</i>	65
Tabla 19	Rango de concentraciones para cada analito.....	69
Tabla 20	Factores estadísticos en la determinación del error asociado a la pendiente e intercepto para un nivel de confianza del 95 %.....	70

	Pág.
Tabla 21	Límites de detección para los ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés..... 73
Tabla 22	Límites de cuantificación para los esteres metílicos de los ácidos grasos de interés..... 74
Tabla 23	Resultados obtenidos para determinar la acidez de los esteres metílicos del ácido nonadecanoico y de la muestra de aceite..... 76
Tabla 24	Resultados obtenidos para determinar el índice de saponificación de los esteres metílicos del ácido nonadecanoico y de la muestra de aceite..... 76
Tabla 25	Valores aproximados para determinar el porcentaje de recuperación según la acidez utilizando el ácido nonadecanoico..... 77
Tabla 26	Valores aproximados para determinar el porcentaje de recuperación según la acidez en la muestra y el ácido nonadecanoico según los índices de acidez y saponificación 77
Tabla 27	Cuantificación de los ácidos grasos en la muestra de aceite de totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>)..... 79
Tabla 28	Composición de ácidos grasos reportados de la semilla del totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>)..... 80
Tabla 29	Datos cromatográficos para diferentes concentraciones (ppm) de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés en relación con 18.51 ppm de éster metílico de ácido nonadecanoico..... 90
Tabla 30	Repetibilidad para un patrón definido de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido cuatro días consecutivos..... 91
Tabla 31	Reproducibilidad para un patrón definido de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido cada 15 días por espacio de un mes y medio..... 92
Tabla 32	Determinación de la concentración de una solución de referencia de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido por curva de calibración..... 94
Tabla 33	Datos para determinación e la sensibilidad con concentración de patrón interno de 18.51 ppm para cada disolución patrón..... 97
Tabla 34	Datos para la determinación de la concentración de ácidos grasos en la muestra de aceite extraído de la semilla el totumo (<i>Crescentia cujete L.</i>)..... 98
Tabla 35	Datos para la determinación de la desviación respecto a la concentración e intervalo de confianza..... 99
Tabla 36	Datos y resultados para la determinación de la precisión del método de acidez y saponificación 100

RESUMEN

El totumo (*Crescentia cujete* L.) es un árbol propio de la región del valle del Patía y su cultivo se ha priorizado como alternativa al programa de sustitución de cultivos ilícitos. Del fruto se utiliza la cáscara para elaborar productos artesanales y como empaque natural para alimentos, entre otros; quedando la pulpa y la semilla como residuos generados. La composición y utilidad de la semilla ha sido poco explorada, tanto a nivel popular como científico, sin embargo en cuanto a la pulpa hay un extenso trabajo realizado sobre su composición, principalmente sobre metabolitos secundarios, pero son pocas las aplicaciones que se le han dado con respaldo científico, limitándose a la medicina popular. Con el fin de dar un mayor valor agregado a este fruto, actualmente el grupo de Investigación en Química de Productos Naturales, ha iniciado un estudio de la composición fisicoquímica de estos residuos, mas específicamente a la semilla, de forma que pueda recogerse información que permita proponer algunos posibles campos de aplicación, ya sea como nueva fuente agroalimentaria o industrial. Se ha evaluado su composición proximal, en minerales y factores antinutricionales; y actualmente se adelanta el análisis del perfil de aminoácidos. En este trabajo se reportan los resultados del contenido de ácidos grasos C18 presentes en el aceite de la semilla, el cual representa un 36 a 39 % aproximadamente de su composición en base seca.

El aceite fue extraído con hexano aplicando la metodología Soxhlet entre 10 y 12 horas. El aceite libre de disolvente fue caracterizado fisicoquímicamente encontrándose los índices de acidez, saponificación, yodo peróxidos, gravedad específica e índice de refracción; son valores característicos para un aceite no refinado de origen vegetal, comparables con aceites de oliva, maní y palma. Para conocer el contenido de los ácidos grasos mayoritarios presentes, fue necesario estandarizar la técnica de análisis por cromatografía de gases utilizando un detector FID, mediante el método de patrón interno, utilizando un estándar de referencia de esteres metílicos de ácidos grasos y como patrón

interno el ácido nonadecanoico. Se establecieron las siguientes condiciones de análisis: flujo óptimo de gas de arrastre (He) a 1.2 mL/min., temperatura e inyección a modo splitless de 260°C, rampa de temperatura entre 175°C a 200°C, con una temperatura del detector de 250°C, utilizando una columna capilar HP-INNOVAX.

Las muestras de aceite fueron saponificadas para realizar el proceso de liberación y esterificación de los ácidos grasos obteniéndose los esteres metílicos correspondientes, los cuales fueron analizados en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones establecidas.

Los resultados indican que, de los ácidos grasos de interés, el ácido oleico se encuentra en mayor proporción (39.2%) y el de menor proporción es el ácido linolénico (0.42%) dando un contenido comparable con aceites vegetales como el de oliva, maíz, girasol, soya y palma. Estos datos permiten pensar en postular posibles aplicaciones del aceite de la semilla del totumo en el campo alimentario ó industrial y/o cosmético; sin embargo es necesario realizar estudios complementarios que permitan establecer no solo su viabilidad técnica sino también económica.

1. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO

1.1 CARACTERISTICAS DEL FRUTO DEL TOTUMO (*Crescentia cujete* L.)

En la continua búsqueda de materiales agrobiológicos se ha encontrado que el departamento del Cauca y más específicamente la región del Patía cuenta con una gran variedad de productos tanto silvestres como cultivados, y que por lo general no son lo suficientemente explotados debidos a la falta de estudios científicos que generen propuestas para mejorar y aumentar su aprovechamiento. Uno de estos materiales es el árbol del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.; con registro 01 de 16 de Febrero de 2007 del herbario CAUP de la Universidad del Cauca proveniente del Patía Caucano a 910 metros a nivel del mar) el cual pertenece a la familia *Bignoniaceae* y genero *Crescentia*; cuenta con una gran variedad de especies que se encuentran en general en estado silvestre y se caracteriza por ser un árbol de hasta 10 m de altura, de copa abierta, hojas largas de hasta 15 cm de largo y un fruto característico de forma ovalada de hasta 30 cm de diámetro, como se observa en las figura 1:

Figura 1. a) Árbol de totumo, b) Fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.), c) Hojas del árbol de totumo



a)



b)



c)

Este árbol multipropósito, importante para sistemas silvopastoriles, es nativo de América tropical y actualmente se encuentra en Latinoamérica desde México hasta Argentina incluyendo las islas del Caribe. También ha sido introducido en África y Asia¹. Se considera de gran importancia en el trópico seco y en regiones con tendencia a la desertización por su resistencia a la sequía aunque también tolera sitios húmedos. Además, en la región sudamericana la especie *cujete L.* es la más abundante.

1.1.1. Utilidades del fruto del totumo

La aceptabilidad cultural del pericarpio seco es muy alta debido a que tiene amplias utilidades; a la pulpa se le atribuyen principios curativos razón por la cual se utiliza en medicina tradicional y como ingrediente de productos comerciales para la tos²

Utilidad artesanal

Es utilizado por las características de su cáscara o pericarpio como utensilio casero, para la manufactura de artesanías e instrumentos musicales. El pericarpio del fruto se seca, pule, labra y decora para diferentes usos, como recipientes domésticos, empaques, instrumentos artísticos, decorativos y recreativos.

La madera del árbol como tal es utilizada como combustible nativo, en la llamada “leña”, la fabricación de sillas de montar, mangos para herramientas e implementos agrícolas, yugos masas y ruedas para vehículos de transporte. Ornamentalmente su principal utilidad es como planta de sombra y ornato de potreros, parques y jardines.

¹ Gentry, AH. Flora neotrópica 25. *Bignoniaceae* Part I. Published for organization for flora neotrópica by the New York Botanical Garden. 1980. 82

² Murguetio E, Ibrahim, M. Ganadería y medio ambiente. XII Congreso venezolano de producción e industria animal. 2004

Utilidad en la medicina tradicional

En nuestro país, el conocimiento etnomedicinal de muchas plantas y animales es en muchas oportunidades mal administrado por habitantes de las zonas rurales, campesinos, comunidades indígenas y negras, y pobladores de los barrios urbanos marginales y pobres (asentados o desplazados). También, en forma creciente, las clases económicas media y alta utilizan la medicina tradicional, buscando mayor o igual eficacia y menor costo³.

Dentro del conocimiento popular y el manejo que le dan a las plantas en la comunidad patiana, se tiene que la pulpa del totumo es utilizada para contrarrestar problemas de tipo respiratorio tales como asma, bronquitis, catarro, pulmonía, resfriados y tos, el cual es suministrado vía oral. También es utilizado para combatir piojos (*pediculus humanus capitatis*), garrapatas, así como en la nutrición de bovinos. A las hojas y el fruto se les atribuye propiedades analgésicas, antisépticas, calmantes, desinflamantes, expectorantes, pectorales, reconstituyentes, sudoríficas y vermífugas⁴.

1.1.2. Cultivo en la región del Patía

El totumo o puro se encuentra diseminado en una extensión muy grande en la región del Patía. Se estima que un árbol produce aproximadamente 100 frutos anuales, con un peso promedio de la pulpa de 500 g. A partir de el año 2005 se ha emprendido el cultivo tecnificado de totumo, en la Hacienda la Pachuca de propiedad de la Fundación para el Desarrollo del Patía - FUNDEVAP, situada a 70 Km de la ciudad de Popayán, a 600 m sobre el nivel del mar, con una temperatura de 28 – 30 °C. En todo el municipio se cuenta con más de 45.000

³ Utilización de los servicios de salud. *Hojas-Resumen sobre Desigualdades en Salud en Colombia*, p. 11. Programa de Políticas Públicas y Salud de la División de Salud y Desarrollo Humano de la O.P.S. 2001

⁴ *Vegetales y Especies promisorias de los países del Convenio Andrés Bello* Tomo II. Bernal H. y Correa J. ISBN: 958-9206-03-4. Editorial: GUADALUPE. 1989, 185

árboles de totumo sembrados y más de 49.000 que ya existen en la región, de los cuales 25.000 ya están en producción⁵. En ese lugar se ha dispuesto de 20 Ha para el desarrollo de la cadena del totumo.

1.1.3. Importancia ecológica

El árbol de totumo se adapta a condiciones de sequía y a terrenos pantanosos en donde existe mucha humedad por lo que fácilmente se puede encontrar en una amplia gama de condiciones agroecológicas; por lo que debido a sus características de adaptabilidad es un árbol que puede resistir el paso del tiempo sin deterioros en su físico.

Es uno de los pocos árboles que difícilmente se deja secar por otra planta, es tanto así que las mejores orquídeas se dan en la corteza del este árbol⁶.

1.1.4. Cosecha del fruto

El fruto es perecedero en cuanto a su pulpa si presenta golpes o daños producidos por microorganismos o insectos. La cosecha se inicia cuando los frutos toman una coloración marrón definida y su pericarpio presenta una dureza firme sin ablandamientos. En el proceso de recolección, sea cual sea, se debe evitar golpes que estimule el deterioro del interior del fruto en cuanto a su pulpa y su semilla, aumentando así el periodo de almacenamiento. El fruto luego de la recolección debe almacenarse en lugares libres de humedad, a temperatura ambiente para evitar la proliferación de hongos y otros microorganismos que deterioren los componentes del fruto⁷.

⁵ Proyecto FUNDASET-CHEMONICS. Establecimiento y operación de una empresa transformadora de productos de totumo. 1996. Valle del Patía. Departamento del Cauca

⁶ Otero, A., Castro, D., Chaparro C., LA QUIMICA DEL TOTUMO. Universidad Pedagógica Nacional, Colectivo de investigación CEPE – UPN (Corporación Escuela Pedagógica Experimental Universidad Pedagógica Nacional). 2000. L1-068

⁷ Arango y Martínez. Árbol alimenticio del pacífico colombiano, en: Resúmenes III seminario recursos vegetales promisorios. Medellín, Facultad de Agronomía. 1.986..

1.1.5. Estudios realizados al fruto de Totumo

Se han realizado investigaciones de la composición del fruto, corteza y hojas de *Crescentia cujete* L. En particular se seleccionaron datos sobre la composición de la pulpa del fruto, encontrándose varios compuestos, algunos nuevos y de interés farmacológico, como las furofuranonaftoquinonas, iridoides y O-glicósidos acantósidos e iridoides con diversos aglicones.

Kaneko, Tetsuo y colaboradores⁸ aislaron ocho compuestos nuevos en el fruto de *Crescentia cujete*, junto con los acantósidos conocidos, α -D-benzoato de glucopiranosilo, (R)-1-O- α -D-glucopiranosil-1,3-octanodiol, y α -D-fructofuranosil 6-O-(*p*-hidroxibenzoil)- γ -D-glucopiranosido. Las estructuras de estas sustancias fueron identificadas y establecidas como tres glicósidos de (2R,4S)-2,4-pentanodiol, dos glicósidos de (R)-4-hidroxi-2-pentanona, dos glicósidos de (R)-1,3-octanodiol y 6-O-(*p*-hidroxibenzoil)-D-glucosa.

Igualmente el grupo de Kaneko también aisló de la fracción acuosa de la pulpa, 15 compuestos nuevos, tres glucósidos iridoides, cinco iridoides, dos 3-hidroxi-2-pentanona glicósidos, tres 2,4-pentanodiol glicosidos y dos 4-hidroxi-2-pentanona. También se aisló e identificó en el extracto metanólico 16 iridoides e iridoides glicosídicos, de los cuales ocho compuestos nuevos fueron clasificados como crescentinas y crescentósidos. Los restantes se identificaron como ajugol, 6-O-*p*-hidroxibenzoilajugol, aucubin, 6-O-*p*-hidroxibenzoil-6-epiaucubin, agnusido, ningpogenin, 5,7-bisdeoxicinancosido y un producto de degradación de glutinósido⁹.

⁸ Kaneko, T., Ohtani, K., Kasai, R.,; Yamasaki, K., Duc, N.. *n*-Alkyl glycosides and *p*-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry* 1998, 47(2), 259-263

⁹ Kaneko, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Duc, N. Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete* *Phytochemistry* 1997, 46(5), 907-910

Las propiedades biológicas de los compuestos iridoideos y secoiridoideos reportadas en bibliografía incluyen actividad antimicrobiana, hipotensiva, analgésica, antiflogística¹⁰, hepatoprotectoras¹¹, sedativa, laxante, antileucémica¹², anticolinérgica¹³, y antileishmaniásica¹⁴. Existen numerosos trabajos reportados en la literatura sobre la aplicabilidad de iridoideos análogos obtenidos de otras fuentes, que han demostrado actividad positiva como anticancerígenos sin derivatizar, como iridoideos O- glicósidos¹⁵, O-acetilados¹⁶, de igual modo han demostrado actividad antimicrobiana¹⁷ y antioxidante¹⁸.

Se han encontrado estudios relacionados a la evaluación de compuestos aislados de hojas y corteza, evaluando su actividad antimicrobiana, además Binutu y colaboradores, reportaron esta misma actividad de los extractos hexanólico, acuoso y clorofórmico de la raíz de esta planta¹⁹. A su vez Heltzel y

-
- ¹⁰ Van der Luis, W.G. Tesis Doctoral: secoiridooids and xanthones in the *genus centarium hill*: a pharmacognostical study. 1985. Rijksuniversiteit utrecht, Bélgica. 26-51
- ¹¹ Liu, J. Y. Liu & C. Klaasen. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implication. J. Ethnopharmacol. 1994. 42: 183-91
- ¹² Sticher, O. New natural products and plant drugs with pharmacological or therapeutical activity. (Wagner, H. And Wolff, P., eds). Springer, Berlin. 1977
- ¹³ Yamajara, J.M. Kobayashi, H. Matsuda & S. Aoki. Inhibition of cytotoxic drug-induced vomiting in suncus by a ginger constituent J.Ethnopharmacol. 1997. 33: 31-5
- ¹⁴ Ray. H.K. Majummbber, A. Chakravarty, S. Mukhopadhyay, R. Gil & G. Cordell; Amarogentin, a naturally occurring secoiridooid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from Leishmania donovani. J.Nat. Prod. 1996. 59: 27-9
- ¹⁵ Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., Ikeda, Y., Kawakami, K., Ito, K., Nose, T. Studies on Iridoid-related Compounds V. Antitumor activity of iridoid derivatives periodates oxidation. Journal of pharmacobiodynamics. 1988, 11 (2), 131-136
- ¹⁶ Wang, C.J., Tseng, T.H., Lin, J.K. Isolation, identification and primary effect on C6 Glioma Cells in vitro. Anticancer Research 1992, 12 (3), 911-915
- ¹⁷ Ishiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Ikeda, Y.; Kawakami, K.; Ito, K.; Nose, T.; Studies on Iridoid-related Compounds IV. Antitumor activity of iridoid aglycones. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1986, 34 (6), 2375 –2379
- ¹⁸ Cevellati, R.; Speroni, E.; Govoni, P.; Guerra, M. C.; Costa, S.; Arnold, U. W.; Stuppner, H. Wulfenia carinthiaca Jacq., Antioxidant and pharmacological activities, Journal of Biosciences. 2004, 59(3/4), 255-262
- ¹⁹ Binutu, O. A. Phytochemical and antimicrobial studies on Crescentia cujete. Fitoterapia 1997, 68(2), 184-185

colaboradores^{20,21} realizaron ensayos de bioactividad de furofuranonaftoquinonas contenidas en el extracto cetónico de esta planta, demostrando la actividad selectiva sobre el DNA en células cancerígenas.

Por otra parte, Harper y colaboradores²² realizaron estudios con semillas de totumo, para el tratamiento antihelmíntico en caninos. Otros investigadores como Nakaguchi y colaboradores²³ reportan estudios sobre extractos del fruto, con utilidad en la restauración del cabello.

En cuanto al estudio de la semilla del totumo se conocen investigaciones sobre la variedad *Crescentia cujete* L., Smith y Dollear²⁴ reporta la aplicación de métodos volumétricos y espectrofotométricos en el estudio de la composición del aceite encontrándose muy similar a la aceite del maní. Estudios de Badami y su grupo²⁵ confirmaron la presencia de los ácidos grasos insaturados oleico, linoléico y también del ácido palmítico. También se encontró un reporte del año 1996, con respecto al estudio de una gran variedad de aceites extraídos de semillas con el fin de utilizarlos como biodiesel entre estas se encuentra la semilla de la variedad *Crescentia cujete* L. Reportan la composición de los ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite, utilizando la cromatografía de

²⁰ Heltzel, C.E.; Gunatilaka, A.L.; Glass, T.E.; Kingston, D.I. Bioactive Furanonaphthoquinones from *Crescentia cujete*. *Journal of Natural Products*. 1993, 56(9), 1500-1505

²¹ Heltzel, C.E.; Gunatilaka, A.L.; Glass, T.E.; Kingston, D.I. Furofuranonaphthoquinones: Bioactive compounds with a novel fused ring system from *crescentia cujete* *Tetrahedron* 1993, 49(31). 6757-6762

²² Lans, C.; Harper, T.; Georges, K; Bridgewater, E.; *Preventive veterinary medicine* 2000, 45(3-4), 201-220

²³ Nakaguchi, O.; Katsada, M.; Matsuyama, Y.; Hashigaki, T.; Sakano, T.; Onishi, K.; Yamaguchi, A.; Okamoto, Y.. *Kokai Tokkyo Koho* 2001, 10 pp

²⁴ Smith, B. A.; Dollear, F. G.; Oil from Calabash Seed, *Crescentia cujete* L. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1947, 24 52-4

²⁵ Badami, R. C.; Shanbhag, M. R.; Fatty Acids in Foods and Their Health Implications. *Journal of the Oil Technologists Association of India* 1975, 7(3), 78-9

gases y detector FID.²⁶ Con relación a su composición aminoacídica, hay reportes para la especie *Crescentia alata*, de la familia Bignoniaceae, una especie ampliamente distribuida en América Central²⁷, pero no se ha encontrado caracterización alguna para la especie distribuida geográficamente en nuestra región.

En un estudio fisicoquímico preliminar realizado por el grupo de investigación de la Universidad del Cauca “Química de Productos Naturales (QPN)”²⁸, se encontró mediante un ensayo proximal de la semilla, valores de contenido de agua, nitrógeno expresado como proteína bruta, grasa o extracto etéreo, cenizas, fibra bruta (carbohidrato insoluble) y carbohidrato soluble y asimilables obteniéndose altos porcentajes de nitrógeno expresado como fracción proteica y de grasa encontrados en la semilla del totumo, también se realizó un estudio preliminar del aceite extraído vía soxhlet en donde cualitativamente se evidenció la existencia de un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados concordando con lo dicho por Smith y Dollear²⁴.

1.2 ACEITES VEGETALES

El aceite vegetal es un compuesto orgánico obtenido a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía. Como todas las grasas está constituido por glicerina y tres ácidos grasos.

²⁶ Kalayasiri, P., Jeyashoke, N., and Frisnangkura, K. Survey of Seed Oils for Diesel Fuel. Journal American Oil Chemistry Society. 1996. Vol 73, N° 4.

²⁷ Brenes R. Bressani, R. Informe técnico: Evaluación nutricional del aceite y de la torta de la semilla de jícara o morro (*Crescentia alata*). INCAP.1982

²⁸ Alegría J., Lenis A., Bolaños D., Muñoz J.C., Ortiz Y., Informe de proyecto de investigación. ID 1483. Convenio Cooperación N° 123 de 2004 Colciencias-Universidad del Cauca: Caracterización Fisicoquímica de la Semilla del Totumo (*Crescentia cujete*) y Posibles Alternativas Agroalimentarias. Universidad del Cauca. Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales (QPN). 2006

Los aceites vegetales son preferibles a las grasas animales para el consumo humano. Esto se debe a que son ricos en ácidos grasos mono o poliinsaturados, una cualidad muy importante para la transformación de grasa en el organismo humano.

La mayor parte de los aceites vegetales se usan para alimentar el ganado. El aceite vegetal más usado para consumo humano es el de girasol y en ocasiones por cuestión económica el de oliva. El aceite de palma, que es sólido a temperatura ambiente, se usa especialmente para jabones y cosméticos²⁹.

En los últimos años se ha fomentado la producción de aceites vegetales para la obtención de biodiesel, tales como el aceite de colza, de girasol o el de cáñamo. Se ha extendido el uso de estos aceites vegetales como combustibles para los motores diesel, con propósito de tener alternativas de energía³⁰.

Un aceite vegetal se puede obtener mecánica o químicamente, y generalmente se usa alguna combinación de ambas técnicas³¹. En el método mecánico las semillas y frutos oleaginosos se someten a un proceso de prensado. Los residuos de este prensado se aprovechan como alimento para el ganado, por ser un producto muy rico en proteínas. Finalmente se somete al aceite extraído a otro proceso de refinamiento.

²⁹ NORMA DEL CODEX PARA GRASAS Y ACEITES. Codex Stan 19-1981, Citado 28-mayo-2008 en la página web: www.codexalimentarius.net/download/standards/74/CXS_019s.pdf

³⁰ Diaz, Y. C., Brashna D.O., Sanchez, C., Okulik, N., Mattea, M.A. Avances en la obtención de biodisel a partir de aceite vegetal. Comunicaciones Científicas y tecnológicas. Universidad Nacional Nordeste. Resumen T-041. 2004. 4 pág.

³¹ Belitz H. y Grosch W. Química de lo Alimentos. Segunda Edición. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza. España.1993. 175 – 274 pág.

El método químico utiliza disolventes orgánicos generalmente hidrocarburos, los cuales hacen que estos métodos sean más rápidos y económicos, además de dar mejor rendimiento. El solvente generalmente utilizado es el hexano.

1.2.1. Características de un aceite vegetal

Pueden distinguirse dos tipos de aceite, los vírgenes y los refinados. Los primeros son los extraídos mediante "prensado en frío" (no más de 27 °C), conservando el sabor de la fruta o semilla de la que son extraídos. Otro método consiste en la centrifugación a 3.200 rpm y filtración a no más de 27°C, método que se denomina "extracción en frío". Finalmente se aplica un proceso físico (como la decantación durante 40 días) para separar los residuos más finos.

Por ambos métodos se obtiene el aceite virgen, un líquido transparente verdoso, de sabor intenso y una acidez entre 1° y 1,5°. Los principales aceites vírgenes que se comercializan son los de oliva y girasol (aunque la mayoría de este último es refinado), algunos de semillas como (alazor, colza, soja, pepitas de uva, de calabaza) o de algunos frutos secos (nuez, almendra, avellana).

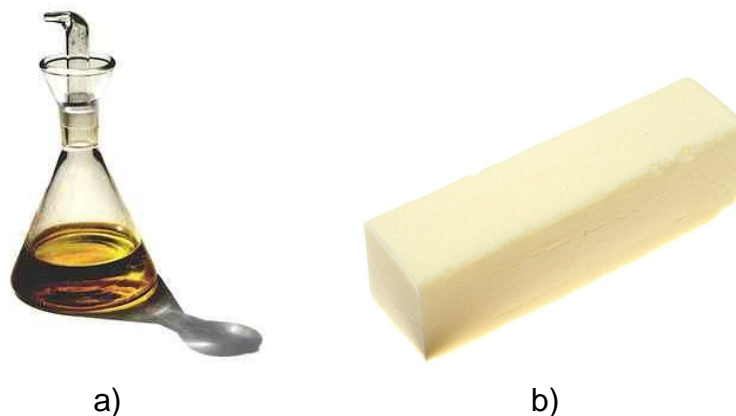
Los aceites refinados son aquellos que se someten a un proceso (refinado) y desodorizado que permite obtener un aceite que responde a ciertos criterios: organolépticamente es de un sabor neutro, visualmente está limpio y con un color adecuado, es seguro alimentariamente y permite una mejor conservación.

Esta técnica suele utilizarse para modificar aceites que no son aptos para el consumo humano (aceite lampate, extraído del bagazo de la oliva) o para poder aumentar la producción de determinados productos, que si fuesen sometidos a

una simple presión en frío para obtener un aceite virgen no resultarían rentables económicamente (semillas de girasol)³².

La composición en cuanto a los ácidos grasos varía de acuerdo al origen del aceite o de la grasa, puesto que si se obtiene de forma animal predominarían los ácidos grasos saturados dando consistencia sólida, en cuanto a la obtención por vía vegetal en su mayoría presentan ácidos grasos insaturados los cuales le dan una consistencia líquida y viscosa como se observa en la figura 2.

Figura 2: Diferencia entre la consistencia entre un aceite vegetal (a) y una grasa animal (b).

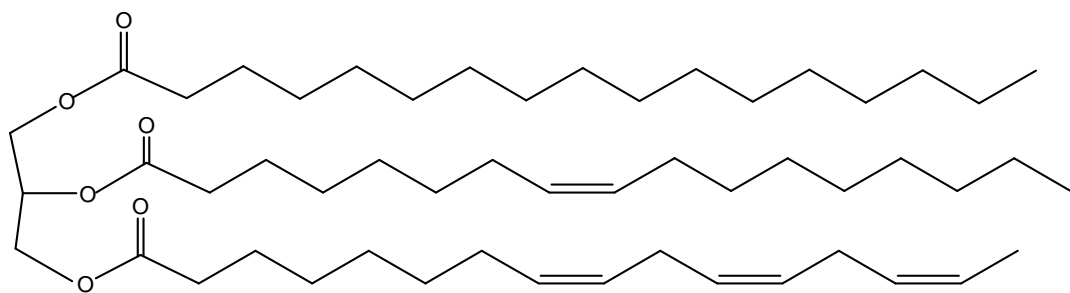


Los aceites vegetales comestibles tienen una función vital en nuestro organismo y constituyen una de las más importantes fuentes de energía, indispensable para mantener el equilibrio de lípidos, colesterol y lipoproteínas que circulan en la sangre, proporcionan vitaminas A, D, E y K y aceites esenciales que nuestro organismo no puede producir; y además, tienen la capacidad de resaltar muchas de las características sensoriales de los alimentos, como el sabor, el

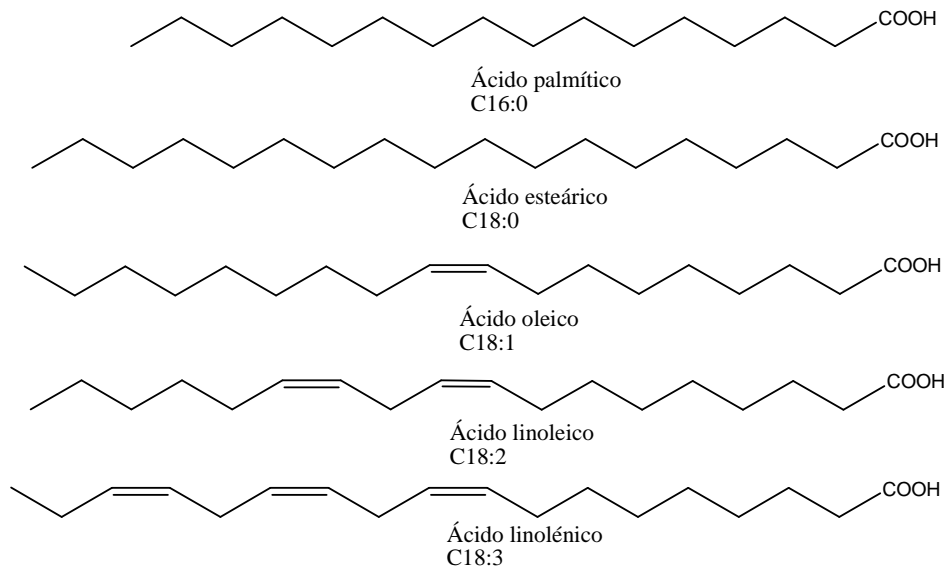
³² Passarelli, A.; *Estudio de Alternativas en el Proceso de Refinación de Aceites Vegetales con la Finalidad de Obtener un Producto para Consumo Humano*, Trabajo de Grado. Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela (1986).

aroma y la textura. Los aceites, así como las grasas, además se componen en su mayoría por triglicéridos de glicerol fosfolípidos y esteroides. El glicerol es capaz de enlazar tres de ácidos grasos llamados carboxilatos. Dichos ácidos grasos por lo general son distintos entre sí; pueden ser saturados o insaturados (los ácidos grasos pueden ser desde 12 carbonos de cadena hasta 22 y 24 carbonos de extensión de cadena, existen en la naturaleza al menos 50 ácidos grasos), a la molécula se le llama triacilglicérido o triacilglicerol, como se puede ver en la figura 3.

Figura 3: a) Triglicérido: glicerol unido a tres ácidos grasos dos insaturados y un saturado. B) Ácidos grasos de importancia y más predominantes en aceite vegetales



a)



b)

En la tabla 1 se dan valores representativos de contenido en ácidos grasos en diferentes aceites.

Tabla 1: Composición de ácidos grasos de aceites vegetales³³

Aceite	% Ácido Graso				
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Oliva	7,5 - 20	0,5 - 5,0	55,0 - 83,0	3,5 - 21,0	0,0 - 1,5
Soya	0,1	10,0 - 10,5	23,5 - 25,5	52,0 - 54,0	7,0 - 7,5
Nuez de palma	15 - 17	6 - 9	13 - 19	0,5 - 2	-
Coco	6 - 11	1 - 4	4 - 11	1-2	-
Canola	3,5 - 5,0	1,0 - 1,5	73 - 77	10 - 14	2 - 4
Maíz	10,4 - 11,0	1,9 - 2,2	25,4 - 30,0	54,9 - 59,4	1,1 - 1,7
Cacahuete	8 - 12	1 - 4	37 - 66	15 - 41	<0,5
Algodón	17 - 31	1 - 3	13 - 21	34 - 60	< 1
Cacao	25,2	35,5	35,2	0,1	-
Girasol	5 - 6	3 - 5	20 - 26	62 - 68	0,1 - 0,5

Los ácidos grasos son la mayor parte de la fracción lípida, son compuestos sencillos y complejos, formados por diversos componentes, tienen una característica analítica y es que pueden ser separados de carbohidratos y proteínas gracias a su total solubilidad en solventes orgánicos y a su insolubilidad en agua. Dan la hidrofobicidad y la reactividad a los lípidos que a su vez participan en la formación de membranas que envuelven a las células y elementos subcelulares. En algunos tejidos animales y órganos de determinados vegetales como la semilla de sus frutos se acumulan especialmente los triacilglicéridos, estos son los verdaderos almacenadores de energía en las células, están compuestos por tres ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol, cada uno de estos lípidos tiene su parte hidrófoba

³³ Calvo, Miguel. Bioquímica de los alimentos. Capítulo Grasas y Aceites. Ed. Creative Commons. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España. 1998. 520 pag.

(cola hidrocarbonada) y su cabeza hidrofílica (cabeza polar) dándole el nombre de compuesto anfipático³⁴.

La importancia de los ácidos grasos para la fisiología de la nutrición, radica en el elevado valor energético de los triacilgliceroles (39 kJ/g aprox.) y la presencia de ácidos grasos esenciales y algunas vitaminas. Aparte de esto tienen ciertas propiedades indispensables para la preparación y obtención de alimentos, en las cuales se destacan: el comportamiento a la fusión, el sabor agradable, la capacidad disolvente para ciertas sustancias sápidas y numerosas sustancias aromáticas.

Estas propiedades son de cierta importancia para conseguir una determinada consistencia, una sensación bucal y aroma específico y una clara estabilidad del aroma. Además, los alimentos se pueden preparar en medio oleoso a temperaturas elevadas. Algunos de estos juegan un papel importante como emulsionantes y como colorantes liposolubles y también son utilizados en la industria cosmética en la fabricación de jabones y encapsulantes de aromas en la perfumería, debido a los diferentes ácidos grasos encontrados en cada tipo de aceite vegetal²⁷.

La composición de los ácidos grasos de una materia prima a otra, (sea animal o vegetal), cambia en cuanto a su composición como en su cantidad dependiendo de factores como la especie, la zona donde es cultivada en el caso de los aceites de origen vegetal, por ello es de importancia conocer esta fracción para determinar la utilidad que se le pueda dar y los beneficios que pueda generar en tanto al sector alimentario como el industrial.

³⁴ Campbell M., Farrell S. Bioquímica. Cuarta edición. Editorial Thompson. México. 2004. 450 pag.

1.2.2. Usos o aplicaciones de los aceites³³.

“Hay que tener en cuenta que existen plantas cuyo aceite no tiene un único uso, por lo cual hay que considerar la siguiente división: industriales, comestibles y fines diversos.

Industriales: Dentro de este grupo el principal representante tanto a nivel mundial como nacional, es el aceite de lino.

Estos aceites, por su poder secante debido a la mayor presencia de ácidos grasos insaturados, poseen valor industrial por ser aptos para producir capas protectoras, debido a la posibilidad de secarse después de su aplicación como películas bien adheridas y resistentes.

Cada aceite tiene usos específicos. El aceite de lino se emplea preferentemente en la elaboración de pinturas y tintas de imprenta, impermeabilización de telas, fabricación de hule, etc. El aceite de tung se emplea en tinturas especiales y lacas. Hay que destacar la competencia surgida en las últimas décadas de estos aceites vegetales con los de origen sintético. El aceite de ricino deshidratado se usa para producir películas más blandas y elásticas que en el caso de los aceites de lino y tung. También se destina a la fabricación de lubricantes, en este caso interesa el bajo poder secante.

Comestibles: Los aceites vegetales tienen su importancia en la industria alimenticia, debido a que juegan un papel importante en la fijación del calcio, caroteno, tiamina, lactosa y con sus vitaminas A, D, E y K, contribuyendo a proveer parcialmente a las necesidades de la alimentación humana.

Entre las especies que proporcionan aceite comestible podemos citar: aceite de girasol, soja, maní, colza, algodón, cártamo, etc.

Es importante considerar la calidad de los aceites comestibles. Esta se mide por distintos parámetros:

- *Grado de estabilidad:* es la capacidad de mantener el sabor en el transcurso del tiempo, como también la resistencia a experimentar cambios frente a variaciones de temperaturas, altas o bajas.
- *Características organolépticas:* sabor, olor color, etc., inciden en la calidad de los aceites, pero las preferencias están asociadas a factores subjetivos del consumidor
- *Nivel nutricional:* Los distintos ácidos grasos que componen el aceite le otorgan características diferenciales, existiendo una relación directa entre dicha composición y el comportamiento en cuanto a la salud humana, especialmente en los problemas cardiovasculares y tasa de colesterol.

Los aceites vegetales para consumo humano, deben tener una relación de ácidos poliinsaturados/saturados alta, pero también hay que tener en cuenta que el ácido linolénico en altas concentraciones puede resultar pernicioso para la salud. Entre los aceites vegetales con mayor contenido de ácido linolénico está el aceite de lino con 60%.

Dentro de los aceites comestibles comunes se destaca el de girasol con un 68% de linolénico. Algunos aceites son ricos en provitamina D, como el de algodón, otros en vitamina E como el maní, las cuales como todas las demás vitaminas, son necesarios para la vida ya que son reguladoras importantes de la formación de varios compuestos de nuestro cuerpo.

Las margarinas son originadas a partir de la hidrogenación de aceites vegetales, principalmente de soja, palma, algodón y maní. Se utilizan como sustitutos de la manteca (grasa saturada de origen animal) ya que esta última genera problemas cardiovasculares.

Fines diversos: se utilizan aceites como por ejemplo de coco, jojoba, palma, etc. Se los utiliza en preparación de cosméticos, jabones, detergentes, etc. En este caso existe un alto grado de sustitución con las grasa de origen animal. También aquí se sintió la competencia ejercida por los productos sintéticos”.

1.3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN ACEITES Y OTROS PARAMETROS DE CALIDAD

Las grasas y aceites vegetales se encuentran en frutos y semillas de las plantas. Es de importancia conocer su composición, incluso los de origen animal, con el fin de predecir su estabilidad, características y ventajas para consumo y utilidades que se le puedan dar como materia prima.

La primera etapa del análisis o estudio de las grasas y aceites consiste en el secado de la materia prima, si esta se encuentra húmeda, se seca hasta un grado de humedad del 5 al 10%, luego se libra de impurezas extrañas, se tritura y se pasa a una segunda etapa que consiste en la extracción de la fracción lípidica, ya sea nivel de laboratorio para análisis (por solventes) o a nivel industrial (prensado). La forma de extracción más utilizada es el *Método Soxhlet*³⁵, el cual consiste en una extracción con solventes apolares que no superan un punto de ebullición del 80°C., lo que garantiza una recuperación del mismo a bajas temperaturas sin promover deterioros del aceite, este método es muy rápido a nivel de laboratorio, puesto que se basa en una extracción sólido-líquido y una posterior concentración para recuperar el solvente y obtener el aceite o la grasa vegetal³⁶.

³⁵ Bernal de Ramírez, Inés. Análisis de alimentos. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Julio Carrizosa Valenzuela N°2. Tercera Edición. Editora Guadalupe LTDA. Bogotá, Colombia 1998. 250 pág.

³⁶ Mayer, L., Métodos de la Industria Química: una visión. Editorial Reverte. Barcelona. España. 1987. 200 pág.

Entre los parámetros a tener en cuenta en el estudio de un aceite se citan: Los índices químicos y físicos del aceite extraído, la composición de los ácidos grasos, punto de fusión, entre otros, los cuales se llevan a cabo por métodos referenciados en la A.O.A.C³⁷. En la tabla 2 se muestran parámetros fisicoquímicos de algunos aceites vegetales³⁸.

Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos de algunos aceites vegetales

Aceite	Oliva	Girasol	Maíz	Algodón	Soya	Colza
Parámetro						
Densidad relativa	0.9148	0.918	0.917	0.918	0.919	0.910
I. Refracción (a 40° C)	1.4672	1.461	1.465	1.458	1.466	1.465
Acidez (% ácido oleico)	1	0.05	0.1	0.05	0.05	0.1
Yodo (g I ₂ / 100 g)	87	104-120	107-135	100-115	124-139	94-120
Peróxidos (meq l/g)	1.5	2	2	2	2	2
Saponificación (mg KOH/g)	182-190	188-194	187-195	189-198	189-195	168-181

Para la determinación de la composición lipídica se han aplicado varias técnicas, entre estas se tiene: La espectroscopia IR y ¹H-RMN (Resonancia magnética nuclear protónica). La espectroscopia IR puede efectuar una determinación muy sencilla de los grupos funcionales presentes de los diferentes compuestos del aceite y también conocer la fracción de los ácidos grasos de una muestra oleaginosa siempre y cuando se conozca el tipo de muestra que se está tratando. Mediante la espectroscopia de ¹H-RMN, la cual se basa en el efecto de resonancia del núcleo protónico de los ácidos grasos presentes, en donde la intensidad de la señal es directamente proporcional al contenido de aceite y es más notoria en la matriz oleosa que en la no oleosa

³⁷ A.O.A.C. Official method of Analysis. Chapter 41: Oils and Fats. 17 edition. 2000

³⁸ NORMA DEL CODEX PARA ACEITES VEGETALES ESPECIFICADOS. CODEX STAN 210-1999. (Citado 30 junio 2008). Disponible en la página web: www.codexalimentarius.net/download/standards/stan/210-1999.pdf

(carbohidratos, proteínas, etc.). Este método es de gran importancia y de interés puesto que estudia el desarrollo de nuevas variedades de plantas, permitiendo la determinación del contenido en aceite de semillas intactas sin previa desecación. Además de establecer de igual forma la relación entre los triacilglicerolos líquidos y sólidos de una muestra oleaginosa.³⁰

1.3.1 Cromatografía de gases y análisis de aceites vegetales y grasas

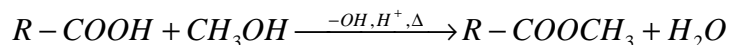
El análisis por cromatografía de gases se puede llevar a cabo debido a su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas y sistemas bioquímicos siendo un método que permite determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito. Estos análisis se llevan actualmente utilizando columnas capilares debido a su mayor eficacia, y los detectores mas utilizados son el FID y masas (espectrofotómetro acoplado)³⁹.

La cromatografía de gases es elegida como técnica para el análisis de aceites y grasas debido a que esta no presenta el inconveniente de manejar presiones y flujos durante la elusión de los ácidos grasos en otros tipos de cromatografía líquida como la CLAR (Cromatografía líquida de alta eficacia), puesto que los elevados pesos moleculares hacen que la elusión de cada analito no sea completa, hecho que en la cromatografía de gases se elimina, pues su elución depende de la volatilidad al manejar elevadas temperaturas.

³⁹ Skoog, Douglas A., James Holler. Principios de Análisis Instrumental. 5ª Edición. McGraw-Hill. Madrid, España. 2001. 1024 pág.

Los ácidos grasos son compuestos que presentan labilidad térmica, pero con una previa derivatización se mejora su estabilidad térmica, su volatilidad y en algunos casos la sensibilidad en la detección, asegurando así, una elusión completa de cada analito durante el análisis, el cual se realiza a la fracción saponificable del aceite que representa hasta el 98% de su composición, la cual está constituida por triglicéridos con ácidos grasos entre 16 y 24 carbonos en su cadena, donde en aceites vegetales generalmente el mayoritario es el ácido oleico. También presentan ácidos grasos saturados, todos ellos en posición *cis*, los cuales cambian debido a ciertos procesos por efecto externo⁴⁰.

El proceso de derivatización de los ácidos grasos del aceite es un proceso muy útil debido a su sencillez, permitiendo disminuir la labilidad térmica. Se fundamenta en la reacción de los ácidos grasos del triglicérido y un exceso de metanol en un medio alcalino o medio ácido o utilizando un ácido de Lewis (BF₃) como catalizador:



Otro posible método a escala analítica es la reacción de los ácidos grasos del aceite con una solución de diazometano en éter³⁰.

Por cromatografía de gases se han analizado diversos aceites y grasas de uso común, su composición y otras fracciones de interés, de lo cual cabe destacar que el principio es el mismo variando las condiciones de análisis como la fase estacionaria (columna capilar), flujo y pre-tratamientos de muestra dependiendo del análisis a realizar. La presencia de tocoferoles, alcoholes con estructuras terpénicas, flavonoides, esteroides, compuestos volátiles, pigmentos e hidrocarburos, y por supuesto la fracción saponificable que en su gran mayoría es compuesta por los ácidos grasos, entran en los innumerables análisis de los

⁴⁰ Aparicio, R., Harwood, J. Manual del aceite de oliva. AMV Ediciones. España. 2003. 614 pag.

aceites y las grasas, encontrándose estudios detallados para cada uno de estos componentes.^{40, 41}

Según la A.O.A.C., cada ácido graso en su contraparte esterificada tiene un tiempo de retención para la comparación de estos con los determinados en una muestra de aceite o grasa desconocida, de los cuales algunos valores se presentan en la tabla 3.

Tabla 3: Algunos tiempos de retención de esteres metílicos de ácidos grasos³⁵

Ácido graso	Tiempo de retención (min.)*	Tiempo de retención relativo
4:0 Butírico	10.49	0.46
8:0 Caprílico	15.69	0.68
10:0 Capríco	20.39	0.89
12:0 Láurico	25.58	1.11
14:0 Mirístico	30.65	1.33
15:0 Pentadecanoico	33.04	1.44
16:0 Palmítico	35.41	1.54
16:1 Palmitoleico	36.88	1.60
18:0 Estearico	39.78	1.73
18:1 Oleico	40.99	1.78
18:1 Octadecenoico	41.54	1.81
18:2 Linoleico	42.87	1.86
20:0 Aráquidico	43.75	1.90
18:3 γ -Linolénico	44.25	1.92
18:3 Linolénico	45.02	1.96
20:2 Eicosatrienoico	46.65	2.03
22:1 Erúcico	48.50	2.11
22:2 Docosadienoico	50.17	2.18

* Este tiempo de retención varía según las condiciones cromatográficas como el tipo de columna utilizada. Datos reportados para una columna capilar SP2560 100 m x 0.25 mm x 0.20 μ m, gas de arrastre helio a 0.75 mL/min, inyección split 200:1 a 225 °C y con detector FID 285 °C.

⁴¹ Methods of Analysis of Food Components and Additives. Ötles Semih. Ege University. Department of Food Engineering. Izmir, Turkey. Taylor & Francis Group, LLC. CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group. 2005. 450 pag.

Actualmente, las microempresas en nuestra región, utilizan frutos nativos de los cuales solo una parte del mismo es aprovechada, como el pericarpio o la pulpa, desechando grandes cantidades de materia orgánica sin utilidad alguna, como las semillas de los mismos. El aprovechamiento de estos desechos representa un reto para aportar nuevas ideas en la elaboración de productos con un alto valor nutritivo a un bajo costo, que puedan ser utilizados para consumo humano y de uso industrial. Las semillas del fruto del totumo contienen en su interior almendras que son altamente oleaginosas, lo que significa que se puede obtener aceite vegetal a partir de un procedimiento de extracción adecuado, por lo que se considera que es un subproducto de desecho al que no se le ha prestado todavía atención. De la bibliografía consultada no se ha obtenido dato alguno relacionado con su aprovechamiento y los referentes a la composición de la grasa de la semilla son muy incompletos y de relativo valor. De aquí nuestro interés de estudiar las características fisicoquímicas y su composición en ácidos grasos mayoritarios del aceite del totumo y generar así un cuadro analítico de los datos y resultados obtenidos que permitan analizar su posible aprovechamiento agroindustrial y nutricional por la comunidad de la región, así como la motivación de las empresas ampliando el sector agrícola e industrial en conjunto con posibles aplicaciones que se le puedan dar a esta fracción del fruto del totumo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Identificar y cuantificar por medio de Cromatografía de Gases (CG-FID) los ácidos grasos presentes en la semilla del totumo (*Crescentia cujete L.*), proponiendo alternativas de aprovechamiento de este subproducto, según el contenido y calidad del aceite presente para generar una visión como nueva fuente agroalimentaria y de desarrollo tanto a nivel comercial como químico

Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente la composición de la semilla del fruto del totumo, mediante el análisis proximal.
- Establecer las propiedades fisicoquímicas del aceite extraído de la semilla del fruto del totumo, mediante los denominados índices de grasas establecidos según la A.O.A.C.
- Extraer y caracterizar los ácidos grasos mayoritarios del aceite de la semilla del fruto del totumo (*Crescentia cujete L.*), por Cromatografía de Gases, determinando diferentes parámetros que servirán como criterio de confianza del método.
- Proponer un conjunto de aplicaciones para el extracto graso resultante del subproducto en estudio, según los resultados obtenidos de los diferentes análisis realizados.

3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS

Todos los reactivos y solventes utilizados para el desarrollo experimental, fueron de grado analítico, se describen a continuación:

Ácido sulfúrico, 97% (Mallinckrodt)

Catalizador para proteína (tabletas kjeldalh) libre de Hg y Se (Merck)

N-Hexano, 98.5% (Merck)

Hidróxido de sodio en lentejas, 99.9% (Merck)

Hidróxido de Potasio, 85% (Carlo Erba)

Fenolftaleína, 1% en etanol

Éter etílico, 99.9% (Mallinckrodt)

Alcohol Etílico, 96% (Merck)

Cloroformo (Mallinckrodt)

Reactivo Wijs (ICI) 0.1 M (Merck)

Yoduro de Potasio, 99.9% (Carlo Erba)

Tíosulfato de Sodio, 99.9% (Carlo Erba)

Almidón comercial

Acido Acético Glacial (Merck)

Cloruro de Metileno, 99.6 % (Sigma-Aldrich)

Sulfato de Sodio Anhidro, 99% (Carlo Erba)

Alcohol Métilico, 96% (Merck)

Cloruro de Amonio, 98% (Carlo Erba)

Patrón FAME 10 mg/mL. Cat. No. 47801(Supelco)

Patrón Acido Nonadecanoico, 99.5% (Fluka Chemis)

3.2 EQUIPOS

Para el tratamiento de la muestra y realizar los análisis fisicoquímicos, de calidad y de cuantificación de los ácidos grasos de interés en las muestras de aceite extraído de la semilla del totumo se emplearon los siguientes equipos.

Balanza analítica METTLER AE 200 (200g \pm 0.0001)

Plancha CORNING PC -240

Horno FISHER SCIENTIFIC Mod. 737G

Refractómetro Abbé

Rotaevaporador Heidolph Laborota 4001

MiniVap Supelco con pipa de nitrógeno

Mufla Terrigeno F2PGA

Ultrasonido Brasonic 151 OR-MT

GPS Map 76 Garmin

Campana de extracción Extractor C180X std.

Espectrofotómetro UV-Vis TERMO Electronic GENESIS 6

Cromatógrafo de gases HP-6890 con detector FID

Microjeringa de 5 microlitros HAMILTON 87930

Despulpadora COMEK tamiz 0.05 mm

3.3 MATERIA PRIMA Y MUESTREO

Para el desarrollo de la parte experimental se realizó un muestreo de los frutos de totumo para posteriormente llevar a cabo un análisis de laboratorio que consistió en ensayos fisicoquímicos de la semilla, la extracción de su aceite, el análisis fisicoquímico de la fracción lípidica y la cuantificación de los ácidos grasos de interés.

3.4 TOMA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La semilla de los frutos de totumo (*Crescentia cujete L.*) constituyen la materia prima utilizada para la extracción del aceite. En cuanto a su tratamiento se tuvo en cuenta lo siguiente:

3.4.1 RECOLECCION DE LOS FRUTOS

Se realizaron dos muestreos; el primero fue en la propiedad de la Hacienda la Pachuca, ubicada en el Bordo (Patía), departamento del Cauca (Colombia) en el mes de marzo de 2007, donde fueron cosechados y seleccionados una cantidad de 220 frutos. El segundo muestreo se realizó durante el mes de noviembre de 2007, mediante un recorrido por los sectores del valle del Patía recolectando y seleccionando una cantidad igual al primer muestreo de frutos. La figura 4 muestra el sitio de recolección de los frutos.

3.4.2 TOMA DE MUESTRAS

Debido a que el árbol del fruto del totumo no presenta un sistema de cultivo tecnificado, no fue posible establecer un patrón definido de muestreo de la variedad seleccionada, por lo cual, se realizó de forma aleatoria simple, con 20 unidades de muestra de una población de tamaño igual a 220 unidades (ver tabla 4), que fueron recolectadas directamente de la zona de producción (ISO-874)⁴².

⁴² ISO 874: 1980. Fresh fruits and vegetables sampling. Fecha de ratificación 2000

Figura 4: Recolección de los frutos de totumo



Tabla 4. Muestreo de productos a granel (Norma ISO 874)⁴²

Masa del lote en Kg o número total de manojos o paquetes en el lote extraídos (mínimo)	Masa total de muestras elementales (en Kg) o número total de manojos o paquetes a ser extraídos
Hasta 200	10
201-500	20
501-1000	30
1001-5000	60
Más de 5000	100

De la muestra universal, tanto para el primer como para el segundo muestreo, se tomaron totalmente al azar 220 frutos, estos conformaron la muestra global. De ésta se tomaron al azar 20 frutos que constituyen la muestra reducida destinada para el análisis.

3.4.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL FRUTO DEL TOTUMO

Se determinaron los principales parámetros físicos de los diferentes componentes de los frutos estudiados, tanto su pericarpio como su pulpa y semilla, esta última de interés en el presente trabajo.

Tamaño, forma y peso: Los frutos son pesados de manera individual en una balanza de 1 g de precisión. Posteriormente se determina su diámetro, y por

observación, se establece la forma más común que presentan al igual que su color y textura.

Cáscara: Para esta fracción se procede evaluando color, apariencia, textura

Pulpa: Para esta fracción se procede de igual manera que con la cáscara, evaluando color, apariencia, textura y cambios físicos durante el despulpado antes del mismo.

Semilla: Por observación directa se evalúan algunas de sus características como: forma, tamaño, color, textura. En la figura 8 se observa la semilla obtenida después del despulpado y características de una semilla en general:

Selección y preparación de los frutos: Se recogieron según su estado de madurez y estado fitosanitario, rechazando aquellos que presentaron daños por golpes, ataque de hongos e insectos y los frutos totalmente inmaduros o sobremaduros. Ya seleccionados se pesaron en conjunto, para posteriormente ser despulados de forma manual, separando la cáscara de la pulpa y las semilla; para la cual se utilizó una despulpadora COMEK tamiz 0.05 mm. Las semillas obtenidas, se lavaron y secaron para su conservación, empaque a vacío, rotulación y almacenamiento a 4° C hasta el momento del análisis. El rendimiento en el despulpado se calculó a partir del peso obtenido de cáscara, pulpa, y semilla respecto al peso del fruto entero.

3.5 CARACTERIZACION DE LA SEMILLA DEL TOTUMO Y SU ACEITE

3.5.1 Tratamiento de la semilla

Separadas las semillas del fruto, estas se sometieron a un lavado general, se rotularon y se almacenaron a 4°C.

El tiempo de secado total de la semilla hasta peso constante fue de 60°C, se estableció en 24 horas. Posteriormente se trituró mediante un molino casero

sometida nuevamente a sequedad por 12 horas a 60°C. Por último se realizó una homogenización de tamaño de muestra utilizando un tamiz # 20 para el análisis mediante un cuarteo de la misma.

3.5.2 Análisis Físicoquímico de la Semilla

Análisis proximal de la semilla del Totumo: A continuación se indica la metodología utilizada para el análisis proximal y de minerales de la semilla:

Tabla 5: Análisis químico de la semilla del totumo ^{iError! Marcador no definido.}

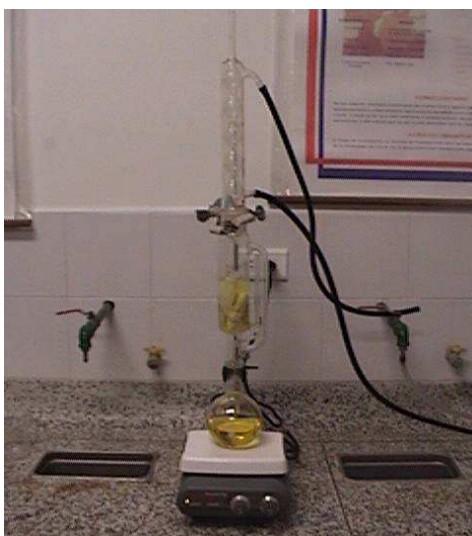
DETERMINACIÓN	DESCRIPCIÓN	MÉTODO
Humedad	Desecación a 100-105°C en estufa a presión constante hasta peso constante por 3 horas	Deshidratación
Ceniza	Calcinación a 550°C, por 4 horas	Calcinación
Extracto etéreo	Extracción Soxhlet, por 4 horas	Soxhlet
Proteína bruta	Digestión ácida y destilación de nitrógeno	Kjeldahl
Fibra bruta	Digestión ácido-base y calcinación	Weende
Extracto no nitrogenado	Por diferencia	
Hierro Total	Determinación mediante absorción UV a 510 nm	Complejo hierro-fenantrolina
Calcio	Determinación complejo-métrica con EDTA	Complejometría
Magnesio	Determinación complejo-métrica con EDTA	Complejometría
Fósforo	Determinación mediante absorción UV a 690 nm	Complejo ortofosfato-molibdato

3.5.3 Extracción del Aceite de la semilla del Totumo

Esta operación se llevó a cabo mediante una extracción sólido-líquido en un equipo Soxhlet de 100 mL, empleando como solvente n-Hexano, tal como se muestra en la figura 5. Con el propósito de garantizar el máximo rendimiento de la fracción lipídica se optimizó el tiempo de extracción manteniendo constante la cantidad de muestra de semilla en aproximadamente 2 gramos (por triplicado) y variando los tiempos de extracción cada dos horas hasta completar 14 horas. Se encontró un tiempo óptimo de extracción de 12 horas.

El extracto aceite-solvente se concentró en un rotaevaporador a una temperatura que osciló entre los 30 y 40 °C, con una rotación de 100 rpm en promedio y aplicando vacío, hasta obtener el aceite libre de solvente. Para garantizar la eliminación máxima de restos de solvente en el aceite, se secó a 50 °C por espacio de 6 horas en una estufa a presión atmosférica; el aceite se almacenó en frasco ámbar bajo refrigeración (4-5 °C).

Figura 5. a) Extracción soxhlet con solvente n-hexano, b) aceite extraído



a)



b)

3.5.4 Análisis fisicoquímico del aceite extraído de la semilla del Totumo

Para establecer los índices fisicoquímicos del aceite extraído se llevaron a cabo los análisis químicos de densidad, índice de refracción, viscosidad, punto de humo, título de aceite, índice de yodo, índice de acidez, índice de saponificación, índice de peróxidos, rancidez oxidativa y fósforo.

La metodología empleada para cada análisis corresponde a protocolos oficiales y se describe en la tabla 6.

Tabla 6: Análisis fisicoquímico del aceite extraído de la semilla del totumo

DETERMINACIÓN	DESCRIPCION	MÉTODO
Densidad	Relación de peso entre el aceite y agua a 20° C	A.O.A.C. 920.212*
Índice de refracción	Medición de la línea de refracción en un prisma a 20° C	A.O.A.C. 921.08*
Viscosidad	Determinación por medición de tiempo y velocidad de flujo	Stokes
Punto de Humo	Temperatura a la cual un aceite presenta cambios en su apariencia	A.O.A.C. 920.156*
Titulo aceite	Temperatura de solidificación de los ácidos grasos libres	A.O.A.C. 942.18*
Índice de yodo	Cantidad de yodo absorbido con relación a la cantidad de instauraciones	A.O.A.C. 920.159*
Índice de acidez	Cantidad de KOH que reacciona con ácidos grasos libres	A.O.A.C. 940.28*
Índice saponificación	Cantidad de KOH para dar aproximación del peso molecular de los ácidos grasos.	A.O.A.C. 920.160*
Índice de peróxidos	Cantidad de yodo absorbido en relación al oxígeno activo de un aceite	A.O.A.C. 965.33*
Rancidez oxidativa	Cambio de color por reacción del aceite con florogucina	Complejo trihidroxibenceno-acetilo**
Fósforo	Absorción UV a 690 nm	Complejo ortofosfo-molibdato**

* Ver referencia 37

** Ver referencia 35

3.6 IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL PERFIL DE ACIDOS GRASOS MAYORITARIOS DEL ACEITE DE LA SEMILLA DEL TOTUMO.

3.6.1 Estandarización de la técnica analítica.

Teniendo en cuenta, las diferentes investigaciones realizadas acerca de condiciones de análisis de grasas y aceites mediante métodos cromatográficos, se optimizaron las condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases con detector de Ionización por llama tales como: el flujo optimo de la fase móvil

(He), rango y rampas de temperatura para la columna utilizada⁴³, esto se llevo a cabo mediante la resolución de los picos cromatográficos, separando los dos picos menos resueltos variando el flujo del gas de arrastre (0.6 a 2.6 mL/min.) y las temperaturas en el horno de la columna.

Establecidas las condiciones de trabajo, se realizó un ensayo cualitativo con un patrón (mezcla de esteres metílico de ácidos graso) inyectando en el cromatógrafo de gases 1 µL de la solución patrón en modo splitless, con lo que se determinaron los tiempos de retención de los ácidos grasos de interés en su éster metílico: ácido palmítico, esteárico, oleico, linoléico y linolénico respectivamente. De igual forma se procedió con el éster metílico del ácido nonadecanoico (patrón interno).

Teniendo en cuenta los problemas de fluctuación instrumental y los errores instrumentales, se eligió el método analítico más adecuado para la cuantificación, ya que tanto el componente de interés (analito) como el patrón interno, experimentan las mismas variaciones, se fijaron los siguientes parámetros:

Sensibilidad y Linealidad: Establecidos los tiempos de retención y su óptima separación, se preparó una curva de calibración estándar de analito (FAME Supelco Cat. No. 47801) en relación al patrón interno (ácido nonadecanoico 99.5% Fluka Chemis, previa derivatización), preparando una solución de patrón interno de 18.51 ppm (concentración constante) y 5 soluciones de concentraciones variables de cada analito (éster metílico de cada ácido graso palmítico, esteárico, oleico, linoléico, linolénico) donde se determinaron la media, la desviación estándar, la linealidad (límites de confianza inferior y

⁴³ Fatty acid composition of Allium species lipids. Michael C. Tsiaganis, Katerina Laskari, E. Melissari. Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) 620–627

superior del total del gráfico), el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación de cada recta de calibración por el método de patrón interno.

Para la determinación de la sensibilidad del método se evaluaron los límites de detección y de cuantificación en donde se realizaron curvas de calibración correspondientes para cada analito por debajo del punto de concentración más bajo a 50%, 25% y 15% de este punto. Para el ácido linolénico se tomaron los datos correspondientes a la curva de calibración principal realizando el mismo tratamiento de datos que para las curvas de baja concentración para los demás analitos. Para su determinación se determinó la desviación estándar del blanco, la pendiente y el intercepto

Determinación de la precisión: Un patrón de concentración correspondiente al punto medio de la porción lineal de la curva, se inyectó por triplicado durante 5 días consecutivos (reproducibilidad) y cada 5 días por espacio de 20 días (repetibilidad) en el cromatógrafo de gases, determinándose la media y los límites de confianza para los datos obtenidos de la medida de la relación de áreas entre cada analito y el patrón interno. Los parámetros de calidad para evaluar la precisión del método analítico aplicado son: *la desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa (RSD), desviación estándar de la media, coeficiente de variación y varianza*, se evaluó la dispersión de datos obtenidos con el estándar en relación al valor medio.

Determinación de la Exactitud: Con el fin de establecer la exactitud del método de cuantificación, se calculó el porcentaje de error sobre las mediciones realizadas por triplicado a una solución patrón de concentración intermedia para cada analito en la mezcla patrón de ésteres metílicos y del patrón interno a la misma concentración de trabajo (18.51 ppm) establecido mediante su relación de áreas.

Determinación de los ácidos grasos: Ya estandarizado el método de cuantificación, se procedió a determinar los diferentes ácidos grasos presentes en la muestra de aceite extraído, comparando los tiempos de retención con los obtenidos con el patrón mezcla de esteres metílicos de ácidos grasos.

3.6.2. Inyección de las muestras en el Cromatógrafo de Gases

Tratamiento de la muestra de aceite extraído: El aceite extraído se sometió a sequedad a 50°C durante 2 horas para realizar la derivatización de los ácidos grasos presentes mediante una reacción de esterificación con metanol en medio ácido para mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y su límite de detección, como se describe a continuación⁴⁴:

Se pesaron por triplicado, entre 200 y 300 mg de aceite en una balanza analítica con precisión de +/- 0.0001 g; en un matraz de 100 mL adaptado a un condensador de reflujo, se adicionaron 5 mL de KOH metanólico 5%, se sometió a reflujo por 5 min. Se adicionaron 15 mL de reactivo esterificante (2 g NH₄Cl, 60 mL metanol, 3 mL H₂SO₄ conc.) continuando el reflujo por 15 min. más, se enfrió y se adicionó 50 mL de agua desionizada y 25 mL de n-hexano. Se separó la capa orgánica mediante un embudo de separación, la capa acuosa se lavó con 10 mL de n-hexano por 4 veces y se juntaron las capas orgánicas para ser concentradas mediante rotaevaporación a 25 °C y aplicación de vacío hasta obtener 5 mL de residuo el cual fue posteriormente secado con nitrógeno y redissuelto en cloruro de metileno, embazado en viales color ámbar a -10 °C.

⁴⁴ PEARSON O. Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos. Editorial ACRIBIA. España 1976.

Procedimiento aplicado al patrón interno del cual se pesó entre 10 y 20 mg.

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo como se describe en 3.5.3, 3.6.1 y 3.6.2 se realizaron los análisis de los ácidos grasos presentes en el aceite extraído de la semilla del totumo realizando inyecciones por triplicado de 1 μL en el cromatógrafo de gases.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se llevará a cabo la interpretación y el análisis de los datos registrados durante el desarrollo experimental.

4.1. TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRA

Se dividió en dos etapas, la primera consistió en la recolección y selección de los frutos, y la segunda en la determinación de sus parámetros físicos antes de su posterior tratamiento para obtener la materia prima de interés, la semilla.

4.1.1. Recolección y Selección

La muestra se recolectó en el Bordo Patía (Cauca), localizado a los 02° 06' 56" de latitud norte y 76° 59' 21" de longitud oeste, con una altura sobre el nivel del mar: 910 m, temperatura media: 23°C y precipitación media anual: 2.171 mm⁴⁵.

La elección del sitio de recolección; tuvo en cuenta factores como la resistencia del árbol de totumo de la variedad *Crescentia cujete* L. a la degradación presentada de los recursos naturales en esta región y la erosión de los suelos, siendo una zona donde hay una mayor presencia de este árbol tanto silvestre como en cultivo.

Se recolectaron los frutos para el análisis teniendo en cuenta las zonas donde se presenta una producción considerable de frutos; como es el caso de la hacienda la Pachuca y las zonas del alrededor del municipio del Bordo-Patía donde hay siembras silvestres de este árbol.

⁴⁵ PATIA-BORDO. Sitio Oficial de Patía-Bordo en Cauca. Información del municipio. (Citado el 08 de Julio de 2008). Disponible en la pagina web: <http://patia-cauca.gov.co/>

La selección de los frutos de totumo (véase 3.4.), se realizó teniendo en cuenta el estado de madurez, parámetro que se determinó con la consistencia de los mismos, los blandos indican un estado no maduro, mientras que los de consistencia dura son aquellos que presentan un buen estado de madurez.

Para la selección de los frutos y la obtención de la muestra reducida se consideró: el estado fitosanitario de los frutos, desechando aquellos que presentaron daños como consecuencia de golpes y presencia de insectos u otros microorganismos tanto en su interior como en el exterior del fruto, asegurando así que la materia prima a analizar no presentara alteración por efectos de degradación por consecuencia de procesos enzimáticos o químicos durante el almacenamiento, su tamaño y peso teniendo en cuenta aquellos que se encontraban maduros con características como mayor diámetro y peso en comparación a los inmaduros. En la tabla 7 se muestra la cantidad de frutos considerados para la obtención de la muestra reducida

Tabla 7: Detalles de recolección y selección de los frutos

	Frutos recolectados	Frutos rechazados	Frutos seleccionados	Frutos para análisis*
Hacienda “La Pachuca”	220	10	210	20
Zonas aledañas Bordo-Patía	220	4	216	20

* Ver 3.4.2, tabla 4.

4.1.2. Caracterización física

Debido a la no existencia de una norma para la caracterización física de este fruto, se realizó teniendo en cuenta aspectos como color, forma, peso (figura 6), para caracterizar el fruto, las observaciones se consignan en la tabla 8:

Tabla 8: Características físicas del fruto del totumo (*Crescentia cujete* L.)

Característica	Observación
Tamaño promedio (diámetro maduro)	11.89 cm
Forma	Ovalada-redonda
Peso promedio (maduro)	1275 g
Color (inmaduro)	Verde
Color (maduro)	Verde-marrón
Textura (inmaduro)	Firme
Textura (maduro)	Blando

Figura 6: Forma y tamaño de los frutos recolectados en los muestreos correspondientes



Los frutos presentaron una coloración verde-marrón en su cáscara y una textura firme y dura indicando una maduración en plenitud.

Al fraccionar el fruto maduro se obtienen tres partes: cáscara, semilla y pulpa, cuyas características físicas generales se muestran en la figura 7 y se resumen en la tabla 9.

Tabla 9: Características físicas de las fracciones del fruto maduro del totumo (*Crescentia cujete* L.)

Fracción	Característica física
Cáscara	Color verde-marrón que al cabo de un tiempo se tornan marrón completamente, grosor de 1 a 2 mm, consistencia firme y dura y al estar secas son quebradizas
Pulpa	Es de color blanca y consistencia fibrosa y gelatinosa, presenta cambio de color a pardo casi inmediatamente de cortado el fruto por lo que evidencia un proceso de oxidación rápido
Semilla	Es de color marrón, consistencia firme y de forma ovalada en forma de almendra, presenta endospermo.

Figura 7: a) cáscara, b) pulpa del fruto, c) semilla húmeda, d) semilla seca



a)



b)

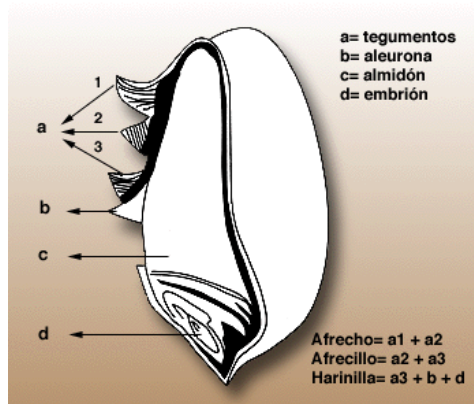


c)



d)

Continuación figura 7: e) características de una semilla del totumo



e)

4.1.3. Rendimientos de despulpado

En la figura 8, se observa el procedimiento manual de separación de la pulpa y la separación de la semilla utilizando una despulpadora de frutas; en la tabla 10 se reportan los rendimientos de despulpado:

Figura 8: Proceso de despulpado del fruto para la obtención de la semilla: a) cortado del fruto, b) separación de la cáscara



a)



b)

Continuación figura 8: c) despulpado



c)

Tabla 10: Rendimiento de despulpado del fruto de totumo (*Crescentia cujete L.*)

Producto	Muestreo 1		Muestreo 2	
	Peso (Kg.)	Rendimiento	Peso (Kg.)	Rendimiento
Materia prima utilizada	22.950	-	25.295	-
Pulpa	11.130	48.49%	12.011	47.48%
Cáscara	6.290	27.40%	8.124	32.12%
Semilla	1.308	5.70%	1.793	7.09%
Perdidas	4.222	18.41%	3.367	13.3%

Debido a los inconvenientes presentados al separar la pulpa de la semilla manualmente como la gran cantidad de pulpa que quedaba en la semilla, además, de generar manchas y deterioro en la piel durante el proceso, se procedió a realizarlo mediante una despulpadora de frutas. La cáscara se separó justo antes de dicho proceso, debido a que la pulpa presenta un pardeamiento, posiblemente se deba a la presencia de componentes sensibles a la oxidación, lo cual, podría afectar las características de la semilla. Las pérdidas presentadas son en general, agua del mismo fruto ya que durante el despulpado se separaba gran cantidad, también pulpa que quedaba en la cáscara y residuos de esta y de semilla depositados en la despulpadora.

El rendimiento de la semilla extraída está entre 5.7% y 7.09%, comparado con los otros componentes del fruto estos porcentajes son bajos, sin embargo representan una cantidad importante cuando se considera que el número de árboles disponibles para cosecha en el sector de recolección oscila entre los 25000 y 30000, en donde la producción por árbol al año es de alrededor de 100 frutos y solo se usa su cáscara con fines artesanales lo cual representa solo una utilidad del fruto del 32.12%. Los residuos resultantes de esta actividad con un porcentaje del 54.57% entre pulpa y semilla, generan una alta contaminación por su degradación al aire libre y su aprovechamiento podría fomentarse con miras a fortalecer esta cadena productiva.

4.1.4. Características de la semilla

Las semillas son pequeñas y lisas en forma de almendra, en la tabla 11 se registran las observaciones físicas realizadas sobre esta parte del fruto.

Tabla 11: Características físicas de las semillas del fruto del totumo (*Crescentia cujete L.*)

Característica	Observación
Tamaño promedio	Diámetro: 5-6 mm Largo: 7-9 mm Grosor: 1-2 mm
Forma	almendra
Peso promedio (100 semillas secas)	4.02 g
Color	Marrón
Textura	Firme

Las semillas de los frutos maduros luego del proceso de despulpado y lavado presentan características como consistencia firme, color marrón y una forma de almendra en su testa con presencia de endospermo, además, presentan una capa gelatinosa que las recubre. Las semillas de los frutos inmaduros no presentan endospermo en su interior por lo que no fueron de interés para este análisis.

4.2. CARACTERIZACION DE LA SEMILLA DEL TOTUMO Y SU ACEITE

Se llevó a cabo un análisis químico para establecer su contenido en macro y micronutrientes de interés

4.2.1. Características fisicoquímicas de la semilla

Los resultados de la composición química de la semilla del totumo se muestra en la tabla 12, se compara con un único reporte encontrado de su composición en Centro América (Honduras)²⁴:

Tabla 12: Comparación de la composición química de la semilla del totumo (*Crescentia cujete L.*), Patía (Cauca) con los reportados en Honduras (contenidos por 100 g de fruto)

CONTENIDO (± 0.0001 g)	EL PATIA		HONDURAS ²⁴	HONDURAS ²⁴
	Base Húmeda	Base seca	Base Húmeda	Base Seca
Humedad (g)	4.60%	-	7.80%	-
Proteína (g)*	19.89%	20.85%	30.25%	32.80%
Grasa (g)	39.17%	40.01%	34.10%	36.98%
Fibra (g)	24.74%	25.93%	12.98%	14.07%
Ceniza (g)	2.79%	2.93%	3.34%	3.62%
ENN (g)	9.81%	10.28%	11.53%	12.43%
Calcio (mg)	66.62	69.40	90	97
Magnesio (mg)	151.28	158.57	-	-
Fósforo (mg)	631.83	662.3	690	750
Hierro (mg)	8.80	9.20	-	-

*Factor utilizado 5.7 (N x 5.7)

Después del despulpado la semilla retuvo una gran cantidad de agua (aproximadamente un 50% de su peso inicial), por lo cual fue necesario realizar un proceso de secado para evitar deterioros del material por ataque de microorganismos y otros factores que pudiesen causar daños a la materia prima hasta el momento de su tratamiento y análisis.

El análisis fisicoquímico de la semilla seca, arrojó un porcentaje relativamente bajo en humedad (4.6%), esta es el agua que conserva la semilla luego del

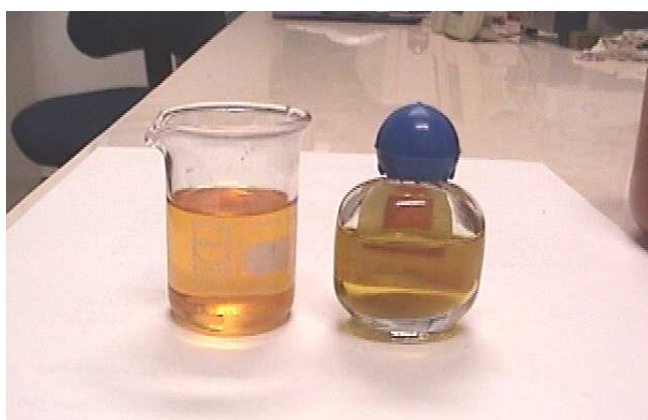
proceso de secado, e indica que puede conservarse bajo condiciones adecuadas evitando así ataques microbianos y reacciones con otras macromoléculas en medio acuoso que se pueden generar durante el almacenamiento y generar deterioros de la misma. En cuanto a su fracción proteica, puede ser parte esencial en cuanto a su valor nutricional debido a su alto porcentaje, fracción en la cual se adelanta un estudio para determinar dichos valores nutricionales con respecto a su composición. La semilla presenta un alto contenido graso y la determinación de su composición lipídica, puede servir como información básica para la búsqueda de aplicaciones a nivel tecnológico y nutricional, direccionado esta materia prima a la industria. Con respecto al contenido de fibra, su alto contenido es en buena parte debido a la presencia de la cascarilla de la misma semilla, que al ser sometida a procesos de molienda y tamizado puede reducir este valor, puesto que un elevado contenido de fibra puede interferir en la asimilación de minerales si se busca una aplicación en nutrición animal, pero también en un porcentaje adecuado puede ser benéfico si es para nutrición humana.

El contenido de cenizas, que representa el contenido mineral o inorgánico presente en la semilla, es relativamente bajo con respecto a las demás fracciones y estos estarán influenciados por la disponibilidad de los mismos en el suelo de cultivo; encontrándose en esta fracción una buena proporción de minerales como calcio, magnesio, hierro y fósforo, los cuales estarán disponibles para su asimilación inmediata. El contenido de cenizas se encuentra en una relación proporcional directa con el contenido de fibra, si hay una disminución de contenido de fibra disminuirá el contenido de minerales debido a que la gran mayoría de estos se encuentran en la cascarilla de la semilla siendo esta la que proporciona a su vez la mayor cantidad de fibra.

4.2.2. Caracterización fisicoquímica del aceite extraído de la semilla del totumo (*Crescentia cujete L.*)

El aceite es de color amarillo debido a pigmentos propios de la semilla; es líquido por encima de 4 °C lo cual indica la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, es translucido, sin precipitados, con aroma suave y no posee sabores extraños como se puede observar en la figura 9.

Figura 9: Aceite extraído de la semilla del totumo



El mayor rendimiento de extracción tal como se describe en 3.5.3, se determinó por la relación entre el tiempo de extracción y el rendimiento obtenido, como se muestra en la tabla 13:

Tabla 13: Rendimiento en la extracción del aceite de la semilla de totumo

No ensayo	Peso muestra (g)	Peso aceite obtenido (g)	Tiempo (horas)	Contenido (g aceite/100 g muestra)
1	2.031	0.788	2	38.80
	2.039	0.792		38.84
	2.011	0.781		38.84
2	2.031	0.796	4	39.19
	2.039	0.800		39.23
	2.011	0.789		39.23
3	2.031	0.801	6	39.44
	2.039	0.803		39.40
	2.011	0.793		39.43

Continuación tabla 13: Rendimiento en la extracción del aceite de la semilla de totumo

No ensayo	Peso muestra (g)	Peso aceite obtenido (g)	Tiempo (horas)	Contenido (g aceite/100 g muestra)
4	2.031	0.807	8	39.73
	2.039	0.810		39.73
	2.011	0.799		39.73
5	2.031	0.810	10	39.88
	2.039	0.813		39.89
	2.011	0.802		39.88
6	2.031	0.811	12	39.93
	2.039	0.814		39.92
	2.011	0.803		39.93
7	2.031	0.812	14	39.98
	2.039	0.815		39.99
	2.011	0.804		39.98

El proceso muestra la máxima extracción a partir de las 8 horas, observándose que con tiempos superiores la eficiencia es constante. Estos valores pueden utilizarse para proyectar su producción a escala industrial. Si comparamos los rendimientos obtenidos en la separación del aceite con la obtenida en otras extracciones de importancia industrial, como por ejemplo las alcanzadas con aceites de origen vegetal como soya, oliva, girasol y otras como se muestran en la tabla 14, es posible concluir que se puede generar un valor agregado en cuanto a esta fracción de la semilla se refiere puesto que a nivel industrial el tener altas eficacias significa tener ganancias económicamente significativas.

Tabla 14: Contenido de aceite por 100 g de algunas semillas oleaginosas³¹

Aceite	Girasol	Soya	Olivo	algodón	Colza	Palma
Contenido	25 - 30	18 - 23	45 - 60	16 - 24	40 - 50	40 - 52

El aceite extraído se caracterizó con respecto a constantes fisicoquímicas de importancia para la industria de aceites, los resultados se presentan en la tabla 15.

Tabla 15: Comparación de los parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la semilla del totumo (*Crescentia cujete L.*)

CONTENIDO (± 0.0001)	Muestreo 1	Muestreo 2	t_{cal.}	n_(p=0.05)	t_{tab.}
Gravedad específica (25° C)	0.9040	0.8789	304.8	4	2.78
Índice de refracción (25° C)	1.4621	1.4572	43.4	4	2.78
Índice de acidez (% ácido oleico)	1.013	4.499	228.2	2	4.30
Índice de peróxido (mequiv./Kg)	6.691	16.513	71.7	2	4.30
Índice de yodo (g I ₂ / 100g)	87.510	86.605	83.2	1	12.31
Índice de saponificación (mg KOH/ g)	192.03 -193.43	182.35 -183.15	12.4	2	4.30
Índice de ésteres (mg KOH/ g)	191.02 -192.42	177.85 -178.65	16.7	2	4.30
Fósforo (ppm)	1.63	1.92	7.9	2	4.30
Viscosidad (poises)	0.3816	0.1388	575.9	3	3.18
Título ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)	25.35	23.50	8.5	4	2.78
Punto de humo ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)	178 -184	154 - 162	8.0	4	2.78
Rancidez oxidativa*	(--)	(--)			

* (+) Rancidez oxidativa positiva por cambio de color (rosa)

(--) Rancidez oxidativa negativa sin cambio de color (incolore)

Entre los dos muestreos realizados hay diferencias significativas entre los datos obtenidos en el análisis al nivel del 5%. Diferencias que posiblemente se deban: al sitio de recolección, recordando que el muestreo 1 se realizó en una zona donde su cultivo está en proceso de tecnificación dada la demanda del fruto para sus fines más comunes y la segunda fue realizada en lugares donde el árbol crece en estado silvestre y su suelo no es fertilizado. También incide la época de recolección, ya que el primero fue realizado a inicio de año y el segundo a finales siendo afectado por el clima y la humedad teniendo en cuenta que a principios de año fue época de verano y a finales fue época lluviosa. La diferencia entre los datos obtenidos en los dos muestreos y los posibles factores que influyen hacen que la acidez obtenida tenga una gran diferencia en

casi un 33%, así como en el índice de peróxidos siendo este en el segundo muestreo mayor al primero, lo cual indica que la formación de peróxidos se ha presentado de manera progresiva teniendo en cuenta que este proceso tiene un avance gradual llegando a un máximo para luego decrecer durante el proceso de maduración del fruto continuando luego de la extracción y conservación del aceite, siendo estos dos parámetros los de mayor diferencia encontrada junto con la viscosidad del aceite que esta relacionada con la cantidad de ácidos grasos libres existentes, entre mayor sea el índice de acidez menor será la viscosidad de un aceite. En general los datos obtenidos están acordes en comparación a algunos aceites vegetales comunes, como se muestra en la tabla 16.

Las características físicas y químicas presentan una similitud con los reportados para aceites vegetales conocidos como se muestra en la tabla 16, así como para otras características de los mismos.

Los valores obtenidos para la gravedad específica, se deben a los diferentes ácidos grasos presentes en la muestra, que va incrementando cuando aumenta el peso molecular de los ácidos combinados y con aumento de ácidos insaturados e hidroxilados³¹. Igualmente, el índice de refracción varía tal como la gravedad específica, en este caso se presenta un índice de refracción muy acorde a muestras de aceites vegetales comerciales^{Error! Marcador no definido.}.

El índice de yodo se encuentra entre 60 -100, y permite clasificar este aceite crudo como un aceite no secante, este valor indica la presencia de insaturaciones en los ácidos grasos los cuales son sensibles a la oxidación pero que no solidifican el aceite en largo periodos de tiempo⁴⁶.

⁴⁶ LAWSON, H. Aceites y Grasas Alimentarios. Editorial ACRIBIA. España. 1999

Tabla 16: Comparación algunos parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la semilla del totumo con aceites comerciales reconocidos.

Aceite	Índice de Yodo (g I₂ / 100g)	Índice de saponificación (mg KOH/ g)	Índice de refracción (25° C)	Gravedad específica (25° C)
Semilla de Totumo	86.91	182.4 – 193.4	1.4598	0.8914
Oliva	87	180.4 -190.4	1.4672	0.915
Maní	98	182.6 -191.2	1.4690	0.915
Girasol	104	188 - 194	1.4610	0.918

Los índices de saponificación y de esteres evidencian la presencia de ácidos grasos de peso molecular relativamente elevado.

El índice de acidez es bajo y se encuentra en un rango entre el 1 y 5 % exigido para consumo directo, se encuentra dentro de los parámetros establecidos para dicho consumo (menor al 10 %). Indica la frescura del aceite luego del proceso de extracción y da un punto de partida para llevar a cabo su refinación donde la neutralización de los ácidos grasos libres no generara perdidas mayores durante este proceso El índice de peróxidos indica que el aceite no ha presentado durante los procesos de almacenamiento y extracción deterioros en su composición de ácidos grasos insaturados no superando el valor máximo de 20 meq/Kg indicando que no es altamente propenso a generar rancidez oxidativa a cortos tiempos de almacenamiento⁴⁷ (como se puede corroborar en la prueba de rancidez oxidativa puesto que dio negativa) y da un punto de partida para establecer parámetros de empaque y conservación del aceite, así como el interés en la elaboración de productos como mantecas y margarinas ya que está relacionada con el grado de insaturaciones presentes en el aceite vegetal y también puede presentar componentes que poseen propiedades

⁴⁷ Stier, R.E. Guía de aceites comestibles, composición, aplicación, nutrición y más. Asociación Nacional de Productos de Semillas de Algodón de los E.U.A., Memphis. 1997.

antioxidantes naturales; teniendo en cuenta que este índice variara según ó de acuerdo con los procesos enzimáticos, de calentamiento y oxidación ⁴⁸.

El contenido de fósforo debido a la los fosfolípidos del aceite extraído, que aun estando presente en bajo contenido, puede generar procesos de oxidación debido a que facilita el contacto del aceite con el aire. El fosfolípido en la interfaz aire-aceite se orienta con la zona hidrofílica hacia el aire resultando el contacto del oxígeno del aire con el aceite facilitando las reacciones de oxidación. Esta es la razón por la que es necesario realizar proceso de desgomado de forma que se elimine esta fracción posteriormente en los procesos de extracción⁴⁹.

Los aceites deben su relativa alta viscosidad a sus largas cadenas de moléculas de glicéridos; esta propiedad física disminuye ligeramente con un aumento de su grado de insaturación; por otra parte, los aceites que contienen ácidos grasos de bajo peso molecular son menos viscosos que aquellos que su grado de saturación es equivalente, pero contienen solamente ácidos grasos saturados de elevado peso molecular⁵⁰. Como se puede observar las viscosidades obtenidas para los dos aceites de las semillas, muestran que el aceite de la semilla del totumo del primer muestreo presenta una mayor viscosidad que el segundo y relacionándolo con el índice de saponificación, el cual da una aproximación del peso molecular medio de las cadenas y con el índice de acidez que indica los ácidos grasos libres presentes en el aceite, esta diferencia es probablemente a la presencia de ácidos grasos de cadenas mas largas y de mayor peso molecular al igual que la menor cantidad de ácidos

⁴⁸ MATISSEK, R. SCHIEPEL, F. STEINER, G. Análisis de los Alimentos. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. Editorial ACRIBIA. 1992

⁴⁹ Bioquímica de los Lípidos. M. I. Gurr and A. T. James. Cornell University Press. Ithaca. New York. 1971. 350 pag.

⁵⁰ Baley, A., Baley, E. Aceites y Grasa Industriales. Editorial REVERTE. Barcelona. España. 1990. 720 pag.

grasos libres presentes en el primer aceite en comparación con el segundo, hace que su viscosidad sea mayor con respecto al segundo aun presentando similitudes en cuanto al numero de instauraciones presentes como se puede deducir según el índice de yodo.

El título de un aceite o grasa es el punto de solidificación de sus ácidos grasos mezclados, esta temperatura indica el grado de insaturación presente en un aceite, como se observa en la tabla 15, las temperaturas obtenidas muestran temperaturas de solidificación de los ácidos grasos mezclados bajos muy similares a los reportados para aceites como oliva y girasol que están entre los 22°C y 26°C, esto corrobora la existencia de un elevado número de insaturaciones en el aceite extraído de la semilla el totumo³⁷.

El punto de humo es la temperatura hasta la cual se puede calentar un aceite antes de que se forme “humo” y pierda sus propiedades. La descomposición también implica la decoloración, el aceite se torna de color oscuro, también su textura se vuelve más viscosa y emite mal olor. Esto se debe a que se forman unas sustancias llamadas acroleínas, siendo potencialmente cancerígenas⁵⁰. Las temperaturas a las cuales el aceite presentó cambios de color y desprendimientos de humo oscilan, tomando en cuenta los dos aceites, entre 190 y 160 °C aproximadamente para los aceites extraídos de las semillas del primer y segundo muestreo respectivamente. Esto se debe a la acidez libre presentada, siendo, entre mayor índice de acidez presentada en un aceite vegetal menor será el punto de humo. Este aceite crudo será térmicamente estable hasta esta temperatura, por encima de esta empezarán a formarse productos de descomposición y deterioro.

Los datos obtenidos en comparación a los reportados por Smith y Dollear ²⁴ y que se muestran en la tabla 17

Tabla 17: Comparación de parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la variedad analizada en Honduras²⁴ de la especie *Crescentia cujete* L.

CONTENIDO	HONDURAS	CAUCA ₁	CAUCA ₂
Gravedad específica (25° C)*	0.9129	0.9040	0.8789
Índice de refracción (25° C)*	1.4676	1.4621	1.4572
Índice de acidez (% a. oleico)	0.90	1.013	4.499
Índice de peróxido (meq./Kg)	7.6	6.691	16.513
Índice de yodo (g I ₂ / 100g)	88.7	87.510	86.605
Índice de sap. (mg KOH/ g)	191.2	192.03 -193.43	182.35 -183.15
Índice de esterés (mg KOH/ g)	190.3	191.02 -192.42	177.85 -178.65
Fósforo (ppm)	40	1.63	1.92

* Precisión de ±0.0001

Con respecto a los datos reportados, no es posible resaltar una comparación significativa teniendo en cuenta que estos datos para la variedad hondureña no se resalta la precisión de la determinación como también la antigüedad de los mismos, en tanto así, se puede observar que hay similitud entre los valores excepto para los índices de acidez y saponificación con respecto al aceite del segundo muestreo con la variedad hondureña. En cuanto al contenido de fósforo la variedad caucana muestra un bajo contenido del mismo.

Kalayasiri y su grupo²⁶ en su estudio de semillas oleaginosas reporta un índice de saponificación e índice de yodo que se muestran en la tabla 18.

Tabla 18: Parámetros fisicoquímicos del aceite extraído de la variedad analizada en Tailandia²⁶ de la especie *Crescentia cujete* L.

CONTENIDO	TAILANDIA	CAUCA ¹	CAUCA ²
Índice de yodo (g I ₂ / 100g)	74.4	87.510	86.605
Índice de sap. (mg KOH/g)	190.4	192.03 -193.43	182.35 -183.15
Calculo de t*	Índice de yodo	t _{cal.}	524
	Índice de sap	t _{cal.}	3.13
			2441
			9.12

* Para 1 grado de libertad el t tabulado es 31.82 para un 98% de nivel de confianza

Para la misma variedad recolectada en Tailandia, presenta diferencia significativa con respecto al índice de yodo a un nivel de confianza del 98% para los dos muestreos con respecto a la variedad tailandesa, pero se presenta una similitud en los valores de índice de saponificación indicando que hay igual número de ácidos grasos de cadena larga presentes en el aceite de las dos variedades pero con la diferencia de que hay, a un 98% de probabilidad, un contenido de ácidos grasos insaturados diferente en la variedad tailandesa con respecto a la variedad caucana.

4.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ÁCIDOS GRASOS MAYORITARIOS DEL ACEITE EXTRAÍDO DE LA SEMILLA DEL TOTUMO

Para la estandarización de la marcha analítica se consideraron variables como: el flujo óptimo del gas de arrastre, detector y columna apropiados y las temperaturas de trabajo óptimas para ofrecer una mayor sensibilidad y resolución entre picos cromatográficos durante el análisis; sirviendo como criterio de confianza para la determinación de los parámetros de linealidad, sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y porcentaje de recuperación⁵¹.

4.3.1. Determinación del flujo óptimo

Se estableció el flujo óptimo del gas de arrastre para una columna HP-INNOWAX, utilizando un patrón FAME Supelco cat. 47801 en cloruro de metileno como referencia por medio de la curva de Van Deemter en un intervalo de 0.6 a 2.6 mL/min. A partir de los resultados se realizó la curva

⁵¹ Quatrocchi, O., Abelaira, S. Laba, R. Introducción al HPLC: Aplicación y práctica. Ed. Artes Graficos Farros S.A. Argentina. 1992. 384 pag.

correspondiente y se encontró un flujo óptimo de 1.2 mL/min, en la cual se presenta una buena resolución de los picos cromatográficos.

A continuación se detallan las condiciones óptimas encontradas para la determinación por cromatografía de gases de los ácidos grasos de interés:

Gas de Arrastre: Helio

Fase estacionaria: columna HP-INNOWAX (100% polietilenglicol)

Flujo óptimo: 1.2 mL/min.

Temperatura inyección:): 260 °C modo splitless

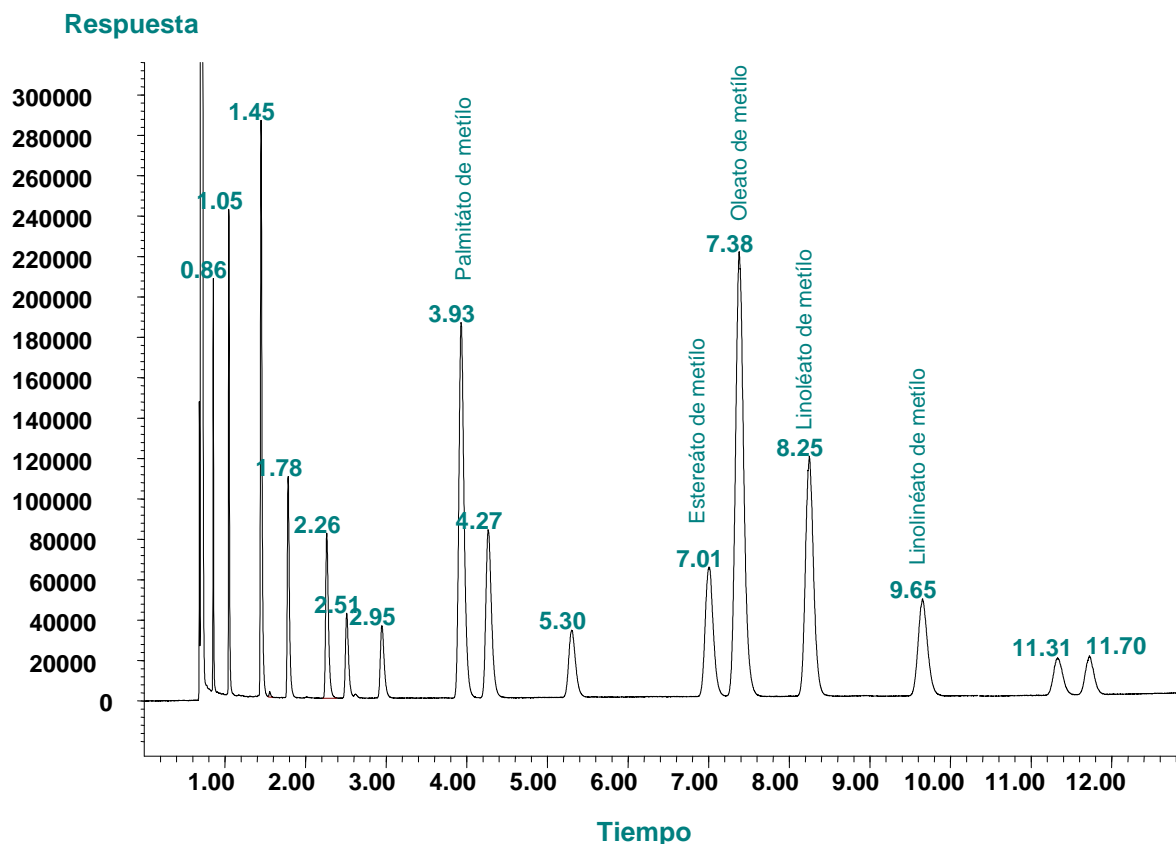
Temperatura horno: Se aplicó una rampa de temperatura inicial de 175 °C, incrementada gradualmente 7 °C/min. hasta 180 °C (4 min.), luego un segundo incremento de 3 °C/min. hasta 190 °C (2 min.), y por ultimo, un tercer incremento de 7 °C/min. 200 °C (1 min.), finalmente se aplica un post-run de 2 minutos a 210 °C.

Temperatura detector FID: 250 °C

En la figura 10 se observa el cromatograma con las condiciones a las cuales se obtienen las señales de interés, los metil ester de interés para este trabajo de: ácido palmítico (3.93 min.), ácido esteárico (7.01 min.), ácido oléico (7.38 min.), ácido linoléico (8.25 min.) y ácido linolénico (9.65 min.). Los tiempos de retención son cortos y con anchos de banda no mayor a 0.113 min., presentan una buena resolución entre los picos cromatográficos, en comparación con otros autores^{37,43} que indican tiempos de retención largos en corridas cromatográficas de hasta mas de 30 minutos.

En el cromatograma de la figura 10, también se observan otros picos cromatograficos, correspondientes a ester de metilicos de ácidos grasos que no son de interés en este trabajo.

Figura 10: Cromatógrama de patrón-mezcla de ésteres metílicos inyectado en una columna HP-INNOWAX, y flujo de gas He de 1.2 mL/min.

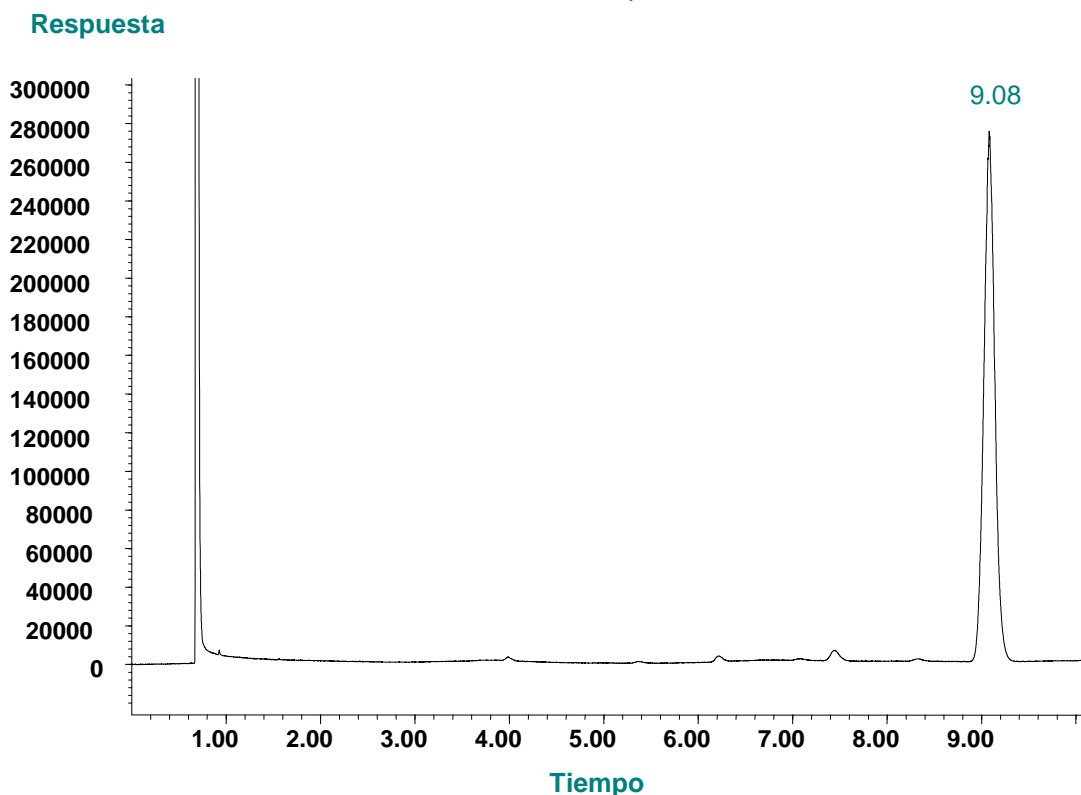


A las mismas condiciones se sometió el patrón interno (éster metílico del ácido nonadecanoico), el cual presentó un tiempo de retención de 9.08 min. como se observa en la figura 11

4.3.2. Curva de Calibración

Optimizadas las condiciones de detección de los ácidos grasos de interés, se construyeron 5 curvas de calibración, una para cada éster metílico de ácido graso de interés. Se relacionó el cociente del área bajo la curva del pico cromatográfico correspondiente a cada analito con respecto al patrón interno versus la concentración de 5 soluciones patrón de cada metil éster de ácido graso (ver anexo 7.2.).

Figura 11: Cromatograma de patrón interno de éster metílico el ácido nonadecanoico inyectado en una columna HP-INNOWAX, y flujo de gas He de 1.2 mL/min.



- **Rango de Linealidad:** Se prepararon 5 disoluciones con concentraciones variables de analito para cada éster metílico a partir del estándar de referencia (como se muestra en la tabla 19) y una concentración fija de patrón interno de 18.51 ppm. Cada una se analizó por triplicado y se construyeron las curvas correspondientes para cada éster metílico de interés por regresión lineal.

Tabla 19: Rango de concentraciones para cada analito

Ester metílico	Rango (ppm)
Palmítato	1 a 10
Esteréato	0.5 a 5
Oleato	1.5 a 14.8
Linoléato	1 a 10
Linolinéato	0.49 a 4.91

El criterio de linealidad establecido es: coeficiente de correlación momento-producto (R) ≥ 0.999 ; coeficiente de determinación (R^2) ≥ 0.980 ; con coeficiente de variación (CV) ≤ 5.00 %.

Existe una relación lineal, de acuerdo con la tabla 29 (ver anexo 7.2.), entre las áreas de los picos de cada analito y el patrón interno, con la concentración de cada analito. Así, las líneas rectas obtenidas que describen estos comportamientos, sirvieron para cuantificar el contenido de los ácidos grasos mayoritarios por interpolación. Fue necesario determinar los errores aleatorios en los valores de pendiente y ordenada de cada éster metílico en las curvas de calibración.

Se utilizó el dato estadístico $S_{y/x}$ para encontrar la desviación asociada a la pendiente (S_m) y al intercepto (S_b) (Ecuación anexo 7.1). Para un límite de confianza del 95% se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 20.

Tabla 20: Factores estadísticos en la determinación del error asociado a la pendiente e intercepto para un nivel de confianza del 95 %

Analito	Palmítato de metilo (C16:0)	Esteréato de metilo (C18:0)	Oleato de metilo (C18:1)	Linoléato de metilo (C18:2)	Linolinéato de metilo (C18:3)
Factor estadístico	$Y = 0.0309x + 0.0567$	$Y = 0.0333x + 0.0268$	$Y = 0.0371x + 0.1057$	$Y = 0.0290x + 0.0612$	$Y = 0.0295x + 0.0294$
$S_{y/x}$	0.0055	0.0019	0.0025	0.0029	0.0010
S_m	0.0008	0.0005	0.0002	0.0004	0.0003
S_b	0.0002	0.0008	0.0011	0.0012	0.0004
$T_{n-2} = 13$	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16
Pendiente (m)	± 0.0017	± 0.0012	± 0.0005	± 0.0009	± 0.0006
Intercepto (b)	± 0.0050	± 0.0018	± 0.0023	± 0.0027	± 0.0009

Los datos obtenidos muestran que a un nivel de confianza del 95% para cada analito, su pendiente e intercepto incluyen el valor verdadero en cada determinación, mostrando incertidumbres en los resultados, en su mayoría, a

partir de la tercera cifra significativa, por lo que se puede decir que las determinaciones son confiables en estos intervalos.

- **Precisión:** La precisión hace referencia a la reproducibilidad y repetibilidad de un conjunto de medidas realizadas con el mismo método de cuantificación. Dado inconvenientes presentados en el equipo de cromatografía de gases, la precisión del método de extracción y derivatización no se pudo llevar a cabo, solo fue posible realizar la precisión del método de cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés, tal como se muestra a continuación.

Repetibilidad: Para establecer el grado de concordancia entre los resultados sucesivos con el mismo método sobre una solución patrón establecida de cada éster metílico de los ácidos grasos de interés, se sometió a ensayo inyectando en el cromatógrafo la solución de referencia 5 veces por 4 días consecutivos en las mismas condiciones de operación (siempre el mismo equipo, operador, laboratorio y pequeños intervalos de tiempo). Se evaluaron los valores de los datos obtenidos en cada curva de calibración de cada analito y se compararon con el valor teórico de referencia. El criterio establecido de repetibilidad fue un coeficiente de variación (CV) de $\leq 5.00\%$.

Los valores de CV indican para cada uno de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que el método de cuantificación por cromatografía de gases presenta repetibilidad (Tabla 30, anexos 7.2.).

Reproducibilidad: Determina la concordancia entre resultados obtenidos con el mismo método sobre la solución patrón de ensayo sometida a diferentes condiciones (operador, laboratorio o épocas diferentes); para encontrar la reproducibilidad del método se emplearon tiempos diferentes de análisis inyectando la solución de referencia por triplicado en el cromatógrafo de gases cada 15 días por espacio de un mes y medio.

Los valores observados en la tabla 31 (anexo 7.2.), indican que existe reproducibilidad del método de cuantificación de los esteres metílicos de los ácidos grasos de interés en el tiempo, puesto que presentan un CV menor al 5 % establecido.

- **Sensibilidad:** La sensibilidad de un método analítico es su capacidad para discernir pequeñas variaciones en la concentración de analito. Hay dos clases de sensibilidad, aquella correspondiente a la pendiente de la recta de calibración (Respuesta / Concentración), la sensibilidad de calibrado, la cual es constante en todo el intervalo de linealidad y la sensibilidad analítica, que se relaciona con la sensibilidad de calibrado y su desviación estándar ya que esta desviación es del tipo de las respuestas (precisión de la recta de calibrado) que aumenta generalmente al aumentar la concentración de analito. La sensibilidad analítica no es constante en todo el intervalo de linealidad, a diferencia de la sensibilidad de calibrado, se puede determinar mediante el límite de detección y de cuantificación⁵¹, esto se realizó tal como se describe a continuación:

- **Límite de detección (LOD):** En el anexo 7.3. se da una definición acerca de este concepto. La aproximación para el LOD se puede definir como aquella concentración que proporciona una señal cromatográfica (y) *significativamente* diferente a la señal de una muestra en blanco⁵². Experimentalmente se determinaron los límites de detección por medio de rectas de regresión a bajas concentraciones (50, 25 y 15% por debajo del último punto de concentración como se muestra en la tabla 18 para cada uno de las rectas de calibrado) para los esteres metílicos de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico y linoléico. Para el éster metílico del ácido linolénico se utilizó la misma curva de calibrado para su determinación, dado que su LOD está por debajo del último punto de

⁵² Miller, N., y Miller, C. Estadística y Quimiometría en Química Analítica. 4º Edición. Editorial Pearson Education S.A. Madrid, España. 2002. 276 pág.

concentración (0.49 ppm), al igual que al tomar valores por debajo de esta concentración, la relación señal/ruido sería inferior a la señal del analito.

Los resultados se evaluaron calculando la recta de regresión (ver anexo 7.3; tabla 32) a partir de las concentraciones establecidas del 50, 25 y 15% por debajo del último punto de concentración para los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoléico, al igual que para la recta de regresión del éster metílico del ácido linolénico original de la cuantificación para definir la respuesta a concentración cero por extrapolación al origen de la recta (b'). Posteriormente se determinó S_{bl} que corresponde a la desviación estándar del intercepto, y por ende, el estimado de la respuesta del blanco.

De esta forma, se define X_{LOD} como la concentración mínima detectable por el cromatógrafo de gases, la cual se determina por la ecuación:

$$X_{LOD} = \left| \frac{3S_{bl} + b'}{m} \right| \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Para el caso del éster metílico del ácido linolénico se determinó el límite de detección con los datos obtenidos en la curva de calibración tomando como S_{bl} el $S_{y/x}$ de la curva de calibrado y como b' la respuesta a concentración cero.

Los LOD para cada éster metílico de los ácidos grasos de interés se muestran en la tabla 21.

Tabla 21: Límites de detección para los ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés

Analito	Palmítato de metilo	Esteréato de metilo	Oleato de metilo	Linoléato de metilo	Linolinéato de metilo
Factor estadístico					
S_{bl}	0.0018	0.0012	0.0027	0.0027	0.0010
Pendiente (m)	0.0873	0.0737	0.1253	0.0906	0.0295
Intercepto (b')	0.0028	0.0064	0.0217	0.0073	0.0294
n	12	12	12	12	15
X_{LOD} (ppm)	0.03	0.04	0.13	0.01	0.28

- **Límite de cuantificación (LOQ):** Indica el valor al cual es posible hacer una afirmación cuantitativa del resultado de una medición con una determinada incertidumbre y precisión⁵². Este valor esta dado por la ecuación:

$$X_{LOQ} = \left| \frac{10S_{bl} + b'}{m} \right| \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Para el caso del éster metílico del ácido linolénico, se determinó con los datos obtenidos en la curva de calibración tomando como S_{bl} el $S_{y/x}$ de la curva de calibrado y como b' la respuesta a concentración cero.

Los LOQ para cada éster metílico de los ácidos grasos de interés se muestran en la tabla 22.

Tabla 22: Límites de cuantificación para los esteres metílicos de los ácidos grasos de interés

Analito Factor estadístico	Palmítato de metílo	Esteréato de metílo	Oleato de metílo	Linoléato de metílo	Linolinéato de metílo
Factor estadístico	Valores	Valores	Valores	Valores	Valores
S_{bl}	0.0018	0.0012	0.0027	0.0027	0.0010
Pendiente (m)	0.0873	0.0737	0.1253	0.0906	0.0295
Intercepto (b')	0.0028	0.0064	0.0217	0.0073	0.0294
n	12	12	12	12	15
X_{LOQ} (ppm)	0.17	0.08	0.39	0.22	0.35

De los datos obtenidos en las tablas 21 y 22 se concluye que, los limites de detección y cuantificación para cada analito de interés están a concentraciones menores al punto de menor concentración de cada curva de calibración, por lo tanto es posible realizar la cuantificación de los esteres metílicos de ácidos grasos en la muestra de aceite de la semilla del totumo mediante cromatografía de gases utilizando las condiciones encontradas y con detector FID.

- **Exactitud:** se refiere a que tan cerca del valor real se encuentra el valor medido. En términos estadísticos, la exactitud está relacionada con el sesgo de una estimación, cuanto menor es el sesgo más exacto es una estimación³⁹.

Cuando expresamos la exactitud de un resultado se expresa mediante el error absoluto que es la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero, este valor se estimó como el valor de referencia; una solución patrón de concentración conocida de los esteres metílicos de los ácidos grasos.

En la tabla 32 del anexo 7.2., se observan porcentajes de error relativos inferiores al 3%. De acuerdo con lo determinado, el método de cuantificación establecido por curva patrón interno presenta exactitud para cada éster metílico de los ácidos grasos de interés.

4.3.3. Estimación de la concentración de los ácidos grasos de interés presentes en el aceite extraído de la semilla del totumo por cromatografía de gases.

Una vez determinados los parámetros de cuantificación por curva patrón interno (pendiente e intercepto) de cada analito de interés, se prosiguió a encontrar la concentración promedio del contenido de cada analito en la muestra de aceite.

De las muestras obtenidas solo se alcanzó a cuantificar la correspondiente al primer muestreo por falta de disponibilidad del equipo de cromatografía de gases. Sin embargo, el porcentaje de recuperación se determinó por métodos químicos húmedos, partiendo de la acidez presentada antes y después del proceso de derivatización. Así, es posible obtener el porcentaje de reacción de esterificación, teniendo como principio un 100% de rendimiento de reacción, utilizando el ácido nonadecanoico C19:0 (patrón interno) para este procedimiento.

Se utiliza la metodología para determinar la acidez de un aceite, descrita en la tabla 6 (método A.O.A.C. 940.28). Se pesaron tres cantidades de patrón interno (ácido nonadecanoico) y tres de muestra de aceite y se sometieron al proceso de derivatización, siguiendo la metodología (3.5.2). Al producto obtenido se le determinó la acidez y se comparó con la acidez inicial. Para el patrón interno se pesaron 3 cantidades entre 15 a 20 mg (± 0.1) y se le determinó con igual procedimiento la acidez (libre puesto que no está esterificado).

De igual forma se utilizó como referencia la muestra de aceite del muestreo 1 aplicando el mismo procedimiento. También se determinó el índice de saponificación al producto obtenido luego de la derivatización, siendo la diferencia entre el índice de saponificación y el índice de acidez la cantidad de ésteres metílicos obtenidos en la derivatización. Los resultados se muestran en la tabla 23 a 26.

Tabla 23: Resultados obtenidos para determinar la acidez de los ésteres metílicos del ácido nonadecanoico y de la muestra de aceite.

Sustancia	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Acidez (mg KOH / g)
Ácido nonadecanoico	0.019	0.017	13.09
	0.017	0.014	13.04
	0.020	0.017	13.01
Aceite	0.414	0.400	0.262
	0.433	0.430	0.267
	0.414	0.409	0.265

Tabla 24: Resultados obtenidos para determinar el índice de saponificación de los ésteres metílicos del ácido nonadecanoico y de la muestra de aceite.

Sustancia	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Saponificación (mg KOH / g)
Ácido nonadecanoico	0.019	0.017	181.07
	0.018	0.015	179.43
	0.016	0.013	177.37
Aceite	0.472	0.470	178.74
	0.445	0.438	179.02
	0.462	0.457	178.91

Tabla 25: Valores aproximados para determinar el porcentaje de recuperación según la acidez utilizando el ácido nonadecanoico

Sustancia	Acidez inicial (mg KOH / g)	Acidez final (mg KOH / g)	% Acidez final	% recuperación aproximado*
Acido nonadecanoico	179.46	13.09	7.31	92,69
	179.15	13.04	7.28	92.72
	179.21	13.01	7.26	92.74

* Para calcular el porcentaje de recuperación aproximado se utilizaron las siguientes formulas:

$$\% \text{ Acidez final} = \frac{\text{Acidez final}}{\text{Acidez inicial}} \times 100 ; \quad \% \text{ Recuperacion} = 100 - \% \text{ Acidez final}$$

Tabla 26: Valores aproximados para determinar el porcentaje de recuperación según la acidez en la muestra y el ácido nonadecanoico según los índices de acidez y saponificación

Sustancia	Índice esteres inicial (mg KOH / g)*	Índice esteres final (mg KOH / g)*	% recuperación aproximado**
Acido C19:0	181.07	167.49	92.50
	179.43	166.03	92.53
	177.37	164.09	92.51
Aceite	192.02	178.48	92.94
	193.42	178.75	92.41
	192.48	178.65	92.81

* Para determinar el índice de esteres se realiza la diferencia entre el de saponificación y el de acidez

** Para determinar el porcentaje de recuperación aproximado se utilizo la siguiente formula:

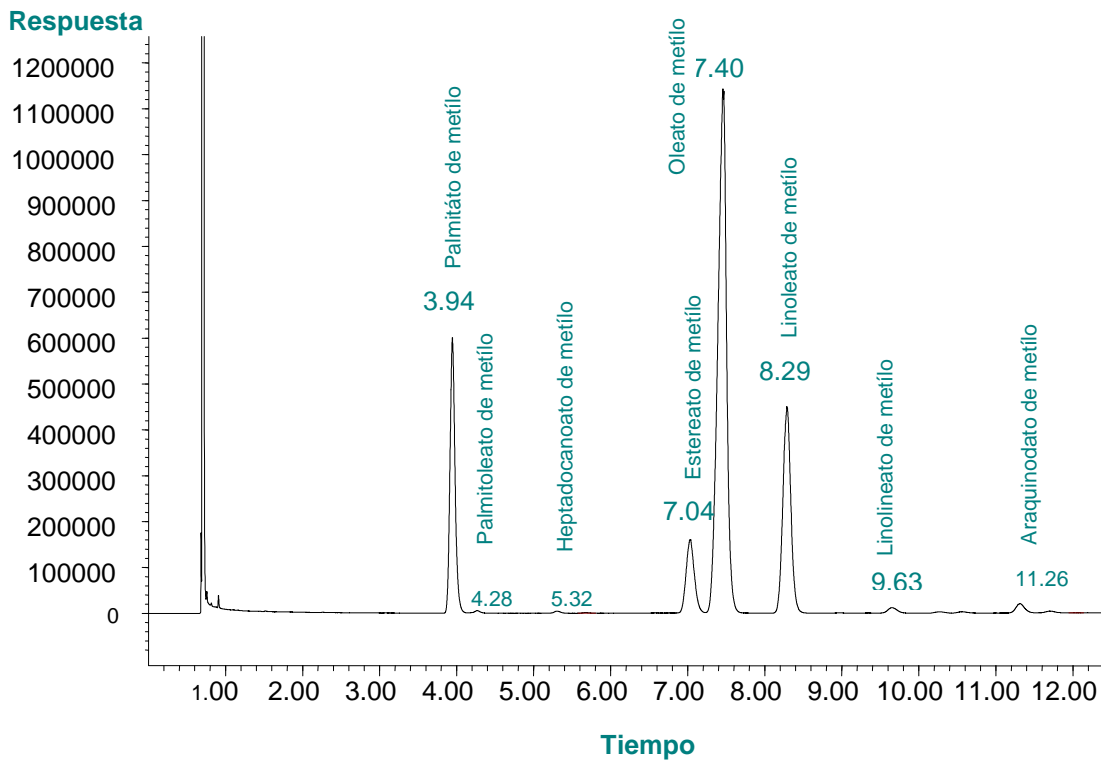
$$\% \text{ Recuperacion} = \frac{\text{Indice esteres final}}{\text{Indice esteres inicial}} \times 100$$

El porcentaje de recuperación es entonces la cantidad de muestra que es esterificada mediante el procedimiento de derivatización utilizado. Su valor esta por encima del 90 %, por lo que se puede decir que el método de derivatización es confiable para el análisis de ácidos grasos presentes en el aceite sobre un 98% de precisión del método de determinación de acidez y de esteres (ver anexo 7.5).

Al inyectar la muestra previa derivatización, como se explica en la metodología (3.6.2), se observaron picos cromatográficos con similares tiempos de retención

que el correspondiente del patrón de ésteres metílicos presentando una buena resolución entre picos cromatográficos y bien definidos con un ancho de banda no mayor a 0.313 min. De esta manera se identificaron los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoléico y linolénico en la muestra. La figura 12 presenta el cromatógrama de la muestra derivatizada del aceite extraído de la semilla del totumo (*Crescentia cujete L.*). Se observan los picos de los ésteres metílicos de ácido palmítico (3.94 min.), esteárico (7.04 min.), oleico (7.40 min.), linoléico (8.29 min.) y linolénico (9.63 min.) y otros picos cromatograficos que no son del interés para este trabajo que aparecen a tiempos de retención de 4.28 min., 5.32 min. y 11.26 min. Estos corresponden a los esteres metílicos de los ácidos palmitoléico, heptadecanoico y araquídico respectivamente, que se encuentran también presentes en el aceite extraído de la semilla y son comunes encontrarlos en otros aceites de tipo vegetal.

Figura 12: Cromatógrama de los esteres metílicos de interés y mayoritarios el aceite de la semilla del totumo (*Crescentia cujete L.*)



En la tabla 27 se indica el contenido de cada ácido graso en el aceite extraído de la semilla del totumo por el método soxhlet, posterior derivatización con metanol. Esta determinación se realizó inyectando la disolución de la muestra cuatro veces.

Tabla 27: Cuantificación de los ácidos grasos en la muestra de aceite de totumo (*Crescentia cujete L.*)

Acido graso	Concentración (g ácido / 100 g aceite)	Limite de confianza
Palmítico	14,36	± 0,32
Esteárico	5,94	± 0,12
Oleico	39,18	± 0,16
Linoléico	18,34	± 0,25
Linolénico	0,43	± 0,08

Las formulas y datos obtenidos para encontrar el contenido de los ácidos grasos de interés en la muestra de aceite se encuentra en el anexo 7.4.

La muestra analizada presenta una composición de ácidos grasos entre los que se destacan de nuestro interés el ácido oleico y linoléico representando casi el 57 % del total de los ácidos grasos, al igual que el ácido palmítico y esteárico en un 20 % del total y por último en un bajo contenido el ácido linolénico. Se encuentra que el ácido oleico es el mayoritario con respecto a los demás ácidos grasos presentando niveles similares a los de otros aceites vegetales como el de palma, soya, girasol y maíz pero es inferior frente al aceite de oliva³³. La proporción de ácido linoléico es similar que el aceite de oliva, pero en comparación con aceites como el de maíz, girasol y soya es tres veces inferior. Por ultimo, el contenido de ácido linolénico es similar a los aceites como el de oliva y girasol, donde generalmente se presenta en trazas, pero es inferior al contenido presente en el aceite de soya. Se presentan ácidos grasos saturados como el ácido palmítico siendo relativamente abundante y similar al de aceites como el de oliva, palma y algodón y en cantidad superior a aceites como el de

maíz y girasol; y el ácido esteárico que se encuentra dentro del rango de aceites como el de oliva, y girasol.

Con respecto a los datos reportados por Smith y Doller²⁴ y por Kalayasiri y su grupo²⁶; de variedades de la misma especie *Crescentia cujete* L. recolectadas en Centro América y Tailandia respectivamente, podemos comparar los resultados obtenidos como se muestra en la tabla 28.

Tabla 28: Composición de ácidos grasos reportados para la semilla del totumo (*Crescentia cujete* L.)

Variedad Ácido graso	Honduras	Tailandia	Cauca	t cal. Honduras	t cal. Tailandia	t tab.
palmítico	19.7 %*	16.1%	14.36%	8,68	17,48	
esteárico		11.9%	5.94%		151,49	
oleico	59.4%	48.9%	39.18%	404,54	194,51	3.18**
linoleico	19.3%	18.8%	18.34%	12,27	5,87	
linolénico	1.6%	1.2%	0.43%	45,25	29,85	

* Ácidos grasos saturados totales

** Para 3 grados de libertad a un 95% de confianza

Como se observa, hay diferencias significativas entre la composición de los ácidos grasos de estudio cal nivel del 5%. Esto hace concluir que estas diferencias en composición de ácidos grasos se deban a factores ya mencionados como sitio de recoleta suelo, etc. Además muestran que los resultados difieren entre las técnicas y métodos utilizados para la determinación, ya que la variedad de Honduras su composición se determinó mediante espectroscopia ultravioleta visible y métodos químicos húmedos, técnicas menos sensibles y precisas, además presentan muchos errores de tipo sistemático al suponer que son cuatro analitos los que representan el 100% de la composición de ácidos grasos, ignorando la presencia de otros ácidos grasos presentes. En tanto la variedad tailandesa, fue analizada por cromatografía de gases en una selección de semillas con alto contenido graso, por medio del

método de “*normalización de áreas*”. Aquí hay que tener en cuenta que el detector utilizado debe ser sensible a todos y cada uno de los analitos a estudiar, dando respuestas lineales y reproducibles, esto conllevaría cierta imprecisión ya que la respuesta del detector no es proporcional al área del analito y por consiguiente a su porcentaje en la muestra. Esta determinación se realizó con el fin de encontrar aplicaciones en biocombustibles, sin embargo no se analizó la aplicación puntual para el aceite de la semilla del totumo.

Debido a las diferencias presentadas y teniendo en cuenta que su composición puede variar por múltiples factores, los resultados obtenidos para la variedad caucana presentan confiabilidad ya que la técnica garantiza, con un nivel de confianza del 95%, la composición de los ácidos grasos del aceite extraído de la semilla del totumo.

4.4 POSIBLES APLICACIONES DE UTILIDAD PARA EL ACEITE EXTRAÍDO DE LA SEMILLA DEL TOTUMO

Teniendo en cuenta el perfil de ácidos grasos, las características fisicoquímicas del aceite y la producción de la materia prima es posible proponer para su estudio, algunas aplicaciones a nivel industrial, alimentario u otros fines.

A nivel industrial este aceite puede emplearse como un posible biocombustible, ya que solo se requiere un alto contenido de ácidos grasos para que pueda llegar a ser una alternativa para los llamados combustibles del futuro, para ello se deben realizar análisis y concretar parámetros que permitan establecer su utilidad como es el índice de cetano, que debe ser mayor a 50, calor de combustión, debe ser superior a 40 julios por gramo y además evaluar el proceso de transesterificación y las cantidades de residuos como metanol, glicerina y triglicéridos, que deben ser menores al 0.25 %. Obviamente se debe

evaluar rendimiento por hectárea para poder recomendar su aplicación en este campo en términos de productividad económica.

Debido a que es un aceite rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados, puede dirigirse a la industria alimenticia, ya sea a nivel industrial, en la producción de margarinas por ejemplo, o para consumo humano directo después de un proceso de refinación. Los ácidos grasos monoinsaturados, en mayor proporción, son resistentes a la oxidación y le confieren estabilidad para su comercialización, mientras que los poliinsaturados son más susceptibles a la oxidación pero se encuentran en menor proporción y su ingesta está recomendada en materia de salud, algunos de ellos son definidos como esenciales, es decir hay que ingerirlos porque el organismo los necesita y son muy importantes para la transformación de la grasa en el organismo humano.

Es recomendable realizar ensayos complementarios en cuanto al contenido de antioxidantes, como el tocoferol, para evaluar su estabilidad frente a la oxidación, al igual que establecer un proceso de refinación para eliminar los ácidos grasos libres y fosfolípidos, de esta forma se puede prolongar su conservación durante largos periodos de almacenamiento.

5. CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica cromatográfica para la determinación y cuantificación de ácidos grasos C16-C18 del aceite de la semilla del totumo, estableciendo las siguientes condiciones: columna HP-INNOWAX, flujo óptimo 1.2 mL/min., temperatura de inyección de 260°C, horno con rampa de temperatura inicial de 175 °C, incrementada a 180 °C por 7 °C/min. (4 min.), luego un segundo incremento a 190 °C por 3 °C/min. (2 min.), y por último, un tercer incremento a 200 °C por 7 °C/min. (1 min.), finalmente se aplica un post-run de 2 minutos a 210 °C y detector FID a 250°C. Los parámetros de confianza reflejan la sensibilidad instrumental del método, con un límite de detección entre 0.01 a 0.28 ppm y cuantificación entre 0.08 a 0.35 ppm para los analitos de interés por debajo de la curva de cuantificación; dando precisión y exactitud por debajo de un 3 % del coeficiente de varianza establecido para el método analítico.

La composición porcentual del aceite de la semilla del totumo se estableció en los siguientes ácidos grasos: palmítico 14.36%, esteárico 5.94%, oleico 37.18%, linoleico 18.34% y linolénico 0.43%. Una comparación con dos investigaciones realizadas con la misma especie, mostró que nuestro estudio tiene la ventaja de contar con un método analítico separativo específico para su cuantificación, dando resultados mucho más confiables.

Las características físicas y químicas del aceite como son su densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de esteres, índice de iodo, entre otros, se encuentran dentro de los intervalos reportados para aceites alimenticios de origen vegetal, como son el de oliva, girasol y maní.

El aceite extraído de la semilla del totumo evidencia su estabilidad y conservación durante los procesos de extracción y almacenamiento, puesto que muchos de sus parámetros fisicoquímicos no reflejan deterioros, como es el

caso de la baja acidez y la formación de peróxidos, que con llevarían a una rancidez del aceite y a alteraciones del mismo mostrando una resistencia a la oxidación en las condiciones de extracción y almacenamiento.

Parámetros como el tamaño de partícula del material de partida y el tiempo de extracción, influyeron sobre el rendimiento del aceite obtenido. La semilla debe ser sometida a un proceso de molienda para reducir su tamaño de partícula y se encontró que el mayor porcentaje de material graso, utilizando metodología Soxhlet y hexano como solvente extractor, se alcanzó entre las 4 a 6 horas del proceso.

La extracción del aceite de la semilla alcanzó un rendimiento del 38-39%, indicando que es posible generar una agroindustria rentable alrededor de este producto, al considerar que la semilla representa el 5 – 7% en peso del fruto del totumo, cantidad importante si se tiene en cuenta que el número de árboles disponibles para cosecha en el sector de recolección oscila entre los 25000 y 30000, con una producción anual por árbol de alrededor de 100 frutos.

El cultivo del fruto del totumo ha sido priorizado en la región del Valle del Patía y el uso mayoritario de su cáscara en la elaboración de productos artesanales produce residuos poco o nada utilizados que, debido a su volumen y descomposición al aire libre, producen una alta contaminación y merecen ser estudiados no solo para disminuir el impacto ambiental negativo sino con el fin de generar un valor agregado que fortalezca su cadena productiva.

El continuo desarrollo de investigaciones sobre este tipo de materiales presentados como residuos agroindustriales y agrobiológicos permite dar opciones de aprovechamientos que aumentan el valor agregado de estas especies.

Los resultados obtenidos sirven como punto de partida para estudiar alternativas de comercialización tanto en campos alimenticios como no alimenticios, por ejemplo como aceite alimenticio para consumo directo o en aplicaciones en la industria alimenticia, también como biodiesel en la industria de los combustibles.

6. RECOMENDACIONES

Para dar continuidad al estudio de esta especie *Crescentia cujete* L. en cuanto a su fracción grasa, se recomienda la determinación de otros ácidos grasos presentes en el aceite extraído, ya que se evidencia la presencia de estos y que no se consideraron en este trabajo como es el caso de los ácidos palmitoleico, heptadocanodeico y araquidónico. Su cuantificación permitirá establecer un perfil de ácidos grasos que permitirá evaluar otras posibles características y aplicaciones para este aceite.

Establecer el porcentaje de recuperación del proceso de extracción y derivatización por el método cromatográfico para dar mayor confianza al método en la determinación de ácidos grasos.

Evaluar los parámetros fisicoquímicos y cromatográficos de este aceite después de procesos de refinado para así establecer las diferencias que se puedan presentar y las pérdidas de características que influyan sobre ciertas aplicaciones, dando así continuidad al trabajo analizando otros componentes y propiedades que permitan decidir la mejor aplicación del aceite tanto desde el punto de vista económico como de producción.

7. ANEXOS

7.1 FORMULAS ESTADISTICAS

Todo tratamiento que involucre curva de calibración (método de patrón interno en este caso) debe contener los siguientes parámetros:

DATO ESTADISTICO

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

Donde:

y_i = Valores experimentales

\hat{y}_i = Valores dados como puntos sobre la recta de regresión lineal

DESVIACION ASOCIADA A LA PENDIENTE

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

DESVIACION ASOCIADA AL INTERCEPTO

$$S_B = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

Donde:

x_i = Valores de concentración

\bar{x} = Centro de gravedad ($\sum x_i / n$)

DESVIACION ASOCIADA A LA CONCENTRACION

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{m} \left\{ 1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - \bar{y})^2}{m^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

Donde y_0 corresponde al valor experimental de y asociado a la muestra.

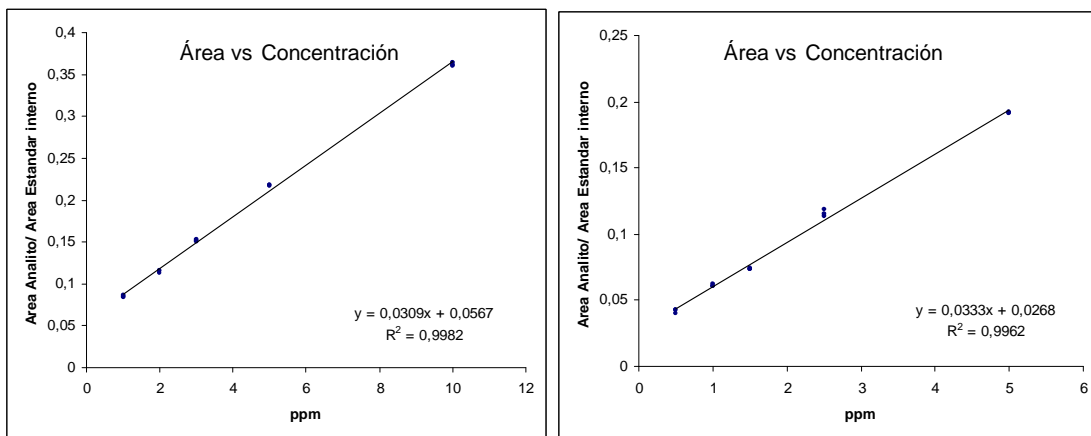
LIMITES DE CONFIANZA

$$\mu = \bar{x} \pm t(s/\sqrt{n})$$

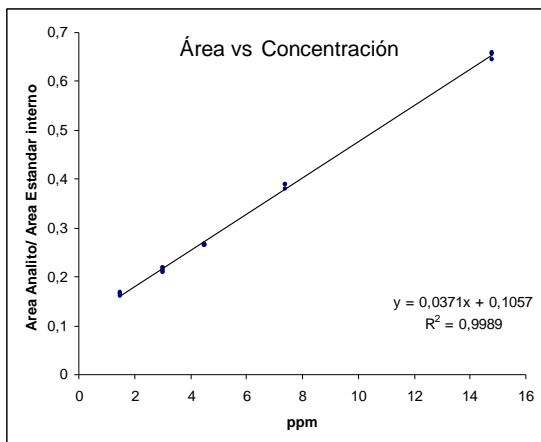
$$|t_{cal}| = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \quad \text{y} \quad |t_{cal}| = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}; \quad |t_{cal}| \geq |t_{tab}| \quad \text{hipotesis nula se rechaza}$$

7.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LOS ESTERES METÍLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

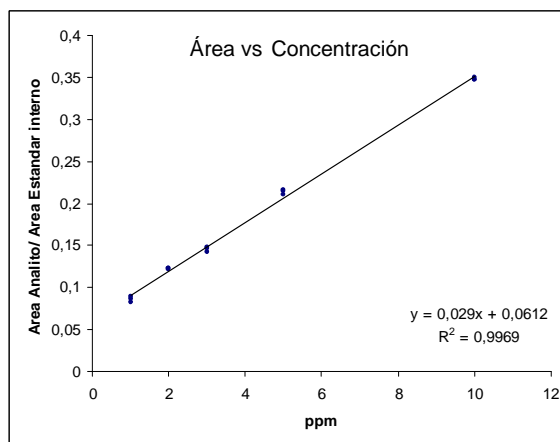
Figura 13: Curvas de calibración para: a) éster metílico de ácido palmítico, b) éster metílico de ácido esteárico



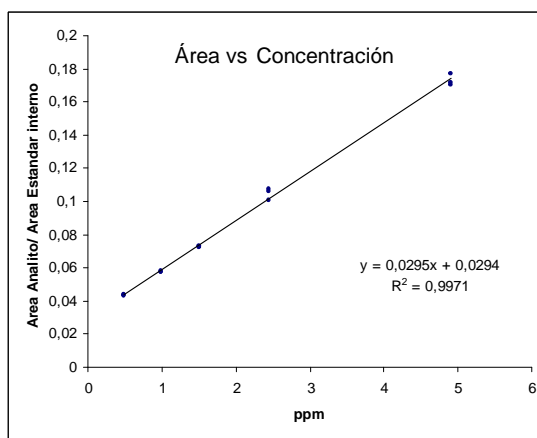
Continuación figura 13: Curvas de calibración para: c) éster metílico de ácido oleico, d) éster metílico de ácido linoléico, e) éster metílico de ácido linolénico



c)



d)



e)

7.2.1. Rango de linealidad

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan a la líneas rectas descritas por el método de mínimos cuadrados, se determinó el coeficiente de correlación momento-producto, el coeficiente de determinación R^2 y el coeficiente de variación CV de los residuos, empleando el método de mínimos cuadrados con los datos obtenidos sin promediar.

Tabla 29: Datos cromatográficos para diferentes concentraciones (ppm) de éster metílico de de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés en relación con 18.51 ppm de éster metílico de ácido nonadecanoico

Éster metílico del ácido palmítico			Éster metílico del ácido esteárico			Éster metílico del ácido oleico			Éster metílico del ácido linoléico			Éster metílico del ácido linolénico		
ppm	Relación de área	%CV	ppm	Relación de área	%CV	ppm	Relación de área	%CV	ppm	Relación de área	%CV	ppm	Relación de área	%CV
1	0,0870	2,119	0,5	0,0428	3,345	1,5	0,1621	1,579	1	0,0860	4,195	0,49	0,0431	0,6444
1	0,0856		0,5	0,0427		1,5	0,1647		1	0,0819		0,49	0,0437	
1	0,0834		0,5	0,0403		1,5	0,1673		1	0,0890		0,49	0,0434	
2	0,1128	1,325	1	0,0607	1,830	3	0,2190	2,086	2	0,1209	0,744	0,98	0,0578	0,5450
2	0,1155		1	0,0627		3	0,2149		2	0,1226		0,98	0,0577	
2	0,1153		1	0,0608		3	0,2101		2	0,1224		0,98	0,0580	
3	0,1507	0,521	1,5	0,0737	0,549	4,5	0,2654	0,562	3	0,1426	1,689	1,5	0,0730	0,6010
3	0,1522		1,5	0,0730		4,5	0,2655		3	0,1460		1,5	0,0723	
3	0,1519		1,5	0,0738		4,5	0,2680		3	0,1474		1,5	0,0730	
5	0,2173	0,303	2,5	0,1152	2,181	7,4	0,3889	1,452	5	0,2167	1,372	2,45	0,1007	3,5310
5	0,2184		2,5	0,1181		7,4	0,3891		5	0,2110		2,45	0,1060	
5	0,2172		2,5	0,1132		7,4	0,3793		5	0,2151		2,45	0,1078	
10	0,3639	0,489	5	0,1920	0,231	14,8	0,6589	1,251	10	0,3498	0,405	4,91	0,1770	2,0321
10	0,3621		5	0,1911		14,8	0,6568		10	0,3471		4,91	0,1715	
10	0,3603		5	0,1918		14,8	0,6438		10	0,3477		4,91	0,1705	
m	0.0309		m	0.0333		m	0,0371		m	0,029		m	0,0295	
b	0.0567		b	0.0268		b	0,1057		b	0,0612		b	0,0294	
R	0.9991		R	0.9980		R	0.9990		R	0,9969		R	0,9985	
R ²	0.9982		R ²	0.9962		R ²	0,9989		R ²	0,9984		R ²	0,9971	

Para la ecuación de la forma $y = m x + b$; donde m indica la pendiente de la línea recta y b el intercepto sobre la ordenada.

7.2.2. Precisión

Repetibilidad

Tabla 30: Repetibilidad para un patrón definido de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido cuatro días consecutivos

Éster metílico	Días		1	2	3	4
	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área	Relación de área
Acido Palmítico	1	3	0,1368	0,1358	0,1325	0,1334
	2	3	0,1350	0,1399	0,1318	0,1339
	3	3	0,1358	0,1381	0,1329	0,1306
	4	3	0,1343	0,1353	0,1342	0,1316
	5	3	0,1381	0,1364	0,1299	0,1338
	PROMEDIO		0,1360	0,1371	0,1322	0,1327
	DESVIACION		0,0015	0,0019	0,0016	0,0015
	% CV		1,1072	1,3627	1,1921	1,1268
	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área	Relación de área
Acido Estéarico	1	1.5	0,0751	0,0756	0,0755	0,0747
	2	1.5	0,0769	0,0738	0,0775	0,0755
	3	1.5	0,0766	0,0736	0,0762	0,0751
	4	1.5	0,0756	0,0731	0,0771	0,0758
	5	1.5	0,0762	0,0727	0,0763	0,0741
	PROMEDIO		0,0761	0,0738	0,0765	0,0750
	DESVIACION		0,0007	0,0011	0,0008	0,0007
	% CV		0,9614	1,5085	1,0657	0,8739
	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área	Relación de área
Acido Oleico	1	4.5	0,2434	0,2343	0,2467	0,2491
	2	4.5	0,2376	0,2397	0,2451	0,2414
	3	4.5	0,2362	0,2349	0,2476	0,2465
	4	4.5	0,2332	0,2385	0,2443	0,2433
	5	4.5	0,2351	0,2357	0,2475	0,2436
	PROMEDIO		0,2371	0,2366	0,2463	0,2447
	DESVIACION		0,0039	0,0024	0,0015	0,0030
	% CV		1,6293	1,0061	0,5975	1,2377

Continuación tabla 30: Repetibilidad para un patrón definido de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido cuatro días consecutivos

Éster metílico	Días		1	2	3	4	
	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área	Relación de área	
Acido Linoléico	1	3	0,1363	0,1321	0,1354	0,1320	
	2	3	0,1348	0,1370	0,1315	0,1325	
	3	3	0,1348	0,1347	0,1342	0,1329	
	4	3	0,1370	0,1339	0,1353	0,1337	
	5	3	0,1395	0,1355	0,1342	0,1359	
	PROMEDIO			0,1365	0,1346	0,1341	0,1334
	DESVIACION			0,0019	0,0018	0,0016	0,0015
	% CV			1,4141	1,3495	1,1823	1,1339

	Días		1	2	3	4	
	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área	Relación de área	
Acido Linolénico	1	1.5	0,0681	0,0663	0,0583	0,0657	
	2	1.5	0,0658	0,0672	0,0574	0,0657	
	3	1.5	0,0662	0,0675	0,0587	0,0671	
	4	1.5	0,0668	0,0669	0,0587	0,0661	
	5	1.5	0,0661	0,0656	0,0583	0,0674	
	PROMEDIO			0,0666	0,0667	0,0583	0,0664
	DESVIACION			0,0009	0,0007	0,0005	0,0008
	% CV			1,3641	1,1230	0,9245	1,2056

Reproducibilidad

Tabla 31: Reproducibilidad para un patrón definido de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido cada 15 días por espacio de un mes y medio

Éster metílico	Días		1	2	3	
	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área	
Acido Palmítico	1	3	0,1368	0,1331	0,1487	
	2	3	0,1351	0,1324	0,1482	
	3	3	0,1358	0,1375	0,1462	
	PROMEDIO			0,1359	0,1343	0,1477
	DESVIACION			0,0006	0,0020	0,0009
	% CV			0,4587	1,4705	0,6355

Continuación tabla 31: Reproducibilidad para un patrón definido de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido cada 15 días por espacio de un mes y medio

Éster metílico	Días		1	2	3
Ácido Esteárico	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área
	1	1.5	0,0751	0,0765	0,0793
	2	1.5	0,0756	0,0760	0,0785
	3	1.5	0,0762	0,0765	0,0790
	PROMEDIO		0,0757	0,0763	0,0789
	DESVIACION		0,0004	0,0002	0,0003
	% CV		0,5184	0,2389	0,3598
Ácido Oleico	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área
	1	4.5	0,2376	0,2562	0,2647
	2	4.5	0,2362	0,2558	0,2659
	3	4.5	0,2332	0,2587	0,2665
	PROMEDIO		0,2357	0,2569	0,2657
	DESVIACION		0,0016	0,0011	0,0007
	% CV		0,6724	0,4231	0,2493
Ácido Linoléico	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área
	1	3	0,1363	0,1464	0,1415
	2	3	0,1348	0,1412	0,1428
	3	3	0,1318	0,1415	0,1415
	PROMEDIO		0,1343	0,1430	0,1419
	DESVIACION		0,0016	0,0021	0,0005
	% CV		1,2054	1,4407	0,3822
Ácido Linolénico	REPLICAS	ppm	Relación de área	Relación de área	Relación de área
	1	1.5	0,0658	0,0648	0,0746
	2	1.5	0,0662	0,0642	0,0742
	3	1.5	0,0668	0,0634	0,0742
	PROMEDIO		0,0663	0,0641	0,0744
	DESVIACION		0,0003	0,0005	0,0002
	% CV		0,5238	0,7886	0,2287

7.2.3. Exactitud

Tabla 32: Determinación de la concentración de una solución de referencia de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido por curva de calibración.

Éster metílico	REPLICAS	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
Acido Palmítico	1	3,006	3,060	3,049
	2	2,998	2,991	3,013
	3	2,983	3,021	3,019
	4	2,966	2,993	3,015
	5	2,967	3,034	3,068
	PROMEDIO	2,984	3,020	3,033
	DESVIACION	0,018	0,029	0,024
	% CV	0,601	0,962	0,810
Acido Estearico	REPLICAS	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
	1	1,494	1,509	1,501
	2	1,502	1,499	1,493
	3	1,504	1,508	1,499
	4	1,508	1,498	1,492
	5	1,494	1,502	1,509
	PROMEDIO	1,501	1,503	1,499
	DESVIACION	0,006	0,005	0,007
% CV	0,416	0,332	0,466	
Acido Oleico	REPLICAS	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
	1	4,494	4,491	4,515
	2	4,566	4,494	4,501
	3	4,494	4,496	4,492
	4	4,515	4,499	4,512
	5	4,512	4,528	4,476
	PROMEDIO	4,516	4,502	4,499
	DESVIACION	0,029	0,015	0,016
% CV	0,653	0,335	0,353	

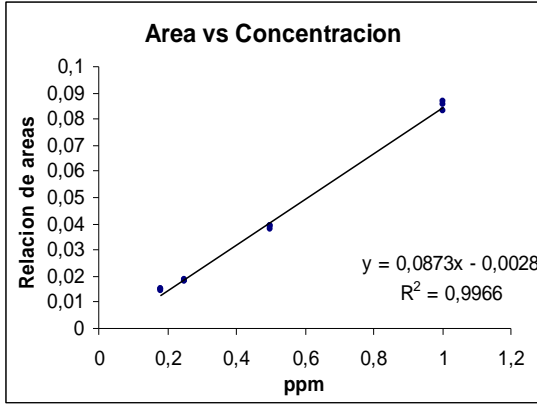
Continuación tabla 32: Determinación de la concentración de una solución de referencia de ésteres metílicos de los ácidos grasos de interés medido por curva de calibración.

Éster metílico	REPLICAS	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
Acido Linoléico	1	3,092	3,076	3,023
	2	3,047	3,036	3,025
	3	3,017	3,064	3,003
	4	3,027	3,051	3,081
	5	3,028	3,125	3,048
	PROMEDIO	3,042	3,070	3,036
	DESVIACION	0,030	0,034	0,030
	% CV	0,973	1,106	0,986
Acido Linoléico	REPLICAS	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
	1	1,506	1,494	1,503
	2	1,508	1,502	1,498
	3	1,499	1,498	1,509
	4	1,491	1,506	1,498
	5	1,518	1,510	1,513
	PROMEDIO	1,504	1,502	1,504
	DESVIACION	0,010	0,006	0,007
% CV	0,660	0,426	0,450	

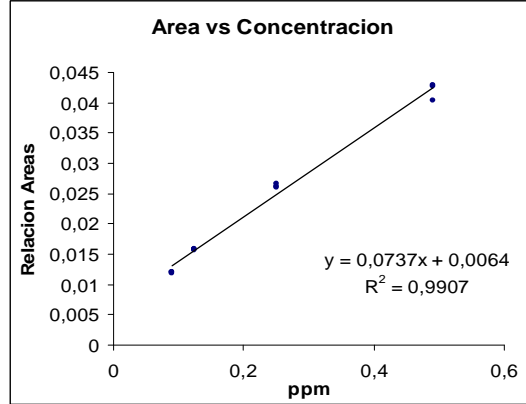
7.3. SENSIBILIDAD

Limites de detección (LOD): Se define como la cantidad mínima de sustancia que puede ser detectada *con fiabilidad* por un método analítico determinado. Intuitivamente, sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco; por lo tanto, el LOD es la concentración que proporciona una señal en el instrumento (S) significativamente diferente a la señal del ruido de fondo (N). No existe un acuerdo total entre su relación que puede estar entre 2 y 6, pero la tendencia lleva a definir el límite de detección como la concentración del analito que proporciona una relación señal-ruido igual a 3, o sea que la concentración mínima detectable siendo la señal del blanco mas tres veces su desviación.

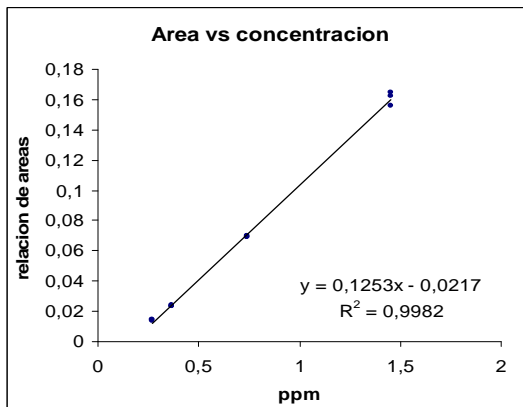
Figura 14: Curvas para determinación de LOD y LOQ: a) éster metílico de ácido palmítico, b) éster metílico de ácido esteárico, c) éster metílico de ácido oleico, d) éster metílico de ácido linoléico, e) éster metílico de ácido linolénico



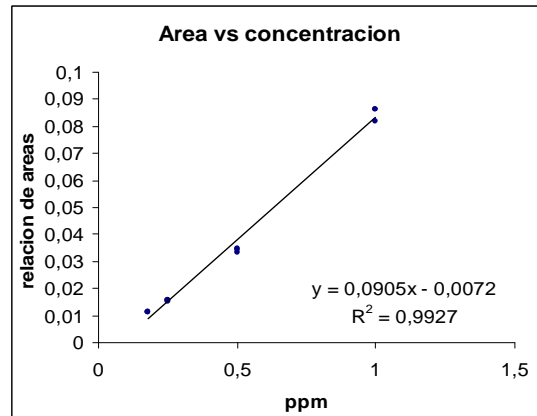
a)



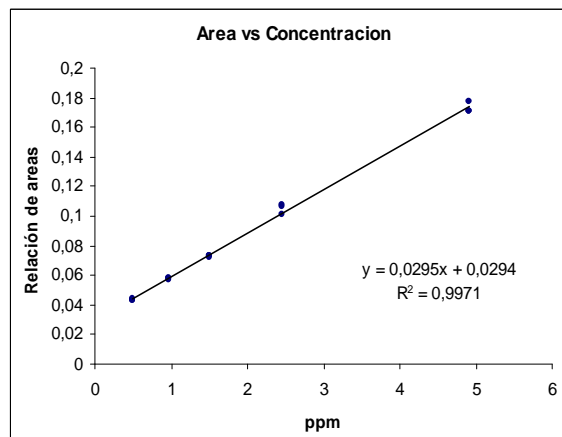
b)



c)



d)



e)

7.3.3. Determinación de la sensibilidad (Limite de detección LOD y limite de cuantificación LOQ)

Tabla 33: Datos para determinación de la sensibilidad con concentración de patrón interno de 18.51 ppm para cada disolución patrón

Éster metílico									
Ácido palmítico		Ácido esteárico		Ácido oleico		Ácido linoléico		Ácido linolénico	
ppm	Relación áreas	ppm	Relación áreas	ppm	Relación áreas	ppm	Relación áreas	ppm	Relación áreas
0,18	0,0147	0,09	0,0120	0,27	0,0141	0,18	0,0111	0,49	0,0431
0,18	0,0148	0,09	0,0119	0,27	0,0141	0,18	0,0111	0,49	0,0437
0,18	0,0148	0,09	0,0120	0,27	0,0146	0,18	0,0115	0,49	0,0434
0,25	0,0181	0,124	0,0158	0,37	0,0237	0,25	0,0156	0,98	0,0578
0,25	0,0185	0,124	0,0157	0,37	0,0234	0,25	0,0156	0,98	0,0577
0,25	0,0184	0,124	0,0159	0,37	0,0237	0,25	0,0154	0,98	0,0580
0,5	0,0382	0,25	0,0262	0,74	0,0690	0,5	0,0347	1,5	0,0730
0,5	0,0394	0,25	0,0260	0,74	0,0691	0,5	0,0346	1,5	0,0723
0,5	0,0392	0,25	0,0267	0,74	0,0697	0,5	0,0336	1,5	0,0730
1	0,0870	0,49	0,0428	1,45	0,1621	1	0,0861	2,45	0,1007
1	0,0856	0,49	0,0427	1,45	0,1647	1	0,0819	2,45	0,1060
1	0,0834	0,49	0,0403	1,45	0,1555	1	0,0862	2,45	0,1078
								4,91	0,1770
								4,91	0,1715
								4,91	0,1705
Pendiente	0,0873	0,0737	0,1253	0,0906	0,0295				
Intercepto	-0,0028	-0,0064	-0,0217	-0,0073	0,0294				
R	0,9983	0,9953	0,9991	0,9963	0,9975				
R ²	0,9966	0,9907	0,9982	0,9927	0,9971				
Sy/x	0,0018	0,0012	0,0027	0,0027	0,0010				
X _{LOD} (ppm)	0,03	0,04	0,13	0,01	0,28				
X _{LOQ} (ppm)	0,17	0,08	0,39	0,22	0,35				

Para la ecuación de la forma $y = m x + b$; donde m indica la pendiente de la línea recta y b el intercepto sobre la ordenada.

7.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Para determinación de la concentración de los ácidos grasos de la muestra de la semilla del totumo se tuvieron en cuenta las diluciones realizadas para preparar las disoluciones de la muestras a inyectar, al igual que el porcentaje de recuperación determinado. Esto se logro mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ppm de éster metílico en solución} = \frac{\text{relación de áreas} + \text{Intercepto curva de calibración}}{\text{pendiente curva de calibración}} \times \frac{92.72}{100}$$

$$\% \text{ acido graso en la muestra de aceite} = \frac{\text{mg éster metílico}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}} \times \frac{0.01 \text{ L}}{\text{peso muestra}^{**}} \times \frac{\text{Wi}^* \text{ acido graso}}{\text{Wi}^* \text{ éster metílico del acido graso}} \times 100$$

* Wi = peso molecular
 ** Peso muestra 0.350 g

Tabla 34: Datos para la determinación de la concentración de ácidos grasos en la muestra de aceite extraído de la semilla el totumo (*Crescentia cujete L.*)

Acido palmítico			Acido esteárico			Acido oleico		
Relación de áreas	ppm (mg/L)	% de acido en aceite	Relación de áreas	ppm (mg/L)	% de acido en aceite	Relación de áreas	ppm (mg/L)	% de acido en aceite
1,8291	57,36	14,42	0,8005	23,23	5,87	5,8670	155,30	39,19
1,8206	57,09	14,35	0,8180	23,76	6,01	5,8574	155,00	39,13
1,8211	57,10	14,34	0,8092	23,50	5,93	5,8639	155,20	39,17
1,8223	57,14	14,35	0,8100	23,52	5,95	5,8696	155,40	39,21
Promedio		14,36	Promedio		5,94	Promedio		39,18

Acido linoléico			Acido linolénico		
Relación de áreas	ppm (mg/L)	% de acido en aceite	Relación de áreas	ppm (mg/L)	% de acido en aceite
2,18049	73,08	18,44	0,0791	1,69	0,43
2,16967	72,71	18,34	0,0791	1,69	0,43
2,16368	72,50	18,29	0,0791	1,68	0,43
2,16360	72,50	18,29	0,0792	1,69	0,43
Promedio		18,34	Promedio		0,43

Tabla 35: Datos para la determinación de la desviación respecto a la concentración e intervalo de confianza

Acido graso	y_o	$(y_o - y_{prom})^2$	S_{x_o}	t ($n = 4$)*	limite confianza
Palmítico	1,8291	3,35E-05	0,1987	3.18	±0,32
	1,8206	7,02E-06	0,1986		±0,32
	1,8211	4,62E-06	0,1986		±0,32
	1,8223	9,80E-07	0,1986		±0,32
	Promedio				±0,32
Esteárico	0,8005	8,05E-05	0,0574	3.18	±0,09
	0,8180	7,40E-05	0,0859		±0,14
	0,8092	4,15E-08	0,0858		±0,14
	0,8100	3,30E-07	0,0858		±0,14
	Promedio				±0,12
Oleico	5,8670	6,36E-06	0,0664	3.18	±0,11
	5,8574	5,00E-05	0,0940		±0,15
	5,8639	3,28E-07	0,1198		±0,19
	5,8696	2,62E-05	0,1197		±0,19
	Promedio				±0,16
Linoléico	2,1805	0,00012389	0,1007	3.18	±0,16
	2,1697	9,67E-08	0,1424		±0,23
	2,1637	3,23E-05	0,1745		±0,28
	2,1636	3,32E-05	0,2077		±0,33
	Promedio				±0,245
Linolénico	0,0791	6,17E-10	0,0338	3.18	±0,05
	0,0791	1,04E-09	0,0478		±0,08
	0,0791	3,19E-09	0,0585		±0,09
	0,0792	1,29E-08	0,0676		±0,11
	Promedio				±0,08

* t para un 95 % de confianza

7.5 DETERMINACION DE LA PRECISION DEL MÉTODO DE ACIDEZ Y SAPONIFICACION

Para establecer la precisión del método de acidez y saponificación necesaria para la determinación del porcentaje de recuperación establecido, se tuvo en cuenta la estandarización de la base y el ácido respectivamente necesarios para determinar los parámetros mencionados.

Se utilizaron patrones primarios para dicha estandarización. Para estandarizar la base utilizada (KOH) para la determinación del índice de acidez a un concentración de 0.1 N se utilizó el ftalato ácido de potasio (KHP), pesando por triplicado una cantidad de este patrón para posteriormente disolverlo en agua desionizada llevando consigo un blanco durante el procedimiento. Se tituló cada disolución patrón y el blanco con la base preparada utilizando indicador fenolftaleína hasta el viraje a color rosa. De la misma forma se procedió con el ácido (HCl) para la determinación de el índice de saponificación a concentración de 0.6 N, utilizando como patrón primario carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) llevando igualmente un blanco y se titularon cada solución patrón y su respectivo blanco con el ácido utilizando como indicador verde bromocresol hasta el viraje a color verde claro. En la tabla 36 se muestran los datos y resultados para esta determinación.

Tabla 36: Datos y resultados para la determinación de la precisión del método de acidez y saponificación

Índice de acidez		Índice de saponificación	
Peso KHP (g)	0,0810	Peso Na_2CO_3 (g)	0,0382
	0,0771		0,0384
	0,0710		0,0384
Volumen KOH (mL)	5,47	Volumen HCl (mL)	1,20
	5,22		1,18
	4,78		1,18
Normalidad KOH	0,0725 N	Normalidad HCl	0,6041 N
	0,0722 N		0,6140 N
	0,0732 N		0,6140 N
promedio	0,0726 N	promedio	0,6107 N
Desviación estándar	0,0005	Desviación estándar	0,0057
limite confianza	$\pm 0,0013$	limite confianza	$\pm 0,0142$
% Precisión	98,25	% Precisión	97,68