

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA
DE LA GRASA DEL INSECTO NIJ
(Homóptera, Margarodidae, *Mlaveia axim*)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

DE LA GRASA DEL INSECTO NIJ

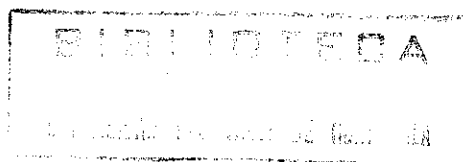
(Homóptera, Margarodidae, *Llaveia axin*)

María Alejandra Llorca Overall

Trabajo de graduación presentado para optar al
grado académico de Licenciada en Bioquímica

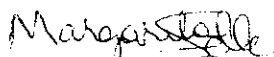
Guatemala

1998



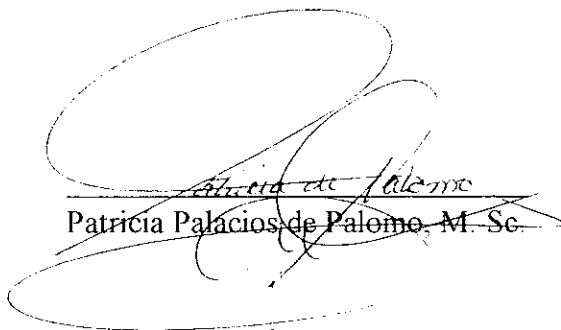


Visto Bueno:

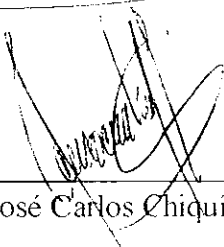


Celia Margarita Selle Sánchez, M. Sc.
Asesora

Tribunal:



~~Patricia Palacios de Palomo, M. Sc.~~



Lic. José Carlos Chiquín



Celia Margarita Selle Sánchez, M.Sc.

Fecha de aprobación:

28 de octubre de 1998

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me ayudaron en la realización del presente trabajo de investigación, en particular a:

Los artesanos de Rabinal, Baja Verapaz, Rosa Morales y Gonzalo Iboy, por su hospitalidad, por haber compartido con el Proyecto Nij el proceso artesanal de extracción de la grasa y por haber proporcionado parte de las muestras de grasa que utilice en los análisis.

Dr. Charles MacVean por el apoyo económico, proporcionado a través del Proyecto Nij, para la compra de los reactivos y los libros de consulta, por su apoyo y sugerencias a lo largo del proceso y por la revisión del presente documento.

Licda. Margarita Selle por su apoyo y asesoría a lo largo de este trabajo y por el minucioso proceso de revisión del presente documento.



RESUMEN

El presente trabajo de investigación, sobre la caracterización fisicoquímica de la grasa del insecto nij (Homóptera, Margarodidae, *Ilaveia axin*), está dirigido a satisfacer parte de los objetivos del Proyecto Nij del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Se pretende establecer cuáles son las propiedades fisicoquímicas de esta grasa, anteriormente poco conocidas, para que posteriormente, con estudios de sus propiedades y su comportamiento como material, se puedan sugerir usos para la misma, adicionales a los que se le da actualmente a nivel artesanal en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala.

Se caracterizaron, en triplicado, tres muestras de grasa de diferente localidad de origen y/o de procesamiento, incluyendo la determinación de las siguientes propiedades, de las cuales se dan los valores promedio mínimos y máximos obtenidos: gravedad específica a 25°C, (0.957–0.963); intervalo de fusión, (33.7–35.3)°C–(50.8–52.2)°C; índice de acidez, (27–35) mg KOH/g grasa; índice de saponificación, (196) mg KOH/g grasa; e índice de yodo, (57–145) g yodo/100 g grasa, valor que incluye tanto las muestras completas como sus fracciones soluble e insoluble en éter de petróleo. Además, se estableció la solubilidad a 25°C en acetona, éter de petróleo y una mezcla de acetona:éter de petróleo 1:1 (v/v), obteniéndose valores de (9–10), (12) y (12) g grasa/100 g solvente, respectivamente. También se determinó la solubilidad a 25°C en etanol y en una mezcla de etanol:éter de petróleo 1:1 (v/v); obteniéndose valores de (<7) y (<12) g grasa/100 g solvente, respectivamente.

Por otra parte, se obtuvieron espectros de absorción ultravioleta–visible e infrarroja y de resonancia magnética nuclear de protones de la grasa o de fracciones de ella. En el primer espectro, la absorción de la región de 300–350 nm reveló la presencia de un pigmento tipo antraquinona; mientras que los dos últimos espectros resultaron ser típicos de aceites o grasas con ácidos grasos predominantemente insaturados, como es el caso de los aceites de soya, de oliva y de semilla de hule.

También se determinó la composición de la grasa en cuanto a triacilglicerol, por cromatografía líquida de alta resolución con fase invertida y detección ultravioleta, lográndose separación e identificación en regiones de número de carbonos equivalentes pero no en triacilglicerol individuales. Entre los triacilglicerol principales pueden estar aquellos con 54 y 48 carbonos equivalentes, ésto es con residuos de ácidos grasos correspondientes a: 18:0–18:1(Δ^9)–18:2($\Delta^{9,12}$) y/o 18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9); 18:0–18:0–18:0 y/o 18:0–18:1(Δ^9)–20:0, respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos para el índice de yodo, la grasa del nij debe ser clasificada como una grasa con propiedades secantes. Por otra parte, la grasa del nij es similar, en cuanto a su índice de yodo y espectro de absorción infrarroja, al aceite de semilla de hule y al aceite de soya; es similar al aceite de palma africana, al lardo de cerdo y a la manteca de semilla de cacao, en relación a su intervalo de fusión; es similar a la manteca de

semilla de cacao y a la cera de la China, en su gravedad específica. Además, es similar a los aceites de linaza, de semilla de hule, de soya, de oliva, de palma africana, y a la manteca de semilla de cacao y al lardo de cerdo, en su índice de saponificación.

La determinación, a lo largo del tiempo, del índice de yodo y del espectro de absorción infrarroja de películas delgadas de grasa del nij expuestas al aire, permitió seguir su proceso de "secado". El índice de yodo, que está relacionado con la concentración de dobles enlaces entre carbonos en la muestra, disminuyó considerablemente entre los 0 y los 6 días de estar expuesta la película de grasa a aire ambiental; en este tiempo el índice de yodo se redujo al 45% del valor inicial y ya no sufrió un cambio considerable. Durante la exposición de la película de grasa a aire seco, su espectro de absorción infrarroja mostró aumento del porcentaje de transmitancia en una banda relacionada con los dobles enlaces entre carbonos y la disminución del mismo en una banda relacionada con los hidroperóxidos; más allá de los siete días de exposición dicho espectro ya no mostró cambios considerables. Estos resultados sugieren un proceso de polimerización de la grasa, por autooxidación por radicales libres, donde los hidroperóxidos son productos iniciales e intermediarios de la reacción en cadena involucrada. Por lo anterior, se sugiere estudiar las propiedades y el comportamiento de la grasa como material secante, en aplicaciones como pinturas, recubrimiento de superficies y tela, para las que se usan los aceites y grasas mencionados.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Aceites, grasas y ceras	3
1. Descripción general y composición	3
a. Esteres de ácidos grasos y glicerol	7
b. Esteres de ácidos grasos con otros alcoholes diferentes al glicerol	10
2. Caracterización	11
a. Propiedades físicas y químicas	12
i. Gravedad específica	12
ii. Intervalo de fusión	14
iii. Solubilidad	14
iv. Índice de acidez	14
v. Índice de saponificación	15
vi. Índice de yodo	15
b. Características espectrométricas	17
i. Absorción ultravioleta y visible	17
ii. Absorción infrarroja	18
iii. Resonancia magnética nuclear de protones	19
c. Composición en ácidos grasos y acilglicerol	20
3. Función en organismos vivos, propiedades y usos	22
4. Reacciones de degradación	25
a. Autooxidación	28
b. Polimerización	31
B. El insecto nij (<i>Llaveia axin</i>) y su grasa	33
1. Descripción general del insecto	33
2. Proceso de obtención de la grasa	34
3. Propiedades físicas y químicas de la grasa	36
4. Usos de la grasa	39
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	41
A. Justificación	41
B. Objetivos	42
1. General	42
2. Específicos	42
IV. HIPOTESIS	43

	Página
V. METODOLOGÍA	45
A. Preparación de las muestras para análisis	47
B. Determinación de propiedades físicas y químicas	47
1. Gravedad específica	47
2. Intervalo de fusión	48
3. Solubilidad	49
4. Índice de acidez	50
5. Índice de saponificación	51
6. Índice de yodo	52
C. Determinación de características espectrométricas	54
1. Absorción ultravioleta–visible	54
2. Absorción infrarroja	55
3. Resonancia magnética nuclear de protones	55
D. Determinación de la composición en triacilglicerotes	55
VI. RESULTADOS	57
A. Determinación de propiedades físicas y químicas	57
B. Determinación de características espectrométricas	61
1. Absorción ultravioleta–visible	61
2. Absorción infrarroja	66
3. Resonancia magnética nuclear de protones	70
C. Composición en triacilglicerotes	73
VII. DISCUSION	81
A. Determinación de propiedades físicas y químicas	81
1. Gravedad específica	81
2. Intervalo de fusión	83
3. Solubilidad en solvente individuales y en mezclas de los mismos	85
4. Índice de acidez	88
5. Índice de saponificación	91
6. Índice de yodo	93
a. Índice de yodo de grasa del nij, de su fracción soluble y de fracción insoluble en éter de petróleo	93
b. Índice de yodo de películas de grasa del nij expuestas al aire ambiental	96
B. Determinación de características espectrométricas	98
1. Absorción ultravioleta-visible de grasa del nij en tetrahidrofurano y en hexano	98
2. Absorción infrarroja de películas de grasa del nij expuestas al aire seco	100
3. Resonancia magnética nuclear de protones de fracciones de grasa del nij solubles en acetona y en cloroformo	107

	Página
C. Determinación de composición en triacilgliceroles de la grasa del nij de Rabinal	109
VIII. CONCLUSIONES	115
IX. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS FUTUROS	119
X. FUENTES CITADAS	121
APENDICES	129
A. Procedimientos y materiales para la caracterización de la grasa del nij	131
B. Titulaciones potenciométricas a partir de las cuales se calculo el índice de acidez y el índice de saponificación de la grasa del nij	157
C. Espectros de referencia de absorción ultravioleta-visible e infrarroja y de resonancia magnética nuclear de protones	165
D. Cromatogramas de referencia de cromatografía líquida de alta resolución de fase invertida de triacilgliceroles presentes en aceite de soya y en aceite de oliva	179
E. Análisis de varianza y comparación de medias de los valores de las determinaciones de las propiedades físicas y químicas de las muestras de grasa del nij	183
F. Cromatogramas de referencia de cromatografía de gases de metil ésteres de ácidos grasos de la grasa del nij	195

FIGURAS

Figura		Página
1	Disposición de las moléculas de los ácidos grasos saturados e insaturados, en su forma libre	7
2	Estructuras del glicerol y de los diferentes tipos de acilgliceroles	8
3	Mecanismo general de la reacción en cadena de autooxidación del ácido linoleico, 18:2 ($\Delta^{9,12}$)	29
4	Reacción general de oxidación y polimerización de triacilgliceroles con insaturaciones	33
5	Picnómetro tipo Hubbard	48
6	Sistema usado para la determinación del intervalo de fusión, con tubo de Thiele y mechero	49
7	Sistema de reflujo usado para la saponificación de las muestras de grasa del nij	52
8	Espectros de absorción ultravioleta–visible de trioleína y de aceite de oliva, en tetrahidrofurano	62
9	Espectros de absorción ultravioleta–visible de trioleína y de grasa del nij de Rabinal, en tetrahidrofurano	63
10	Espectros de absorción ultravioleta–visible de aceite de soya y de grasa del nij de Rabinal–Guatemala, en tetrahidrofurano	63
11	Espectro de absorción ultravioleta–visible de la fracción soluble de la mezcla patrón de triacilgliceroles, en hexano	64
12	Espectros de absorción ultravioleta–visible de aceite de soya, aceite de oliva y grasa del nij de Rabinal, en hexano	64
13	Espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco	67
14	Espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal–Guatemala, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco	68

15	Espectros de absorción infrarroja de aceite de soya y de aceite de oliva, corridos como referencia, en capa delgada entre ventanas de KCl	69
16	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la fracción soluble de la grasa del nij de Rabinal-Guatemala, en acetona deuterada	71
17	Espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la fracción soluble de la grasa del nij de Rabinal-Guatemala, en cloroformo deuterado	72
18	Cromatograma de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, para triacilgliceroles presentes en la grasa del nij de Rabinal	75
19	Cromatograma de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, para triacilgliceroles presentes en el aceite de soya	76
20	Cromatograma de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, para triacilgliceroles presentes en el aceite de oliva	77
21	Superposición de espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco	104
22	Superposición de espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal-Guatemala, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco	105

CUADROS

Cuadro		Página
1	Acidos grasos más comunes en la naturaleza	6
2	Tipos y propiedades físicas y químicas de algunos aceites, grasas y ceras	13
3	Índice de yodo para diferentes tipos de aceites y para grasas	16
4	Composición, en ácidos grasos totales, de algunos aceites y grasas	21
5	Triacilgliceroles presentes en aceite de soya y aceite de oliva, y su respectivo número de carbonos equivalentes	23
6	Origen y usos de algunos aceites, grasas y ceras	26
7	Procedimiento experimental seguido	46
8	Gravedad específica de las muestras de grasa del nij a 25°C/25°C	57
9	Intervalo de fusión de las muestras de grasa del nij	58
10	Solubilidad, % (p/p), de las muestras de grasa del nij a 25°C, en solventes individuales y en mezclas	58
11	Índice de acidez e índice de saponificación de las muestras de grasa del nij	59
12	Índice de yodo de muestras y fracciones de grasa del nij	59
13	Índice de yodo de la grasa del nij de Rabinal a lo largo del tiempo, al exponerla al aire ambiental, en forma de película	60
14	Máximos de absorbancia (λ max.) en ultravioleta-visible para las muestras de trioleína, aceite de soya, aceite de oliva, mezcla patrón de triacilgliceroles y grasas del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala, en tetrahidrofurano o hexano	65
15	Asignación de bandas de absorción infrarroja de la grasa del nij de Rabinal, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl	70
16	Asignación de bandas de resonancia magnética nuclear de protones de las fracciones de grasa del nij de Rabinal-Guatemala solubles en acetona y en cloroformo deuterados	73

Cuadro		Página
17	Tiempo de retención y porcentaje de área de los picos de los cromatogramas de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, de grasa del nij de Rabinal, aceite de soya y aceite de oliva	78
18	Triacilgliceroles mayoritarios más probables en grasa del nij de Rabinal, según composición de ácidos grasos totales y número de carbonos equivalentes	79
19	Propiedades físicas y químicas de algunos aceites, algunas grasas, y una cera, reportados en la literatura, y de la grasa del nij, según este trabajo	82

GRAFICAS

Gráfica		Página
1	Índice de yodo de la grasa del nij de Rabinal a lo largo del tiempo, al exponerla al aire ambiental, en forma de película	60



I. INTRODUCCION

La hembra del insecto escama *Llaveia axin*, Superfamilia Homóptera, Familia Margarodidae, produce en el interior de su cuerpo una grasa que ha sido usada por los indígenas de la región mesoamericana, desde la época precolombina hasta la actualidad, para dar un acabado decorativo y preservante a diferentes materiales (McBryde, 1943; MacVean, 1992). Se cree que los mayas usaron esta grasa para preservar los dinteles de madera de zapote que decoraban sus templos (McBryde, 1943). Los nativos de ciertas regiones de Guatemala y México aun usan este material para dar un acabado lustroso a objetos hechos de jicaras que se venden en los mercados locales (Luján y Toledo, 1986; MacVean, 1992; MacVean, 1993b).

En la actualidad, estos insectos y su grasa se conocen y aprovechan en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala, donde se les llama "nij"¹, y en varias localidades de México (MacVean, 1992). En Valladolid, Yucatán, México, a estos insectos se le conoce como "menché"; y en Chiapa de Corzo, y Uruapan, Michoacán, ambos también en México, se les conoce bajo el nombre de "aje" (Jenkins, 1964; MacVean, 1992). Desde el siglo XVI (de Landa, 1941; de Sahagún, 1985; Walcott, 1940) está documentado el uso de esta grasa con fines muy diversos, en diferentes regiones desde México hasta Panamá (Jenkins, 1964; McBryde, 1943).

La grasa del nij es un sólido suave de color amarillo y olor distintivo; al frotarla entre los dedos se funde y al exponerla al aire tiende a formar una costra de color café en su parte exterior, mientras que su interior permanece suave. El acabado lustroso que da esta grasa a diferentes materiales ha sido descrito como extraordinariamente durable, ya que persiste por mucho tiempo ante el uso y el lavado frecuente con agua. (Jenkins, 1964)

La mayoría de los estudios de la grasa del nij se han centrado en: la antigüedad de su uso, su papel en las costumbres de los nativos, su forma de obtención y su distribución geográfica (de Landa, 1941; de Sahagún, 1985; Jenkins, 1964; McBryde, 1943). Hay poca información disponible sobre las características físicas y químicas de la grasa. Al respecto, se conocen dos estudios que datan de mediados del siglo pasado y principios de éste; el primero fue hecho en los Estados Unidos de América por V.G. Bloede (Schott, 1869) y el segundo en Francia por René Guérin (Luján y Toledo, 1986). Estos estudios se refieren a algunas de las propiedades tradicionalmente usadas para caracterizar aceites y grasas, tales como: punto de fusión, solubilidad en varios solventes y grado de saponificación. Principalmente, por su época de realización, estos estudios no se refieren a otros parámetros, sobre todo de composición química y espectrométricos, que hoy en día son importantes para hacer una descripción de las propiedades de una grasa que permita proponer otros posibles

¹ La ortografía correcta para esta palabra en achi' es "nijj"; de esto se tuvo conocimiento posteriormente a la aprobación de este trabajo de investigación por lo que en el mismo se utilizará nij en vez de nijj.

usos para ella.

El insecto nij y su grasa han despertado interés en un grupo del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, cuyos objetivos de estudio han sido determinar la biología del insecto, conocer las propiedades físicas y químicas de la grasa y, sugerir usos alternativos y nuevos mercados para la grasa. Este grupo, dirigido por el entomólogo Charles MacVean, Ph. D., ha estudiado el insecto, y la preparación y utilización de la grasa, principalmente en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala. En esta localidad, hay actividad artesanal a nivel familiar que produce guacales, chinchines y otros objetos utilitarios y decorativos hechos a partir de jícaras, que son las cáscaras del fruto del árbol de morro, *Crescentia alata* HBK y *Crescentia cujete* L, familia Bignoniaceae. Las jícaras son cubiertas y decoradas con la ayuda de esta grasa después que se han cocinado, vaciado, secado y lijado. Luego, estos objetos, tallados con diferentes motivos decorativos sobre el fondo negro lustroso, son vendidos en los mercados guatemaltecos. (MacVean, 1992)

El grupo de investigación de la Universidad del Valle de Guatemala ha llevado a cabo una caracterización química preliminar de la grasa del nij, en cuanto a sus componentes principales, en colaboración con la Colorado State University (Selle, 1993). Siguiendo en esta línea, el presente estudio se centra en la caracterización fisicoquímica general de la grasa del nij; incluye la verificación de lo reportado en la literatura (Schott, 1869; Luján y Toledo, 1986) y la generación de nueva información sobre: algunos parámetros fisicoquímicos, algunas características espectrométricas y la composición general en cuanto a triacilgliceroles. Esta caracterización se basa en métodos oficiales de análisis dados por *The American Oil Chemists Society* (AOCS), *The International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), *The Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) y *The American Society for Testing and Materials* (ASTM).

Con base en las propiedades físicas y químicas determinadas en este estudio, se compara la grasa del nij con otros aceites, grasas y ceras conocidos, de aplicación en la artesanía y la industria. Para poder sugerir otras posibles aplicaciones para la grasa, que le den mayor interés y valor, en el área rural donde es producida y utilizada actualmente, se requeriría también la caracterización de la película de grasa como material en aspectos tales como: dureza, resistencia a hongos, impermeabilidad a agua y durabilidad. Esta caracterización como material va más allá de lo abarcado por el presente trabajo, y se espera sea cubierto en otros estudios del mismo proyecto de la Universidad del Valle de Guatemala.

II. ANTECEDENTES

A. Aceites, grasas y ceras

1. Descripción general y composición

Los aceites, grasas y ceras pertenecen a un grupo más amplio de compuestos químicos llamados lípidos. Los lípidos pueden ser definidos como sustancias que: son insolubles en agua, son solubles en solventes orgánicos tales como éter dietílico, hexano cloroformo, benceno y metanol, pueden contener cadenas hidrocarbonadas largas en sus moléculas, y están presentes en o se derivan de organismos vivos. Los lípidos se clasifican como: lípidos simples, que pueden ser hidrolizados para dar uno o dos tipos diferentes de productos por molécula; lípidos complejos, que contienen tres o más productos de hidrólisis por molécula; y lípidos derivados, que provienen de los dos grupos anteriores, por hidrólisis. (Christie, 1982; Martin et al., 1984)

Los lípidos simples son ésteres de ácidos grasos con diferentes alcoholes; incluyen los acilgliceroles que son ésteres de ácidos grasos con glicerol, los ésteres de ácidos grasos con otros alcoholes diferentes al glicerol, los ésteres de ácidos grasos con el colesterol y los ésteres de ácidos grasos con las vitaminas A y D (Christie, 1982; Mehlenbacher, 1960). A las sustancias que están compuestas principalmente por acilgliceroles se les llama aceites, si están en estado líquido a 25 °C y, grasas, si están en estado sólido a esta misma temperatura (Martin et al., 1984). Se les llama ceras a las sustancias que están constituidas principalmente por ésteres de ácidos grasos con alcoholes diferentes al glicerol (Martin et al., 1984).

Los lípidos complejos son ésteres de ácidos grasos que contienen otros grupos funcionales, además de un alcohol y un ácido graso. Entre los lípidos complejos están los fosfolípidos y los glicolípidos. Los fosfolípidos son acilgliceroles que contienen, además de los ácidos grasos y el glicerol, moléculas de ácido fosfórico, grupos amino y otros sustituyentes. Estos lípidos incluyen fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, fosfatidil serina, plasmalógenos, y esfingomielinas. Los glicolípidos están compuestos de ácidos grasos, esfingosina y carbohidratos; contienen nitrógeno pero no ácido fosfórico ni glicerol. Los lípidos complejos también incluyen compuestos tales como los sulfolípidos y los aminolípidos; dentro de esta última categoría se pueden colocar las lipoproteínas. (Martin et al., 1984)

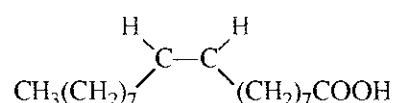
Los lípidos derivados incluyen ácidos grasos, tanto saturados como insaturados (presencia o no de dobles enlaces en su estructura), glicerol, otros alcoholes, carotenoides (Mehlenbacher, 1960), esteroides, esteroides, aldehidos grasos (aldehidos de cadena larga), hidrocarburos y las proteínas de las lipoproteínas. (Martin et al., 1984)

Los aceites, grasas y ceras, que son los lípidos de mayor interés en este trabajo, tienen como componentes mayoritarios a los lípidos simples; a continuación se tratará con mayor detalle la estructura, nomenclatura y características de sus componentes. En primer lugar, se tratarán los ácidos grasos por ser comunes a todos los lípidos simples. Luego, se tratarán los ésteres de ácidos grasos con glicerol y, por último, los ésteres de ácidos grasos con otros alcoholes diferentes al glicerol.

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono; tienen variaciones en el grado y clase de ramificaciones, y en la ausencia o presencia y el número de dobles enlaces (Martin et al., 1984). Los más comunes en la naturaleza, entre los ácidos grasos sin dobles enlaces, o sea saturados, son los de cadena recta con número par de entre 14 y 20 átomos de carbono (Martin et al., 1984). La nomenclatura sistemática de los ácidos grasos está basada en el nombre del hidrocarburo con el mismo número de átomos de carbono; la terminación *o* de los hidrocarburos se sustituye por *oico* en los ácidos grasos (Martin et al., 1984). Así, los ácidos grasos saturados terminan en *anoico*, por ejemplo, el ácido con dieciséis átomos de carbono y fórmula estructural condensada $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$, se nombra ácido hexadecanoico (Christie, 1982). Los ácidos grasos con dobles enlaces, es decir insaturados, terminan en *enoico*, por ejemplo, el ácido con dieciocho átomos de carbono y una insaturación se nombra ácido octadecenoico (Christie, 1982). Aún es de uso común el nombre trivial de los ácidos grasos el cual ha sido asignado por el tipo de aceite o grasa en el que son un componente mayoritario; por ejemplo, el ácido hexadecanoico es llamado palmítico por ser mayoritario en el aceite de palma (Christie, 1982).

Para simplificar los nombres de los ácidos grasos, existe otra nomenclatura llamada numérica que consiste en indicar tanto el número de átomos de carbono como el número de insaturaciones del ácido graso, separando los dos números por dos puntos, es decir tomando el ácido palmítico; por ejemplo el ácido hexadecanoico es designado como 16:0 (Christie, 1982).

En fuentes naturales se han caracterizado ácidos grasos de cadena recta con un número par de 10 a 30 átomos de carbono, que contienen un doble enlace por molécula, éstos es monoinsaturados en configuración *cis* por molécula. También se conocen, pero son muy raros, ácidos grasos monoinsaturados en configuración *trans* que son escasos en la naturaleza, por razones biosintéticas. La designación *cis* o *trans* se refiere la disposición espacial relativa de los átomos enlazados a los carbonos del doble enlace. Estos ácidos grasos monoinsaturados pueden tener el doble enlace en diferente posición, por lo que una descripción completa de ellos debe especificar la posición y la configuración del doble enlace (los átomos de carbono de los ácidos grasos se numeran a partir del átomo de carbono carboxílico, que se designa como carbono 1). Por ejemplo, el ácido monoinsaturado más común en la naturaleza es el ácido *cis*-9-octadecenoico, el cual tiene el nombre trivial de ácido oleico y la estructura siguiente.



En la nomenclatura numérica, este ácido se designa, 18:1(Δ^9); el número 1 indica que sólo hay un doble enlace en la molécula, y Δ^9 significa que hay un doble enlace entre los átomos de carbono 9 y 10. El símbolo indicado entre paréntesis, (Δ^9), sólo se usa para los ácidos grasos que contienen dobles enlaces en configuración *cis* (Christie, 1982; Martin et al., 1984).

Cuando el ácido graso tiene más de una insaturación se le llama poliinsaturado. Los ácidos poliinsaturados comunes en la naturaleza son de número par de carbonos entre 16 y 20, son no conjugados y en ellos los grupos de dobles enlaces, CH=CH, están separados por un grupo metileno, CH₂. A este tipo de ácidos no-conjugados también se les puede aplicar la nomenclatura sistemática ya explicada. El Cuadro 1 contiene una lista de los ácidos grasos saturados, mono y poliinsaturados no-conjugados más comunes en la naturaleza, su nombre trivial, su nombre sistemático, la nomenclatura numérica y su punto de fusión. En este cuadro sólo se incluyen los ácidos grasos con número par de átomos de carbono y configuración *cis* pues, por razones biosintéticas, son los más comunes en la naturaleza. (Christie, 1982; Lehninger et al., 1993)

Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen, están fuertemente determinadas por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. La larga cadena hidrocarbonada no polar explica la baja solubilidad de los ácidos grasos en agua. Por ejemplo, el ácido dodecanoico (12:0) tiene una solubilidad de 0.063 mg/g de agua, la cual es mucho menor que la de un azúcar como la glucosa, 1.100 mg/g de agua, que tiene un peso molecular similar. A medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada y disminuye el número de dobles enlaces de un ácido graso, disminuye su solubilidad en agua. El grupo carboxilo es polar; ésto explica la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos de cadena corta. (Lehninger et al., 1993)

El punto de fusión de los ácidos grasos, y de los compuestos que los contienen, está fuertemente influenciado por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada (ver Cuadro 1). A 25°C, los ácidos grasos saturados del 12:0 al 24:0 son sólidos, mientras que los ácidos grasos insaturados de esa longitud, son líquidos aceitosos. (Lehninger et al., 1993)

En los compuestos completamente saturados, la libre rotación alrededor de los enlaces C-C de los grupos CH₂, le da a la cadena hidrocarbonada su gran flexibilidad. Estos compuestos poseen una conformación en zig-zag (ver Figura 1a), en la cual el impedimento estérico (que se relaciona con la repulsión de nubes electrónicas) de los átomos vecinos es mínimo. Estas moléculas pueden colocarse muy juntas en arreglos regulares (ver Figura 1d) estabilizadas por interacciones hidrofóbicas, dando sólidos a 25°C. Un doble enlace en conformación *cis* en la cadena, provoca un cambio de ángulo en ese punto (ver Figura 1b); ésto se debe a que los enlaces simples forman ángulos de 109.5°, mientras que los dobles

enlaces *cis*, ángulos de 120°. Los ácidos grasos con uno o varios dobles enlaces en configuración *cis* no pueden colocarse tan juntos y en arreglos tan regulares como los ácidos grasos completamente saturados, y así las interacciones de las moléculas son más débiles. Lo más común en la naturaleza es que los ácidos grasos insaturados estén presentes mezclados con los saturados; la Figura 1e muestra el arreglo irregular resultante de esta mezcla. Debido a que se necesita menor energía térmica para desordenar los poco ordenados arreglos de los ácidos grasos insaturados, éstos tienen puntos de fusión mucho menores que los de los ácidos grasos saturados, con la misma longitud de cadena. (Lehninger et al., 1993)

Cuadro 1
Ácidos grasos más comunes en la naturaleza¹
(Christie, 1982; Lehninger et al., 1993; Mathews and van Holde, 1990)

Nombre sistemático	Nombre trivial	Nomenclatura numérica ²	Punto de fusión, °C
dodecanoico	láurico	12:0	44.2
tetradecanoico	mirístico	14:0	53.9
hexadecanoico	palmitico	16:0	63.1
octadecanoico	esteárico	18:0	69.6
eicosanoico	araquídico	20:0	76.5
docosanoico	behénico	22:0	81.5
tetracosanoico	lignocérico	24:0	86.0
<i>cis</i> -9-hexadecenoico	palmitoleico	16:1(Δ^9)	-0.5
<i>cis</i> -9-octadecenoico	oleico	18:1(Δ^9)	13.4
<i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico	linoleico	18:2($\Delta^{9,12}$)	-5
<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	α -linolénico ³	18:3($\Delta^{9,12,15}$)	-1

¹ La fórmula general de los ácidos grasos saturados es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, la de los monoinsaturados, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ y la de los poliinsaturados es análoga.

² Número de átomos de carbono : número de dobles enlaces (posición de los dobles enlaces, contando los carbonos a partir del carbono carboxílico).

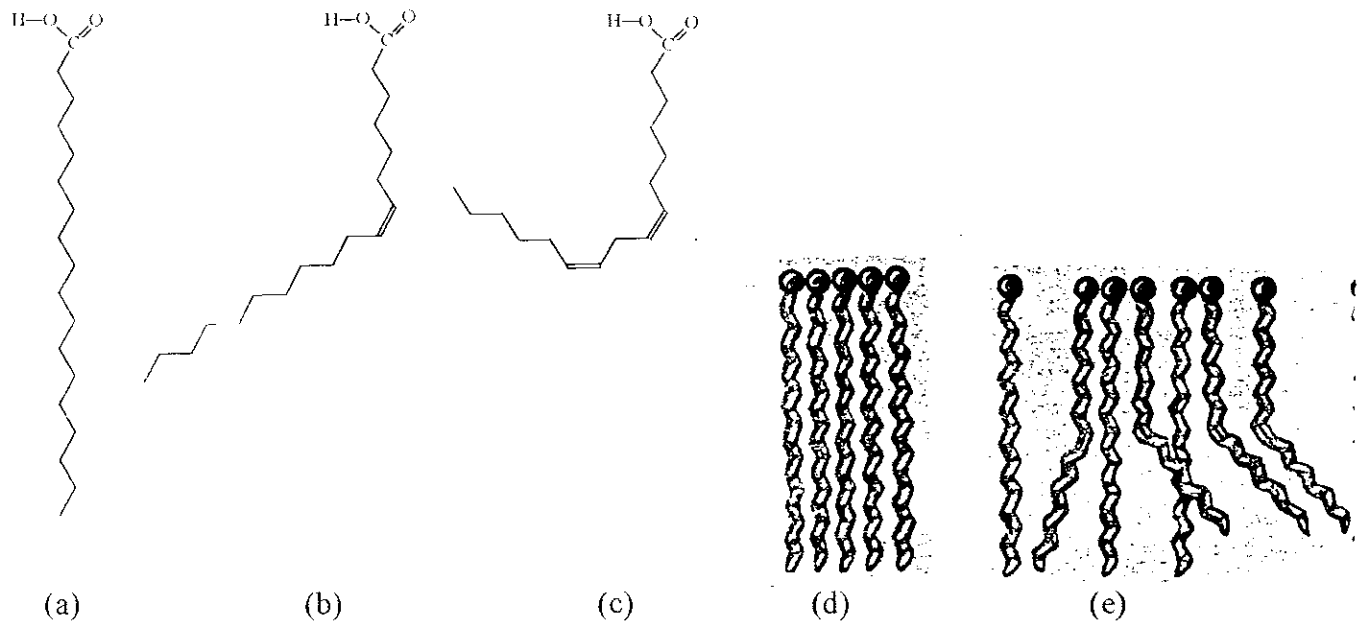
³ Existen, en la naturaleza otros isómeros del ácido octadecatrienoico que difieren en la posición de los dobles enlaces, para distinguirlos, en la nomenclatura trivial se usan letras griegas antes del nombre. α , β , γ .

a. Esteres de ácidos grasos con glicerol

Los ésteres de los ácidos grasos con el glicerol son llamados acilgliceroles (ver Figura 2). Estos se dividen en tres principales tipos: monoacilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles, que son los mono-, di- y tri ésteres del glicerol con los ácidos grasos, respectivamente. Los isómeros de los acilgliceroles difieren en la posición relativa de las cadenas de los ácidos grasos dentro de su estructura, así como en su orientación espacial relativa al glicerol. La Comisión de Nomenclatura Bioquímica, de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y de la Unión Internacional de Bioquímica, IUPAC-IUB por sus siglas en inglés (Christie, 1982), ha recomendado que los nombres mencionados tri-, di-, y monoacilglicerol, sean usados en vez de los nombres tradicionales mono-, di-, y triglicérido ya que los primeros definen la estructura de estos compuestos con más precisión. (Kates, 1986)

Figura 1

Disposición de las moléculas de los ácidos grasos saturados e insaturados en su forma libre (Lehninger et al., 1993)



(a) Acido octadecanoico. 18:0

(b) Acido *cis*-9-octadecenoico. 18:1(Δ^9), que muestra el cambio de ángulo en la cadena causado por el doble enlace *cis*: ésto se debe a que los enlaces simples forman ángulos de 109.5° , mientras que los dobles enlaces *cis*, ángulos de 120° .

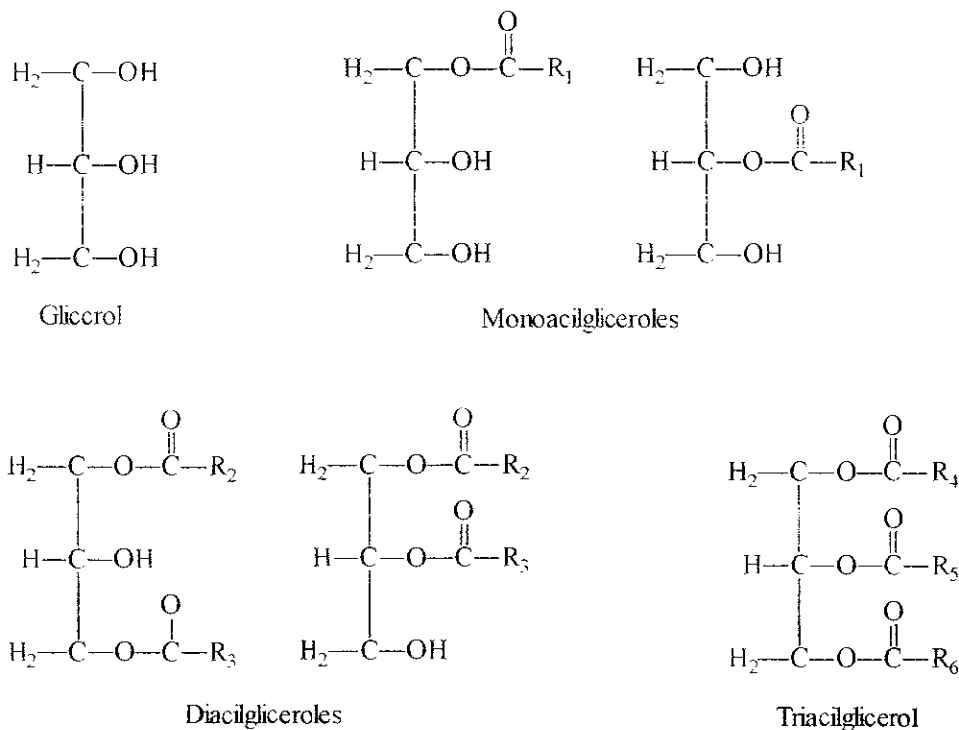
(c) Acido *cis,cis*-9,12-octadecadienoico. 18:2($\Delta^{9,12}$), que muestra los cambios de ángulo en la cadena causados por los dobles enlaces *cis*: ésto se debe a que los enlaces simples forman ángulos de 109.5° , mientras que los dobles enlaces *cis*, ángulos de 120° .

(d) Arreglo de ácidos grasos completamente saturados agrupados en arreglos regulares, estabilizados por interacciones hidrofóbicas.

(e) Arreglo de una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados que muestra el arreglo irregular resultante.

Figura 2

Estructura del glicerol y de los diferentes tipos de acilglicerol (Christie, 1982; Kates, 1986; Mathews and van Holde, 1990)



$R_1 - R_6$ = cadenas hidrocarbonadas (las más comunes en la naturaleza son de 12 a 24 carbonos de longitud). saturadas o insaturadas, de los ácidos grasos, las cuales pueden ser iguales o diferentes.

Como se muestra a continuación, una forma simplificada de representar los triacilglicerol consiste en dibujar como líneas en zig-zag, las cadenas hidrocarbonadas saturadas o insaturadas, y como líneas rectas, el esqueleto del glicerol ($\text{CH}_2\text{---CH---CH}_2$). En esta forma simplificada, no se muestran las insaturaciones que, para triacilglicerol de fuentes naturales, generalmente están en configuración *cis*. (Hall, 1989)



La nomenclatura trivial para los triacilglicerol sólo se utiliza cuando los tres ácidos grasos esterificados al glicerol son iguales; por ejemplo, tripalmitina, trioleína y trilinoleína. La mayoría de los triacilglicerol contienen una mezcla de ácidos grasos, que frecuentemente incluye tanto saturados como insaturados (Mathews and van Holde, 1990). La nomenclatura numérica explicada anteriormente para los ácidos grasos (ver Cuadro 1) también puede usarse

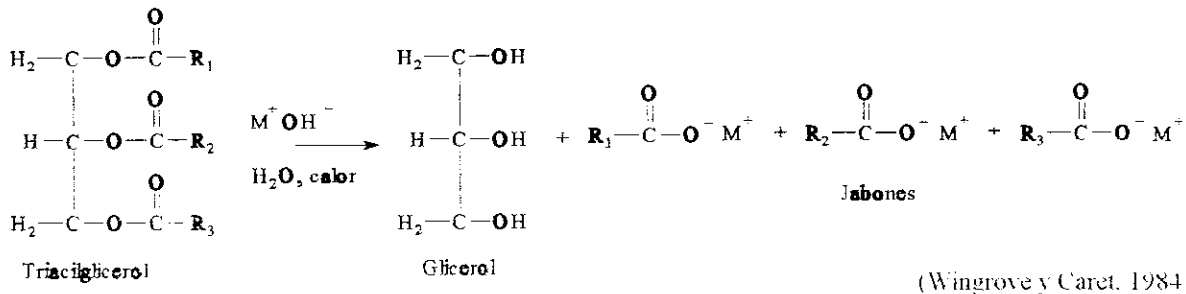
para identificar a los triacilgliceroles, que indica cada uno de los ácidos grasos que están esterificados al glicerol. Así, la triestearina, se representa 18:0–18:0–18:0. Otra forma simplificada de representar los triacilgliceroles es sustituir la nomenclatura numérica de los ácidos grasos por la inicial (en inglés) del nombre trivial de cada uno de ellos: P=palmitico, S=estearico, O=oleico, L=linoleico, Ln=linolénico, etc. La triestearina, en este sistema, se designa SSS. En este trabajo, a esta última forma de representar a los triacilgliceroles se le llama "símbolo" del triacilglicerol. (Christie, 1987)

La esterificación con el glicerol disminuye en gran medida el carácter polar de los grupos carboxilo provenientes de los ácidos grasos. Como consecuencia, los triacilgliceroles son menos solubles en agua que los ácidos grasos libres correspondientes; son solubles en éter, cloroformo, benceno y etanol caliente. (Mathews and van Holde, 1990)

El punto de fusión de los triacilgliceroles lo determina su composición de ácidos grasos. En general, el punto de fusión se incrementa con el número de ácidos grasos saturados (de los tres que pueden estar presentes) y la longitud de la cadena hidrocarbonada de estos ácidos grasos saturados. Por ejemplo, la tripalmitina (16:0–16:0–16:0) y la triestearina (18:0–18:0–18:0) son sólidos a 25°C, mientras que la trioleína (18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9)) y la trilinoleína (18:2($\Delta^{9,12}$)–18:2($\Delta^{9,12}$)–18:2($\Delta^{9,12}$)) son líquidos a la misma temperatura. (Lehninger, et al. 1993)

Según lo anterior, a 25°C, los materiales lipídicos ricos en triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados líquidos y se les llama aceites, mientras que aquellos ricos en triacilgliceroles con un contenido mayor de ácidos grasos saturados, son sólidos y les llama grasas. Una grasa con triacilgliceroles completamente saturados, como componentes mayoritarios, es un sólido muy firme, especialmente si las cadenas hidrocarbonadas de los triacilgliceroles son largas. La razón es la misma que la explicada para los ácidos grasos (ver Figura 1). De hecho, la hidrogenación parcial de aceites con una elevada proporción de triacilgliceroles insaturados se usa comercialmente para producir grasas. (Mathews and van Holde, 1990)

Los acilgliceroles sufren hidrólisis al ser hervidos en medio ácido o básico. La hidrólisis básica, llamada saponificación, produce glicerol y una mezcla de jabones, que son las sales de los ácidos grasos correspondientes. La reacción general de saponificación de un triacilglicerol se indica a continuación al usar hidróxido de sodio o potasio ($M'OH$) y siendo R_1 , R_2 , R_3 , las cadenas hidrocarbonadas originalmente del triacilglicerol y luego de los jabones (Wingrove y Caret, 1984). Los monoacil y diacilgliceroles también pueden sufrir este tipo de reacción.



De los acilgliceroles presentes en aceites y grasas, los triacilgliceroles son los componentes mayoritarios; las cantidades menores de mono y diacilgliceroles que pudieran encontrarse, se derivan de procesos de degradación de los triacilgliceroles. Los triacilgliceroles son la familia más abundante de lípidos de almacenamiento en células animales y vegetales. (Martin, et al., 1984)

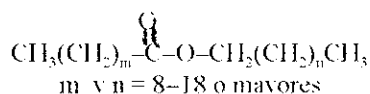
Los aceites y grasas contienen pequeñas cantidades de constituyentes minoritarios, solubles en los acilgliceroles, como: del tipo de carotenos, pigmentos carotenoides y clorofila; pigmentos del tipo quinona como benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas; esteroides como el colesterol, en grasas animales; fosfolípidos; lipoproteínas; glicolípidos; hidrocarburos; vitamina E y otros tocoferoles; vitamina A, proveniente de los carotenos; vitamina D; ceras, y productos de degradación de ácidos grasos, proteínas y carbohidratos (Mathews and van Holde, 1990).

Los aceites y grasas están distribuidos ampliamente en la naturaleza; se derivan de fuentes vegetales, animales, tanto terrestres como acuáticos. Aceites y grasas de todos los tipos se han usado a lo largo del tiempo como alimentos, combustibles, lubricantes y materia prima para producir compuestos derivados. La gran diversidad de las aplicaciones de estas sustancias se debe a la estructura química y propiedades físicas únicas que poseen; su estructura química es muy compleja debido a la combinación y permutación de ácidos grasos que se pueden esterificar en los tres grupos hidroxilo del glicerol. (Lehninger, et al., 1993)

b. Esteres de ácidos grasos con otros alcoholes diferentes al glicerol

Las ceras son aquellas sustancias que tienen como componentes mayoritarios ésteres de ácidos grasos con alcoholes diferentes al glicerol; además de los ésteres de ácidos grasos con alcoholes diferentes al glicerol, las ceras pueden incluir compuestos tales como alcoholes libres de cadena larga, hidrocarburos, aldehídos alifáticos cetonas, hidroxí-cetonas y β-dicetonas, y triterpenos (Kates, 1986).

Dependiendo de la estructura de las cadenas hidrocarbonadas del ácido graso y del alcohol que los forman, estos ésteres pueden dividirse en simples y complejos. Los ésteres simples son monoésteres de ácidos grasos con alcoholes primarios (tienen el grupo OH en posición terminal), ambos de cadena saturada y no ramificada; tienen la fórmula general indicada a continuación. (Kates, 1986; Wingrove y Caret, 1984)



Los ésteres son complejos cuando el alcohol ó el ácido graso que los componen, o ambos, tienen estructuras con ramificaciones, dobles enlaces u otros grupos funcionales, como el hidroxilo (Kates, 1986).

Como se puede ver en la estructura general de los componentes mayoritarios de las ceras, el grupo éster de éstos es sólo ligeramente hidrofílico, al estar unido a dos largas cadenas hidrocarbonadas. Como consecuencia, las ceras, tanto simples como complejas, son completamente insolubles en agua; de hecho, son tan hidrofóbicas que frecuentemente sirven como repelentes del agua, como en las plumas de algunos pájaros y en la superficie de las hojas y frutos de algunas plantas. También se las encuentra como cubierta protectora sobre el pelo de algunos animales, sobre la cutícula de muchos insectos, en algas, hongos y bacterias. (Lehninger et al., 1993; Mathews and van Holde, 1990)

2. Caracterización

Como se ha indicado anteriormente, los aceites y grasas están constituidos principalmente por triacilgliceroles, y las ceras, por ésteres de ácidos grasos con alcoholes diferentes al glicerol. En esta sección de caracterización se hará referencia principalmente a aceites y grasas dada la naturaleza del material de interés de este trabajo de investigación. Selle (1993) analizó una muestra del material lipídico del insecto nij proveniente de Rabinal, Guatemala y determinó que los componentes mayoritarios de esta muestra son los triacilgliceroles (se tratará ésto con más detalle en la sección de propiedades físicas y químicas de la grasa del insecto nij). Según ésto, el material lipídico del nij se clasifica como una grasa y no como una cera, a pesar de que en la literatura se refieren a él como cera (Roque, 1986; Dirección General de Agricultura de Guatemala, 1940).

Hasta la década de 1970, los parámetros que se consideraban suficientes para caracterizar y confirmar la identidad de la mayoría de los aceites y grasas eran: densidad o gravedad específica, intervalo de fusión, solubilidad, índice de refracción, índice de acidez, índice de saponificación, índice de yodo y porcentaje de materia insaponificable. Egan et al. (1987) mencionan que a partir de la década antes mencionada, las determinaciones de los perfiles de ácidos grasos por cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y la determinación de acilgliceroles por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus

siglas en inglés) han complementado a los métodos tradicionales. Además de los métodos ya mencionados, también se determinan las características espectrométricas del material bajo estudio.

Las características espectrométricas incluyen: la absorción de radiación de diferentes regiones del espectro electromagnético: ultravioleta, visible e infrarrojo, y la resonancia magnética nuclear con radiofrecuencia. La determinación del espectro en cada una de las regiones indicadas da información característica y complementaria sobre los grupos funcionales y la estructura de las especies que constituyen el material bajo estudio. Estos espectros son característicos de cada material; son como su huella digital, y por ello constituyen elementos importantes para su caracterización. (Silverstein, et al., 1981)

a. Propiedades físicas y químicas

A continuación se describe con detalle las propiedades físicas y químicas que se determinan comúnmente para la identificación de los aceites y las grasas. Los valores para varias de las propiedades físicas y químicas varían considerablemente para diferentes muestras del mismo tipo de aceite o grasa. Estos valores no se pueden establecer con la precisión con la que es posible para sustancias químicamente puras, ya que los aceites y grasas naturales son mezclas, que tienen como componentes mayoritarios, diferentes triacilglicerolos. Sin embargo, se han definido ciertos intervalos arbitrarios en los que están incluidos estos valores. El Cuadro 2 presenta los intervalos de estas propiedades físicas y químicas para algunos aceites y grasas. El intervalo de fusión es la única propiedad de este Cuadro que se determina como intervalo para una réplica dada, como se verá más adelante al hablar sobre esta propiedad; las demás propiedades se determinan como valores puntuales individuales para cada réplica. (Deuel, 1951)

En el caso de los aceites y grasas vegetales, las variaciones en los valores obtenidos para sus propiedades se deben a factores tales como que una misma especie de planta crezca bajo condiciones ambientales diferentes, así como qué especies relacionadas crecen bajo las mismas condiciones. Por otro lado, las variaciones en los valores obtenidos para grasas animales se deben principalmente al tipo de dieta que consume el animal. (Deuel, 1951)

i. Gravedad específica

La densidad de una sustancia se define como la masa que corresponde a una unidad de volumen, mientras que su gravedad específica se define como la razón de su densidad a la densidad de otra sustancia de referencia, generalmente agua, ambas a la misma o diferentes temperaturas, las cuales deben ser especificadas. Cuando se desea comparar la gravedad específica de dos o más sustancias es necesario que los valores de éstas estén expresados para las mismas condiciones de temperatura; si los valores de densidad o gravedad específica no están expresados para las mismas condiciones, es necesario convertirlos para las condiciones deseadas, mediante las relaciones apropiadas. En el Cuadro 2 se muestran los valores de gravedad específica de algunos aceites y grasas.

Cuadro 2

Tipos y propiedades físicas y químicas de algunos aceites y grasas

(Bennett, 1963; Deuel, 1951; Egan et al. 1987; Gunstone, 1987; Kirk and Othmer, 1984; Lide, 1990-1991; Lottmann, 1981; Mazuelos, 1986)

TIPOS	ACEITE, GRASA	Intervalo de fusión o de solidificación, °C ²	Gravedad específica a temp. dada	Gravedad específica a 25°C/25°C ³	Índice de Acidez, mg KOH / g ⁴	Índice de Saponificación, mg KOH / g	Índice de Yodo (Wijs), g yodo/100 g
Aceite vegetal secante	Aceite de semilla de linaza	- 24.0	0.938 15°C/15°C	0.934	-----	188-196	168-204
Aceites vegetales semi secantes	Aceite de semilla de hule	3-7	0.923-0.933 25°C/25°C	0.923-0.933	25.2-29.9	190-194	137-140
	Aceite de semilla de soya	- 16.0	0.919-0.925 20°C/20°C	0.917-0.923	0.6	189-195	117-140
Aceite vegetal no secante	Aceite de fruto de olivo	- 6.0	0.910-0.916 20°C/20°C	0.908-0.914	17	186-196	76-90
Grasas vegetales	Aceite de fruto de palma africana ¹	27-43	0.8927 50°C/50°C	0.9008	-----	195-205	35-61
Grasas animales	Manteca de semilla de cacao	31-35	0.950-0.975 15.5°C/15.5°C	0.946-0.971	0.5-1.75	188-198	33-42
	Lardo de cerdo	35-45	0.896-0.904 40°C/20°C	0.907-0.951	1.3	190-202	53-77
	Mantequilla	28-35	0.910-0.913 37.8°C/37.8°C	0.913-0.916	-----	218-235	25-38

¹ Se le conoce como aceite, aunque es sólido a 25°C.² En el caso de darse valores en vez de intervalos, éstos corresponden al límite superior del intervalo.³ Estos valores de gravedad específica se calcularon a partir de los de la columna anterior usando la fórmula $\text{gr. esp. } t_1/t_2 = \text{gr. esp. } t_3/t_4 - 0.00065 (t_1 - t_2) / (\text{dens. H}_2\text{O}_{t_4} / \text{dens. H}_2\text{O}_{t_2})$ (Dutton, 1959).⁴ ----- Significa que los valores no están disponibles en la literatura consultada.

ii. Intervalo de fusión

La fusión de una grasa y la solidificación de un aceite son comportamientos de gran importancia para determinar sus posibles usos. Ya que los aceites y las grasas son principalmente mezclas de triacilgliceroles y que cada acilglicerol tiene diferente punto de fusión, estos materiales no tienen un punto de fusión discreto, sino un intervalo de fusión. A temperaturas inferiores a este intervalo, todos los componentes están por debajo de su punto de fusión y el material es completamente sólido. A temperaturas que correspondan a la parte inferior del intervalo, los componentes de menor punto de fusión, que son aquellos de menor peso molecular o los más insaturados, están líquidos, mientras que los componentes de mayor punto de fusión permanecen sólidos. A medida que se eleva la temperatura, la proporción de líquido a sólido se incrementa y el material va aumentando su plasticidad hasta que ya no queda materia sólida (Coulter, 1990). En el límite superior del intervalo de fusión, todos los componentes del aceite o grasa se habrán fundido y el material llegará a ser completamente líquido y traslúcido (AOCS, 1989).

Si se quiere hablar del punto de fusión de la grasa o de solidificación del aceite, debe entonces definirse este punto de fusión para las condiciones específicas del método por medio del cual se determina; en algunos métodos este punto se define como aquel en el cual el material llega a ser completamente líquido y traslúcido (AOCS, 1989), es decir, el límite superior del intervalo de fusión. El Cuadro 2 muestra intervalos de fusión o solidificación para varios aceites y grasas; en su defecto, presenta el límite máximo de dicho intervalo.

iii. Solubilidad

Como se mencionó al inicio de esta sección de antecedentes, la definición de lípido involucra su solubilidad; son sustancias que son insolubles en agua, son solubles en solventes orgánicos tales como éter dietílico, hexano cloroformo, benceno y metanol (Christie, 1982; Kates, 1986). A temperaturas superiores a su punto de fusión o de solidificación, los aceites y las grasas son completamente solubles en la mayoría de solventes orgánicos; a temperaturas inferiores a su punto de fusión o solidificación, los aceites y las grasas son sólo parcialmente solubles en estos mismos solventes apolares (Swern, 1964).

iv. Índice de acidez

El índice de acidez de un aceite o una grasa dada se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar un gramo de dicho material (Whart, 1956). La determinación del índice de acidez involucra una titulación basada en la reacción ácido-base entre los ácidos grasos libres y el hidróxido, según se indica a continuación (Wingrove y Caret, 1984).



El índice de acidez es una medida del grado en que se han degradado los acilglicérols de un aceite o grasa por acción de una lipasa (enzima que rompe lípidos) sobre el enlace éster de estos acilglicérols, o por alguna otra causa que da lugar a la liberación de ácidos grasos; esta degradación es acelerada por el calor y la luz como se explica más adelante, en la sección de reacciones de degradación. En el caso de producirse ácidos grasos libres de cadena corta, se habla de degradación tipo rancidez, caracterizada por un olor desagradable particular. (Egan et al., 1987)

El Cuadro 2 incluye valores de índice de acidez para varios aceites y grasas.

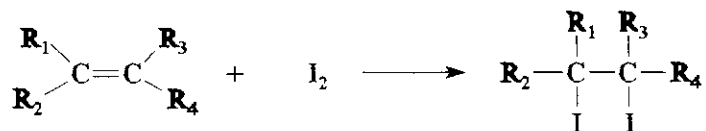
v. Índice de saponificación

El índice de saponificación de un aceite o una grasa dada se define como los miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar un gramo de este material (AOCS, 1989). (Ver reacción en sección IIA.1.a.).

vi. Índice de yodo

El índice de yodo de un aceite o una grasa dada se define como los gramos de yodo que reaccionan con cien gramos de este material. La reacción involucrada consiste en que los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados, libres o esterificados presentes en aceites y grasas, se convierten en enlaces simples al sufrir adición del halógeno; por consiguiente, el índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en el material. (Egan et al., 1987)

A continuación se presenta la reacción general correspondiente donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 representan hidrógeno o cadenas hidrocarbonadas, iguales o diferentes (Wingrove y Caret, 1984).



El índice de yodo es un parámetro adecuado para distinguir muchos aceites y grasas entre sí, ya que es un valor bien definido. El índice de yodo es constante para un aceite o grasa específicos, pero el valor exacto obtenido depende del método particular que se emplee.

como se explica en la sección de metodología (Egan et al., 1987). El Cuadro 2 incluye valores de índice de yodo para varios aceites y grasas determinados por el método de Wijs. Con frecuencia, el índice de yodo es el valor más útil para verificar la identidad de un aceite o grasa o, al menos, para verificar su pertenencia a un grupo en particular. Los aceites vegetales se clasifican en tres grupos, secantes, semi-secantes y no secantes, según su capacidad para formar una película "seca" al exponerlos al aire. Esta capacidad "secante" está relacionada con el índice de yodo del material, según se explicará más adelante, en la sección IIA4, reacciones de degradación. (Egan et al., 1987)

El Cuadro 3 muestra los tipos de aceites según sus valores de índice de yodo correspondientes, así como los valores de este parámetro para grasas.

A aceites como el de linaza se les llama aceites secantes por la función que desempeñan como constituyentes de pinturas y barnices; estos son mezclas de triacilglicérols, que incluyen ácidos grasos insaturados en alta proporción. Los enlaces C=C de los ácidos grasos insaturados desempeñan un papel decisivo en la formación de una película "seca". Como se indica más adelante en la sección de reacciones de degradación de aceites y grasas, el proceso de formación de esta película involucra la desaparición de los dobles enlaces de los acilglicérols; como el índice de yodo es una medida del grado de insaturación de estos materiales, el índice de yodo disminuirá a lo largo del tiempo, como resultado de esas reacciones de degradación. (Perkins, 1960)

Cuadro 3

Índice de yodo para diferentes tipos de aceites, y para grasas
(Egan et al., 1987; Kirk and Othmer, 1984)

Grupo	Índice de yodo, g de yodo/100 g de material
Aceites vegetales secantes	>140
Aceites vegetales semisecantes	125-140
Aceites vegetales no secantes	<125
Grasas animales y vegetales	30-70

También se debe hacer notar que entre las grasas, las menos insaturadas tienen índices de yodo bajos y son sólidas a 25°C e, inversamente, los materiales más insaturados, son líquidos a la misma temperatura; por lo tanto, el índice de yodo o grado de insaturación aumenta al disminuir el punto de fusión. (Egan et al., 1987).

b. Características espectrométricas

i. Absorción ultravioleta y visible

Los espectros que presentan los diferentes materiales en la región ultravioleta-visible (UV-VIS) son el resultado de su absorción de radiación ultravioleta o visible como consecuencia de la excitación de los electrones del nivel de valencia de los compuestos presentes. Debido a esto, la longitud de onda de los picos de absorción se puede correlacionar con los tipos de enlace existentes en la especie que se estudia. Para que la sustancia absorba en esta región del espectro debe tener electrones involucrados en enlaces múltiples o electrones del nivel de valencia no enlazados, situados como pares de electrones libres en átomos como oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno. (Silverstein et al., 1981; Skoog y Leary, 1994; Willard et al., 1991)

La región UV más comúnmente estudiada es la llamada UV cercana, que comprende longitudes de onda entre 185 y 330 nm, aproximadamente; la región VIS comprende de 330 a 900 nm, aproximadamente. En estas dos regiones, la absorción de radiación se restringue a un número limitado de grupos funcionales (llamados *cromóforos*) que contienen electrones de valencia con energías de excitación relativamente bajas. Entre estos grupos funcionales, los más importantes son los que contienen enlaces π tales como $C=C$, $C\equiv C$, $C=O$, aromáticos, etc. Los grupos dobles enlaces conjugados absorben fuertemente en esta región. Se dice que un grupo de doble enlace, $CH=CH$, está conjugado cuando está vecino al siguiente grupo de doble enlace sin ningún grupo metileno, CH_2 entre ellos, así $CH=CH-CH=CH$ (Wingrove y Caret, 1984). (Silverstein et al., 1981; Skoog y Leary, 1994; Willard et al., 1991)

En los aceites y grasas los grupos funcionales que absorben en UV-VIS son: el grupo éster de los acilgliceroles y de los ésteres de ácidos grasos con alcoholes diferentes al glicerol, y el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres; ambos absorben entre 200–210 nm con una absorptividad molar (ϵ) de 50–70 $M^{-1} cm^{-1}$. Los dobles enlaces de las cadenas de ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados (son no conjugados) absorben alrededor de los 184 nm con una ϵ de aproximadamente 10,000 $M^{-1} cm^{-1}$. Un tipo de pigmentos comúnmente presente en los aceites y grasas, los carotenoides, contienen dobles enlaces conjugados por lo que absorbe fuertemente en la región visible entre 400 y 500 nm, aproximadamente, con ϵ mayores de 35,000 $M^{-1} cm^{-1}$ (DMS, 1966). Las benzo-, nafto- y antraquinonas, pigmento presente en los insectos de la superfamilia Coccoidea (a la que pertenece el insecto nij objeto de estudio de este trabajo, descrito más adelante) absorben en la región entre 250 y 350 nm, aproximadamente, con ϵ mayores de 25,000 $M^{-1} cm^{-1}$ (DMS, 1966). (Silverstein et al., 1981; Skoog y Leary, 1994; Willard et al., 1991)

En el Apéndice C se incluyen espectros UV-VIS, obtenidos de la literatura, para el β -caroteno y algunos pigmentos del tipo de las quinonas mencionadas. No se encontraron en la literatura disponible espectros UV-VIS de acilgliceroles, aceites y grasas.

ii. Absorción infrarroja

El espectro infrarrojo (IR) para algunos materiales es una característica que permite su rápida identificación. El espectro IR es inherentemente más útil en la identificación de algunos materiales que medir otras propiedades físicas tales como punto de fusión o punto de ebullición, las cuales sólo son debidas a una propiedad del material bajo consideración. El espectro IR es una serie extensa de medidas de la absorción del material dentro de un amplio intervalo de números de onda de IR. Ya que la medida de cada número de onda representa una característica individual del material y está relacionada directamente con su estructura molecular, el espectro IR completo es una propiedad altamente específica de la sustancia. Generalmente, el espectro IR, da mucha más información acerca del material ya que no sólo se puede identificar el(los) componente(s) principal(es) del material sino que, a menudo, el material se puede diferenciar de otros similares, pero de fuentes diferentes. (Swinehart, 1968)

La región más comúnmente estudiada es la llamada IR, medio que comprende números de onda en el intervalo entre 4000 y 400 cm^{-1} ; en esta región se obtiene el espectro de absorción o transmisión de radiación infrarroja por parte de una sustancia. Los espectros infrarrojos dan información sobre las vibraciones de los enlaces y con ello, sobre la presencia o ausencia de los diferentes grupos funcionales en las moléculas, ya que estos grupos funcionales tienen bandas características. (Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981)

La identificación de los aceites y grasas, a partir de su espectro IR, se puede hacer, básicamente, por dos métodos: el primero es el llamado de huella digital, el cual involucra la comparación del espectro conocido entre 4000 y 400 cm^{-1} con una biblioteca de espectros IR de referencia; el segundo método, usado cuando no se encuentra en una biblioteca un espectro suficientemente similar, involucra la correlación de las bandas de absorción con los posibles grupos funcionales. Cuando se usa el segundo método como método principal de identificación, el paso final de confirmación es, generalmente, una comparación del espectro del aceite o grasa de interés con el espectro obtenido para un material propuesto o similar al propuesto. (Swinehart, 1968)

En el espectro IR de aceites y grasas es posible asignar bandas a los grupos funcionales correspondientes a los principales componentes: banda relacionada con el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres, alrededor de 3300–2500 cm^{-1} ; bandas relacionadas con el grupo éster de los acilglicerolos, en 1750–1735 cm^{-1} y 1210–1163 cm^{-1} , aproximadamente; bandas relacionadas con los grupos CH_2 y CH_3 de las cadenas hidrocarbonadas de los acilglicerolos y los ácidos grasos libres, alrededor de 3000–2840 cm^{-1} ; y bandas relacionadas con los dobles enlaces, $\text{C}=\text{C}$, de las cadenas insaturadas, alrededor de 3000 cm^{-1} y 1667–1640 cm^{-1} . (Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981)

En el Apéndice C se incluyen espectros obtenidos de la literatura para: varios ácidos grasos, de sus ésteres metílicos o etílicos y del aceite de la semilla de hule *Hevea brasiliensis*.

En la literatura disponible no se encontraron espectros IR de otros aceites y grasas.

Como se tratará en detalle más adelante, la degradación de los aceites y grasas involucra principalmente reacciones de autooxidación; el espectro IR de estos materiales proporciona un medio simple y rápido para seguir los complejos cambios que tienen lugar a medida que éstos se autooxidan. Se puede seguir el comportamiento a través del tiempo de la absorción IR relacionada con dos grupos funcionales, el grupo de doble enlace C=C y el grupo hidroperóxido, -OOH, involucrados en el proceso de autooxidación; estos grupos tienen bandas de absorción, alrededor de 3050 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} , respectivamente (van de Voort et. al., 1994).

iii. Resonancia magnética nuclear de protones

El espectro de resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR, por sus siglas en inglés) de un compuesto es el resultado de la orientación, en el campo magnético, de los protones presentes en éste al absorber energía de la región de radiofrecuencia. Estos espectros pueden interpretarse en términos de presencia o ausencia de los diferentes grupos funcionales protonados posibles y en términos de las relaciones estructurales y geométricas entre los grupos presentes. (Ault and Dudek, 1976)

Los espectros ^1H NMR de compuestos puros suelen ser muy bien definidos. En el caso de mezclas, el espectro obtenido es, en realidad, la suma del espectro de cada uno de los componentes, lo que le resta definición al espectro resultante de la mezcla. Como ya se ha dicho, los aceites y grasas son mezclas complejas de triacilglicerol como componentes mayoritarios y, monoacilglicerol, diacilglicerol, ácidos grasos libres y glicerol, como componentes minoritarios, provenientes de la degradación de los triacilglicerol.

En el espectro ^1H NMR de un aceite o grasa se pueden observar principalmente las bandas provenientes de los protones de: las cadenas alifáticas de los ácidos grasos, esterificados y libres, saturados e insaturados, los protones del esqueleto del glicerol en los acilglicerol y del protón del grupo C(=O)OH proveniente de los ácidos grasos libres. Los protones de los grupos CH_3 absorben entre 0 y 2 ppm; los de los grupos CH_2 , entre 1 y 2 ppm; los de los grupos $\text{HC}=\text{CH}$, entre 4.3 y 7.5 ppm; los grupos CH_2 vecinos a O, entre 3.0 y 4.0 ppm; y el protón del grupo C(=O)OH, entre 10.0 y 13.2 ppm. La posición exacta, en ppm, y la multiplicidad, número de picos, de la banda de absorción correspondiente a cada tipo de protones depende del tipo de grupos funcionales protonados que estén vecinos a él. (Ault and Dudek, 1976; Mathieson, 1965; Silverstein et al., 1981)

En el Apéndice C se incluyen espectros obtenidos de la literatura para varios ácidos grasos y sus ésteres metílicos o etílicos; no se encontraron en la literatura disponible espectros ^1H NMR de triacilglicerol, aceites y grasas.

c. Composición en ácidos grasos y acilglicérol

La determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de un aceite o grasa en cuanto a ácidos grasos permite la rápida determinación del tipo a que pertenece: secante, semi-secante o no secante, dependiendo de la proporción en que estén presentes los ácidos grasos insaturados en relación con los saturados (AOCS, 1989). Además, para la mayoría de aceites y grasas de uso industrial, está disponible en la literatura la composición en ácidos grasos por lo que este parámetro podría ser otra forma de identificar el material y comparar la similitud de éste con otros aceites y grasas. La determinación de la composición, en cuanto a ácidos grasos libres o totales, puede hacerse por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID, por sus siglas en inglés), en la cual se separan las sustancias volátiles de diferente punto de ebullición (Christie, 1994).

Así, los ácidos grasos totales a identificar incluyen los ácidos grasos libres del aceite o la grasa inicial, y los que no están libres que deben ser liberados al hidrolizar los acilglicérols (Egan, et al., 1987). Todos estos ácidos grasos deben ser convertidos en productos volátiles para poder ser analizados por cromatografía de gases (Egan, et al., 1987). Esto se logra mediante una esterificación a ésteres de alcoholes alifáticos de cadena corta; en la mayor parte de los casos se preparan los ésteres metílicos (Egan, et al., 1987). Para detectar estos ésteres se usa un detector de ionización en llama que responde al número de átomos de carbono por unidad de tiempo (Skoog y Leary, 1994; Willard et al., 1991). La necesidad de formar los ésteres para el análisis por cromatografía de gases se ve en el siguiente ejemplo: El ácido 18:2($\Delta^{9,12}$) tiene un punto de ebullición de 230°C a una presión de 16 mmHg, mientras que su éster metílico tiene un punto de ebullición de 212°C a la misma presión (Budavari, 1989).

El Cuadro 4 incluye la composición, en ácidos grasos totales, de algunos aceites y grasas obtenida por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales de cada material.

Por otra parte, el gran poder de resolución de la cromatografía líquida de alta resolución con fase estacionaria de polaridad invertida (RPHPLC, por sus siglas en inglés) ha sido utilizado para la separación de los diferentes acilglicérols presentes en aceites y grasas. Los detectores usados para la determinación de los triacilglicérols así separados incluyen: de índice de refracción diferencial, de absorción de radiación ultravioleta, de absorción de radiación infrarroja y de masas. Uno de los más usados para este propósito es el detector ultravioleta; en éste, la detección generalmente se hace entre 215 y 220 nm, que corresponde a la región donde absorben los enlaces éster de los acilglicérols. (Christie, 1987)

Como ya se dijo, los triacilglicérols son ésteres de ácidos grasos con glicerol; estos ácidos grasos pueden ser iguales o diferentes. Por lo tanto, conocer la composición en ácidos grasos totales, información que ya se tiene para la grasa del nij (Selle, 1993), no es suficiente para saber la composición de la grasa en cuanto a triacilglicérols.

Cuadro 4

Composición, en ácidos grasos totales, de algunos aceites y grasas ¹

(Lide, 1990–1991; Lottmann, 1981)

ACEITE O GRASA	Ácidos grasos totales. %(p/p)						
	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1(Δ^9)	18:2($\Delta^{9,12}$)	18:3($\Delta^{9,12,15}$)
Aceite de semilla de linaza	—	—	6	4	13–37	5–23	26–58
Aceite de semilla de soya	—	—	2.3–10.6	2.4–6.0	23.5–30.8	49.0–51.5	2.0–10.5
Aceite de semilla de hule	—	—	7.5	8.8	24.8	41.1	17.9
Aceite de oliva	—	1.3	7–16	1.4–3.3	64.5–84.5	4–5	—
Aceite de palma africana ²	—	0.6–2.4	35–45	4.0–6.3	38–53	6–12	—
Mameca de semilla de cacao	—	—	24.4	35.4	38.1	2.1	—
Lardo ³	—	0.9–2.1	22.4–31.0	16.5–23.7	38.3–44.4	4.5–8.8	—
Mantequilla	3	10	25	11	28.5	2.5	—

¹ obtenida por cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales de cada material² se le conoce como aceite, aunque es sólido a 25°C³ tipo de manteca de cerdo

Cuando la cromatografía RPHPLC se aplica a triacilgliceroles, el orden de elución es en orden ascendente del número total de átomos de carbono en las cadenas alifáticas de los tres ácidos grasos que lo constituyen; la presencia de un doble enlace en cualquiera de los ácidos grasos del triacilglicerol reduce el tiempo de retención de este triacilglicerol al del triacilglicerol con dos átomos de carbono menos. El tiempo de retención de un triacilglicerol dado se ha definido en términos de su número de carbonos equivalentes (ECN, por sus siglas en inglés) o número de partición. El ECN está dado por: el número real de átomos de carbono en los residuos alifáticos (CN, por sus siglas en inglés) menos el doble del número de dobles (n) enlaces (los átomos de carbono del glicerol no se toman en cuenta para este cálculo), es decir, $ECN = CN - 2n$. (Christie, 1987)

Se les llama grupos críticos a dos o más triacilgliceroles que tienen el mismo valor de ECN. Por ejemplo, los triacilgliceroles que contienen las combinaciones de ácidos grasos 16:0–16:0–16:0, 16:0–16:0–18:1(Δ^9), 16:0–18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9) y 18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9) tienen todos un valor de ECN de 48 y, por ello tienden a eluir muy juntos. En este caso, la posición de los ácidos grasos del triacilglicerol no tiene efecto en el orden de elución. (Christie, 1987)

El gran incremento en la capacidad de resolución de las modernas fases estacionarias de RPHPLC utilizadas para separar triacilgliceroles (casi exclusivamente se han usado las fases de octadecilsilano para este propósito) ha hecho posible la separación de los grupos críticos, por lo que los valores de ECN sólo sirven como una guía de qué estará en una región dada del cromatograma. A raíz de esto, El-Hamdy y Perkins (1981b) han sugerido que los

triacilgliceroles (incluyendo los grupos críticos) se pueden identificar en los cromatogramas a partir del número teórico de carbonos (TCN, por sus siglas en inglés) definido como $TCN = ECN - (U_1 + U_2 + U_3)$. U_i es un factor determinado experimentalmente para los diferentes ácidos grasos que pueden estar formando parte del triacilgliceroles (0 para saturados; 0.60 para 18:1(Δ^9); y 0.7 para 18:2($\Delta^{9,12}$)). Entonces, el TCN para un triacilgliceroles que contiene 16:0–18:1(Δ^9)–18:2($\Delta^{9,12}$) se calcula así:

$$TCN = 46.0 - [0 \text{ (para 16:0)} + 0.6 \text{ (para 18:1(\Delta^9))} + 0.7 \text{ (para 18:2(\Delta^{9,12}))}]$$

$$TCN = 46.0 - 1.3 = 44.7$$

Mientras, para los triacilgliceroles 18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9)–16:0, 18:1(Δ^9)–16:0–16:0 y 16:0–16:0–16:0, los cuales tienen el mismo valor de ECN que el triacilgliceroles recién considerado, los valores de TCN son 46.8, 47.4 y 48.0, respectivamente. Los valores de U_i varían con las condiciones cromatográficas y deben ser determinados independientemente por cada analista para sus propias condiciones. (Christie, 1987)

En la literatura se presentan cromatogramas RPHPLC de varios aceites: soya, oliva, cacahuate (maní), palma africana, maíz (Christie, 1987; AOAC, 1995; El-Hamdy and Perkins, 1981a,b; Herslöf et al., 1979; AOCS, 1989; Plattner et al., 1977; Plattner, 1981). Las condiciones de estos cromatogramas incluyen fases móviles de acetonitrilo–acetona y acetonitrilo–tetrahidrofurano, y detectores de índice de refracción diferencial y de absorción ultravioleta. En el Apéndice D se incluyen cromatogramas RPHPLC, obtenidos en la literatura arriba mencionada, para los aceites de soya y oliva; por otra parte, el Cuadro 5 contiene datos sobre la composición de estos mismos aceites, en cuanto a triacilgliceroles y los valores de ECN correspondientes.

Los resultados de la determinación de ácidos grasos totales obtenidos por GC–FID facilitan la interpretación de los cromatogramas de triacilgliceroles obtenidos por RPHPLC con detección ultravioleta o refractométrica. Dichos resultados ayudan a limitar los posibles triacilgliceroles presentes al descartar aquellos que tienen en su estructura ácidos grasos que no forman parte del material.

3. Función en organismos vivos, propiedades y usos

En los seres vivos, los lípidos están involucrados en el metabolismo energético y en aspectos de estructura y función biológica; los últimos dos tipos de aspectos incluyen estructura de las membranas celulares y funciones como hormonas esteroideas, ciertas vitaminas y otros reguladores biológicos. La mayor parte de los lípidos en la mayoría de los organismos están en forma de triacilgliceroles. Para ser utilizados como fuente de energía, ya sea en procesos metabólicos o en la producción de calor, los triacilgliceroles son primero hidrolizados, por enzimas especializadas (lipasas), a ácidos grasos y luego oxidados a compuestos de alta energía. (Mathews and van Holde, 1990)

Cuadro 5

Triacilgliceroles presentes en aceite de soya y aceite de oliva,
y su respectivo número de carbonos equivalentes¹
(El-Hamdy and Perkins, 1981b)

Aceite	Triacilglicerol	Símbolo ²	ECN ³
Soya	18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:3($\Delta^{9,12,15}$) – 18:3($\Delta^{9,12,15}$)	LLnL.n	38
	18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:3($\Delta^{9,12,15}$)	L.L.L.n	40
	18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	LLL	42
	16:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	PL.L	44
	18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	O.L.L	44
	18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	OOL	44
	16:0 – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	POL	46
	16:0 – 16:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$)	PPL	46
	16:0 – 18:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$)	PSL	48
	18:0 – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	SOL	48
	18:0 – 18:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$)	SSL	50
Oliva	18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	OLL	44
	18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	OOL	46
	16:0 – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	POL	46
	16:0 – 16:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$)	PPL	46
	18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9)	OOO	48
	16:0 – 18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9)	POO	48
	16:0 – 16:0 – 18:1(Δ^9)	PPO	48
	18:0 – 18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9)	SOO	50
	16:0 – 18:0 – 18:1(Δ^9)	PSO	50
	18:0 – 18:0 – 18:1(Δ^9)	SSO	52

¹ Información obtenida a partir de cromatografía RPHPLC, con detección por refractometría diferencial

² P = palmítico, S = esteárico, O = oleico, L = linoleico, Ln = linolénico

³ ECN = CN – 2n: donde: ECN = número de carbonos equivalentes,

CN = número real de átomos de carbono en los residuos alifáticos,

n = número de dobles enlaces por molécula

Las semillas vegetales almacenan, generalmente dentro del embrión y algunas veces en el endosperma, cantidades considerables de triacilgliceroles como fuente de energía para el desarrollo embrionario de la planta. Ya que los lípidos vegetales contienen principalmente ácidos grasos insaturados (ver Cuadro 4), los triacilgliceroles de las semillas están principalmente en forma de aceites. (Mathews and van Holde, 1990)

Las plantas también poseen ceras, además de aceites. Estas ceras se encuentran principalmente como recubrimiento de hojas y tallos y, de ciertas bayas y hierbas; algunas, menos comunes, cubren flores, raíces y frutos. Entre las ceras vegetales más conocidas están: la de carnauba, que es exudada por las hojas del árbol *Copernicia cerifera*; y la de candelilla, que se encuentra en forma de escamas en la superficie de la planta *Euphorbia cerifera*. (Bennett, 1963)

El peso corporal de un mamífero puede estar constituido entre 5 y 25% o más por lípidos, con 90% de éstos en forma de triacilgliceroles. La mayor parte de esta grasa, la cual está almacenada en el tejido adiposo, constituye la reserva primaria de energía; en células especializadas llamadas adipocitos, contienen glóbulos gigantes de grasa que ocupan la mayor parte del espacio intracelular. Además de constituir reservas energéticas, los triacilgliceroles tienen otras funciones en animales: actúan como amortiguadores que protegen los órganos contra golpes, y como efectivos aislantes térmicos, especialmente en mamíferos marinos que deben mantener su temperatura corporal muy por encima de la del agua del océano en el cual viven. (Mathews and van Holde, 1990)

Los lípidos de los insectos funcionan como componentes esenciales e integrales de las membranas celulares y como fuentes importantes de energía metabólica para el mantenimiento celular, el vuelo, la reproducción, la embriogénesis y la metamorfosis. Estos lípidos también desempeñan un papel importante como feromonas, hormonas, protectores cuticulares y como secreciones de escama para la elaboración de albergüe (abejas e insectos escama a los que pertenece el nij). (Jackson and Arnold, 1977)

La función principal de los lípidos cuticulares es ser una barrera impermeable al agua y al ataque de algunos microorganismos; también protegen a los insectos contra la abrasión mecánica, y previenen la penetración de insecticidas. En general, estos lípidos pueden incluir: hidrocarburos, ácidos grasos libres saturados e insaturados, hidrocarburos metilramificados, esteroides, ésteres de esteroides, triacilgliceroles, cetonas, alcoholes y aldehídos. El intervalo de número de átomos de carbono en los ácidos grasos va desde los usuales C16 y C18 saturados e insaturados hasta más largos de entre C24 y C34. Estos últimos están generalmente presentes en cantidades sustanciales en insectos escama, en abejas y en ciertos otros grupos de insectos. Además, los lípidos cuticulares también pueden contener trazas de otros lípidos tales como pigmentos y lípidos polares (principalmente fosfolípidos como cefalinas y lecitinas). (Jackson and Arnold, 1977; Stanley-Samuelson et al., 1988)

Entre las ceras cuticulares están: la conocida como de la China que se obtiene del insecto cóccido *Coccus ceriferus* y la cera Shellac que se extrae del insecto cóccido *Carteria lacca* (Whart, 1956).

La mayoría de los lípidos no cuticulares de los insectos están en forma de acilglicérols; principalmente como triacilglicérols, en la grasa corporal, y como diacilglicérols en la hemolinfa. Los ácidos grasos que forman parte de los acilglicérols son generalmente de cadena larga, tanto saturados como insaturados. Entre los ácidos grasos no cuticulares de la mayoría de los insectos, predominan los ácidos grasos 16:0 y 18:1(Δ^9); además, en menor proporción, el ácido 18:0 y el ácido 18:2($\Delta^{9,12}$). (Chapman, 1982; Stanley-Samuelson et al., 1988)

El Cuadro 6 incluye el origen y los principales usos de algunos aceites, grasas y ceras, escogidos como representativos de los diferentes tipos en que están clasificados: aceites vegetales, ya sea secantes, semisecantes o no secantes; grasas vegetales; grasas animales; y ceras animales y vegetales.

Los aceites, grasas y ceras utilizadas en la artesanía y en la industria están caracterizadas por parámetros tradicionales que incluyen: intervalo de fusión, gravedad específica, índice de acidez, índice de saponificación e índice de yodo; para algunos de ellos también se encuentra en la literatura información acerca de la composición en ácidos grasos y en triacilglicérols. Los Cuadros 2, 3, 4 y 5, ya antes comentados, presentan información de interés para algunos de los mismos aceites, grasas y ceras incluidas en el Cuadro 6.

4. Reacciones de degradación

Como otros materiales orgánicos, los aceites y grasas experimentan reacciones de degradación. La principal forma de degradación, en el caso de los aceites y grasas, es la llamada rancidez. Generalmente, la rancidez va acompañada de un olor desagradable particular que se debe a la liberación de moléculas volátiles, principalmente ácidos, aldehídos y cetonas de bajo peso molecular. (Deuel, 1951)

En el caso de los aceites predominantemente insaturados, la rancidez se lleva a cabo por oxidación atmosférica y está acompañada por polimerización (Bailey, 1945, no ha sido posible conseguir una edición más reciente de esta referencia o una que la sustituya).

Como se mencionó anteriormente, los aceites pueden agruparse, a partir de su capacidad para formar películas secas en: no secantes, semisecantes y secantes. Los aceites predominantemente insaturados, los que pertenecen a los tipos semisecante y secante, y experimentan reacciones de degradación como la formación de películas secas, con más facilidad que los aceites predominantemente saturados que pertenecen al tipo de los no secantes. Esta diferencia en comportamiento es debida a la predominancia o no de dobles enlaces en las cadenas de sus ácidos grasos, esterificados o no; algo similar se puede decir que ocurre para las grasas predominantemente saturadas e insaturadas.

Cuadro 6
 Origen y usos de algunos aceites, grasas y ceras
 (Bennett, 1963; Egan et al., 1987; Gunstone, 1987; Lottmann, 1981; Kirk and Othmer, 1984; Whartha, 1956)

ACEITE, GRASA O CERA	ORIGEN	USOS
Aceite de semilla de linaza	Se obtiene del lino. <i>Linum usitatissimum</i> L., por prensado hidráulico de las semillas.	Producción de pinturas, barnices, esmaltes, lacas, tintas para imprentas; impermeabilización de telas (principalmente lona, seda, lino).
Aceite de semilla de hule	Proviene del árbol <i>Hevea brasiliensis</i> Muell.; el proceso de obtención involucra secado y limpieza del fruto y; decorticado y extracción de la semilla con un solvente (el n-hexano parece ser el que da mejores rendimientos).	Se sugiere: en la industria de alimentos, en la industria de pinturas y como combustible.
Aceite de semilla de soya	Se obtiene de la semilla de la soya, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.; el proceso de obtención involucra secado, limpieza y decorticado de la semilla, y extracción del aceite con n-hexano.	Para freír alimentos, para ensaladas, en pastelería y para producir margarina (después de hidrogenarlo parcialmente); para la fabricación de jabones y como componente secante en pinturas y barnices (después de refinamiento).
Aceite de fruto de olivo	Se obtiene de <i>Olea europaea</i> L.; el proceso de obtención involucra secado, limpieza del fruto y; prensado de la pulpa de éste.	Para ensaladas.
Aceite del fruto de palma africana	Proviene de la palma <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.; el proceso de obtención involucra secado, limpieza del fruto y; prensado de la pulpa de éste.	Para producir margarina (después de hidrogenarlo parcialmente) y como ingrediente de helados.
Mantequilla de semilla de cacao	Se obtiene del árbol tropical <i>Theobroma cacao</i> L.; por el prensado de los cotiledones de la semilla, previamente fermentada y secada.	Como ingrediente en la fabricación de chocolate.

- continúa -

cont. Cuadro 6
 Origen y usos de algunos aceites, grasas y ceras

ACEITE, GRASA O CERA	ORIGEN	USOS
Lardo de cerdo	Se obtiene de los tejidos adiposos firmes, limpios y frescos del cerdo en el momento de sacrificarlo.	Para cocinar alimentos.
Mantequilla de leche de vaca	Es el producto obtenido del batido de la grasa de la leche de vaca, generalmente separada en forma de crema.	Para cocinar, para pastelería y como aderezo.
Cera de hoja de carnauba	Es una exudación del árbol <i>Copernicia pruriifera</i> (Mill.) H.E. Moore. Las hojas cubiertas por la cera se cortan, se dejan secar al sol y se golpean para removerla.	En forma de emulsión se utiliza para recubrir y dar un acabado brillante a pisos, superficies metálicas, papel carbón y materiales aislantes. Actualmente, aún es un ingrediente importante de los productos para encerar automóviles.
Cera de la China	Es un producto obtenido del material ceroso en el que se encierra el insecto coccido <i>Ceroplastes ceriferus</i> Anderson. La cera se raspa del insecto.	Para elaboración de candelas, para recubrir y dar un acabado brillante a muebles, papel y tela.

se le conoce como aceite aunque es sólido a 25°C

Las reacciones de degradación de los aceites y las grasas se pueden dividir en tres tipos, dependiendo de la temperatura a la cual se llevan a cabo, y a la presencia o no de oxígeno: autooxidación que ocurre entre 25 y 100°C, en presencia de oxígeno; oxidación térmica, que ocurre alrededor de los 200°C, en presencia de oxígeno; y polimerización térmica que ocurre entre 200 y 300°C, en ausencia de oxígeno (Perkin, 1960). Entre 25 y 100°C, la degradación de los aceites y las grasas, ocurre muy lentamente en ausencia de oxígeno (Bailey, 1945). Debido a que el proceso de degradación de la grasa del nij en su uso artesanal, objeto de estudio de este trabajo de investigación, se lleva a cabo a condiciones ambientales, en esta sección sólo se tratará el proceso degradativo por autooxidación y se profundizará en la ruta correspondiente a la polimerización.

a. Autooxidación

En general, la autooxidación se puede definir como la reacción de cualquier material con oxígeno molecular; en esta reacción, los primeros compuestos formados catalizan la reacción. El deterioro oxidativo de los aceites y grasas, sobre todo el de los constituidos por triacilgliceroles insaturados, involucra principalmente, reacciones autooxidativas, las cuales van acompañadas por varias reacciones secundarias que tienen o no carácter oxidativo. Bajo las condiciones normalmente presentes durante el deterioro oxidativo de los aceites y grasas, 25°C y presencia de oxígeno, los productos iniciales de las autooxidación son los hidroperóxidos de los ácidos grasos correspondientes. (Lillard, 1983; Lundberg, 1962)

Los hidroperóxidos en cuestión son compuestos que tienen el grupo funcional, C–O–O–H vecino a los carbonos con dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos, como se verá más adelante. Estos compuestos, los productos iniciales de la reacción en cadena, son muy inestables y se degradan por mecanismo de radicales libres y producen muchos tipos de productos secundarios. Una de las rutas por la que se pueden degradar los hidroperóxidos es la polimerización. (Lea, 1962; Lillard, 1983; Lundberg, 1962; Keeney, 1962)

En general, los mecanismos de reacción en cadena constan de tres etapas: iniciación, en la que se forman moléculas inestables y altamente reactivas; propagación, en la que reaccionan las moléculas formadas en la etapa de iniciación, entre sí o con el reactivo original; y terminación, en la que se consumen las moléculas reactivas para formar los productos finales de la reacción que son más estables (Wingrove y Caret, 1984). En la Figura 3 se muestra, como ejemplo, la reacción en cadena de la autooxidación por radicales libres del ácido linoleico, 18:2($\Delta^{9,12}$) por la ruta de la polimerización; todas estas reacciones también son aplicables a otros ácidos grasos insaturados libres y esterificados en acilgliceroles (Perkins, 1960). Como puede verse en esta Figura, la autooxidación involucra la desaparición gradual de algunos de los dobles enlaces de las cadenas dándose la polimerización a través de enlaces peróxido, –C –O –O –C –, en esas posiciones. La ruta de la polimerización será tratada en la próxima sección.

Aunque el mecanismo de la reacción en cadena de la autooxidación de ácidos grasos por radicales libres ha sido bien establecido, la reacción inicial de formación de hidroperóxidos no ha sido satisfactoriamente explicada; se ha propuesto un mecanismo fotoquímico en el cual estaría involucrado un estado excitado del oxígeno en vez de éste en su estado basal (Terao and Matsushita, 1977).

La composición del aceite o grasa (naturaleza y proporción de ácidos grasos insaturados presentes) es el principal factor que afecta su proceso de autooxidación; los otros factores incluyen alta temperatura, luz (principalmente UV y azul), radiación ionizante (α , β , γ , X), peróxidos ya presentes (tanto provenientes del aceite o grasa como de otras fuentes) y enzimas lipoxidasas (enzimas oxidantes de lípidos). (Lea, 1962)

De los factores mencionados anteriormente, la luz (UV y azul) parece acelerar marcadamente la descomposición de los hidroperóxidos; el efecto de la luz ultravioleta (UV) es más pronunciado. La autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados más comunes conduce a la producción de sistemas insaturados complejos, los cuales absorben fuertemente luz UV en ciertas longitudes de onda. En tales sistemas, la luz UV acelera marcadamente la descomposición de los peróxidos, pero también puede influenciar el curso del proceso de oxidación. (Lundberg, 1962)

En un intento por entender mejor el mecanismo de autooxidación de grasas y aceites, se ha estudiado la autooxidación del oleato de metilo; a continuación se muestra los hidroperóxidos que ha sido posible identificar. Se ha visto que esta autooxidación induce a una isomerización *cis-trans* del doble enlace con lo que se forman los hidroperóxidos *trans*, que son más estables que los *cis*. El mecanismo de formación del hidroperóxido involucra como primer paso la abstracción del hidrógeno vecino al doble enlace, lo que da un radical intermediario, híbrido de resonancia respecto de la posición del doble enlace. La reacción de este radical intermediario con oxígeno, da como resultado los hidroperóxidos. (Frankel, 1962)

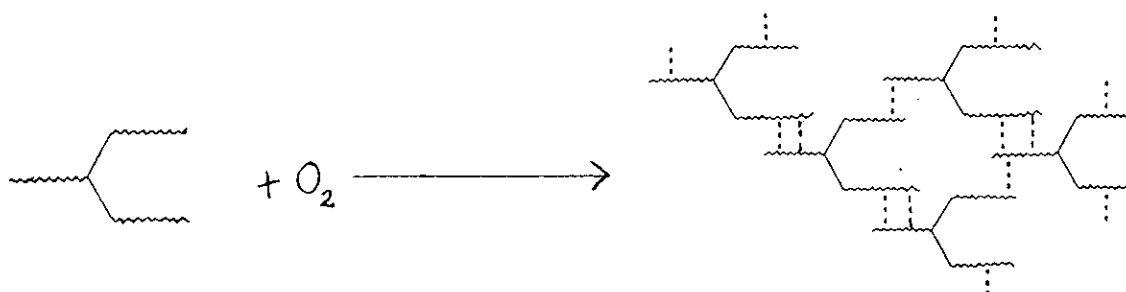
Al formarse los hidroperóxidos, la presencia del enlace persiste y, en algunos de los casos, migra a la posición vecina. A continuación se presentan los diferentes hidroperóxidos que se han podido identificar para el oleato de metilo. (Frankel, 1962)

Industrialmente, a los polímeros sintéticos se les divide en dos grupos principales: plásticos y elastómeros (hules sintéticos). Los polímeros plásticos se dividen en termoplásticos y termoestables (termosets). Los polímeros termoplásticos, a los que pertenecen el polietileno, el poliestireno, el polipropileno y el polivinilcloruro (PVC), pueden fundirse y moldearse al calentarlos. Los polímeros termoestables, como el poliuretano y las resinas fenólicas, no pueden fundirse ni moldearse al calentarlos, su estructura es irreversible una vez formada. Los elastómeros, tales como el policlorofeno (neopreno) y el nitrilo, se caracterizan por elevada elasticidad, la capacidad para recobrar muy rápidamente su forma original. Los polímeros sintéticos tales como las fibras, los adhesivos y los utilizados para recubrimiento de superficies, pueden pertenecer a cualquiera de los tipos recién mencionados en cuanto a su composición y propiedades. Los polímeros que interesan en este trabajo de investigación son los de origen natural formados a partir de lípidos secantes y semisecantes; éstos pertenecen a los polímeros termoestables. (Hall, 1989)

A aceites como el de linaza se les llama aceites secantes por la función que desempeñan como constituyentes de pinturas y barnices; éstos son mezclas de triacilglicérols, que incluyen ácidos grasos insaturados en alta proporción. Cuando una pintura o barniz se aplica a una superficie, la película aplicada experimenta los siguientes cambios sucesivos; primero, el aceite de la película se va volviendo espeso y viscoso y, finalmente, pegajoso; segundo, la película se solidifica, y entonces en un período que va desde horas hasta días, ésta se va volviendo más firme y dura. Este fenómeno se parece, superficialmente, al que ocurre en muchos sistemas acuosos al evaporarse el agua, de ahí el término "secante". En realidad, este término es ambiguo; la pintura no contiene agua, y la parte esencial del secado no involucra evaporación en el sentido estricto del término. (Bailey, 1945)

Los enlaces $C=C$ de los ácidos grasos insaturados, esterificados o no, de los aceites secantes desempeñan un papel decisivo en la formación de la película polimérica; al exponerse al aire, estos aceites con insaturaciones reaccionan con el oxígeno (Hall, 1989). El proceso de formación de esta película polimérica involucra la desaparición de los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas de los acilglicérols (Perkins, 1960). El resultado final es la formación de una red polimérica entrelazada, en la cual hay enlaces primarios $C-O-O-C$, tipo peróxido, en las posiciones donde estaban originalmente las insaturaciones (Hall, 1989). Este tipo de enlace peróxido se muestra en los compuestos formados en la reacción de la Figura 3. La reacción general de oxidación y polimerización se haya esquematizada para triacilglicérols con dobles enlaces en configuración *cis* en la Figura 4. Sobre ésto, que es la de mayor interés para este trabajo, no se ha encontrado mayor información.

Figura 4
Reacción general de oxidación y polimerización de triacilglicerolos con insaturaciones
(Hall, 1989)



Diferentes triacilglicerolos con insaturaciones

Red polimérica de diferentes triacilglicerolos
con --- = enlace tipo peróxido. C-O-O-C

El índice de yodo y el espectro IR de los aceites y grasas proporcionan un medio para seguir los complejos cambios que tiene lugar a medida que estos materiales se autooxidan y polimerizan. Ya que el índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los aceites y las grasas, el valor de este parámetro disminuirá a lo largo del tiempo como resultado de este proceso (Perkins, 1960). Por otro lado, el comportamiento de la absorción IR relacionada con dos grupos funcionales, el grupo hidroperóxido, $-OOH$, y el grupo de doble enlace $HC=CH$, puede ser seguido a lo largo del tiempo pues estos grupos funcionales tienen bandas de absorción características en el intervalo de IR medio en el cual generalmente se corren los espectros (van de Voort et. al., 1994).

B. El insecto nij (*Llaveia axin*) y su grasa

1. Descripción general del insecto

La primera descripción científica del insecto *Llaveia axin* data de 1832, cuando Pablo de la Llave, de cuyo apellido se origina el nombre de este género, describió especímenes de Tlacotalpan, México. En esta villa se usaba la grasa del insecto en pintura y para propósitos medicinales (Jenkins, 1964).

El género *Llaveia* pertenece a la familia Margarodidae, la que a su vez está dentro de la superfamilia Coccoidea del orden Homóptera. La clasificación taxonómica de este insecto es la siguiente: Clase Insecta, Orden Homoptera, Suborden Sternorrhyncha, Superfamilia Coccoidea, Familia Margarodidae, Género *Llaveia*, Especie *Llaveia axin*. En la Universidad del Valle de Guatemala se logró recientemente demostrar que todos los insectos productores de grasa del género *Llaveia* pertenecen a la única especie *Llaveia axin* (Pérez and Williams, 1995; Pérez and Williams, 1996). A la superfamilia Coccoidea se le conoce como la de los

insectos escama porque muchos de sus miembros tienen un recubrimiento exterior ceroso con apariencia de escamas (Borrer et al., 1981).

De acuerdo con estudios hechos en la Universidad del Valle de Guatemala, el insecto *Llaveia axin* es conocido actualmente en: Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala, bajo el nombre de "nij"; en Chiapa de Corzo, Chiapas, México, bajo el nombre de "aje" o "axin"; en Valladolid, Yucatán, México, bajo los nombres de "menché" y "ni-in" (MacVean, 1993b).

El nij, ni-in, aje, axin o menché exhibe el dimorfismo sexual típico de los insectos escama. Los machos son insectos diminutos que viven apenas unos días como adultos y no contienen grasa aprovechable; son frágiles, parecidos a pequeños mosquitos y con un solo par de alas, a diferencia de la mayoría de insectos adultos que poseen dos pares. Las hembras no tienen alas; son criaturas con forma ovalada y masa blanda, que de adultas alcanzan tamaños de hasta 25 mm de largo por 12 mm de ancho. (MacVean, 1993a)

Las hembras adultas del insecto nij son de color naranja-rojizo y están cubiertas por un polvo blanco ceroso que secretan (MacVean, 1992); de este color blanco se ven las ramas de las plantas hospederas infestadas (Jenkins, 1964). La sustancia que se utiliza para elaborar la grasa del nij proviene del interior de las hembras adultas y corresponde al tejido graso del insecto (formado por células que almacenan grasa), que es su reserva energética para la producción de huevos (Chapman, 1982); el polvo ceroso blanco externo del cuerpo de la hembra no se utiliza para la fabricación de esta grasa.

Todos los insectos nij que se han encontrado hasta la fecha, dentro del proyecto de investigación de este insecto y su grasa, que está en marcha en la Universidad del Valle de Guatemala desde 1992, tienen como zona de vida el bosque tropical seco en el mismo tipo de plantas hospederas. Tanto en el valle interior de Rabinal como en la depresión central de Chiapas, México, las principales plantas hospederas son: *Jatropha curcas* ("piñón", familia Euphorbiaceae), *Acacia* spp. ("ixcanal", familia Mimosaceae) y a veces *Spondias* spp. ("jocote", familia Anacardiaceae). (MacVean, 1992)

2. Proceso de obtención de la grasa

Durante septiembre de 1992, principios de octubre de 1993 y 1995 varios grupos de estudiantes e investigadores de la Universidad del Valle de Guatemala trabajaron con una familia indígena de Rabinal, en el procesamiento de la grasa del nij (MacVean, 1992; MacVean, 1993; Selle y Larios, 1995). De este proceso ya se tenía conocimiento por una descripción hecha por el Dr. Webster McBryde, geógrafo del Departamento de Geografía de Ohio State University (1943), a partir de una visita a Rabinal en la cual "descubrió" el proceso de obtención de la grasa del nij.

El proceso artesanal, observado por el grupo de la Universidad del Valle de Guatemala, incluyó los siguientes pasos, que requirieron dos días para ser completados. Se recolectó los insectos hembras adultos en las plantas hospederas de los alrededores y se lavaron para removerles el polvo blanco; se hirvieron en agua y maceraron colándolos a través de una tela, para separar la cutícula y las patas del líquido grasoso y el agua. Después de esto, se dejó quieta la mezcla líquida durante la noche para provocar la separación de la grasa; al día siguiente, la mezcla se batió con la mano por aproximadamente una hora, observándose al final, la repentina formación de pequeños glóbulos amarillos de grasa. Los glóbulos se fueron juntando con la mano a modo de ser fácilmente separados de la fase acuosa y reunidos en una masa. Esta masa fue exprimida y lavada con agua para eliminar lo que queda de la hemolinfa (sangre) y del pigmento exterior del insecto que es hidrosoluble y se torna rojo al cocinar los insectos. Finalmente, las tortas de grasa amarilla obtenidas fueron envueltas en hojas de banano; así envuelta, la grasa se fue secando. (MacVean, 1992; MacVean, 1993). La anterior descripción del proceso de obtención de la grasa del nij corresponde muy bien con lo dicho por McBryde (1943).

El rendimiento de uno de los procesos fue tal que de aproximadamente 17,000 hembras adultas se obtuvieron 2.2 kg de grasa procesada (MacVean, 1992). Estos datos junto con los de peso promedio de las hembras adultas (0.72 ± 0.06 g) (Selle et al., 1993) sugieren que los insectos nij contienen aproximadamente 25% (p/p) de grasa, en base seca, lo que es una proporción alta de su masa corporal (MacVean, 1992).

El proceso descrito parece ser muy similar al empleado en la producción de mantequilla, en el cual la centrifugación inicial de la leche logra la separación de la crema del resto de la leche y el batido posterior de esta crema permite la aglomeración de los glóbulos de grasa suspendidos, obteniéndose la mantequilla (MacVean, 1993b).

A mediados de octubre de 1993 se preparó, en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala, lotes experimentales de grasa de nij con insectos recolectados a principios de ese mismo mes. El propósito era probar técnicas mecánicas simples para macerar, batir y separar los extractos y determinar qué aspectos son los más importantes en el proceso y cómo éste se puede hacer más eficiente en el campo. Primero, los insectos se lavaron y cocinaron en agua hirviendo como se hizo en Rabinal; a continuación, se maceraron y se coló el fluido grasoso con parte del agua de cocción usando un colador mecánico, del tipo usado para moler y colar frijoles. La mezcla de grasa y agua se procesó por dos procedimientos diferentes: a. sólo centrifugándola con equipo de laboratorio, o batiéndola, con una máquina eléctrica del tipo usado para hacer helados, y luego centrifugándola con el mismo equipo de laboratorio. (Selle et al., 1993)

La evaluación de los resultados de ambos procedimientos reveló que el batido es innecesario si está disponible la centrifugación, ya que el rendimiento del primer procedimiento fue muy similar al del segundo, aproximadamente 32%(p/p), en base seca, a partir del peso de los insectos vivos. Al comparar los procesamientos de la grasa del nij en el laboratorio de la Universidad con el del campo, los primeros fueron mucho más rápidos y

aparentemente más eficientes; el del campo requiere dos días para completarlo, mientras que los hechos en el laboratorio tomaron 5–6 horas. (Selle et al., 1993)

Entre octubre y diciembre de 1995 se continuó con las pruebas de laboratorio en la Universidad del Valle de Guatemala usando técnicas mecánicas simples para la extracción de la grasa. Esta vez se probaron los siguientes procesos de separación: centrifugación manual en tubos o en cubeta y centrifugación eléctrica. Independientes o combinados con algunos de los procesos anteriores, se incluyó: reposo a temperatura ambiente o en refrigeración. Las etapas del proceso de obtención de la grasa, previas a la separación de la misma del extracto acuoso, fueron comunes para todas las pruebas y similares a las de 1993: lavado, cocción, maceración y colado de los insectos. (Selle y Larios, 1995)

Por el comportamiento de la grasa observado durante el proceso y por el rendimiento logrado, los resultados más importantes son los obtenidos en los procesos con reposo sin y con refrigeración, acompañados o no por centrifugación manual en cubeta. El reposo en refrigeración y la centrifugación manual en cubeta, dieron rendimientos similares, 39% y 38%, respectivamente; se trabajó a partir de insectos vivos. Sin embargo, se puede decir que la centrifugación manual en cubeta facilitó la aglomeración de los glóbulos de grasa y con ello la remoción de ésta, a un grado no alcanzado por el reposo en refrigeración. (Selle y Larios, 1995)

Estos resultados tienen gran importancia, ya que sugieren que un artesano productor de grasa de nij podría simplificar y acelerar enormemente el proceso con un simple colador mecánico y una centrífuga manual apropiada (MacVean, 1993b), además de aumentar el rendimiento.

3. Propiedades físicas y químicas de la grasa

Katherine Jenkins, en las memorias del XXXV Congreso Internacional de Americanistas (1964), menciona que la grasa del nij es de color amarillo con un olor distintivo. La grasa del nij, al frotarla entre los dedos, adquiere una consistencia semifluida lo que permite que sea fácil de aplicar sobre superficies como madera, cerámica y metal, y al mismo tiempo provoca su penetración en la piel de la persona que la manipula (Selle et al, 1993).

El primer estudio químico de la grasa del nij, del que se tiene conocimiento, fue hecho a una muestra proveniente de Mérida, Yucatán, México, por V.G. Bloede, químico analítico de Nueva York, a solicitud del Comisionado de Agricultura del gobierno de los Estados Unidos de América, Dr. Arthur Schott (Schott, 1869). Este estudio indica que, en general, las propiedades de la grasa del nij parecen ser muy similares a las de la manteca de cerdo o a las del sebo de los riñones de bueyes, corderos, etc.; es neutra, aunque cuando se la expone al aire adquiere una muy leve tendencia a manifestar un comportamiento ácido (Schott, 1869).

El punto de fusión reportado por Bloede (Schott, 1869) para la grasa del nij es de aproximadamente 49°C aunque, una vez fundida, a una temperatura de 27–30°C aún permanece en un estado semifluido. Por otro lado, Herrera (1884), en el periódico científico “La Naturaleza”, indica que el punto de fusión es de 35°C. Bloede continúa diciendo que a una temperatura de 16°C, este material tiene una consistencia pastosa y densa, como la de la manteca de cerdo, y su gravedad específica es aproximadamente 0.92.

En relación a su solubilidad, se ha reportado que la grasa del nij parece tener las mismas propiedades que cualquier grasa animal: no es soluble en alcohol frío ni caliente; y sí es muy soluble en éter etílico, tanto frío como caliente, y en trementina, obtenida de la oleoresina del pino. Con estos solventes, la grasa forma un líquido aceitoso, que en el caso del éter etílico es de color amarillo. Esta grasa también se disuelve fácilmente en éter de petróleo y en cloroformo: éstos parecen ser sus mejores solventes. (Jenkins, 1964; Schott, 1869; Herrera, 1884).

Bloede (Schott, 1869) indica que desde el punto de vista químico, la grasa del nij debía ser clasificada indudablemente entre los aceites secantes, aunque su absorción de oxígeno se lleva a cabo más lentamente que la mayoría de este tipo de aceites; también indica que es el primer ejemplo de una grasa sólida o grasa animal secante. De acuerdo con este analista, al igual que otras grasas animales, la grasa del nij contiene un ácido volátil distintivo propio; en el caso de esta grasa, el ácido volátil es de olor acre, que recuerda el olor de hojas de árbol quemándose, y podría ser denominado ácido niínico.

Bloede (Schott, 1869) continúa diciendo que la composición química de la grasa del nij difiere poco de la de otras grasas animales pues incluye un fluido aceitoso, al cual llama oleína, y una parte sólida, que contiene ácido esteárico y otros ácidos grasos. La porción sólida de la grasa pudo ser separada del fluido aceitoso utilizando trementina o éter; la porción aceitosa se disolvió y el precipitado sólido fue separado por filtración. La Dirección General de Agricultura de Guatemala (1940) también menciona que la grasa del nij está constituida por dos fracciones; a la soluble en éter le llama “labeína” y dice que es amarilla, y a la soluble en alcohol (según Bloede la grasa no es soluble en alcohol), le llama “nigeína”, y dice que es blanca.

Según Bloede (Schott, 1869), una característica peculiar de la grasa del nij es ser difícil de saponificar. El probó con hidróxido de amonio, hidróxido de potasio e hidróxido de sodio concentrados; en todos los casos, la saponificación fue lenta e incompleta. Por lo anterior, dedujo que la grasa del nij no podía considerarse una buena grasa saponificable. Bloede clasificó la grasa del nij dentro de los aceites secantes.

Continúa diciendo Bloede (Schott, 1869) que cuando la grasa del nij se fundió y el líquido resultante se expuso a una temperatura de 121–177°C, durante una hora se observó que el residuo había adquirido una apariencia como de barniz, flexible y viscoso. A su vez, cuando capas delgadas de la solución de la grasa del nij en trementina fueron expuestas al aire por unos pocos días, ésta adquirió las propiedades de un barniz resinoso, debido a la

absorción de oxígeno. La película de este barniz era muy elástica y, al mismo tiempo, dura, lo cual le daba un carácter superior al de algunos otros materiales.

Jenkins (1964) menciona que la grasa del nij, expuesta al aire, tiende a "cristalizar", formándose una costra de color café en la parte exterior de la masa, mientras que el interior permanece suave y utilizable, por meses e incluso, años. Este comportamiento es el mismo que se ha observado en la grasa del nij producida en Rabinal (MacVean, 1993b).

Otro estudio de la grasa del nij del que se tiene información es el hecho en París, Francia, a solicitud de René Guérin, Delegado por el Gobierno de Guatemala a la Exposición Universal de París del año 1900, y citado textualmente por José María Roque (1986) y, el trabajo realizado por M. Hoppe y citado por Herrera (1884). Los resultados de estos estudios coinciden, en su mayor parte, con los reportados por Bloede (Schott, 1869); el aspecto en el que hay divergencia es el de la saponificación, pues estos estudios dicen que la grasa del nij se saponifica fácilmente, aun en solución acuosa diluida. A este respecto, también indica que al saponificar la grasa del nij se libera una sustancia con olor a membrillo o a manteca rancia que se obtiene al inicio, al llevar a cabo una destilación por arrastre de vapor; esta sustancia parece ser responsable del olor característico de la grasa (Herrera, 1884; Roque, 1986). No se ha encontrado en la literatura disponible ningún otro estudio de las propiedades físicas y químicas de la grasa del nij, aparte de los realizados por Bloede (Schott, 1869), y los citados por Guérin (Roque, 1986), Herrera (1884) y la Dirección General de Agricultura de Guatemala (1940).

El estudio químico más reciente del que se tiene información fue llevado a cabo por Margarita Selle, M.Sc., química analítica de la Universidad del Valle de Guatemala, en colaboración con Louis Bjostad, Ph.D. y Charles Lang, B.Sc., de Colorado State University, E.U.A., durante junio de 1993; se realizó en los laboratorios de Colorado State University, dentro del proyecto del nij del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. En este estudio se analizó la grasa del nij procesada en 1992, en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala, y mantenida alrededor de 25°C durante casi un año. (Selle, 1993; MacVean, 1993a)

En este estudio químico de la grasa del nij, se extrajo parcialmente el material amarillo-café suave, con diclorometano (CH_2Cl_2) o con una mezcla de cloroformo:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) en proporción 2:1. Los extractos se analizaron por cromatografía de gases (GC), directamente o después de una hidrólisis y derivatización con trifluoruro de boro en metanol ($\text{BF}_3-\text{CH}_3\text{OH}$) para obtener los metilésteres de los ácidos grasos; en este análisis cromatográfico se utilizaron columnas capilares de metilsilicona y detectores de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MS). (Selle, 1993)

Los extractos preparados en este estudio también fueron analizados por cromatografía en capa fina, utilizando, al igual que para la cromatografía de gases, sustancias patrón como referencia para la identificación; además, al usar detector selectivo de masas en la cromatografía de gases, se utilizó una base de datos de espectros de masas para el efecto. Se

determinó que los triacilgliceroles y ácidos grasos libres eran las principales fracciones de los extractos de la grasa, separadas e identificadas tentativamente por cromatografía de capa fina; una tercera fracción principal y otras presentes en menor cantidad, no pudieron ser identificadas. Ya que, según este estudio, los componentes mayoritarios son triacilgliceroles, por lo tanto, el nij debe ser llamada una grasa, no una cera. (Selle, 1993)

Al utilizar detector de ionización en llama para la cromatografía de gases, se determinaron las áreas relativas de los metil ésteres de los ácidos grasos totales del extracto de la grasa nij en cloroformo:metanol 2:1: 1.83%(16:0)Me, 1.194% (16:1(Δ^9))Me, 34.30% (18:0)Me, 32.75% (18:1(Δ^9))Me, 19.10% (18:2($\Delta^{9,12}$))Me y, trazas de (14:0)Me y 10.82% (22:0)Me; la identidad de estos componentes se verificó al usar el detector selectivo de masas (Selle, 1993). A pesar de que el detector FID responde al número de átomos de carbono que pasan por el mismo por unidad de tiempo y no a la concentración de los compuestos presentes (Skoog y Leary, 1994; Willard et al., 1991), las áreas relativas de los picos dan una buena idea de la concentración relativa de los metil ésteres de los ácidos grasos totales en el extracto de la grasa del nij porque la diferencia en longitud de cadena entre éstos ácidos grasos es proporcionalmente muy pequeña.

El insecto nij parece tener, al menos, dos pigmentos; uno rojo e hidrosoluble, presente en la cutícula y otro amarillo y liposoluble, en el interior del cuerpo (Selle et al., 1993). Respecto del pigmento de la grasa del nij, que corresponde al pigmento liposoluble del insecto, la única referencia de la cual se tiene conocimiento es la hecha por Guérin (Roque, 1986), quien indica que el pigmento es amarillo, es soluble en la labeína, la fracción de la grasa del nij soluble en éter (Dirección General de Agricultura, 1940) y que, probablemente por oxidación, se convierte en un pigmento rojo soluble en alcohol al saponificar la grasa. Un estudio publicado por Banks (1977) sobre los pigmentos de la superfamilia Coccoidea, a la cual pertenece el insecto nij, indica que estos pigmentos son antraquinonas y compuestos biosintéticamente relacionados. Esta publicación no hace referencia específica al nij pero sí a varios géneros de la misma familia, Margarodidae, en los cuales se han identificado varias antraquinonas; tampoco indica si los pigmentos a los que se refiere provienen de la cutícula y/o del interior del insecto.

4. Usos de la grasa

La grasa del nij es conocida como "cera" en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala o como "manteca" en Valladolid, Yucatán, México, por los artesanos que la usan (MacVean, 1992). Actualmente, en Rabinal, Baja Verapaz, Guatemala, la grasa del nij, suavizada entre los dedos del artesano, se frota sobre la superficie seca y pulida de las jícaras (fruto del árbol de morro, *Crescentia alata* HBK y *Crescentia cujete* L, familia Bignoniaceae) agregando polvo de humo (hollín) para darles un acabado negro lustroso (MacVean, 1992). La Dirección General de Agricultura de Guatemala (1940) menciona otra forma de aplicación de la grasa del nij: derretir la grasa en aceite de linaza y espesar con negro de humo (hollín).

y luego aplicar sobre el objeto que se quiere barnizar; este procedimiento no se ha observado en Rabinal (Selle et al., 1993). La superficie de la jícara ya coloreada y lustrosa se talla para producir una variedad de patrones con forma de hojas, flores, pájaros, etc. ; las jicaras así terminadas se usan para hacer chinchines, alcancías, tazas (con la jícara cortada a la mitad) y varias piezas ornamentales (MacVean, 1992). En Chiapa de Corzo, Chiapas, México, las jicaras se utilizan con propósitos decorativos, pero allí el acabado se hace con grasa del nij y pigmentos naturales y sintéticos de diversos colores, en vez de hollín (MacVean, 1992).

En Valladolid, Yucatán, México la grasa del nij se usa para tratar llagas y se obtiene al calentar las hembras del insecto en una jarra o sobre un plato de hojalata hasta que la "manteca" sale del interior. No se reportó ningún otro uso para la grasa en esta localidad. (MacVean, 1993b)

En Uruapan, Michoacán, México, los artesanos se especializan en la decoración de platos de madera para lo cual usan una mezcla de polvos minerales de diferentes colores con la grasa del nij, que allí llaman "aje", y aceite de linaza, logrando un brillo muy característico (MacVean, 1993b).

A mediados del siglo pasado, Bloede (Schott, 1869) sugirió varios usos para la grasa del nij. Por una parte, sugirió mezclar una solución de nij en trementina con los pigmentos que se utilizan para elaborar las pinturas al óleo; según él, esta mezcla daría acabados más brillantes y secarían con mayor rapidez. Por otra parte, sugirió aprovecharla para la fabricación de telas impermeables, siguiendo un procedimiento que consistiría en saturar el material con grasa del nij fundida y, entonces, calentarlo en un horno entre 121 y 177°C hasta que la grasa adquiriera una apariencia de barniz.

Uno de los relatos más antiguos encontrados acerca del uso de la grasa del nij, corresponde a la Epoca Colonial y es del cronista español Fray Bernardino de Sahagún (ca. 1499–1590), quien en su "Historia General de las Cosas de Nueva España" menciona el uso como: como humectante para los labios y la cara, antídoto contra el envenenamiento por comer setas crudas, y como ablandador para el chicle usado como goma de mascar (de Sahagún, 1985).

También Fray Diego de Landa (1524–1579), un religioso franciscano español, en su "Relación de las Cosas de Yucatán", se refiere a un "gusanito colorado del cual se hace unguento muy bueno, amarillo". Entre los usos de este último, dice que "sirve de óleo para pintar los vasos y hace fuerte la pintura" (de Landa, 1941).

En "The Badianus Manuscript", que es una traducción de un documento azteca, se menciona que la grasa del nij era mezclada con pigmentos nativos; se cree que era usada en pinturas dándoles las cualidades de durabilidad a éstas en las construcciones antiguas (Walcott, 1954). McBryde (1943) especula sobre el uso de la grasa del nij en la época precolombina, y considera que es probable que los indígenas Mayas antiguos cubrieran sus construcciones de piedra caliza, y los dinteles de madera de zapote, con la grasa del nij.

III. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

A. Justificación

Este trabajo de investigación está dirigido a satisfacer el objetivo de conocer las propiedades físicas y químicas de la grasa del insecto nij, dentro del proyecto correspondiente que se desarrolla en el Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Dentro de este proyecto, ya se ha hecho una caracterización química preliminar de la grasa en cuanto a sus componentes principales. Lo que corresponde a continuación es la verificación de las propiedades físicas y químicas reportadas en la literatura y la determinación de otras propiedades, a modo de conocer más ampliamente la naturaleza de este material.

Un aspecto importante de hacer la caracterización física y química de la grasa del insecto nij, es que muy pocos productos naturales de especies tropicales americanas han sido desarrollados comercialmente dentro de la ciencia de materiales. La rama de materiales estructurales de origen biológico, dentro de la ciencia de materiales, está surgiendo como uno de los sectores más prominentes en la industria química. Ecologistas renombrados, como Thomas Eisner, han hecho ver la importancia urgente de hacer investigación química como un medio para establecer la protección ambiental de hábitats tropicales; casi todas las investigaciones químicas en esta línea han sido dirigidas al descubrimiento de nuevas drogas, plaguicidas y repelentes; sin embargo, puede haber otros tipos de materiales de tanto o mayor interés en dichos hábitats.

Por falta de apertura de nuevos mercados y precios atractivos para el producto terminado elaborado con grasa del nij, además de lo trabajoso de su producción, se ha ido perdiendo la costumbre de la obtención y utilización de este material. La caracterización física y química general de la grasa del nij, complementada con la evaluación de sus propiedades y su comportamiento como material, servirá como punto de partida para sugerir posibles usos en las comunidades de origen adicionales a los ya documentados. En última instancia, la sugerencia de estos posibles usos permitirá, dentro del proyecto total del nij, promover el desarrollo de una industria artesanal sostenible en las comunidades de origen de este insecto. Tal desarrollo es extremadamente valioso para justificar la protección de especies tropicales, como el insecto nij, y sus hábitats.

B. Objetivos

1. General

Caracterizar física y químicamente la grasa del nij y, con base en las propiedades así establecidas, compararla con aceites, grasas y ceras de uso común en la artesanía y la industria.

2. Específicos

- Determinar para la grasa del nij los valores de las propiedades físicas y químicas tradicionalmente usadas para la caracterización de aceites y grasas tales como: gravedad específica, intervalo de fusión, solubilidad, índice de acidez, índice de saponificación e índice de yodo. Con esto se busca verificar los valores de las pocas propiedades ya reportadas en la literatura y producir valores para otras propiedades.
- Determinar las características espectrométricas de la grasa del nij en las regiones ultravioleta-visible, infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de protones.
- Determinar, por medio de análisis cromatográfico, la composición de la grasa del nij en cuanto a triacilglicérols.
- Llevar a cabo a través del tiempo un seguimiento químico de la cobertura lustrosa que da la grasa del nij a las superficies tratadas con ella.
- Determinar la similitud o diferencia, en propiedades físicas y químicas, entre la grasa del nij y otros aceites, grasas y ceras naturales, cuyas propiedades y usos artesanales e industriales están reportados en la literatura.
- Generar información fisicoquímica básica acerca de la grasa del nij para que, complementada con información de sus propiedades y su comportamiento como material, se puedan sugerir posibles usos para la misma, adicionales a los ya documentados.

HIPOTESIS

- Las propiedades físicas y químicas de la grasa del nij son similares a las de otras grasas naturales reportadas en la literatura, tales como lardo de cerdo, manteca de semilla de cacao y mantequilla de leche de vaca.
- El límite inferior del intervalo de fusión de la grasa del nij es de alrededor de 37°C, por lo cual al ser frotada entre los dedos adquiere una consistencia semifluida.
- La grasa del nij, como cualquier grasa natural, está constituida principalmente por triacilgliceroles con cadenas de ácidos grasos de entre 16 y 20 carbonos de longitud.
- Por el comportamiento de la grasa del nij en cuanto a formar una cobertura lustrosa al aplicarla sobre diferentes superficies, ésta puede clasificarse como un material con propiedades secantes, similar al aceite de linaza. Esta propiedad secante de la grasa del nij está relacionada con un valor alto de índice de yodo y con una elevada proporción de triacilgliceroles con insaturaciones.



V. METODOLOGÍA

Los métodos indicados a continuación, se tomaron de alguna de las siguientes fuentes de métodos oficiales: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society (AOCS, 1989), Annual Book of the American Society for Testing and Materials Standards (ASTM, 1992) y Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1979). No fue posible encontrar un método oficial para la determinación de solubilidad de aceites y grasas, por lo que se realizó el análisis según el procedimiento "Solubility test on waxes" indicado por Wharh (1956)

A continuación se indica la procedencia y año de las muestras de grasa del nij que fueron analizadas. Muestra de grasa del nij de Rabinal, Guatemala, alrededor de 2,000 g; elaborada por artesanos de esa localidad, en octubre de 1993 (MacVean, 1992). Muestra de grasa del nij de Rabinal-Guatemala, Guatemala, alrededor de 50 g; elaborada en los laboratorios de la Universidad del Valle Guatemala, en octubre de 1993, a partir de insectos recolectados en Rabinal, Guatemala (Selle et al., 1993). Muestra de grasa del nij de Chiapa de Corzo, Chiapas, México, alrededor de 200 g; comprada a artesanos de esa localidad, en septiembre de 1992 (se cree que fue preparada un año antes) (MacVean, 1992).

Por disponibilidad de cantidad de muestra en cada caso, no se utilizaron las tres muestras en todas las determinaciones; en cada método se indica qué muestras se analizaron. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en triplicado para cada muestra analizada, con excepción de la determinación del índice de yodo de la grasa del nij a lo largo del tiempo al exponerla al aire en forma de película. A partir de estos triplicados se calcularon medias e intervalos de confianza; además, se realizaron análisis de varianza, con el paquete estadístico SPSS para Windows (Norusis, 1993), para comparar las medias de estas determinaciones y establecer si existe o no, diferencia estadísticamente significativa entre ellas (ver análisis de varianza en Apéndice E). En el caso de la determinación del índice de yodo de la grasa del nij, a lo largo del tiempo de exposición al aire en forma de película, lo que se calculó fue la incertidumbre de cada una de las mediciones a partir de fórmulas de propagación del error, por no disponerse de réplicas de cada determinación (ver fórmulas en Apéndice E). En el Cuadro 7 se resume el procedimiento experimental en cuanto a propiedad analizada, método utilizado, muestras analizadas y la evaluación de resultados realizada.

Cuadro 7
 Procedimiento experimental seguido
 (AOAC, 1995; AOCS, 1989; ASTM, 1992; IUPAC, 1979; Wharh, 1956)

Propiedad	Método utilizado	Muestras analizadas	Análisis de resultados
Gravedad específica	ASTM ¹ Pienómetro tipo Hubbard	Rabinal y Chiapas	Intervalo de confianza de triplicados. análisis de varianza y comparación de medias.
Intervalo de fusión	AOCS ² Tubo de Thiele	Rabinal, Chiapas y Rabinal-Guatemala	
Solubilidad	Wart	Rabinal y Chiapas	
Índice de acidez	IUPAC ³ Titulación potenciométrica	Rabinal y Chiapas	
Índice de saponificación	IUPAC ³ Titulación potenciométrica	Rabinal y Chiapas	
Índice de yodo	AOAC ⁴ Método de Hanus	Rabinal y Chiapas	
Espectrofotometría UV-VIS	200-400 nm	Rabinal y Rabinal-Guatemala	
Espectrofotometría IR	400-4000 cm ⁻¹	Rabinal y Rabinal-Guatemala	
Espectroscopía ¹ H NMR	0-10 ppm	Rabinal-Guatemala	
Cromatografía HPLC	AOCS ² Fase invertida ACN/THF 73/27 % (v/v)	Rabinal	

¹ ASTM: American Society for Testing and Materials Standards

² AOCS: American Oil Chemists Society

³ IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

⁴ AOAC: Association of Official Analytical Chemists

A. Preparación de las muestras para análisis

Las muestras de grasa del nij de Rabinal y Chiapas, constaban de dos partes diferentes y fácilmente distinguibles: una capa externa de color marrón de consistencia quebradiza y dura y una masa interior que no tenía un color homogéneo sino que éste iba de amarillo a mostaza. La muestra de grasa del nij de Rabinal-Guatemala no estaba constituida de dos partes diferentes sino que era una masa de color amarillo homogéneo; esta apariencia es típica de la grasa cuando, después de su preparación, no es expuesta al aire.

Para la preparación de las muestras de grasa del nij se siguió el método "2.001. Preparation of the Sample" (IUPAC, 1979) que es aplicable a aceites y grasas animales y vegetales. El método consistió, en términos generales, en fundir los bloques de grasa a aproximadamente 60°C, en horno con vacío, e inmediatamente filtrar por gravedad el material fluido. La principal modificación consistió en la utilización de vacío, durante la fundición de las muestras, para extraerles el aire y la humedad, y para minimizar la autooxidación y polimerización de las mismas al reaccionar con oxígeno.

B. Determinación de propiedades físicas y químicas

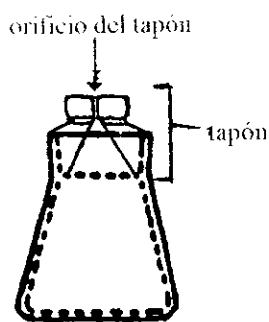
1. Gravedad específica

La densidad de una sustancia se define como la masa que corresponde a una unidad de volumen, mientras que su gravedad específica se define como la razón de su densidad a la densidad de otra sustancia de referencia, generalmente agua, ambas a la misma o diferentes temperaturas, las cuales deben ser especificadas (ASTM, 1992). Para la determinación de la gravedad específica de la grasa del nij, se siguió el método "ASTM 1963-8 Standard Test for Specific Gravity of Drying Oils, Varnishes, Resins, and Related Materials at 25/25°C" (ASTM, 1992). Sólo se determinó esta propiedad a las muestras de grasa del nij de Rabinal y de Chiapas, por la cantidad de grasa disponible de cada una de las localidades. El método da la opción de usar un picnómetro tipo Leach o uno tipo Hubbard. Se escogió usar el picnómetro tipo Hubbard (ver Figura 5) porque éste, a diferencia del tipo Leach, puede usarse para muestras que son sólidas o semisólidas a la temperatura a la cual se hace la determinación, que es el caso para la grasa del nij. Se usó una balanza analítica con una precisión de ± 0.01 mg en vez de la sugerida de ± 0.1 mg, por disponibilidad. El método consistió en la calibración de los picnómetros con agua desionizada, y la posterior la determinación de la gravedad específica de las muestras en los picnómetros ya calibrados. La determinación de la gravedad específica de las muestras se hizo al llenar el picnómetro hasta la mitad con grasa fundida, dejarla solidificar y, agregar agua desionizada sobre la muestra que estaba dentro del picnómetro hasta llenarlo. El procedimiento seguido se encuentra detallado en el Apéndice A.

Los resultados se expresan como:

$$\text{gravedad específica} = \frac{\text{masa de la muestra agregada}}{\text{masa del agua correspondiente al volumen de la muestra agregada}}$$

Figura 5
Picnómetro tipo Hubbard
(ASTM, 1992)



2. Intervalo de fusión

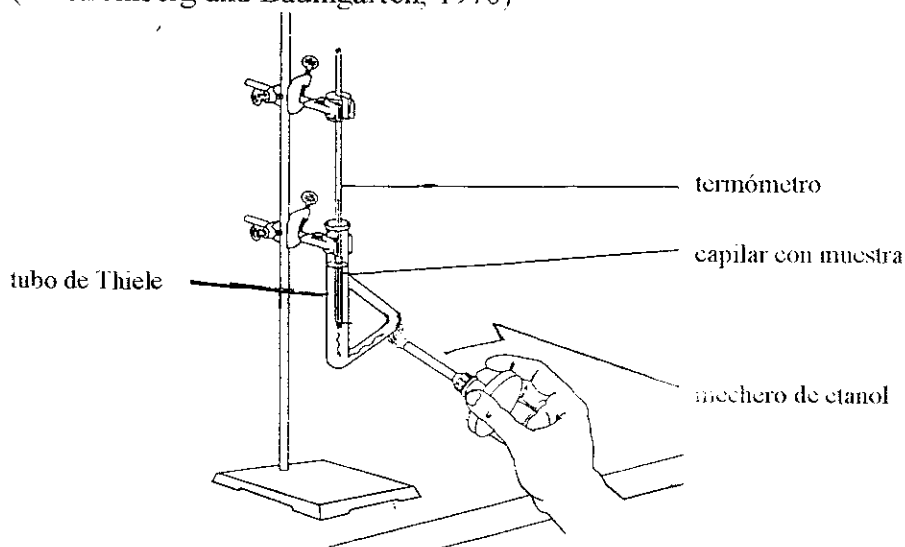
Se utilizaron las muestras preparadas según lo indicado en la sección de preparación de las muestras para análisis para determinación del intervalo de fusión indicado por el método "Cc 1-25 Melting Point, capillary tube method" (AOCS, 1989) dado para grasas animales y vegetales. Se determinó esta propiedad a las tres muestras de grasa del nij. El método consistió, términos generales, en: introducir en un tubo capilar una porción de muestra fundida, sellar con fuego uno de los extremos del tubo, permitir que se solidifique la muestra en la refrigeradora y calentarla lentamente en un tubo de Thiele con glicerina. Se tomó como límite inferior del intervalo la temperatura en la cual se observaba la primera fracción líquida de muestra y, como límite superior, la temperatura en la cual ya no se observaba mayor fusión de la muestra, es decir, que la porción de materia sólida parecía aparentemente constante. En el Apéndice A se detalla el procedimiento seguido. La Figura 6 muestra el sistema usado para la determinación del intervalo de fusión con tubo de Thiele y mechero de etanol.

Los resultados se expresan como: $(a - b)^{\circ}\text{C}$

siendo, a = límite inferior del intervalo de fusión
 b = límite superior del intervalo de fusión

Figura 6

Sistema usado para la determinación del intervalo de fusión, con tubo de Thiele y mechero (Linstromberg and Baumgarten, 1970)



3. Solubilidad

La solubilidad se define, en este caso, como los gramos de grasa que se logran disolver en 100 g de solvente a 25.0°C (Warth, 1956). Por disponibilidad de cantidad de muestra, sólo se le determinó esta propiedad a las de Rabinal y de Chiapas. No fue posible encontrar un método oficial para la determinación de solubilidad de aceites y grasas, por lo que se realizó el análisis según el procedimiento "Solubility test on waxes" indicado por Wharth (1956) al que se le hicieron algunas modificaciones; el procedimiento detallado se encuentra en el Apéndice A. El método consistió, en términos generales, en pesar 2.00000 g de grasa del nij y agregarle 25 ml del solvente, centrifugar la fracción soluble, transferir una alícuota de 20 ml del sobrenadante de esta mezcla ya centrifugada a (25.0 ± 0.3)°C a un pesasustancias y evaporar el solvente con flujo de nitrógeno hasta llevar a masa constante. De esta forma se determina la masa de grasa disuelta y la masa de solvente, en ese volumen de solución.

Los resultados se expresan como:

$$\text{Solubilidad} = \frac{\text{masa de grasa disuelta, g}}{\text{masa del solvente, g}} \times 100 \text{ g solvente a } 25.0^{\circ}\text{C}$$

Esta determinación se hizo en etanol, acetona y éter de petróleo individualmente y en mezclas binarias de estos solventes, es decir, etanol:acetona y acetona:éter de petróleo. Para las determinaciones en mezclas binarias, se usó balanza semianalítica, con precisión ±0.01 g, en vez de la analítica porque se vio en la determinación con solventes individuales que la variación entre las réplicas era mucho mayor que la precisión de la balanza analítica.

4. Índice de acidez

El índice de acidez de un aceite o una grasa se define como el número de miligramos de KOH necesarios para neutralizar un gramo de dicho material (Whart, 1956). La determinación del índice de acidez involucra una titulación basada en la una reacción ácido-base entre los ácidos grasos libres y el hidróxido según se indica a continuación (Wingrove y Caret, 1984).



Para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij se siguió el método oficial de IUPAC "Method 2.201 determination of the Acid Value and the Acidity, Section 5. Acid Value-Potentiometric Method" (IUPAC, 1979) dado para aceites y grasas vegetales y animales. Por disponibilidad de cantidad de muestra, sólo se le determinó esta propiedad a las de Rabinal y de Chiapas. El método consistió, en términos generales, en titular potenciométricamente 4.00000 g de grasa del nij en 50.0 ml del 2-pentanona, con una solución patrón de 0.50N de KOH en 2-propanol. La principal modificación fue usar 2-pentanona por disponibilidad, en vez de la metilisobutilcetona indicada por el método. El procedimiento seguido se detalla en el Apéndice A. A continuación se presenta la estequiometría para calcular el índice de acidez a partir de la reacción anterior.

$$\frac{V \text{ ml de soln. KOH}}{m \text{ masa de muestra, g}} \times \frac{N \text{ eq. de KOH}}{1000 \text{ ml de soln. KOH}} \times \frac{1 \text{ mol KOH}}{1 \text{ eq. KOH}} \times \frac{56.11 \text{ g KOH}}{1 \text{ mol KOH}}$$

$$\times \frac{1000 \text{ mg KOH}}{1 \text{ g KOH}} = \frac{\text{mg KOH}}{1 \text{ g de muestra}}$$

siendo, V = ml usados de la soln. de KOH para alcanzar el punto final

m = masa, en g, de la porción de masa usada

N = normalidad de la soln. de KOH

Esta estequiometría puede reducirse, para calcular los valores de índice de acidez, a la expresión indicada a continuación.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(56.11) \times (V) \times (N)}{m}$$

$$\text{Índice de acidez} = \frac{\text{mg de KOH}}{1 \text{ g de muestra}}$$

$$\frac{(V_o - V_1) \text{ ml de soln. HCl}}{m \text{ masa de muestra, g}} \times \frac{N \text{ eq. de HCl}}{1000 \text{ ml de soln. HCl}} \times \frac{1 \text{ mol HCl}}{1 \text{ eq. HCl}} \times \frac{1 \text{ mol KOH}}{1 \text{ mol HCl}}$$

$$\times \frac{56.11 \text{ g KOH}}{1 \text{ mol KOH}} \times \frac{1000 \text{ mg KOH}}{1 \text{ g KOH}} = \frac{\text{mg KOH}}{1 \text{ g de muestra}}$$

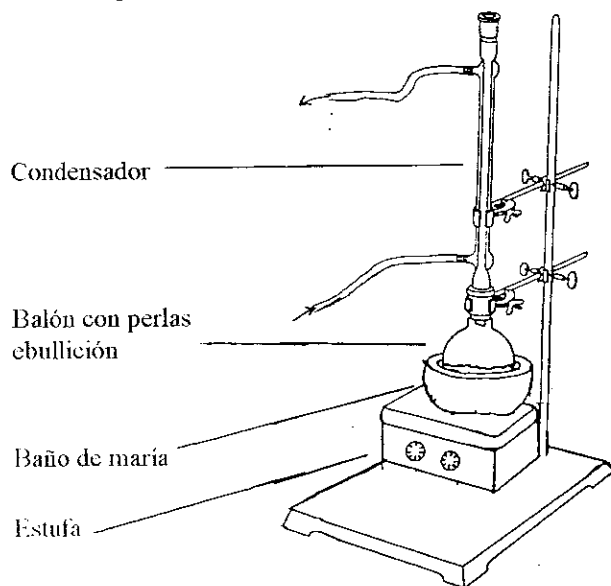
- siendo, V_o = número de ml usados de la solución patrón de HCl para titular el blanco
 V_1 = número de ml usados de la solución patrón de HCl 2-propanol para titular la muestra de grasa
 m = masa de la porción de muestra usada, g
 N = normalidad de la solución patrón de HCl en 2-propanol usada

Esta estequiometría puede reducirse, para calcular los valores de índice de saponificación, a la expresión indicada a continuación.

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{(56.11) \times (N) \times (V_o - V_1)}{m}$$

Figura 7

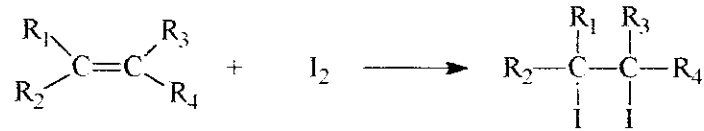
Sistema de reflujo usado para la saponificación de las muestras de grasa del nij



6. Índice de yodo

El índice de yodo de un aceite o una grasa se define como los gramos de yodo que reaccionan con 100 gramos de este material. Los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados que hay en aceites y grasas, se convierten en enlaces simples al agregarse el halógeno en esta posición y el índice de yodo es, por consiguiente, una medida del grado de insaturación. (Egan et al., 1987)

La reacción general de la determinación del índice de yodo, en términos de I_2 , consiste en la adición del yodo a los dobles enlaces de las cadenas de ácidos grasos tanto libres como esterificados, según se indica a continuación (Wingrove y Caret, 1984).

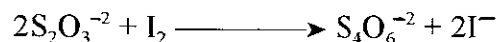


$R_1, R_2, R_3, R_4 = H$ o cadenas hidrocarbonadas, pueden ser iguales o diferentes.

El índice de yodo se determina usualmente por el método de Wijs en el cual se usa tricloruro de yodo. Otro método alternativo es el de Hanus que utiliza yodo y bromo en ácido acético glacial. El índice de yodo también puede calcularse a partir de los datos obtenidos de una cromatografía gas-líquido al cuantificar los metil ésteres de los ácidos grasos insaturados específicos del aceite o grasa (AOCS, 1989).

Para la deteminación del índice de yodo de las muestras de grasa del nij, indicador del grado de insaturación de la grasa, se siguieron los métodos oficiales de la AOAC "Iodine Absortion Number of Oils and Fats, Hanus Method, Final Action, 28.021–28.022" y "Standard Solutions of Sodium Thiosulfate, Final Action, 50.037–50.038" (AOAC, 1984). Por disponibilidad de cantidad de muestra, sólo se le determinó esta propiedad a las de Rabinal y de Chiapas. Además, se determinó el índice de yodo a las fracciones de grasa del nij de Rabinal, soluble e insoluble en éter de petróleo; estas fracciones se obtuvieron de la determinación de solubilidad en éter de petróleo. El método consistió, en términos generales, en hacer reaccionar una porción de grasa del nij de tamaño apropiado según índice de yodo esperado (se usó 0.20000–0.30000 g), durante exactamente 30 minutos, con un exceso de una solución de monobromuro de yodo (I–Br) en ácido acético glacial y luego, titular, con una solución patrón de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) el halógeno en exceso, es decir, lo que no reaccionó con la grasa. El procedimiento detallado y el Cuadro a partir del cual se decide el tamaño apropiado de muestra, se encuentran en el Apéndice A.

A continuación se presenta la reacción de titulación del I_2 con la solución patrón de $Na_2S_2O_3$ y la estequiometría necesaria para calcular el índice de yodo de la muestra a partir de esta reacción.



$$\frac{(B - S) \text{ ml de soln. } Na_2S_2O_3}{m \text{ g de muestra}} \times \frac{N \text{ eq. de } Na_2S_2O_3}{1000 \text{ ml de soln. } Na_2S_2O_3} \times \frac{1 \text{ mol } Na_2S_2O_3}{1 \text{ eq. } Na_2S_2O_3}$$

$$\times \frac{1 \text{ mol } I_2}{2 \text{ moles } Na_2S_2O_3} \times \frac{253.81 \text{ g } I_2}{1 \text{ mol } I_2} \times 100 \text{ g de muestra} = \frac{\text{g } I_2}{100 \text{ g muestra}}$$

siendo, B = ml usados de la soln. patrón $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para alcanzar el punto final en el blanco
 S = ml usados de la soln. patrón $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para alcanzar el punto final en la muestra
 N = normalidad de la solución patrón de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
 m = masa de la porción de muestra usada, g
 253.81 = peso fórmula del I_2

Para calcular el índice de yodo de la muestra esta estequiometría puede reducirse a la expresión indicada a continuación.

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(B - S) \times (N) \times (253.81)}{(m) \times (20)} = \frac{\text{g } \text{I}_2}{100 \text{ g muestra}}$$

También se determinó el índice de yodo de películas de grasa del nij de Rabinal expuestas al aire ambiental entre 1 y 12 días; no se llevó a cabo réplicas de cada uno de los tiempos de exposición. Para formar estas películas, se pesó 0.5–0.6 g de grasa del nij de Rabinal en uno de los lados de una caja Petri grande, se fundió en el horno con vacío a aproximadamente 50°C y, mientras aún estaba caliente, se extendió al inclinar la caja Petri con las manos a fin de obtener una capa lo más delgada y homogénea posible; entonces se dejó expuesta al aire.

Después del tiempo de exposición, que iba de 1 a 12 días, y justo antes de la determinación del índice de yodo, se raspó toda la grasa de cada una de las cajas Petri con ayuda de una espátula pequeña analíticas. Cada porción de grasa se transfirió a un erlenmeyer con tapón esmerilado para llevar a cabo la determinación del índice de yodo. La mayor parte de la grasa raspada tenía apariencia de cáscara. Se siguió el mismo procedimiento ya antes indicado para la grasa, para la determinación del índice de yodo de las películas. Como no se llevo a cabo réplicas de estas películas, los resultados se reportaron como el valor de índice de yodo \pm su incertidumbre calculada a partir de fórmulas de propagación del error. Ver fórmulas en Apéndice E.

C. Determinación de características espectrométricas

1. Absorción ultravioleta–visible

Usando celdas de cuarzo, se corrió el espectro de absorción ultravioleta–visible (UV–VIS) de trioleína, una mezcla patrones de triacilglicerol (Sigma), aceite de oliva y aceite de soya como patrones y, de grasas del nij de Rabinal–Guatemala y de Rabinal, en el intervalo de 200–450 nm, usando tetrahydrofurano y hexano como solventes. Las muestras de grasa del nij se fundieron justo antes de agregarles el solvente, según lo recomendado en el método de HPLC usado para la separación de los triacilglicerol (AOCS, 1989) (ver procedimiento detallado y condiciones de trabajo de estos métodos en Apéndice A).

Se hicieron diluciones de las soluciones iniciales preparadas para cada una de las muestras, hasta que el máximo de absorbancia fuera igual o menor que 2 unidades de absorbancia; entonces, se trazaron los espectros a estas concentraciones. La mezcla de patrones de triacilgliceroles fue la excepción, pues no se hizo dilución; se corrió el espectro de la solución inicial y el máximo fue de aproximadamente 3.5 unidades de absorbancia.

2. Absorción infrarroja

Trabajando en el modo de transmisión, y con transformada de Fourier, se corrió el espectro de absorción infrarroja (IR), en el intervalo de 400–4000 cm^{-1} , de las muestras de grasa del nij de Rabinal y de Rabinal–Guatemala, esparcidas sobre ventanas circulares de KCl en forma de película delgada. Se corrió el espectro de estas películas estando recién esparcidas y luego una vez a la semana hasta que el espectro ya no cambiara apreciablemente por la exposición de la película al aire (3 corridas por todo). Lo que interesaba en este análisis era seguir, a lo largo del tiempo, el proceso de “secado” de una película al estar expuesta al aire. Entre un análisis y el otro, las ventanas de KCl con las películas se dejaron dentro de desecadora, para evitar el empañamiento de dichas ventanas; por lo anterior, el proceso sucedió por exposición al aire seco.

3. Resonancia magnética nuclear de protones

Se corrió el espectro de resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR) de las fracciones de la muestra de grasa del nij de Rabinal–Guatemala solubles en acetona y en cloroformo deuterados, en el intervalo 0–10 ppm; se revisó hasta 13 ppm pero por no haber observado señales más allá de 10 ppm, los espectros finales sólo se corrieron hasta 10 ppm (ver discusión). Se probaron varias concentraciones, siendo las finales nominales: 0.6 g de muestra en 1 ml de acetona deuterada y 0.6 g de muestra en 0.8 ml de cloroformo deuterado.

D. Determinación de la composición en triacilgliceroles

Para la determinación de los triacilgliceroles presentes en la grasa del nij se siguió el método oficial "AOCS Official Method Ce 5b-89, Triglycerides in Vegetable Oil by HPLC" (AOCS, 1989), escogiéndose el procedimiento en el que se usa detector ultravioleta. El procedimiento detallado y las condiciones de trabajo se hallan en el Apéndice A. Las modificaciones fueron las siguientes: se usó, por disponibilidad, la columna C18 Varian MCH5-n-cap, 300 x 4 mm, tamaño de partícula 5 μm en vez de dos C18 Spherisorb S3ODS-2, 150 x 4.5 mm una a continuación de la otra; la longitud de onda a la que se fijó el detector, 250 nm en vez de 220 nm; no se mantuvo la columna a temperatura controlada por un horno, sino que se trabajó a temperatura ambiente (laboratorio con aire acondicionado a 20°C).

Se usaron los solventes, patrones y muestras indicados a continuación. Solventes para la fase móvil: acetonitrilo y tetrahidrofurano. Solventes para disolver los patrones y las muestras: tetrahidrofurano y hexano. Patrones y muestras: aceite de oliva, aceite de soya y grasa del nij de Rabinal; esta última fundida justo antes de agregarle el solvente, según lo recomendado en el método de HPLC.

VI. RESULTADOS

Los resultados presentados para la grasa del nij, corresponden sólo a muestras de tres localidades y años de elaboración diferentes, como se indica a continuación. Muestra de grasa del nij de Rabinal, Guatemala, alrededor de 2,000 kg; elaborada por artesanos de esa localidad, en octubre de 1993 (MacVean, 1992). Muestra de grasa del nij de Rabinal-Guatemala, Guatemala, alrededor de 50 g; elaborada en los laboratorios de la Universidad del Valle Guatemala, en octubre de 1993, a partir de insectos recolectados en Rabinal, Guatemala (Selle et al., 1993). Muestra de grasa del nij de Chiapa de Corzo, Chiapas, México, alrededor de 200 g; comprada a artesanos de esa localidad, en septiembre de 1992 (se cree que fue elaborada un año antes) (MacVean, 1992). No se sabe si las diferencias encontradas entre dichas muestras, en cuanto a los análisis realizados, se pueden atribuir a su procedencia y/o a su año de elaboración.

A. Determinación de propiedades físicas y químicas

A continuación se presentan los resultados de las determinaciones de propiedades físicas y químicas a las muestras de grasa del nij. No fue posible llevar a cabo todas las determinaciones de estas propiedades en las tres muestras por disponibilidad de cantidades de muestra. Los resultados presentados en los Cuadros 7 al 11 como medias y sus respectivos límites de confianza, se calcularon a partir de triplicados independientes de cada una de las muestras; mientras que los resultados incluidos en el Cuadro 12 y en la Gráfica 1 corresponden a una sola determinación por lo que su incertidumbre se calculó a partir de fórmulas de propagación de error (ver fórmulas en Apéndice E). Además, para los triplicados de las determinaciones presentadas en los Cuadros 7 al 11, se realizaron análisis de varianzade una vía y prueba de comparación de medias de Tukey, con el paquete estadístico SPSS para Windows (Norusis, 1993), para determinar diferencias, estadísticamente significativas, entre las medias de estas determinaciones (ver análisis de varianza en Apéndice E).

Cuadro 8

Gravedad específica de las muestras de grasa del nij a 25°C/25°C ¹

Muestra	Gravedad específica, $\bar{x} \pm I_{C_{95\%}}$
Grasa del nij de Rabinal	0.957 \pm 0.002 ^a
Grasa del nij de Chiapas	0.963 \pm 0.002 ^b

^{a,b} Letras diferentes implican que hay diferencia estadísticamente significativa entre los intervalos señalados por dichas letras, según el análisis de varianza realizado (ver análisis estadísticos correspondientes en Apéndice E).

¹ Por disponibilidad de cantidad muestra, no se le determinó esta propiedad a la muestra del grasa del nij de Rabinal-Guatemala.

Cuadro 9

Intervalo de fusión de las muestras de grasa del nij

Muestra	Intervalo de fusión. °C ¹
Grasa del nij de Rabinal	34.8–51.8 ^a
Grasa del nij de Chiapas	35.3–52.2 ^a
Grasa del nij de Rabinal–Guatemala	33.7–50.8 ^b

^{a,b} Letras iguales implican que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los intervalos señalados por dichas letras, según la prueba de comparación de medias de Tukey de todos los tratamientos entre sí

¹ El límite de confianza, $Ic_{95\%}$, para cada uno de los extremos de los intervalos es de $\pm 0.7^\circ\text{C}$

Cuadro 10

Solubilidad, %(p/p), de las muestras de grasa del nij a 25.0°C, en solventes individuales y en mezclas ¹

Muestra	Solvente	Solubilidad, $x \pm Ic_{95\%}$ ² masa grasa disuelta, g x 100 masa solvente, g	Solubilidad, $x \pm Ic_{95\%}$ masa grasa disuelta, g x 100 masa grasa total, g
Grasa del nij de Rabinal	Etanol	<7	<53
	Acetona	9 \pm 3 ^a	75 \pm 2
	Éter de petróleo	12 \pm 1	71.8 \pm 0.2
	Acetona : éter de petróleo, 1:1 (v/v)	12 \pm 1 ^b	79.0 \pm 0.6
Grasa del nij de Chiapas	Etanol	<5	<34
	Acetona	10 \pm 2 ^b	74 \pm 7
	Éter de petróleo	12 \pm 1	68 \pm 3

^{a,b} Letras iguales implican que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los intervalos señalados por dichas letras, según la prueba de comparación de medias de Tukey de todos los tratamientos entre sí

¹ Por disponibilidad de cantidad de muestra, no se usó la muestra de Rabinal–Guatemala para este análisis, ni la Chiapas para para la determinación en la mezcla acetona:éter de petróleo, 1:1 (v/v)

² La prueba de Tukey no fue capaz de determinar con exactitud la similitud o no de la solubilidad de la grasa del nij de Rabinal en la mezcla acetona:éter de petróleo y de la de grasa del nij de Chiapas en éter de petróleo por lo que no se les asignó letras. Los resultados de solubilidad en etanol, de las muestras de Rabinal y de Chiapas, se reportaron como "menor que" por tener error determinado.

Cuadro 11

Índice de acidez e índice de saponificación de las muestras de grasa del nij

Muestra ¹	Índice de acidez ² mg KOH/g. $x \pm I_{c_{95\%}}$	Índice de saponificación ² mg KOH/g. $x \pm I_{c_{95\%}}$
Grasa del nij de Rabinal	27 ± 2^a	196 ± 2^c
Grasa del nij de Chiapas	35 ± 1^b	196 ± 7^c

¹ Por disponibilidad de cantidad muestra. no se le determinó esta propiedad a la muestra del grasa del nij de Rabinal-Guatemala

² En el Apéndice B se incluyen Cuadros y Gráficas de titulaciones a partir de las cuales se calcularon estos valores ^{a,b,c} Letras diferentes implican que hay diferencia estadísticamente significativa entre los intervalos señalados por dichas letras, según el análisis de varianza realizado

Cuadro 12

Índice de yodo de muestras y fracciones de grasa del nij ¹

Muestra	Índice de yodo (Ianus) g yodo/100 g muestra, $x \pm I_{c_{95\%}}$
Grasa del nij de Rabinal	145 ± 2^a
Grasa del nij de Chiapas	126 ± 1^b
Grasa del nij de Rabinal, fracción soluble en éter de petróleo a 25°C	143 ± 1^c
Grasa del nij de Rabinal, fracción insoluble en éter de petróleo a 25°C	57 ± 1^d

¹ Por disponibilidad de cantidad muestra. no se le determinó esta propiedad a la muestra del grasa del nij de Rabinal-Guatemala ni en fracciones de grasa del nij de Chiapas

^{a,b,c,d} Letras diferentes (a, b, c, d) implican que hay diferencia estadísticamente significativa entre los intervalos señalados por dichas letras, según el análisis de varianza realizado (ver análisis estadísticos correspondientes en Apéndice E)

Cuadro 13

Índice de yodo de la grasa del nij de Rabinal a lo largo del tiempo, al exponerla al aire ambiental, en forma de película

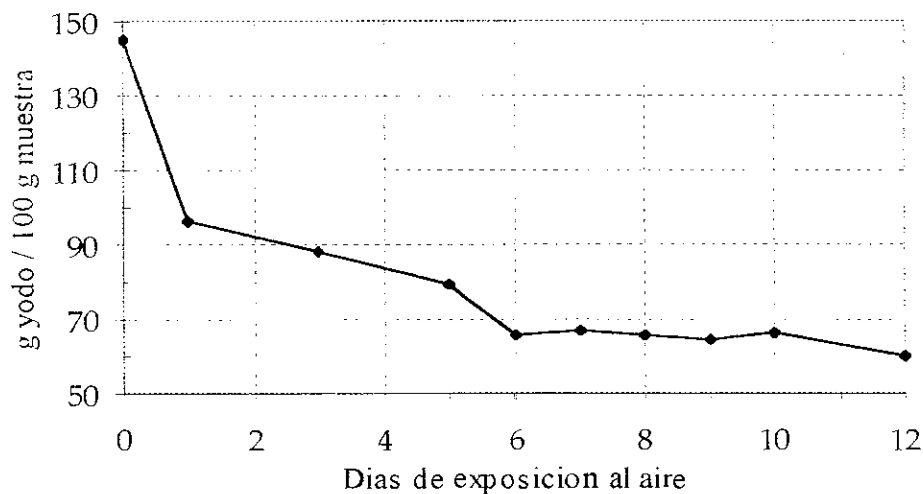
Días de exposición al aire ambiental	Índice de yodo (Hanus), g yodo/100 g ¹
0 ²	145 ± 2
1	96.2 ± 0.7
3	88.0 ± 0.7
5	79.4 ± 0.5
6	65.5 ± 0.4
7	66.6 ± 0.3
8	65.9 ± 0.3
9	64.6 ± 0.4
10	66.6 ± 0.3
12	59.9 ± 0.3

¹ Sólo se hizo una determinación para cada día de exposición indicado por lo que las incertidumbres de los resultados se calcularon a partir de fórmulas de propagación de error

² Este valor se tomó del Cuadro 12

Gráfica 1

Índice de yodo de la grasa del nij de Rabinal a lo largo del tiempo, al exponerla al aire ambiental, en forma de película^{1,2}



¹ Las películas de grasa del nij de Rabinal se dejaron expuestas al aire ambiental

² Los datos se tomaron del Cuadro 13; sólo se hizo una determinación para cada día de exposición indicado

B. Determinación de características espectrométricas

A continuación se presentan las determinaciones de las características espectrométricas de la grasa del nij en las regiones ultravioleta–visible, infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protones. No se usó las tres muestras para estas determinaciones, en cada análisis se indica qué muestras se analizaron y por qué.

I. Absorción ultravioleta–visible

Se corrió el espectro de absorción ultravioleta–visible de trioleína, una mezcla patrón de triacilgliceroles, aceite de oliva y aceite de soya, como patrones, y de grasas del nij de Rabinal y de Rabinal–Guatemala, en el intervalo de 200 a 450 nm, usando tetrahidrofurano y hexano como solventes. No se corrió el espectro de la grasa del nij de Chiapas, por ya no haber disponibilidad de esta muestra en el momento de llevar a cabo este análisis.

No se logró disolver completamente la mezcla patrón de triacilgliceroles en tetrahidrofurano ni en hexano; ya que la disolución fue mejor en hexano pues había menor cantidad de sedimento, a la fracción soluble de esta mezcla se le corrió su espectro de absorción ultravioleta–visible. Tampoco se logró disolución completa de la grasa del nij de Rabinal en hexano; se observó que aproximadamente la mitad de la muestra se sedimentó en el fondo del recipiente de vidrio con hexano a pesar de que la grasa se fundió justo antes de agregarle el solvente. Por lo anterior, no se conoce la concentración real en hexano de la fracción soluble de la mezcla patrón de triacilgliceroles ni de las diluciones preparadas a partir de la fracción soluble de la grasa del nij de Rabinal; las concentraciones indicadas para las diluciones son nominales pues sólo representan la masa de grasa para el volumen de hexano dado. Si se observó disolución completa en el caso de las muestras de aceite de soya y aceite de oliva, tanto en tetrahidrofurano como en hexano y, en el de las muestras de grasa del nij en tetrahidrofurano.

Las Figuras 8 a 12 presentan los espectros ultravioleta–visible, en tetrahidrofurano o en hexano, de las muestras de trioleína, aceite de oliva, aceite de soya, aceite de oliva, grasa del nij de Rabinal y de Rabinal–Guatemala y mezcla patrón de triacilgliceroles. El Cuadro 14 incluye las longitudes de onda de los máximos de absorción de los espectros ultravioleta–visible de estas mismas muestras.

Figura 8
Espectros de absorción ultravioleta-visible de trioleína y de aceite de oliva, en tetrahidrofurano

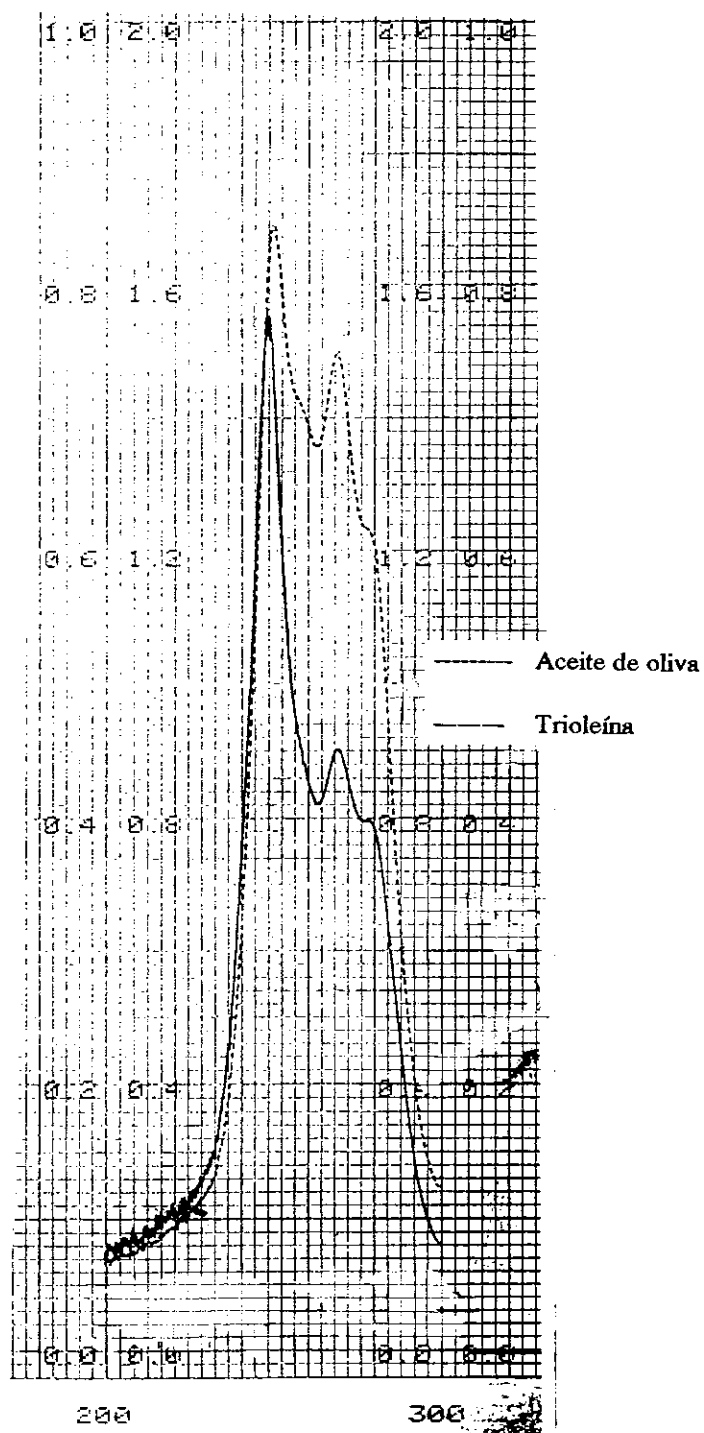


Figura 9
Espectros de absorción ultravioleta-visible
de trioleína y de grasa del nij de Rabinal,
en tetrahydrofurano

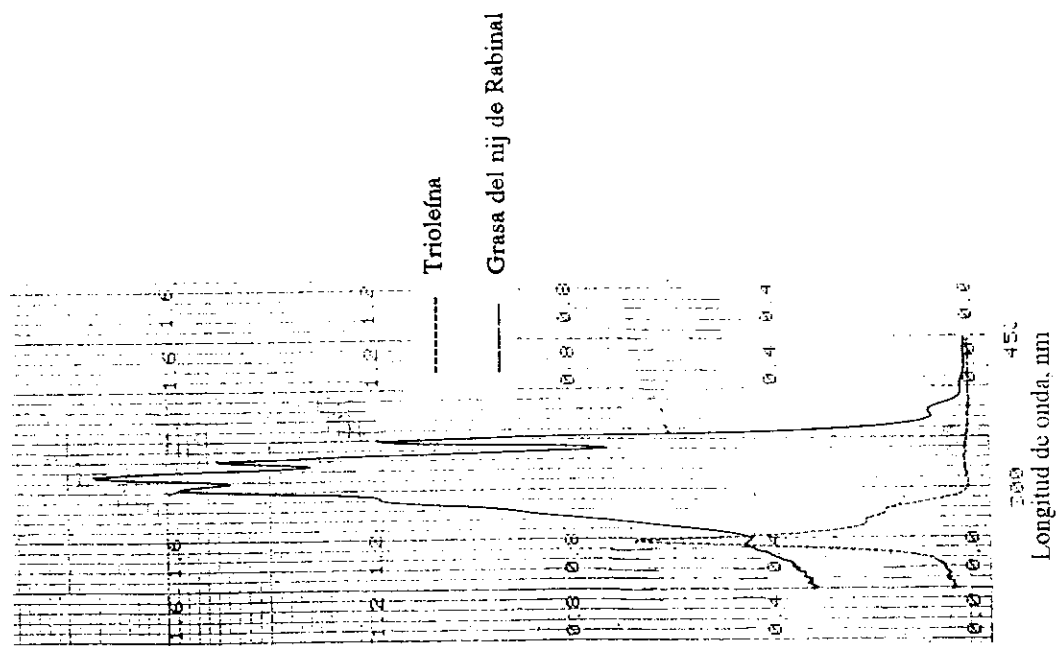


Figura 10
Espectros de absorción ultravioleta-visible de aceite
de soya y de grasa del nij de Rabinal-Guatemala,
en tetrahydrofurano

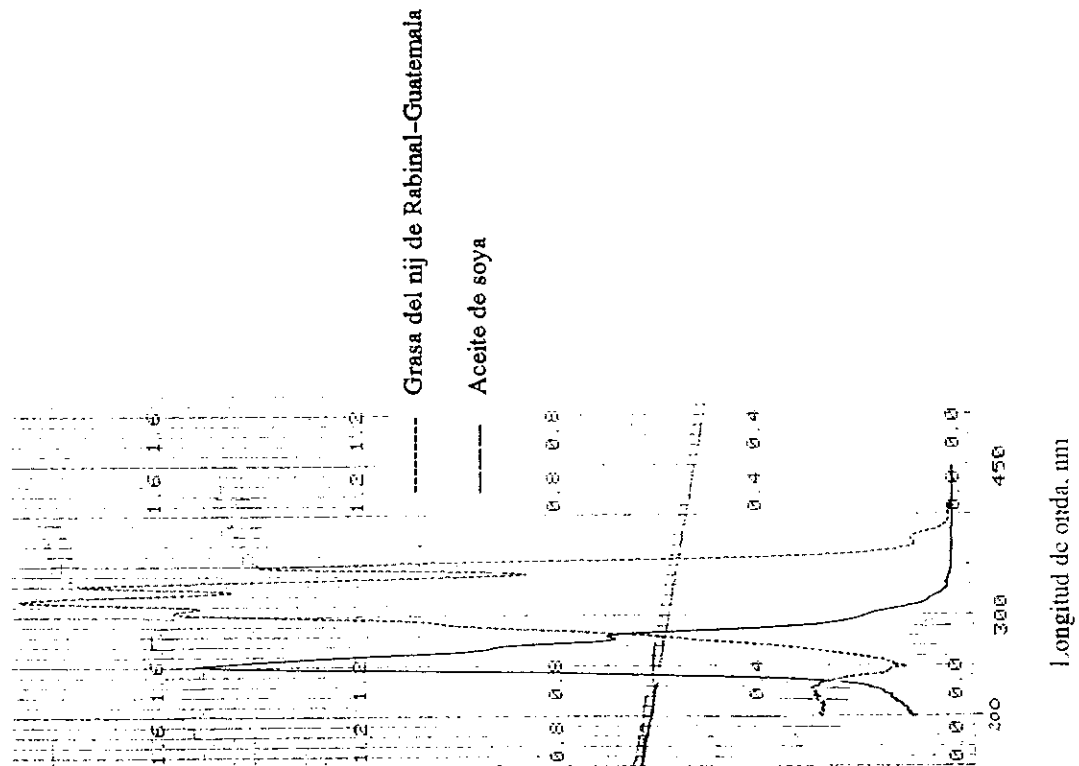


Figura 11
Espectro de absorción ultravioleta-visible de la fracción soluble de la mezcla patrón de triacilglicerol, en hexano

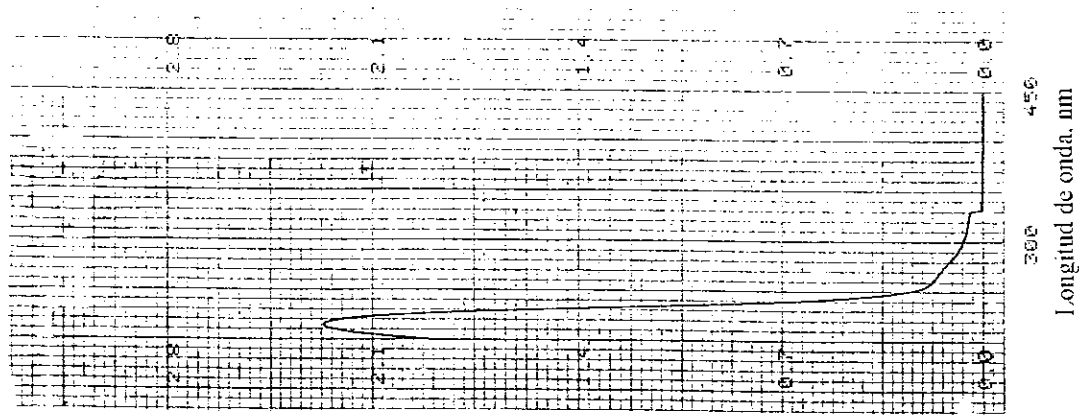
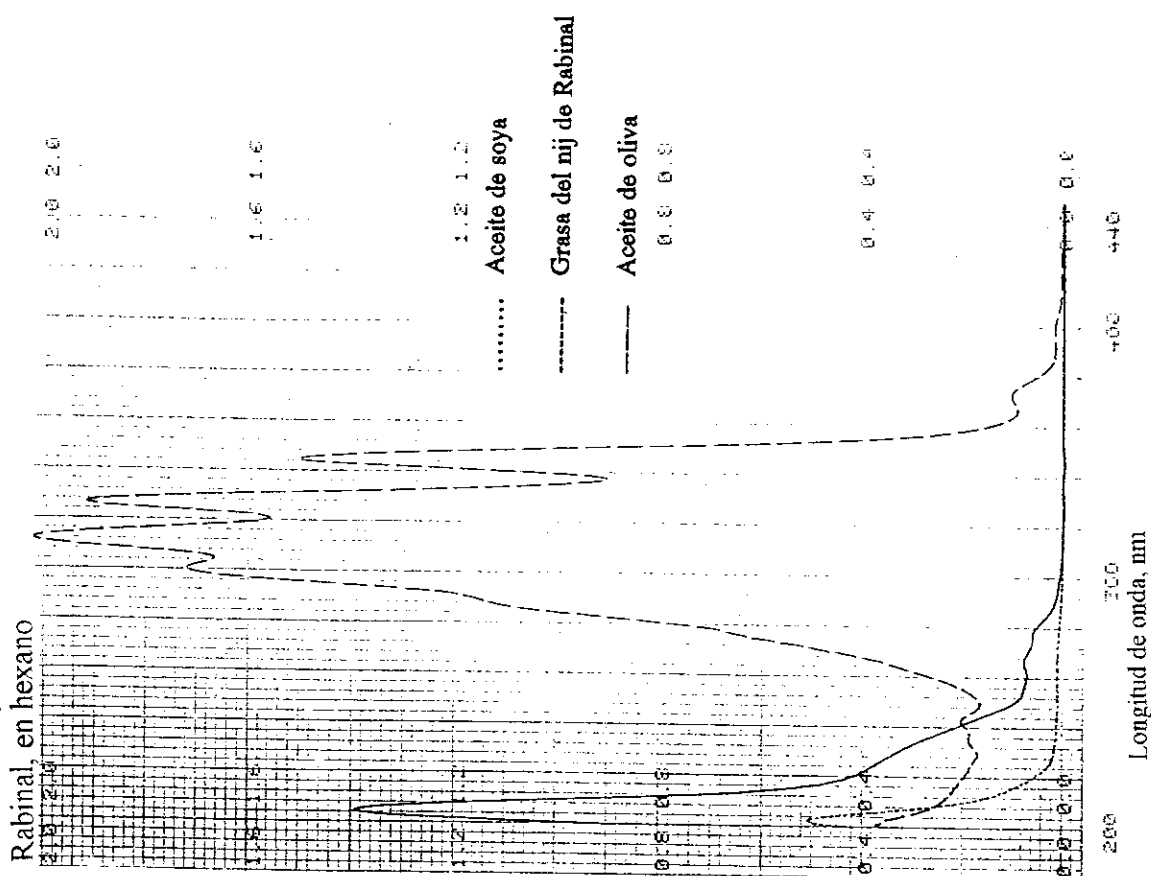


Figura 12
Espectros de absorción ultravioleta-visible de aceite de soya, aceite de oliva y grasa del nij de Rabinal, en hexano



Cuadro 14

Máximos de absorbancia (λ max.) en ultravioleta-visible para las muestras de trioleína, aceite de soya, aceite de oliva, mezcla patrón de triacilglicerolos y grasas del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala, en tetrahidrofurano o hexano

Muestra, conc. g / ml	Solvente	λ max., nm	Absorbancia
Trioleína ^{1,2} , 2.679 X 10 ⁻³	tetrahidrofurano	247.8	0.783 ¹ , 0.671 ²
		269.7	0.456
Aceite de soya ³ , 9.474 X 10 ⁻³	tetrahidrofurano	250.6	1.521
Aceite de soya ⁵ , 2.095 X 10 ⁻⁵	hexano	202.4	0.516
Aceite de oliva ¹ , 2.090 X 10 ⁻²	tetrahidrofurano	249.9	1.708
		269.4	1.508
Aceite de oliva ⁴ , 1.022 X 10 ⁻³	hexano	204.6	1.404
Grasa del nij de Rabinal ² 2.047 X 10 ⁻⁵	tetrahidrofurano	303.4	1.585
		316.4	1.756
		330.6	1.507
		349	1.181
Grasa del nij de Rabinal ⁵ 2.010 X 10 ⁻⁵	hexano ⁶	242.8	0.209
		300.8	1.731
		312.6	2.034
		327.4	1.926
		345.0	1.510
Grasa del nij de Rabinal-Guatemala ³ 2.001 X 10 ⁻⁵	tetrahidrofurano	226.4	0.291
		303.4	1.567
		316	1.875
		330.6	1.753
		348.6	1.396
Mezcla patrón de triacilglicerolos ⁴ < 1.500 X 10 ⁻²	hexano ⁶	212.8	2.749

¹ ver Figura 8² ver Figura 9³ ver Figura 10⁴ ver Figura 11⁵ ver Figura 12

⁶ Se corrió el espectro de la fracción soluble; en el cálculo de la concentración de las diluciones se asumió disolución completa, sin embargo, no se logró disolución completa de la mezcla primaria.

2. Absorción infrarroja

A continuación se presentan los espectros de absorción infrarroja de las muestras de grasa del nij a lo largo de estar expuestas al aire seco, en forma de película delgada sobre ventanas de KCl. Los espectros individuales, a lo largo del tiempo, para las películas de la grasa del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala se presentan en las Figuras 13 y 14, respectivamente. El Cuadro 15 incluye la asignación de las bandas señaladas en las Figuras 13 y 14; en la discusión se analiza el comportamiento de estas bandas a lo largo del tiempo de estar expuestas las películas de grasa. Además, en la Figura 15 se presentan los espectros de absorción infrarroja de aceites de soya y de oliva, corridos como referencia en el presente trabajo.

Al terminar este análisis, resultó imposible desprender, ni aún con ayuda de un gendarme, las películas de grasa formadas sobre las ventanas de KCl. Estas ventanas con las películas, se sumergieron 3-4 días en éter de petróleo y luego, un tiempo similar en acetona. Al sacar las ventanas de la acetona al final de este tiempo, las películas de grasa estaban completamente desprendidas y casi enteras; ya no eran brillante, sino opacas y quebradizas.

Figura 13
Espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco

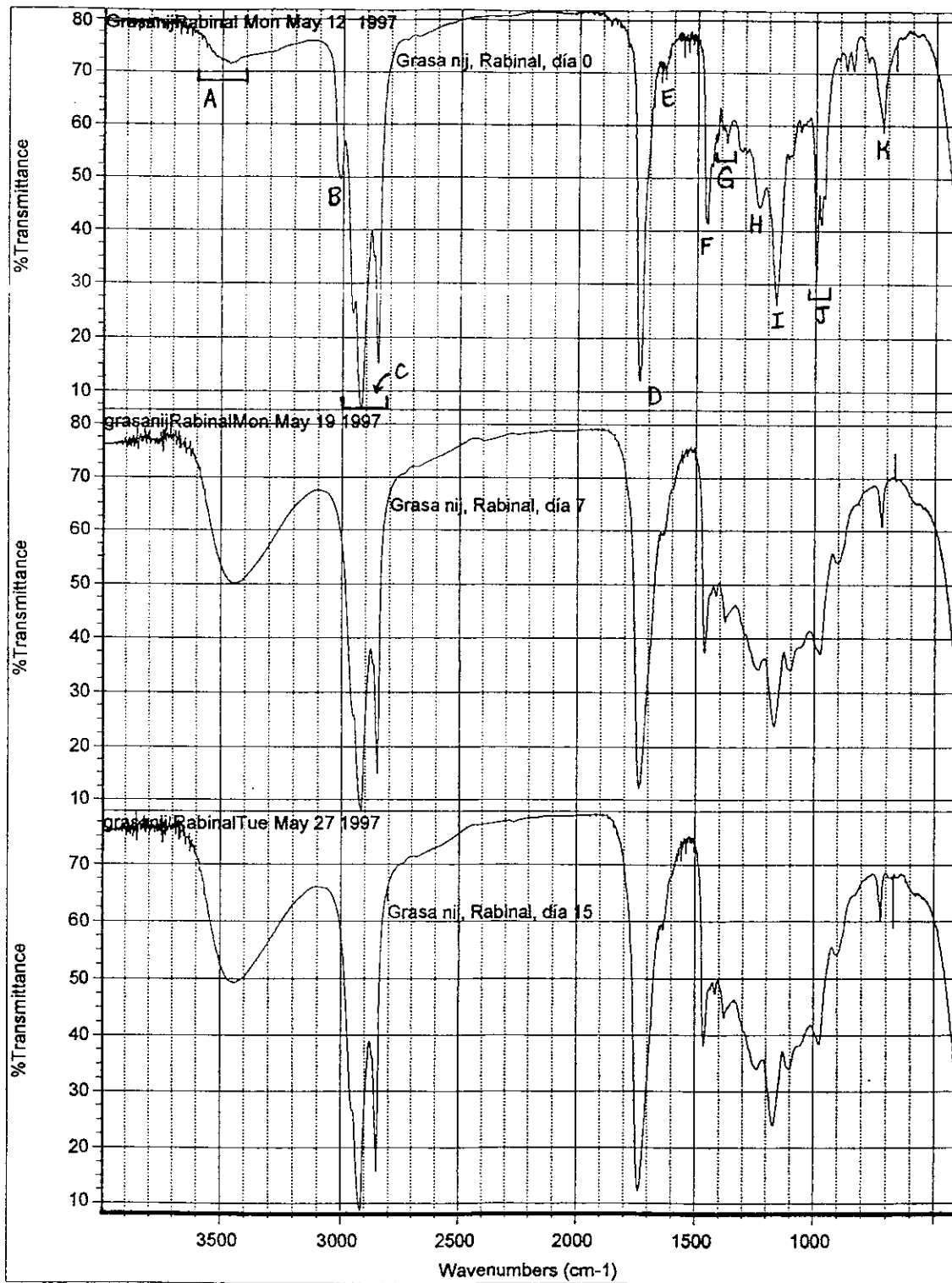


Figura 14

Espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal-Guatemala, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco

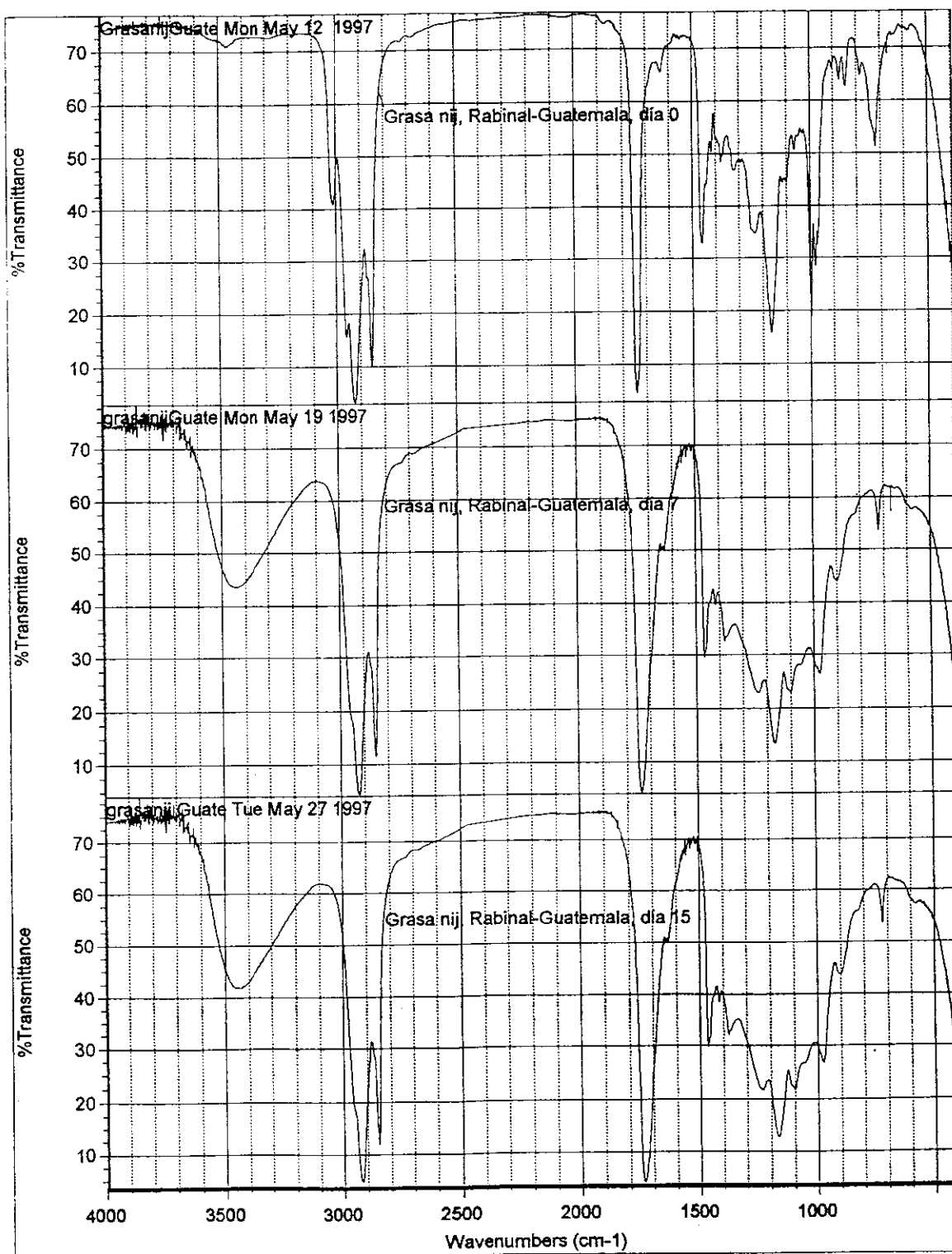
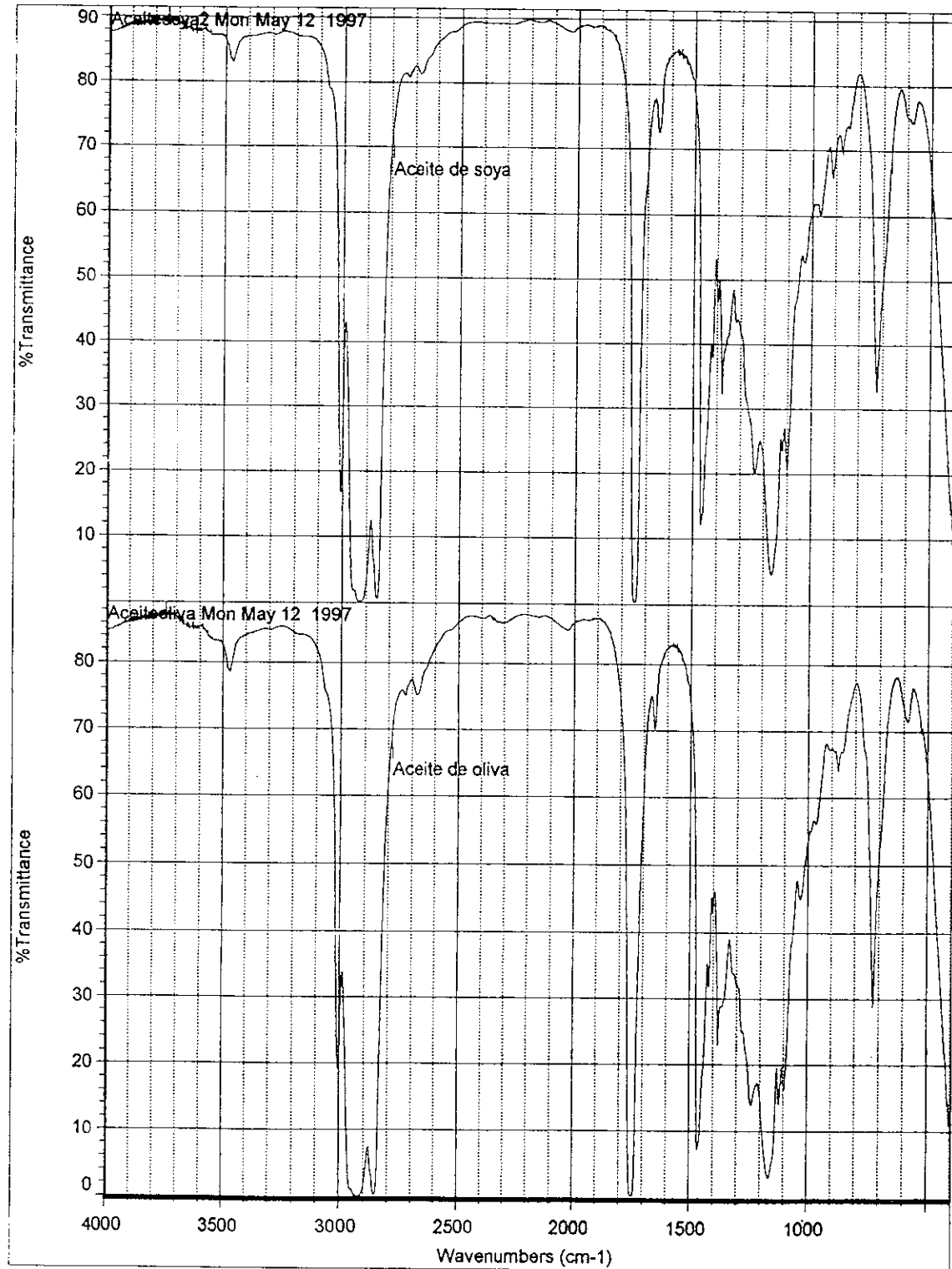


Figura 15

Espectros de absorción infrarroja de aceite de soya y de aceite de oliva frescas, corridos como referencia, en capa delgada entre ventanas de KCl



Cuadro 15

Asignación de bandas de absorción infrarroja de la grasa del nij de Rabinal, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl¹

(Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981; van de Voort et al., 1994)

Banda	Número de onda aprox., cm ⁻¹	Asignación de banda a vibración de grupos funcionales
A	3450	estiramiento O-H en C-O-O-H ²
B	3030	estiramiento C-H en C=C-H
C	2970-2850	estiramiento C-H en CH ₂ y CH ₃
D	1750	estiramiento C=O en ésteres alifáticos
E	1637	estiramiento C=C
F	1450	flexión C-H en CH ₂
G	1420-1330	flexión O-H en C-O-O-H en el plano
H	1250	estiramiento del anillo epóxido -HC-CH-
I	1175	estiramiento C-C-O en ésteres alifáticos
J	990-975	flexión C-H en C=C-H no conjugado. trans
K	720	bambolco de esqueleto con cuatro o más CH ₂

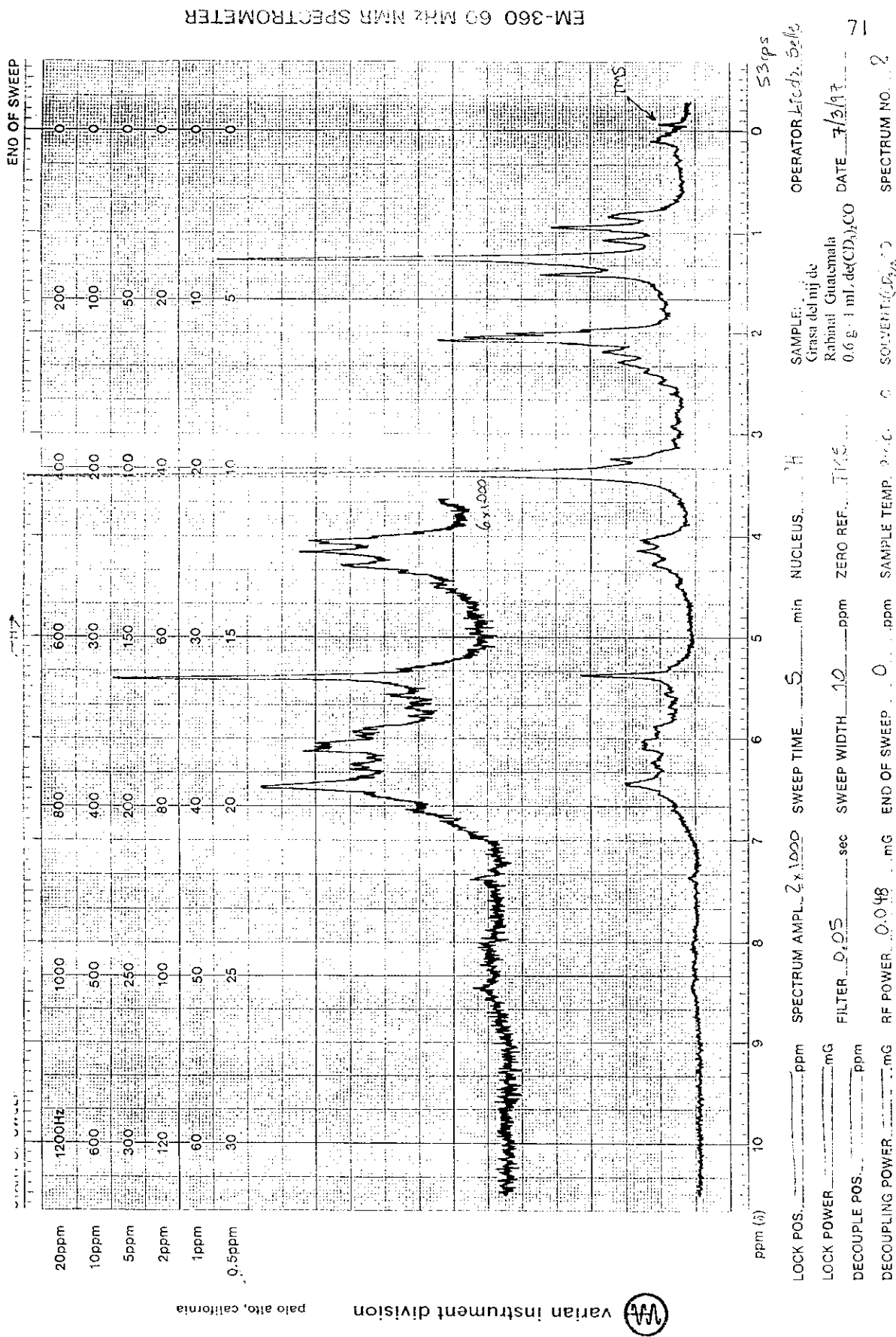
¹ Las bandas se marcaron en el espectro correspondiente al día 0

² Se descartó que se debiera al agua: ver en discusión la sección correspondiente

3. Resonancia magnética nuclear de protones

Las Figuras 16 y 17 presentan los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de la fracciones solubles de la muestra de grasa del nij de Rabinal-Guatemala en acetona y cloroformo deuterados, respectivamente. En el Cuadro 16, se han asignado las bandas más importantes de estos espectros.

Figura 16
Espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la grasa del nij de Rabinal - Guatemala en acetona
deuterada

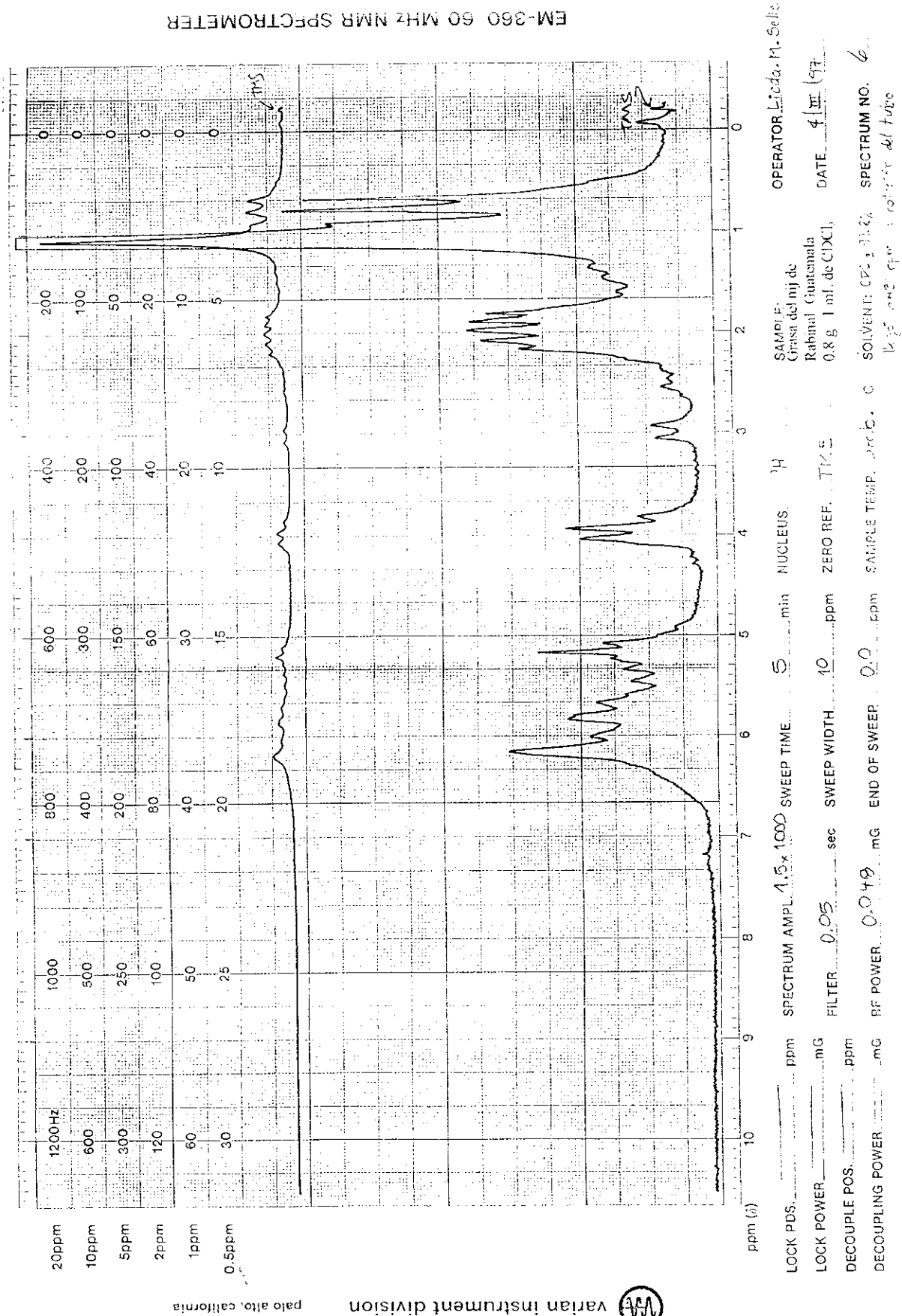


Varian Instrument Division

Varian Instrument Division



Figura 17
Espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la fracción soluble de la grasa del nij de Rabinal-Guatemala, en cloroformo deuterado



Cuadro 16

Asignación de bandas de resonancia magnética nuclear de protones de las fracciones de grasa del nij de Rabinal-Guatemala solubles en acetona y en cloroformo deuterados (Ault and Dudek, 1976; Mathieson, 1965; Silverstein et al., 1981)

Banda	Desplazamiento químico aprox. δ . ppm		multiplicidad	Asignación de bandas a grupos funcionales
	Acetona deuterada ¹	Cloroformo deuterado		
A	0.95	0.90	tripleto	CH ₃ vecinos a CH ₂
B	1.30	1.30	singleto	CH ₂ con desplazamiento químico similar (cadena alifática larga)
C	2.10	1.95	multiplete	CH ₂ vecino a C=C CH ₂ vecino a C=O
D	3.40	3.00	multiplete	CH ₂ vecino a O (ver espectro del glicerol en anexos)
E	4.15	3.90	cuarteto distorsionado	CH ₂ vecino a OC(C=O)R
F	5.30-6.60	5.00-6.40	multiplete	H-C=C-
G	ζ 7.30-8.70? ²	—————	ζ multiplete?	ζ H aromático?

¹ La banda sin asignar, en alrededor de 3.50 ppm, se cree que corresponde a impurezas de acetona en la acetona deuterada

² Sólo observable en amplitud 6 X 1000

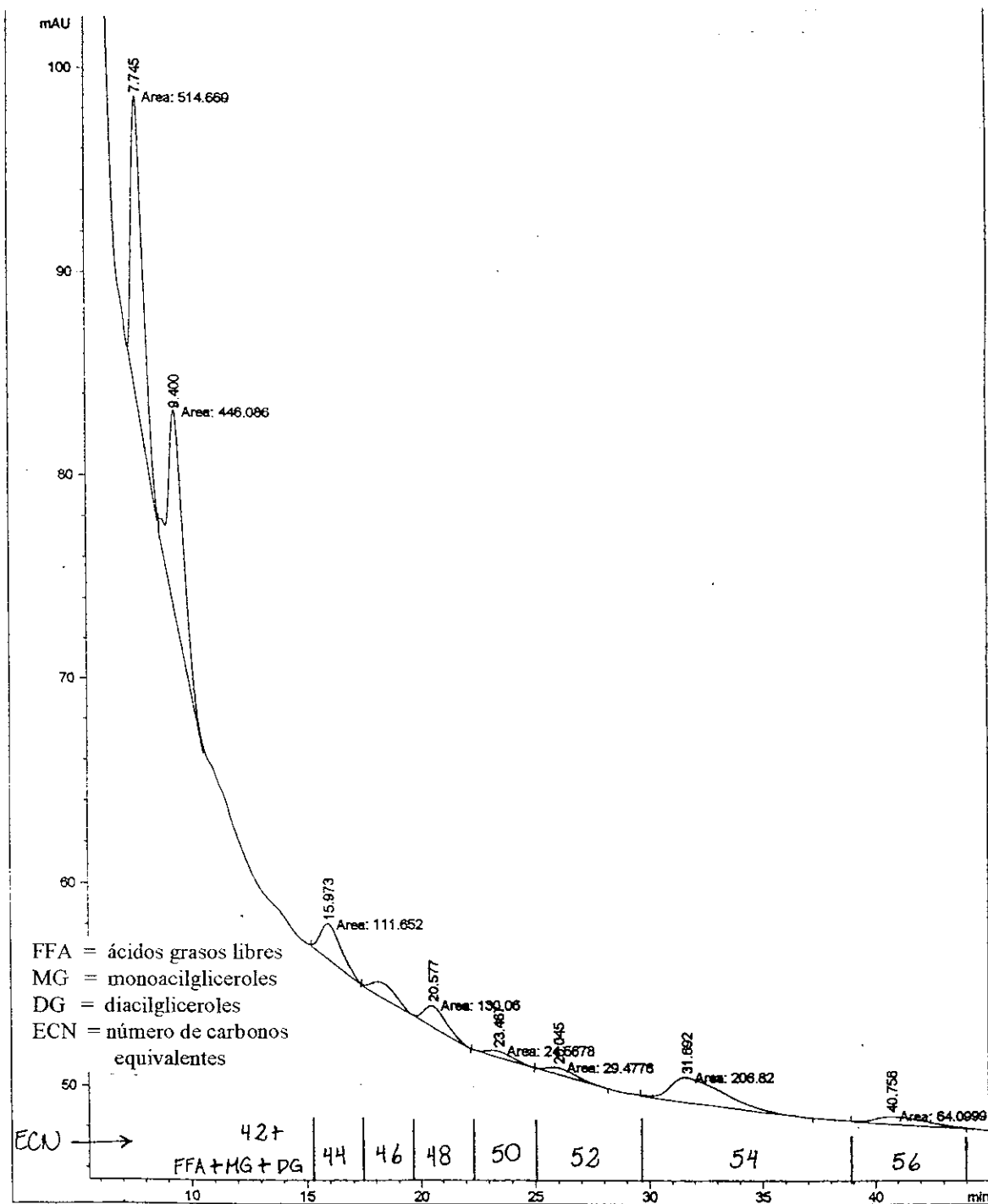
C. Composición en triacilglicerol

El Cuadro 17 incluye los tiempos de retención y porcentaje de área de los picos de los cromatogramas RPHPLC-UV de la grasa del nij de Rabinal y, de aceites de soya y de oliva, corridos como referencia. Los aceites de soya y de oliva se corrieron como referencia por disponibilidad y por haberse obtenido de la literatura, cromatogramas de los mismos en donde se indica la identidad de cada uno de los picos. Las Figuras 18 a la 20 presentan los cromatogramas correspondientes. La información de los tiempos de retención (t_R) y áreas relativas del Cuadro 17 y de las Figuras 18 a la 20 se tomaron de los informes preparados por el sistema Chemstation para adquisición, procesamiento y registro de datos utilizados. El tiempo de retención de un triacilglicerol dado se ha definido en términos de su número de carbonos equivalentes (ECN, por sus siglas en inglés) o número de partición (Christie, 1987). El ECN está dado por: el número real de átomos de carbono en los residuos alifáticos (CN,

por sus siglas en inglés) menos el doble del número de dobles (n) enlaces (los átomos de carbono del glicerol no se toman en cuenta para este cálculo), es decir, $ECN = CN - 2n$ (Christie, 1987). Las regiones de número de carbonos equivalentes para los cromatogramas de los aceites de soya y de oliva fueron estimadas a partir de la información de los cromatogramas de referencia incluidos en el Apéndice D y las regiones de número de carbonos equivalentes para el cromatograma de la grasa del nij se estimaron a partir de la información del Cuadro 17 y de los tiempos de retención de los cromatogramas experimentales de soya y de oliva. Los triacilglicérols mayoritarios para la grasa del nij incluidos en el Cuadro 18 se estimaron a partir de la composición conocida de la grasa, en cuanto a ácidos grasos totales, a partir de análisis de GC-FID y GC-MS de los metil ésteres correspondientes, hecho por Selle (1993). Según este análisis, los ácidos grasos mayoritarios de la grasa del nij, en orden descendente de porcentaje de área relativa son: (18:0), 18:1(Δ^9), 18:2($\Delta^{9,12}$), 22:0, 16:0, 16:1(Δ^9) y 14:0.

Figura 18

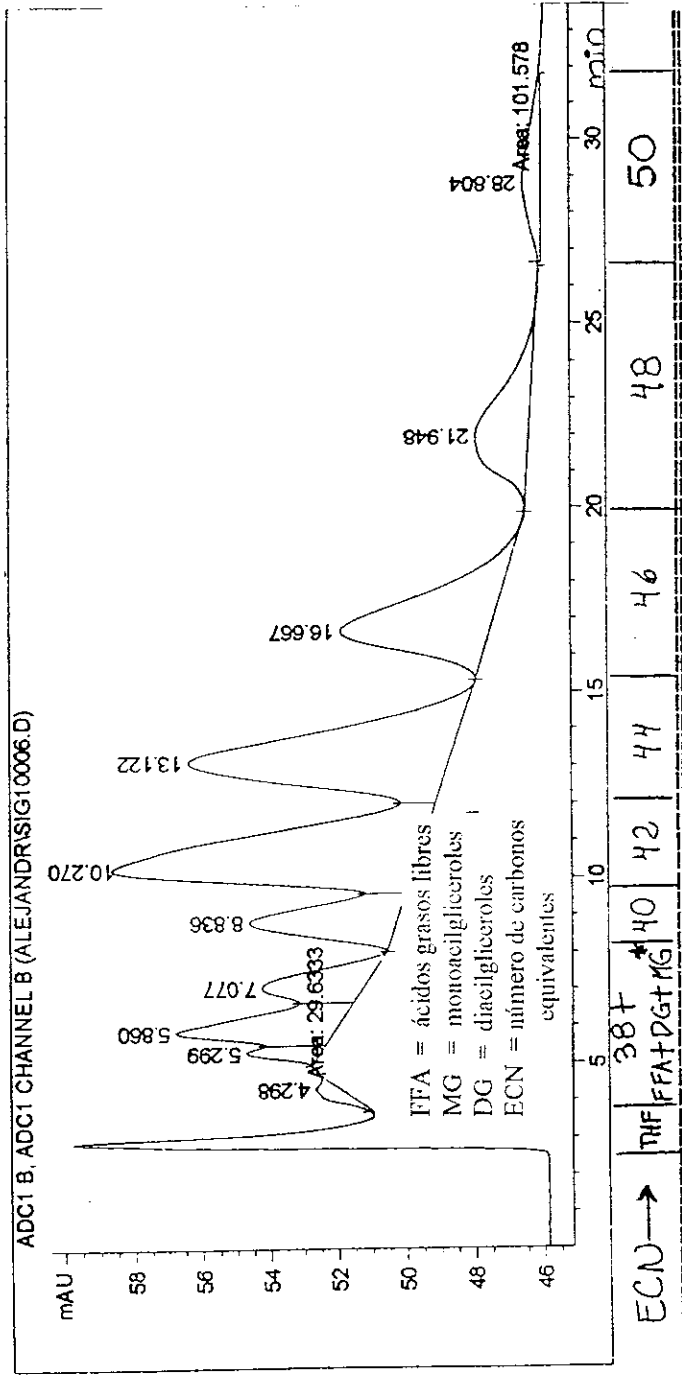
Cromatograma de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, para triacilgliceroles presentes en la grasa del nij de Rabinal



Condiciones de trabajo

Fase móvil ACN / THF 73 / 27 % (v/v) premezclada, filtrada y degasificada
 Flujo de la fase móvil 1.0 ml / min
 Solvente de la muestra tetrahidrofurano
 Detector UV en 250 nm

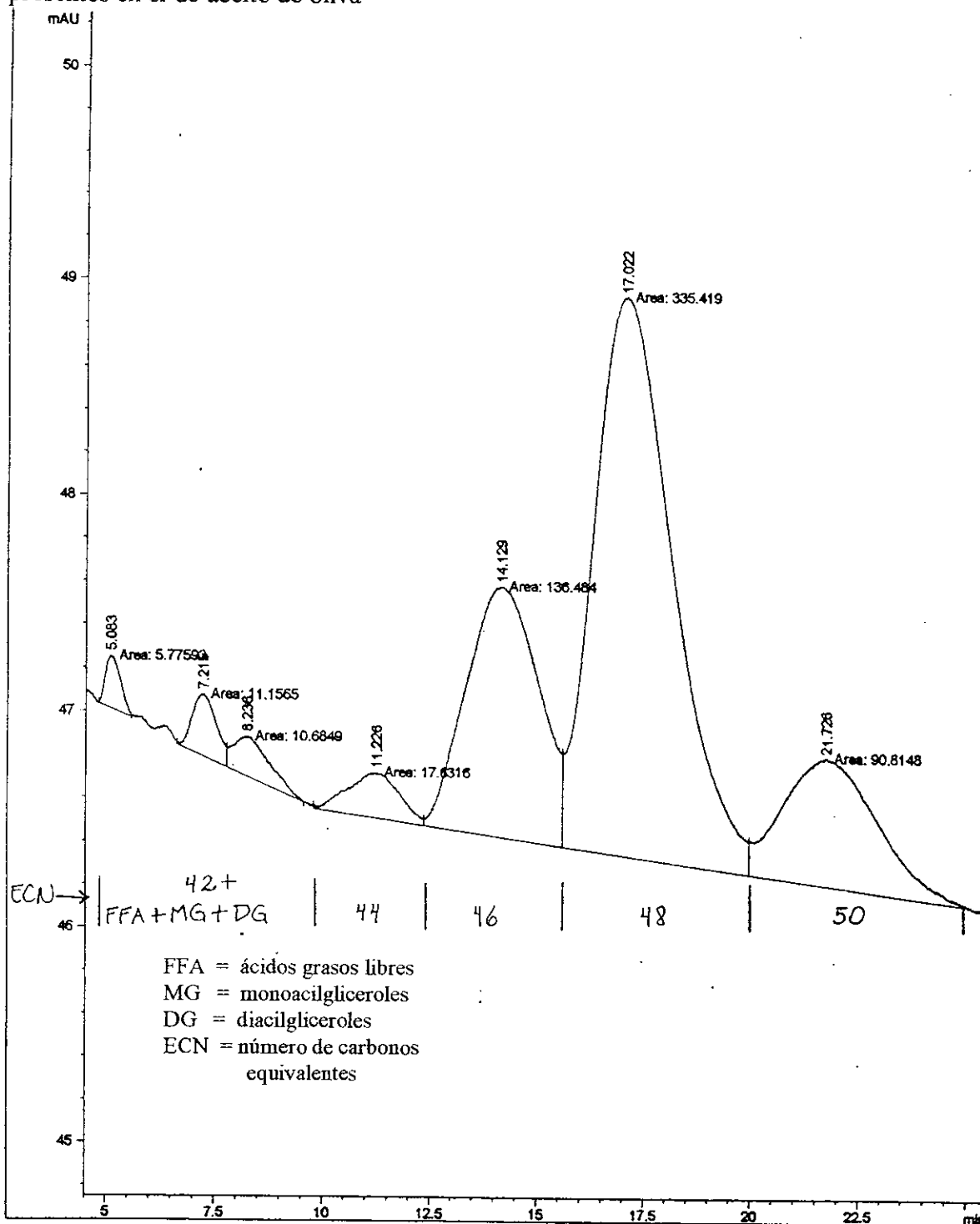
Figura 19
 Cromatograma de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, para triacilgliceroles presentes en el aceite de soya



Condiciones de trabajo
 Fase móvil ACN / THF: 73 / 27 % (v/v) premezclada, filtrada y degasificada
 Flujo de la fase móvil 1.0 ml / min
 Solvente de la muestra tetrahidrofurano
 Detector UV en 250 nm

Figura 20

Cromatograma de líquidos en fase invertida, con detección ultravioleta, para triacilgliceroles presentes en el de aceite de oliva



Condiciones de trabajo

Fase móvil	ACN / THF 73 / 27 % (v/v) premezclada, filtrada y degasificada
Flujo de la fase móvil	1.0 ml / min
Solvente de la muestra	tetrahidrofurano
Detector	UV en 250 nm

Cuadro 17

Tiempos de retención y porcentaje de área de los picos de los cromatogramas de líquidos en fase invertida, con detector ultravioleta, de grasa del nij de Rabinal, aceite de soya y aceite de oliva

Muestra	Pico	t_R , min. ³	% de área	ECN ¹
Grasa del nij de Rabinal	1	7.75	33.70	42 + FFA ²
	2	9.40	29.20	+ MG + DG
	3	15.97	7.31	44
	4	20.58	8.51	48
	5	23.47	1.61	50
	6	26.05	1.93	52
	7	31.69	13.54	54
	8	40.76	4.20	56
Aceite de soya	1	4.30	1.01	38 + FFA + MG + DG
	2	5.30	1.63	
	3	5.86	7.29	
	4	7.08	5.16	
	5	8.84	8.02	40
	6	10.27	25.40	42
	7	13.12	24.51	44
	8	16.67	15.37	46
	9	21.95	8.13	48
	10	28.80	3.47	50
Aceite de oliva	1	5.08	0.95	42 + FFA
	2	7.22	1.84	+ MG + DG
	3	8.24	1.76	
	4	11.23	2.90	44
	5	14.13	22.45	46
	6	17.02	55.17	48
	7	21.73	14.94	50

¹ ECN = número de carbonos equivalentes

² FFA = ácidos grasos libres; MG = monoacilglicerol; DG = diacilglicerol

³ t_R = tiempo de retención

Cuadro 18

Triacilgliceroles mayoritarios más probables en grasa del nij de Rabinal, según composición de ácidos grasos totales ¹, y número de carbonos equivalentes

Triacilglicerol	Símbolo ²	ECN ³
18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	LLL	42
18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	OLL	44
18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	OOL	46
18:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	SLL	46
18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9)	OOO	48
18:0 – 18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$)	SOL	48
18:2($\Delta^{9,12}$) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 20:0	LAA	48
18:0 – 18:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$)	SSL	50
18:0 – 18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9)	SOO	50
18:1(Δ^9) – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 20:0	OLA	50
18:0 – 18:0 – 18:1(Δ^9)	SSO	52
18:0 – 18:2($\Delta^{9,12}$) – 20:0	SLA	52
18:1(Δ^9) – 18:1(Δ^9) – 20:0	OOA	52
18:0 – 18:0 – 18:0	SSS	54
18:0 – 18:1(Δ^9) – 20:0	SOA	54
18:2($\Delta^{9,12}$) – 20:0 – 20:0	LAA	54
18:0 – 18:0 – 20:0	SSA	56
18:1(Δ^9) – 20:0 – 20:0	OAA	56
18:0 – 20:0 – 20:0	SAA	58
20:0 – 20:0 – 20:0	AAA	60

¹ Determinada por GC-FID y GC-MS (Selle, 1993)

² S = esteárico (18:0), O = oleico (18:1 (Δ^9)), L = linoleico (18:2 ($\Delta^{9,12}$)), A = araquidónico (20:0)

³ ECN = número de carbonos equivalentes

VII. DISCUSION

De acuerdo con lo presentado en los Cuadros 8 a 12, las propiedades de la grasa del nij determinadas en este trabajo corresponden a muestras de tres diferentes localidades de origen y proceso. La cantidad disponible, así como la calidad, de cada una de estas tres muestras fue diferente. Fue con base en estos dos aspectos que se decidió cuál o cuáles de las tres muestras utilizar para la determinación de cada propiedad.

A continuación, para cada una de las determinaciones de las propiedades físicas, químicas, espectrométricas y cromatográficas de la grasa del nij, se discute acerca de los resultados obtenidos y las observaciones realizadas; por otra parte se comparan estos resultados con los reportados en la literatura tanto para la grasa del nij como para ciertos aceites y grasas. Dentro de cada subsección también se discuten brevemente las pruebas preliminares que fue necesario realizar y el procedimiento seguido para la determinación definitiva de cada una de las propiedades de la grasa.

A. Determinación de propiedades físicas y químicas

A continuación se presenta el Cuadro 19 que incluye las propiedades físicas y químicas de algunos aceites y grasas, una cera y la grasa del nij. Los valores que allí se presentan para la grasa del nij corresponden a los dados en los Cuadros 8 a 12; los valores para los otros materiales provienen del Cuadro 2.

1. Gravedad específica

Después de hacer varias veces la calibración de los picnómetros tipo Hubbard a usar en la determinación de gravedad específica, según el método "ASTM 1963-8 Standard Test for Specific Gravity of Drying Oils, Varnishes, Resins, and Related Materials at 25°C/25°C" (ASTM, 1992), se concluyó que lo decisivo para lograr una calibración reproducible es que el agua a introducir en el picnómetro esté recién hervida y enfriada en frasco bien cerrado, para minimizar la redisolución del aire. Al mismo tiempo, es decisivo hacer descender el agua que queda dentro del capilar del tapón del picnómetro, para minimizar su evaporación durante la pesada; para esto, se sumerge el picnómetro en agua fría justo antes de pesarlo; la evaporación impediría obtener una lectura estable de masa en la balanza.

De acuerdo con lo indicado en el Cuadro 8, hubo diferencia significativa entre la gravedad específica 25°C/25°C de la grasa del nij de Rabinal, 0.957, y la grasa del nij de Chiapas, 0.963.

Cuadro 19
 Propiedades físicas y químicas de algunos aceites, algunas grasas, y una cera, reportados en la literatura, y de la grasa del nij, según este trabajo (Bennett, 1963; Deuel, 1951; Işgan et al. 1987; Gunstone, 1987; Kirk and Othmer, 1984; Lide, 1990-1991; Lottmann, 1981; Mazuelos, 1986)

ACEITE, GRASA O CERA	Pto. o intervalo de fusión, °C	gr. esp. a 25°C/25°C	Índice de Acidez, mg KOH / g	Índice de Saponificación, mg KOH / g	Índice de Yodo (Wijs), g yodo/100 g
Aceite de semilla de linaza	- 24.0	0.934	—	188-196	168-204
Aceite de semilla de hule	3-7	0.923-0.933	25.2-29.9	190-194	137-140
Aceite de semilla de soya	- 16.0	0.917-0.923	0.6	189-195	117-140
Aceite de oliva	- 6.0	0.908-0.914	17	186-196	76-90
Aceite de fruto de palma africana	27-43	0.9008	—	195-205	35-61
Manteca de semilla de cacao	31-35	0.946-0.971	0.5-1.75	188-198	33-42
Lardo	35-45	0.907-0.951	1.3	190-202	53-77
Cera de la China	81.5-84.0	0.946-0.966	0.2-1.5	73-93	1.4
Grasa del nij ¹	(33.7 ⁴ - 35.3 ³) - (50.8 ⁴ - 52.2 ³)	0.957 ² - 0.963 ³	27 ² - 35 ³	196 ^{2,3}	126 ³ - 145 ² (Hanus)

¹ Resultados del presente trabajo, abarcando lo obtenido para las diferentes muestras analizadas: Grasa del nij de Rabinal², Grasa del nij de Chiapas³, Grasa del nij de Rabinal-Guatemala⁴ (ver Cuadros 8 al 12).

Tanto para los resultados del triplicado de la grasa del nij de Rabinal, como para los de la de Chiapas, se obtuvo un límite de confianza al 95% de ± 0.002 unidades de gravedad específica a $25^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$. El hecho que no se haya logrado una mayor precisión en los resultados podría atribuirse al posible atrapamiento de burbujas de aire durante el proceso de vertido de la grasa en el picnómetro, a pesar de haber tratado de reducir la presencia de éstas en la grasa, fundiéndola al vacío y calentando el picnómetro justo antes de introducirle la grasa.

Para poder comparar valores de gravedad específica, éstos deben haber sido obtenidos bajo las mismas condiciones de temperatura o debe conocerse el factor de corrección de gravedad específica para el tipo de material. En el Cuadro 2 se incluyen, para varios aceites, grasas y ceras, valores de gravedad específica a diferentes temperaturas, en una columna, y corregidos a $25^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$, en otra columna. La corrección involucra un coeficiente de expansión de los aceites y grasas, en general, y la densidad del agua, tanto a la temperatura a la cual estaba dada la gravedad específica como a la temperatura a la cual se desea corregir (Dutton, 1959). Como se puede ver en el Cuadro 18, la gravedad específica determinada en este trabajo a $25^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ para la grasa del nij, la cual va de 0.957 a 0.963, parece ser similar a las reportadas para la manteca de cacao, 0.946–0.971, y para la cera de la China, 0.946–0.966, ambas coregidas a $25^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ (Bennett, 1963; Egan et al., 1987).

En cuanto a valores reportados en la literatura para la grasa del nij, Bloede reporta (Schott, 1869) una gravedad específica de "0.92 a 16°C "; asumiendo que la temperatura del agua también sea 16°C , lo cual Bloede no aclara, la gravedad específica corregida a $25^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ también sería 0.92, por cifras significativas. Según esto, los valores que se obtuvieron en el presente trabajo, 0.957–0.963, son mayores que el reportado por Bloede; no se puede discutir acerca de esta discrepancia, pues Bloede no especifica qué procedimiento se siguió para esta determinación, ni cómo se preparó la muestra para ella.

2. Intervalo de fusión

Ya que una grasa es una mezcla de varios compuestos, la temperatura de fusión de la grasa del nij no es un punto sino un intervalo que, según lo indicado en el Cuadro 9, inicia a una temperatura entre 33.7 y 35.3°C y termina a una temperatura entre 50.8 y 52.2°C . El límite inferior de este intervalo es aquella temperatura a la cual se observa la primera porción líquida; esto se observa en el menisco superior de la grasa, que toma apariencia aceitosa, traslúcida y de color un poco más oscuro que la grasa sólida. Después de iniciada la fusión, la grasa toma una apariencia opalescente hasta el momento en que queda completamente fundida y traslúcida; la temperatura a la que se completa la fusión se toma como el límite superior del intervalo (ver, más adelante, explicación detallada de lo observado para el caso de la grasa del nij).

Para que la diferencia en el intervalo de fusión de dos muestras no sea estadísticamente significativa, deben ser estadísticamente iguales tanto el límite inferior como el superior del intervalo. Con el fin de establecer si las diferencias entre las muestras de grasa del nij son o no significativas, se hizo un análisis de varianza de una vía y comparación de medias de las temperaturas inferior y superior de los intervalos de fusión de las grasas de las tres localidades (ver análisis de varianza y comparación de medias en Apéndice E). Estos análisis señalaron que en cuanto al intervalo de fusión, las muestras de Rabinal y Chiapas no son significativamente diferentes entre sí pero que ambas sí son diferentes de la de Rabinal-Guatemala.

Respecto del comportamiento de las grasas durante el proceso de fundición cabe mencionar que en las grasas de Rabinal y Rabinal-Guatemala, se fundió una mínima parte al inicio del intervalo y la grasa permaneció aparentemente sin cambio hasta que se fundió el resto en los últimos 5°C del intervalo; en la grasa de Chiapas, se fundió aproximadamente la mitad de la muestra en los primeros 5°C del intervalo y luego, se fue fundiendo, poco a poco, a lo largo de todo el intervalo. Esto sugiere una composición diferente entre la grasa del nij de Chiapas y las de Rabinal y Rabinal-Guatemala.

Al hacer pruebas preliminares de la determinación del intervalo de fusión de las muestras preparadas, como se indica en el Apéndice A, se observó que a medida que la muestra se fundía iban desapareciendo las partículas sólidas dispersas en la muestra; sin embargo, después de los aproximadamente 50°C, dependiendo de la muestra, la cantidad de partículas sólidas permanecía aparentemente sin cambio, es decir, ya no parecían fundirse aun calentando hasta más o menos 105°C. Se cree que las partículas sin fundir son parte de la "cáscara" de los bloques de muestra de la grasa que no se había logrado eliminar por filtración a través de la gasa, dado el tamaño de los agujeros de la usada; la gasa tenía un mesh de 20, lo que equivale a un tamaño de partícula de 1.3 mm (Gordon, 1972). Según esto, considerando que dichas partículas eran parte de la "cáscara" que no se logró eliminar en la preparación de la muestra, se tomó como final del intervalo de fusión, la temperatura a la cual ya no se observaba cambio en la apariencia de la muestra (cantidad fija de partículas sin fundir). Para decidir cuál era esta temperatura, se seguía calentando un poco más arriba de la temperatura que se creía que era la indicada.

En general, el punto de fusión de los triacilglicérols se incrementa con el número de ácidos grasos saturados que contengan, del total de los tres posibles, y con la longitud de la cadena carbonada de estos (Lehninger, 1993). Por ejemplo, el punto de fusión de la tripalmitina, triacilglicérol formado por tres ácidos grasos 16:0, es de 65.5°C, el de la tristearina, triacilglicérol formado por tres ácidos grasos 18:0, es de 71.5°C y el de la trioleína, triacilglicérol formado por tres ácidos grasos 18:1(Δ^9), es de 5°C (Bailey, 1945; Lehninger et al., 1993). Los diferentes isómeros de los triacilglicérols que contienen los mismos ácidos grasos tienen puntos de fusión diferentes (Bailey, 1945). Por lo anterior, es difícil relacionar el punto de fusión de la grasa del nij con su composición en triacilglicérols; más adelante se discute el análisis de composición en triacilglicérols de la grasa del nij por

medio de cromatografía líquida de alta resolución.

Un aspecto interesante es que la grasa del nij se vuelve untosa después de frotarla entre las yemas de los dedos; esto se debe, además de que el frotamiento genera calor, a que el límite inferior del intervalo de fusión, alrededor de 34°C, es inferior a la temperatura corporal humana, aproximadamente 37°C. Al manipularla, la grasa no se funde completamente porque no se alcanza el límite superior del intervalo; su textura untosa se debe a que, en este punto, es una mezcla de partículas sólidas y líquidas.

El punto de fusión reportado para la grasa del nij, aproximadamente 49°C (Jenkins, 1962; Schott, 1869), cae dentro del intervalo aquí determinado, 33.7–52.2°C que corresponde al menor límite inferior y al mayor límite superior obtenidos (ver Cuadro 9), y está cerca del límite superior de este. En los análisis reportados por otros autores no se indica cómo se preparó la muestra para determinar este punto de fusión (si se filtró, secó, etc.) o si fue determinado en la muestra como recibida, como la usan los artesanos, factores que podrían afectar el intervalo de fusión y su interpretación. Al comparar el intervalo de fusión determinado para la grasa del nij con el de otras grasas reportadas en la literatura se ve que en este aspecto la grasa del nij es similar al aceite de palma africana, 27–43°C y al lardo de cerdo que tiene un intervalo de fusión de 35–45°C. (Egan et al., 1987; Mazuelos, 1986)

3. Solubilidad en solventes individuales y en mezclas de los mismos

Las pruebas preliminares de determinación de solubilidad de la grasa del nij se hicieron en etanol, acetona, éter dietílico, éter de petróleo y tolueno, individualmente; citados aproximadamente en orden de polaridad decreciente. Estas pruebas preliminares sirvieron para llevar a cabo las modificaciones apropiadas, al procedimiento indicado por Wharh (1956) a fin de obtener resultados lo más precisos posibles. A fin de que las muestras alcanzaran para el resto de análisis que se realizaron, las pruebas definitivas de solubilidad en solventes individuales se llevaron a cabo solamente en etanol, acetona y éter de petróleo, en las muestras de Rabinal y Chiapas; mientras que para la determinación de solubilidad en mezclas de etanol:éter de petróleo y acetona:éter de petróleo, ambas 1:1 (v/v), sólo se usó la muestra de Rabinal. Con la intención de cubrir lo mejor posible el intervalo de polaridades de los solventes, se escogió para las pruebas definitivas, etanol como solvente polar, éter de petróleo como apolar y acetona, de polaridad intermedia entre ambos. Por disponibilidad, a la muestra de grasa del nij de Rabinal-Guatemala no se le llevó a cabo la determinación de solubilidad. Las observaciones indicadas a continuación para solventes individuales, incluyen tanto a los solventes utilizados en las pruebas preliminares como a los usados en las pruebas definitivas.

Al mezclar la grasa del nij con cada solvente o mezcla de solventes y reducir el tamaño de los fragmentos de la misma, se observó que el sobrenadante tomaba un color característico dependiendo del solvente usado. El sobrenadante era de color naranja en el caso de acetona, éter dietílico y tolueno; amarillo-naranja con éter de petróleo, y amarillo con etanol. Es posible que el color del sobrenadante se deba a diferentes compuestos coloreados de la grasa que son solubles en cada uno de los solventes.

Al evaporar el solvente y llevar a masa constante lo que eran los solutos, se observó que la apariencia de éstos era diferente, respecto del color y olor, dependiendo del solvente del cual provenían. En términos generales, lo soluble en acetona, éter de petróleo y éter dietílico casi no tenía olor perceptible, era del color de la solución de la que provenían, formaban una delgada película seca en la superficie y lo que estaba debajo de ésta, tenía una consistencia grasosa; lo soluble en tolueno era similar a lo anterior excepto en que la película superficial no era seca sino pegajosa; lo soluble en etanol era diferente a los anteriores, de color amarillo, consistencia granulosa no grasosa y de olor rancio.

La apariencia granulosa no grasosa en el caso de la parte soluble en etanol hace pensar en una precipitación de proteínas que ocurre precisamente en este solvente; ésto supondría la presencia de proteínas en la grasa, probablemente asociadas con la misma en forma de lipoproteínas. La delgada película, ya sea seca o pegajosa, observada en la superficie de lo que eran los solutos de los diferentes solventes, pudo ser el resultado una reacción de oxidación y polimerización de estos solutos con el aire.

En un boletín publicado en Guatemala para los agricultores (Dirección General de Agricultura, 1940), en el que se le llama "nige" a la grasa del nij, se indica "El nige está constituido principalmente por una grasa amarilla llamada labeína y otra blanca, la nigeína. Tratando la cera en bruto se pueden separar estas dos sustancias por el alcohol, que sólo disuelve la nigeína. La labeína es soluble en éter y en gasolina, y en esta solución de labeína también es soluble la nigeína". Además, Bloede (Schott, 1869) señala que, al igual que otras grasas, la del nij contiene un "aceite fluido" al que le llama "oleína" y un sólido que contiene ácidos grasos como el esteárico, 18:0, y que ambas porciones de la grasa pueden separarse mezclándola con éter en el que es soluble "el aceite" pero no el sólido.

Se cree que los solventes, individualmente, disuelven los compuestos de la grasa que tienen una polaridad similar a ellos. Debido a que la grasa es una mezcla compleja de varios tipos de compuestos, parte de la fracción soluble en un solvente se supone que no es soluble en otro. Más adelante se discuten los resultados de solubilidad de la grasa del nij en mezclas binarias de solventes.

Para estas determinaciones de solubilidad, uno de los pasos que se agregó al procedimiento original dado por Wharh (1956) fue la centrifugación del sobrenadante antes de tomar la alícuota de solución porque en varios casos dicho sobrenadante no era traslúcido debido a sólidos en suspensión. Aún así, en el caso del etanol, el sobrenadante después de

centrifugado no quedó completamente traslúcido. El hecho que no se haya podido obtener una solución verdadera indica que las partículas suspendidas eran de tipo coloidal y que para sedimentarlas era necesario el uso de una centrífuga más potente. Por esta razón, el resultado de solubilidad en etanol se presenta solamente como una cota superior, <7 y <5 masa grasa disuelta, $g \times 100/\text{masa solvente, g}$, para las muestras de Rabinal y Chiapas, respectivamente.

Los resultados presentados en el Cuadro 10 indican que hay diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de Rabinal y Chiapas en cuanto a su solubilidad en acetona, siendo los valores 9 ± 3 y 10 ± 2 para las muestras de Rabinal y Chiapas, respectivamente. La prueba de comparación de medias de Tukey no fue capaz de determinar con exactitud la similitud o no de las dos muestras, respecto de su solubilidad en éter de petróleo siendo el intervalo 12 ± 1 tanto para la muestra de Rabinal como para la Chiapas (ver análisis de varianza y comparación de medias en Apéndice E). Los resultados de la determinación de solubilidad en etanol, de las muestras de Rabinal y de Chiapas, no se tomaron en cuenta para llevar a cabo el análisis estadístico por ser sólo cotas superiores. Además, se puede ver que la solubilidad de las dos muestras aumenta de etanol a acetona y a éter de petróleo lo que, por la disminución de polaridad de los solventes, implica que la grasa del nij posee mayor contenido de componentes muy apolares que de poco apolares; ésto es de esperarse porque los triacilgliceroles, principales constituyentes de las grasas, son muy apolares.

Respecto de los resultados de solubilidad de la grasa del nij en las mezclas de solventes etanol:éter de petróleo y acetona:éter de petróleo, ambas 1:1 (v/v), los sobrenadantes de las mezclas resultantes eran del mismo color naranja, similar al observado al usar sólo éter dietílico como solvente. Justo antes de transferir el sobrenadante a los tubos para centrífuga, se observó que la parte no disuelta de la grasa era mínima, en el caso de la mezcla de acetona:éter, y aproximadamente la mitad del volumen, en el caso de etanol:éter; en ambos casos, la parte no disuelta era de un tono más claro que el sobrenadante. Al igual que cuando se usó sólo etanol como solvente, no fue posible lograr una solución verdadera en el sobrenadante de la mezcla de etanol:éter de petróleo, al centrifuga. Lo anterior causa que los resultados de solubilidad en etanol:éter, como se mencionó anteriormente para el caso del etanol sólo estén expresados como una cota superior <12 masa grasa disuelta, $g \times 100/\text{masa solvente, g}$, y no se hayan tomado en cuenta en el análisis estadístico. Para obtener una solución, en el caso de la mezcla etanol:éter de petróleo, habría sido necesario utilizar una centrífuga más potente.

Después evaporar el solvente y llevar a masa constante las partes solubles de la grasa, se observó que la fracción de grasa disuelta en ambas mezclas no tenía olor perceptible. La fracción soluble proveniente del etanol:éter, tenía apariencia granulosa, ligeramente aceitosa y de color naranja, muy similar al color de la fracción proveniente de la acetona; la fracción proveniente de acetona:éter, tenía una apariencia y consistencia muy similar a la grasa antes de agregarle el solvente.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de solubilidad la grasa del nij de Chiapas en acetona y la grasa del nij de Rabinal en acetona:éter de petróleo 1:1 (v/v). Ya que la polaridad de esta mezcla no es igual a la polaridad del éter de petróleo solo, es muy probable que en esta mezcla y en el solvente individual se hayan disuelto diferentes tipos de compuestos, alcanzándose un porcentaje similar de grasa disuelta.

En la literatura no se encontraron valores de la solubilidad de otros aceites o grasas en ningún solvente o mezcla de los mismos, por eso, no pudo compararse la grasa del nij con otros aceites y grasas con base en este parámetro. Los valores obtenidos para solubilidad son útiles para decidir en qué solvente es mejor disolver la grasa del nij para la determinación de otras propiedades y para su uso industrial, ya sea sola o mezclada con otras sustancias.

4. Índice de acidez

En el método original para la determinación del índice de acidez (IUPAC, 1979) se disuelve la muestra en metilisobutilcetona (4-metil-2-pentanona). No se disponía de esta cetona y el método no da otra opción; se decidió usar 2-pentanona en vez de la metilisobutilcetona por disponibilidad y porque son similares en cuanto a polaridad (Przybytek, 1982). Se redujo el tamaño de la muestra, de los 7.5 g que se usaron en las pruebas preliminares a 4.0 g en las determinaciones definitivas, para que alcanzara la grasa para el resto de análisis. Además, se usó una bureta de (10.00 ± 0.01) ml en las determinaciones definitivas, en vez de la de (50.0 ± 0.1) ml de las pruebas preliminares, para lograr suficiente precisión en los resultados al haber reducido el tamaño de muestra.

En el caso de la muestra de Chiapas, aproximadamente la cuarta parte de la porción pesada no se disolvió en la 2-pentanona; la parte insoluble era del mismo color que la porción de grasa antes de disolver. Lo más probable es que lo que no se disolvió sean restos de la capa externa del bloque de muestra, esto es, grasa oxidada y polimerizada por su reacción con el oxígeno, que no se eliminaron en la etapa de filtración dentro de la preparación de la muestra. Se piensa lo anterior porque en la literatura se encontró que la acetona disuelve aceites sin polimerizar pero no los ya polimerizados (Link, 1959), y se podía asumir que en esto la 2-pentanona tiene un comportamiento similar al de la acetona.

Los resultados de índice de acidez del Cuadro 11 corresponden a triplicados; cada uno de los valores se calculó en la gráfica de la segunda derivada de cada una de las titulaciones de grasa del nij en 2-pentanona con KOH en 2-propanol, tomando como punto final el volumen de titulante en el cual la segunda derivada es cero. Para minimizar el margen de error de hacer gráficamente los cálculos, se amplió la escala de la región donde se esperaba ese cero. En el Apéndice B se incluye, como ejemplo, el cuadro de datos de la titulación de la primera réplica de la grasa del nij de Rabinal; también se incluyen, la gráfica de esta titulación, y las de su primera y segunda derivadas, completas, y la de la segunda derivada

sólo de la región ampliada.

Los valores de índice de acidez reportados aquí son muy superiores a la mayoría de los incluidos en el Cuadro 2; la excepción es la muestra de aceite de semilla de hule analizada por Lottmann (1981), con un valor de 25.2–29.9 mg KOH/g grasa, que es similar al de la grasa del nij de Rabinal. Durante el proceso de purificación industrial de los aceites y grasas comestibles o no, se eliminan, por neutralización con una solución diluida de KOH, la mayor parte de los ácidos grasos libres, responsables del índice de acidez (Bailey, 1945); se piensa que a eso se debe que los valores del Cuadro 2 sean tan bajos. El que los valores de índice de acidez de la grasa del nij y el aceite de semilla de hule sean tan altos, en relación a los demás de este Cuadro, se debe probablemente a que estas dos muestras no fueron purificadas antes de determinárseles este parámetro. En el caso de la grasa del nij, antes de su uso artesanal no se hace ninguna purificación de este u otro tipo.

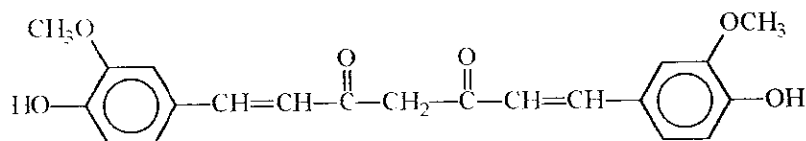
El Cuadro 11 indica que las muestras de grasa del nij de Rabinal y Chiapas analizadas son diferentes estadísticamente en cuanto a índice de acidez, 27 y 35 mg KOH/g grasa, respectivamente. El índice de acidez es una medida del grado en que se han degradado los acilgliceroles de la grasa, dando lugar a los ácidos grasos libres (Egan et al., 1987) que son los que se titulan. No se sabe si la diferencia respecto de este parámetro entre las muestras analizadas, que es un reflejo del avance de la degradación, fue causado más por la localidad que por la edad de la grasa, porque no se tienen muestras de la misma edad, para cada localidad, ni de la misma localidad, de diferente edad. La localidad se refiere a la forma en que se obtuvo y almacenó, y la edad, al tiempo transcurrido desde su obtención. En la obtención se considera importante qué tan bien se lava la grasa del nij con agua y jabón, después de extraída, para eliminar el pigmento hidrosoluble del insecto, pues los artesanos dicen que de no hacerlo, la grasa se "arruina"; también es importante que se elimine el agua residual y los fragmentos de patas y exoesqueleto del insecto (MacVean, 1993). En el almacenamiento se considera importante saber si la grasa se dejó expuesta al aire y/o a la luz, pues estos dos factores aceleran la degradación de la grasa (Deuel, 1951; Egan et al., 1987).

De las dos muestras provenientes de insectos de Rabinal, ambas de 1993, la elaborada en la Universidad del Valle conservaba, después de dos años, el mismo olor característico, el color amarillo y la consistencia suave en el interior, y la delgada "cáscara" era del mismo color amarillo que la grasa. La muestra obtenida en Rabinal tenía un olor característico más intenso, un color marrón claro y una consistencia más dura en el interior, y una "cáscara" más gruesa y dura, de color marrón oscuro. La principal diferencia entre los procesos que dieron lugar a estas muestras fue el cuidado que se tuvo con la elaborada en la Universidad del Valle de eliminar el pigmento hidrosoluble, factor considerado como el más importante en el proceso de degradación. Respecto de la grasa del nij de Chiapas, ésta tenía un olor más intenso, color marrón oscuro y consistencia más dura en el interior, y una "cáscara" mucho más gruesa y dura, en comparación con la grasa del nij de Rabinal.

El término rancidez se refiere a los procesos de degradación de los aceites y grasas. Estos procesos de degradación pueden ser de carácter oxidativo o hidrolítico, y pueden ser causados por actividad enzimática o por oxidación espontánea con el aire. En la rancidez hidrolítica los productos son aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos, tanto de alto como de bajo peso molecular. Los productos de bajo peso molecular, por ser volátiles, son los que contribuyen principalmente al olor rancio de los aceites y grasas. (Deuel, 1951). Ya que la rancidez hidrolítica implica la liberación de ácidos grasos, se puede ver la relación entre el olor rancio más intenso en la grasa del nij de Chiapas y su valor superior de índice de acidez, en comparación con la grasa del nij de Rabinal.

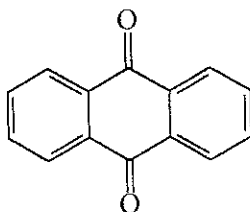
Un aspecto interesante de señalar de la titulación de la grasa del nij, en 2-pentanona con KOH en 2-propanol, es que la mezcla de grasa del nij en 2-pentanona, inicialmente marrón claro, se oscureció justo después del punto final y siguió oscureciéndose gradualmente con cada nueva adición de exceso de titulante. Al respecto, Bloede (Schott, 1869) señala que este cambio de color depende de la materia coloreada de la grasa del nij la cual, como el amarillo tumérico (*Curcuma longa*), cambia a rojo, al parecer como resultado de una reacción básica; se supone que el rojo a que se refiere Bloede es el marrón oscuro que se observó en este trabajo.

La curcumina, una chalcona, se extrae de las raíces de la *Curcuma longa* L. Son cristales naranja-amarillo, insolubles en agua y en éter, y solubles en etanol y en ácido acético glacial. Este compuesto presenta un color café-rojizo (marrón) en medio básico y un color amarillo pálido en medio ácido, pH de viraje 8-9. A continuación se muestra la fórmula estructural de la curcumina.



(Budavari, 1989)

Banks (1977) indica que los pigmentos de los insectos de la superfamilia Coccoidea, a la que pertenece el insecto nij, tienen el esqueleto del antraceno, son antraquinonas y compuestos biosintéticamente relacionados. A continuación se muestra la estructura general de las antraquinonas. Estos compuestos tienen la capacidad, reportados para algunos de ellos, de cambiar de amarillo a marrón al aumentar el pH de ácido a básico.



(Budavari, 1989)

Se cree que la similitud de comportamiento entre la curcumina y las antraquinonas se debe a que ambos compuestos tienen un sistema de anillos conjugados, como puede verse en sus fórmulas estructurales. Para comprobar esta afirmación debería aislar el pigmento del nij y caracterizarlo. Esto no se hizo por ir más allá de los objetivos de este trabajo de investigación.

Aparte del procedimiento seguido para la determinación del índice de acidez de la grasa, y a fin de comprobar si el cambio de color mencionado en el párrafo anterior es reversible, se agregó, a la mezcla de grasa del nij ya titulada hasta el punto final del índice de acidez, un volumen suficiente de una solución de ácido clorhídrico 0.50N para regresar a un pH similar al inicial antes de titular con KOH. Al agregar esta solución de HCl, se observó que el color se iba aclarando gradualmente con la disminución del pH hasta que, al llegar a un pH similar al inicial antes de titular, la mezcla había regresado al color marrón claro. Lo anterior sugiere una reacción reversible de los compuestos que cambiaron de color con el pH, característica de los indicadores ácido-base como las chalconas; esto coincide con lo dicho por Bloede (Schott, 1869). Las chalconas tienen este comportamiento ácido-base por tener un hidrógeno ácido entre los grupos carbonilo. Por otro lado, las antraquinonas en general, tienen un equilibrio más de tipo óxido-reducción que de tipo ácido-base. Así que, lo anterior es una especulación que podría comprobarse al caracterizar el pigmento de la grasa del nij.

5. Índice de saponificación

De acuerdo con el método seguido para la determinación del índice de saponificación (IUPAC, 1979) de la grasa del nij, después de una hora de reflujar la grasa con KOH en 2-propanol, se procedió a titularla con HCl en 2-propanol. Al finalizar el reflujo la mezcla tenía un color marrón oscuro; a medida que se iba titulado con ácido, su color se fue aclarando hasta quedar marrón claro, en un pH aproximadamente de 7. Como era de esperarse, por involucrar una disminución en vez de un aumento de pH, el cambio de color durante la titulación del exceso de base en la determinación del índice de saponificación, fue exactamente inverso al observado en la titulación del índice de acidez. Al terminar la titulación, la mezcla resultante se dejó en reposo toda la noche y al día siguiente se observó sedimentado un sólido granuloso fino de color amarillo y un sobrenadante de un color marrón, ligeramente más claro que el color antes de iniciar la titulación. Lo anterior sugiere que el componente que cambió de color en la titulación es insoluble y al haber estado en suspensión hacía ver la mezcla de un color marrón claro; esto coincide nuevamente con lo señalado por Bloede (Schott, 1869) (ver discusión del índice de acidez). Se dejó sedimentar una muestra saponificada, sin titular, y el sedimento resultó ser del mismo color que la solución, marrón oscuro.

No se sabe qué componente de la grasa, originalmente de color marrón claro, es el que reacciona con la solución de KOH para dar una solución marrón oscuro a caramelo y que

no parece experimentar ningún cambio de color después del punto final, es decir, su reacción parece no ser reversible; este componente podría ser un pigmento de la grasa. Tanto porque Bloede (Schott, 1869) indica que la grasa del nij es difícil de saponificar como por el residuo observado al finalizar el reflujo, se decidió realizar pruebas preliminares; en ellas se aumentó gradualmente el tiempo de reflujo de una prueba a las siguientes, para determinar el punto en el que ya se ha saponificado casi la totalidad de la grasa. Se probó reflujo dos y tres horas pero, no hubo diferencias significativas en el índice de saponificación con el de una hora; por lo que las determinaciones definitivas se hicieron refluendo una hora: el residuo insaponificable fue considerable. La muestra de Chiapas se comportó igual que la de Rabinal, durante el proceso de saponificación. A pesar de que la muestra de Chiapas inicialmente era más oscura que la de Rabinal, el color de la mezcla durante el reflujo y después de la titulación coincidió con el observado para la de Rabinal, lo que sugiere que la muestra ya había sufrido, en mayor extensión, el proceso de degradación que parece ser acelerado por la saponificación.

Las determinaciones de índice de saponificación se hicieron en triplicados. Los valores de cada uno de estas réplicas, al igual que en el caso del índice de acidez, se calcularon a partir de la gráfica de la segunda derivada de cada una de las titulaciones, tomando como punto final el volumen de titulante en el cual la segunda derivada es cero. Para minimizar el error de hacer los cálculos gráficamente, se amplió la escala de la región donde se esperaba ese cero. El Apéndice B incluye como ejemplo, el cuadro de datos de la titulación de la primera réplica de la grasa del nij de Chiapas; también incluye la gráfica de esa titulación, así como de su primera y segunda derivadas completas, y de la segunda derivada, sólo de la región ampliada. El Cuadro 11 indica que los valores de índice de saponificación de las muestras de Rabinal y Chiapas analizadas, ambos como una media los valores obtenidos en cada una de las determinaciones, 196 mg KOH/g grasa para ambas muestras, no son estadísticamente diferentes. Respecto de la repetibilidad de los resultados, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones llevadas a cabo en rápida sucesión no excedieron el 0.2% del valor medio; de esta manera, se cumplió con la repetibilidad requerida por el método utilizado: que la diferencia no excediera al 0.5% del valor medio.

Las muestras de grasa del nij analizadas resultaron ser similares, en cuanto a índice de saponificación, con los siguientes aceites y grasas: lardo, manteca de cacao, aceite de fruto de palma africana, aceite de oliva y aceite de linaza con intervalos 190–202, 188–198, 195–205, 186–196 y 188–196 mg KOH/g de índice de saponificación, respectivamente (Egan et al., 1987; Gunstone, 1987; Kirk and Othmer, 1984; Lide, 1990–1991; Lottmann, 1981). Lo anterior confirma lo indicado en la literatura (Egan et al., 1987; Link, 1959) en cuanto a que el índice de saponificación no es un buen parámetro de identificación porque muchos aceites y grasas naturales tienen índices de saponificación muy similares, entre 190 y 200 mg KOH/g (Deuel, 1951). La utilidad de conocer el índice de saponificación de una grasa es que este parámetro da una idea de la longitud promedio de las cadenas de ácidos grasos, esterificados o no, ya que el índice de saponificación es inversamente proporcional al peso molecular de la grasa (Deuel, 1959; Egan et al., 1987). Esta relación se puede ver al tomar

como ejemplo los triacilgliceroles tripalmitina (16:0) y triesterina (18:0), cuyos pesos moleculares e índices de saponificación son: 806.8 g/mol y 208.6 mg KOH/g, y 890.9 g/mol y 188.9 mg KOH/g, respectivamente (Deuel, 1951).

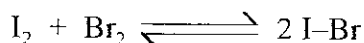
Tanto en el índice de acidez como en el índice de saponificación se hace reaccionar el aceite o grasa con una solución de KOH; para que ocurra la saponificación, no sólo la neutralización de los ácidos grasos libres, la reacción se lleva a cabo en caliente, usando reflujo. Cuando el índice de acidez se resta del índice de saponificación, la diferencia es igual al KOH utilizado para saponificar la grasa; a esta diferencia se llama índice de éster. En los métodos de determinación del índice de saponificación no se acostumbra hacer una corrección para eliminar la contribución de los ácidos grasos libres en el valor del índice de saponificación porque, en el caso de la mayoría de aceites y grasas refinados, como en el de los crudos de alta calidad, los índices de éster y saponificación son prácticamente idénticos, porque el índice de acidez es muy bajo (ver Cuadro 2). (Deuel, 1951). En el caso de la grasa del nij se obtiene un valor de $196 - 27 = 169$ mg KOH/g para el índice de éster.

6. Índice de yodo

a. Índice de yodo de grasa del nij, de su fracción soluble y de su fracción insoluble en éter de petróleo

Para la determinación del índice de yodo se utilizó muestras comerciales de aceite de soya y de aceite de oliva como control, para estimar la exactitud de método. El hecho que los intervalos de índice de yodo experimentales para aceite de oliva y para aceite de soya caigan dentro de los intervalos de índice de yodo reportados en la literatura, da mayor seguridad de que los resultados para las diferentes muestras de grasa del nij son exactos, ya que para la grasa del nij no se encontró en la literatura ningún valor para este parámetro.

El método AOAC 28.021 (AOAC, 1984) (ver Apéndice A) sugiere dos opciones para preparar el reactivo de Hanus para la determinación del índice de yodo: una opción es mezclando el yodo y el bromo en el ácido acético glacial; la otra opción es preparando las soluciones de bromo y yodo en ácido acético glacial por separado, y mezclando volúmenes adecuados de las mismas para obtener el reactivo, justo antes de agregarlo a la muestra. A continuación se muestra la reacción involucrada en la preparación de este reactivo en la que se forma el monobromuro de yodo (I-Br), que es la especie que reacciona con la muestra.



Además, el método indica que, como parte del procedimiento para la determinación del índice de yodo de la muestra, se lleve a cabo una determinación de la misma manera pero sin agregar muestra; esto constituye el blanco del método.

Las pruebas preliminares consistieron en la determinación del índice de yodo de las muestras de aceite de soya y de aceite de oliva (ver reacciones involucradas en esta determinación en las secciones antecedentes, metodología y apéndice A, en la subsección correspondiente a índice de yodo). Fue necesario llevar a cabo estas pruebas dos veces, una con cada opción de preparación del reactivo de Hanus. La primera vez se preparó el reactivo de Hanus justo antes de usarlo, a partir de las soluciones individuales de bromo y yodo. Se esperaba un valor de índice de yodo para el aceite de oliva entre 76 y 90 g yodo/100 g muestra (Kirk and Othmer, 1984) pero, se obtuvo un valor muy por debajo de éste, 34 g yodo/100 g muestra. Al repetir estas pruebas preliminares, preparando el reactivo de Hanus premezclando el yodo y el bromo, se obtuvo valores de índice de yodo de 129 y 83 g yodo/100g muestra, para las muestras de aceite de soya y de aceite de oliva, respectivamente. Estos valores de índice de yodo sí cayeron dentro de los intervalos reportados en la literatura para aceite de soya y de oliva, 117–140 y 76–90 g yodo/100 g muestra (Kirk and Othmer, 1984), respectivamente.

No se tiene una explicación por qué al preparar el reactivo de Hanus de manera distinta afectó los resultados. Una posibilidad es que al preparar el reactivo, premezclando el yodo y el bromo, se favorezca la formación del I-Br, que es el que reacciona con la muestra; mientras que al prepararlo justo antes de usarlo a partir de soluciones individuales de bromo y de yodo, la formación de I-Br sea más lenta después de mezclar las soluciones. Al preparar el reactivo de Hanus premezclado se observó que, al agregar el bromo a la solución de yodo, ésta cambiaba de un color café a marrón, como resultado de la formación del I-Br; así, esto constituye una prueba cualitativa de que ya se ha formado el I-Br.

El procedimiento consistió, en términos generales, en hacer reaccionar durante exactamente 30 minutos, 0.20000–0.30000 g de grasa del nij disuelta en cloroformo con un exceso de una solución de I-Br en ácido acético glacial y luego, titular con una solución patrón de tiosulfato de sodio el halógeno en exceso, es decir, lo que no reaccionó con la grasa. El punto final de esta titulación consiste en la desaparición del color índigo del complejo almidón-yodo. Las reacciones involucradas en esta determinación se encuentran en las secciones de antecedentes, metodología y apéndice A, en la subsección correspondiente a índice de yodo.

Al agregarle a los aceites de oliva y de soya el cloroformo, estos aceites se disolvieron inmediatamente; al agregarlo a las muestras de grasa del nij, éstas sólo se disolvieron parcialmente, obteniéndose una suspensión. Después de estar las muestras de grasa del nij de Rabinal y la de aceite de soya en contacto con el reactivo de Hanus media hora en la oscuridad, se observó que el medio se había oscurecido al color café, característico de la solución de yodo antes de agregarle el bromo. En el caso del blanco y la muestra de aceite de oliva, después de estar media hora en la oscuridad con el reactivo de Hanus, no se observó cambio en el color del medio, es decir que seguía del color marrón del I-Br.

El oscurecimiento del medio en el caso de la grasa del nij de Rabinal, y su fracción soluble en éter de petróleo, así como en el caso del aceite de soya, después de media hora de estar en contacto con el reactivo de Hanus, puede deberse a la liberación de yodo como resultado de la reacción de las muestras con el I-Br. Este oscurecimiento es más evidente en estas muestras por tener índices de yodo relativamente elevados, 143-147, 142-144 y 129 g yodo/100 g muestra, respectivamente, en comparación con el aceite de oliva, que tiene un índice de yodo mucho más bajo, 83 g yodo/100g muestra.

Respecto del punto final de la titulación de las muestras, en el caso del aceite de oliva y el aceite de soya, su color no interfirió con el punto final. En el caso de las muestras de grasa del nij, el color marrón de las mismas dificultaba la observación del punto final en la mezcla bajo agitación magnética, pero como este color sólo se encontraba en la fase orgánica, cerca del punto final se interrumpía la agitación magnética momentáneamente, después de cada adición de titulante, con lo que se separaban las fases y así se podía alcanzar con más precisión el punto final viendo el viraje de índigo a incoloro, en la fase acuosa.

Guerin, citado por José María Roque (1986), indica que la grasa puede separarse en dos fracciones, por su solubilidad en éter de petróleo, y que la fracción soluble tiene propiedades secantes. Por otro lado, también se ha encontrado que los aceites se pueden separar en fracciones que difieren en su grado de insaturación por medio de extracción con un disolvente apropiado (Kirk and Othmer, 1984). A fin de averiguar si la grasa del nij posee dos fracciones con grado de insaturación diferente, se obtuvieron las fracciones soluble e insoluble en éter de petróleo de la grasa del nij de Rabinal de las determinaciones de solubilidad y se les determinó su índice de yodo, que es una medida del grado de insaturación. Este análisis sólo se llevó a cabo con la grasa del nij de Rabinal por disponibilidad de cantidad de muestra.

Durante la preparación de las fracciones en éter de petróleo, se observó que la fracción soluble en éter, después de llevada a masa constante, era de un color marrón más claro y de consistencia grasosa mucho más suave que la grasa inicial. La fracción insoluble en este solvente era una masa de color café, muy dura, quebradiza y no tenía consistencia grasosa. Respecto de la determinación del índice de yodo, la fracción soluble se comportó de manera similar a la grasa original; la fracción insoluble se comportó como las películas expuestas al aire (ver más adelante). Fue necesario reducir el tamaño de partícula de la fracción insoluble en éter de petróleo al agregarle el cloroformo, solvente inicial para la determinación del índice de yodo, porque ésta no se disolvió.

En el Cuadro 12 se muestran los índices de yodo obtenidos para las muestras de grasa del nij de Rabinal, para sus fracciones soluble e insoluble en éter de petróleo y para la muestra de grasa del nij de Chiapas; de un análisis de varianza de una vía y comparación de medias de Tukey, se determinó que estas cuatro muestras son estadísticamente diferentes en cuanto a este parámetro. Según los intervalos para índice de yodo indicados en el Cuadro 3, la grasa del nij de Rabinal y su fracción soluble en éter de petróleo se pueden clasificar como grasas

con propiedades secantes, lo cual coincide con lo señalado por Bloede (Schott, 1869) y por Guerin (Roque, 1986); la grasa del nij de Chiapas se puede clasificar como semi-secante; y la fracción insoluble de la grasa del nij de Rabinal en éter de petróleo, como no secante.

De acuerdo a los valores para índice de yodo de varios aceites, grasas y ceras dados en el Cuadro 2, los valores de la grasa del nij de Rabinal, su fracción soluble en éter de petróleo y la grasa del nij de Chiapas, correspondientes a 143-147, 142-144 y 125-127 g yodo/100 g muestra, respectivamente, son cercanos a los valores del aceite de soya, 117-140 g yodo/100 g muestra (Kirk and Othmer, 1984). Los valores de índice de yodo de las dos primeras muestras de grasa del nij son similares al los del aceite de semilla de hule, 137-140 g yodo/100 g muestra, determinado por Lottmann (1981). La fracción insoluble de la grasa del nij de Rabinal en éter de petróleo tiene un índice de yodo de 56-58 g yodo/100 g muestra, que es similar al del aceite de palma africana y al del lardo. 35-61 y 53-77 g yodo/100 g muestra, respectivamente (Kirk and Othmer, 1984).

En el caso de la grasa del nij de Chiapas, el bajo índice de yodo y el alto índice de acidez obtenidos indica que la grasa estaba bastante degradada, lo que coincide con la observación de que la grasa tenía una apariencia interior mucho más dura que las muestras de Rabinal y de Rabinal-Guatemala. La muestra de Rabinal fue elaborada por los artesanos de Rabinal en 1993; la de Rabinal-Guatemala se elaboró en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala en el mismo año, y la de Chiapas, se cree que fue elaborada por los artesanos de Chiapa de Corzo, Chiapas, en 1991 (MacVean, 1992).

b. Índice de yodo de películas de grasa del nij expuestas al aire ambiental

El propósito de este análisis fue seguir, por medio del índice de yodo, el proceso de oxidación y polimerización de la grasa del nij al exponerla al aire. Esto porque el índice de yodo está relacionado con la concentración de dobles enlaces entre carbonos en la muestra, y el proceso de oxidación y polimerización de la grasa involucra la reacción de estos dobles enlaces con el oxígeno, con lo que disminuye su concentración. En otras palabras, una disminución del índice de yodo indica una disminución en el grado de insaturación en los enlaces entre carbonos. Se tenía planeado exponer la grasa entre 0 y 15 días; por la apariencia ya "seca" de la película expuesta por 12 días se consideró innecesario seguir hasta los 15 días.

Para formar las películas se pesó 0.5-0.6 g de grasa del nij de Rabinal en uno de los lados de una caja Petri de 14 cm de diámetro, se fundió en el horno con vacío a aproximadamente 50°C (límite superior del intervalo de fusión) y, mientras aún estaba caliente, se extendió inclinando la caja Petri a fin de obtener una capa lo más delgada y homogénea posible; esta película se dejó expuesta al aire ambiental. Después del tiempo de exposición dado, y justo antes de la determinación del índice de yodo, se raspó toda la grasa de la caja Petri, con ayuda de una espátula para pesadas analíticas, y se transfirió al erlenmeyer; la mayor parte de la grasa tenía apariencia de película seca debajo de la cual

había, en algunos casos, una capa mínima de grasa. Dado que la película estaba muy bien adherida a la caja Petri, no fue posible quitarla como película sino que tuvo que rasparse para transferirla al erlenmeyer.

Al agregar el cloroformo y reducir el tamaño de partícula con una varilla de vidrio, las películas no se disolvieron; el cloroformo tomó un color amarillo pálido y las partículas de película quedaron flotando en la superficie del cloroformo. Al agregar el reactivo de Hanus no se observó cambio en el color de este reactivo, ni tampoco después de estar en contacto con la grasa media hora en la oscuridad. El color de la fase orgánica no interfirió en la determinación del punto final como en el caso de la grasa completa de Rabinal, que sí interfería.

En la sección de Resultados, el Cuadro 13 contiene los valores de índice de yodo a lo largo del tiempo de estar expuesta al aire la película de grasa del nij de Rabinal y, posteriormente, la Gráfica 1 muestra la tendencia de estos valores. Según dicha gráfica, la mayor disminución del índice de yodo y, por lo tanto de los dobles enlaces, de la grasa del nij de Rabinal, expuesta al aire en forma de película, ocurre en los primeros seis días y luego ya no ocurren cambios importantes respecto de este parámetro. Esto coincide con que alrededor de los seis días, la película formada en la superficie de la grasa ya está “seca” y lisa al tacto y ya no se marcan los dedos al tocarla. Lo anterior coincide con lo indicado en la literatura (Deuel, 1951) para los aceites secantes.

El hecho que el índice de yodo ya no siga disminuyendo después de los seis días, puede deberse a que la capa formada en la superficie de la grasa impide que el resto de dobles enlaces de la grasa, que pudiera haber quedado bajo la película, reaccione con el aire. El valor inicial de índice de yodo de la grasa del nij, 143–147 g yodo/100 g muestra para la de Rabinal, es menor que el reportado para el aceite de linaza, 188–196 g yodo/100g muestra (Lide, 1990–1991), por lo que la concentración de dobles enlaces de la primera es menor que la segunda. El valor de índice de yodo de la grasa del nij está en la frontera de los valores de los aceites semi-secantes y de los secantes, mientras que el de linaza es superior.

Deuel (1951) indica que los aceites secantes tardan entre 2 y 6 días en secarse. El hecho que la grasa del nij tarde tanto tiempo en secarse como los aceites secantes de secado más lento confirma lo señalado por Bloede (Schott, 1869) a este respecto. Además, la velocidad menor en el secamiento también puede deberse a que los valores iniciales de índice de yodo son menores que los reportados para aceites secantes como el de linaza, lo que disminuiría la velocidad de reacción de los dobles enlaces con el aire, pues la velocidad de reacción depende de la concentración de los dobles enlaces (Deuel, 1951).

B. Determinación de características espectrométricas

No se ha encontrado en la literatura, previo a este estudio, ningún reporte de espectrometría de la grasa del nij. El objetivo de las determinaciones espectrométricas era conocer el espectro de la grasa nij en las regiones ultravioleta-visible, infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de protones. En cada una de las secciones de espectrometría se discute, primero, el espectro obtenido en relación con el esperado para un aceite o grasa y, a continuación, diferentes aspectos relacionados con otros objetivos que se han planteado para el análisis.

1. Absorción ultravioleta-visible de grasa del nij en tetrahidrofurano y en hexano

Al analizar los espectros ultravioleta-visible (UV-VIS), por facilidad, se consideraron dos regiones: de 200 a 260 nm y de 260 nm a 400 nm. Dentro de la primera región, la longitud de onda de 220 nm sugerida por el método HPLC AOCS Ce 5b-89 (AOCS, 1989) (ver Apéndice A), para fijar el detector UV, según la literatura, corresponde a la absorción del enlace éster en los triacilgliceroles en tetrahidrofurano (Christie, 1987).

Previo al análisis de las muestras, se corrió una mezcla de patrones de triacilgliceroles. Al correr el espectro de esta mezcla de patrones en hexano, dentro del intervalo de 200–450 nm, sólo se observó una banda con su máximo a aproximadamente 212 nm (ver Figura 11). La longitud de onda para el enlace éster es de 215 nm (Christie, 1987). Esta banda puede experimentar un corrimiento en la longitud de onda esperada dependiendo del solvente utilizado. No se encontró en la literatura el corrimiento esperado para el grupo éster en hexano (Brown et al., 1988; Robinson, 1991; Silverstein et al., 1981), por lo que no fue posible calcular si el corrimiento observado era el esperado. La mezcla de patrones no se disolvió completamente en hexano, posiblemente debido a la alta concentración de la mezcla, 1.500×10^{-2} g/ml como concentración nominal. Se calentó la mezcla para acelerar y mejorar la disolución, pero esto no pareció ayudar. Por todo lo anterior, se presume que se obtuvo el espectro de solamente una fracción de esta mezcla.

Las muestras de la grasa del nij de Rabinal, del aceite de soya y del aceite de oliva fueron completamente solubles en hexano, no así la grasa del nij de Rabinal; fundir la grasa del nij, justo antes de agregar el hexano, no mejoró su solubilidad en este solvente. Al correr los espectros UV de las muestras en hexano, se observó que un máximo a aprox. 202–204 nm (ver espectros en Figura 12) en las tres muestras. No se sabe por qué este máximo no correspondió con el observado para la mezcla patrón de triacilgliceroles en hexano, 212 nm.

Al correr los espectros de las muestras de grasa del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala y, de aceites de soya y de oliva, disueltas en tetrahidrofurano (THF), lo primero que se observó fue que un corrimiento del máximo de absorbancia de 202–204 nm

a 250 nm (ver espectros en Figuras 8–12).

No se sabe con seguridad a qué se debe el corrimiento de banda de las muestras disueltas en THF. El hecho que se haya observado el máximo en todas las soluciones de las muestras en tetrahidrofurano a aproximadamente la misma longitud de onda sugiere como posible explicación una reacción de un producto de degradación del solvente con algún componente de la grasa, dando como resultado grupos funcionales que absorben a otras longitudes de onda. Una probable reacción es la relacionada con la formación de hidroperóxidos en las muestras de aceites y grasas analizados. El tetrahidrofurano, por ser un éter, tiene tendencia a la formación de peróxidos, por lo que generalmente se vende con un estabilizador adicionado como BHT (butil–hidroxitolueno); el tetrahidrofurano utilizado en este análisis no tenía estabilizador. Como se explicó en la sección “Reacciones de degradación de aceites, grasas y ceras”, sección II.A.4., la oxidación de los aceites y las grasas insaturadas pueden darse al reaccionar con oxígeno y esta reacción es catalizada por varios factores, entre ellos la luz UV y peróxidos ya presentes en el medio, ya sea provenientes del propio aceite o grasa o de otros compuestos presentes.

Las muestras de aceites y grasas analizadas tienen al menos dos posibles componentes susceptibles a oxidación por tener dobles enlaces presentes: las cadenas alifáticas de los triacilglicérols y los pigmentos. Estos pigmentos son posiblemente de tipo carotenoide, en el caso de los aceites de oliva y de soya (Egan, 1987), y posiblemente de tipo antraquinona, en el caso de la grasa del nij (Banks, 1977) (ver estructuras de estos compuestos en Apéndice C); se habla más en detalle de estos pigmentos al analizar la otra región del espectro UV–VIS. Así, se especula que es posible que las muestras hayan reaccionado con los peróxidos del tetrahidrofurano formando hidroperóxidos conjugados con dobles enlaces (ver estructuras de estos hidroperóxidos en la sección antes mencionada) y dar una absorción de tipo enona, $C=C-C=O$, que tiene equilibrio ceto–enólico y que aparece alrededor de 250 nm según lo indicado por Silvestein et al. (1981). Esta reacción pudo haber sido catalizada por la luz UV de la fuente utilizada al irradiar las muestras para obtener su espectro UV. Aparentemente, la degradación causada por tetrahidrofurano ocurrió a pesar de que las soluciones de las muestras eran recién preparadas y de que estuvieron protegidas de la luz ambiental desde el inicio.

No fue posible obtener el espectro de la mezcla de patrones de triacilglicérols en THF pues no fue soluble en este solvente. Se cree que la dificultad encontrada al tratar de disolver la mezcla en THF se debió a que por tener cuatro triacilglicérols completamente saturados y uno insaturado, esta mezcla de patrones era más apolar que el THF.

Respecto de la región de 260–400 nm, donde interesaba buscar bandas relacionadas con el pigmento de la grasa del nij, sólo se observaron bandas en las muestras de Rabinal y de Rabinal–Guatemala, tanto en tetrahidrofurano como en hexano (ver espectros en Figuras 8–10 y 12), pero no en las muestras de aceites de soya y de oliva; estas últimas dos muestras eran de color amarillo. Por la forma y número de estas bandas, se cree que se deben a la

presencia de anillos aromáticos en el pigmento de la grasa y por la posición de los máximos de estas bandas, es probable que el sistema aromático sea del tipo antraceno (Silverstein et al. 1984). Banks (1977) indica que los pigmentos de los insectos de la superfamilia Coccoidea, a la que pertenece el insecto nij, tienen el esqueleto del antraceno; son antraquinonas y compuestos biosintéticamente relacionados. Esto es apoyado por la similitud entre esta región del espectro UV de las grasas del nij con los espectros reportados en la literatura para las antraquinonas (ver espectros UV-VIS de algunas benzoquinonas y antraquinonas en Apéndice C); también es apoyado por la capacidad, reportada para algunas de ellas, de cambiar de amarillo a marrón al aumentar el pH de ácido a básico (Budavari, 1989). Este cambio de color coincide con el que ya había sido observado por Bloede (Schott, 1869) en la grasa del nij y con el observado al determinar el índice de acidez y de saponificación de la misma, dentro de este trabajo.

Este pigmento de tipo antraquinona parece ser el mismo para las muestras de grasa del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala, pues se observó que los máximos en los espectros de estas muestras estaban en las mismas longitudes de onda y la forma general de las bandas en la región de 260–400 nm era igual; esto era de esperarse porque ambas muestras de grasa provienen de insectos recolectados en Rabinal. No se observó mayor diferencia entre los espectros de las muestras de grasa del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala en esta región, en tetrahidrofurano y en hexano; los máximos no difirieron más de 4 nm. Aún se desconoce la razón por la cual estas bandas no experimentaron el mismo corrimiento que las bandas de la región de 200–260 nm al cambiar de solvente.

2. Absorción infrarroja de películas de grasa del nij expuestas al aire seco

Se obtuvieron espectros de absorción infrarroja (IR) de películas de muestras de grasa del nij, de Rabinal y de Rabinal-Guatemala, y de aceites de soya y de oliva comerciales. El análisis se realizó dos veces para resolver la duda que quedó al realizarlo por primera vez de si la banda A. de la que se hablará más adelante, era debida a agua o a hidroperóxidos; la segunda vez se colocó desecante de alta capacidad en la desecadora. Además, para mejorar la resolución del espectro, la segunda vez se aplicó una película más delgada de grasa sobre la ventana de KCl. Los espectros incluidos en las Figuras 21 y 22, a continuación, y en la sección de resultados, corresponden a los obtenidos la segunda vez que se llevó a cabo el análisis.

Según la composición esperada de la grasa, triacilgliceroles como componentes mayoritarios y pequeñas cantidades de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, ácidos grasos libres y pigmentos, en el Cuadro 15 se presenta la asignación de las bandas más importantes del espectro IR incluido en la Figura 13.

Para tener seguridad de la presencia de un grupo funcional en IR es necesario verificar la presencia de las bandas características de éste. Por ejemplo, alrededor de 1700 cm^{-1}

absorbe el grupo carbonilo; para discernir si esta absorción es debida al carbonilo de un ácido carboxílico, una cetona, un aldehído o un éster, es necesario asignar otra(s) banda(s) característica(s) de alguno de estos grupos funcionales. Según lo anterior, se logró determinar, como se esperaba, la presencia del grupo funcional éster en la grasa, por las bandas identificadas en el Cuadro 15 como D e I (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981). Las bandas B, C, E, F, J y K indican la presencia de cadenas hidrocarbonadas de más de 4 carbonos de longitud y con una o más insaturaciones (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981); ésto corresponde a las cadenas de ácidos grasos insaturados de los acilglicerolos.

La banda A del espectro de la grasa del nij de Rabinal podría corresponder al enlace O-H de un ácido graso (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981), pues por la determinación del índice de acidez de la grasa, se sabe de la presencia de ácidos grasos libres en la misma; no fue posible asignar la banda correspondiente al grupo carbonilo de estos ácidos grasos posiblemente porque aparece en la misma región del grupo éster, banda D (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981), que en el caso de la grasa del nij, está en mucha mayor concentración, por los acilglicerolos, que el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres. Además de indicar la presencia de un enlace O-H de un ácido graso, la banda A también podría indicar la presencia de pequeñas concentraciones de hidroperóxidos, lo que es apoyado por la banda G (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981; van de Voort et al., 1994) que correspondería al mismo grupo funcional. La presencia de hidroperóxidos es muy probable, pues la grasa analizada no es fresca y por ende puede estar autooxidada; además, no se llevó a cabo ningún proceso de purificación previo, en la preparación de las muestras, que asegurara la eliminación de los hidroperóxidos que pudieran haber estado presentes (ver preparación de la muestra para análisis en el Apéndice A, sección A.1.). Para la eliminación de hidroperóxidos de una grasa, van de Voort y colaboradores (1994) sugieren una extracción de la grasa con hexano, en el que no son solubles los compuestos oxigenados, y recuperación de la grasa al eliminar el solvente en un rotavapor a presión reducida. Se asignó la banda H como correspondiente a un anillo epóxido (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981; van de Voort et al., 1994) que provendría de la reacción de un hidroperóxido con un doble enlace, como parte de la reacción de polimerización para la formación de película.

En este punto es importante hacer notar que, ya que la grasa es un material complejo, la asignación de las bandas en la región del espectro corrida es bastante tentativa, pues en esta región se observan bandas que podrían ser un traslape de bandas correspondientes a diferentes grupos funcionales. Este traslape se debe a que por ser la grasa una mezcla compleja de varias sustancias el espectro obtenido para la misma es la suma de la absorción de los grupos funcionales de estas sustancias. A eso se atribuye que no haya sido posible determinar la presencia de otras bandas que confirmaran la presencia de otros grupos funcionales esperados. No se observó una banda débil entre $3050-2990\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento C-H del anillo epóxido (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart,

1974; Silverstein et al., 1981), que confirmaría la presencia de este grupo funcional, porque en esa región aparece la banda B correspondiente al estiramiento C–H del enlace C=C–H (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981). No fue posible verificar la presencia de la banda entre 769–650 cm^{-1} correspondiente a la flexión O–H en C–O–O–H (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981), posiblemente por traslape de bandas, que confirmaría la presencia de hidroperóxidos. Otra banda que no se pudo ubicar fue la de 730–665 cm^{-1} correspondiente a la flexión C–H en C=C–H en configuración *cis* (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981), que es la más común para los ácidos grasos insaturados de aceites y grasas naturales, tal vez porque esta banda normalmente es muy débil. No se pudo verificar la presencia de enlaces de tipo éter C–O–C ni de tipo peróxido C–O–O–C, en 1125 cm^{-1} y 890–820 cm^{-1} respectivamente (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981), de nuevo posiblemente por traslape de bandas, que se esperaban siendo parte de la red supuestamente presente en la película formada a partir de la grasa; estas bandas corresponderían al estiramiento de estos enlaces.

Respecto de la presencia de un pigmento tipo antraquinona en la grasa, para verificar la presencia de éste se buscó bandas en la región 2000–1650 cm^{-1} que corresponde al estiramiento C–H del anillo aromático y, las bandas 1690–1660 cm^{-1} y 1655–1635 cm^{-1} correspondientes al estiramiento de dos C=O en el mismo o diferentes anillos de una quinona, respectivamente (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981); no fue posible detectar ninguna de estas bandas en este espectro quizá porque, por ser pigmentos, están presentes en concentraciones muy bajas. Para identificar el pigmento hubiera sido necesario extraerlo de la grasa y obtener sus espectros UV–VIS, IR y $^1\text{H-NMR}$, ésto no se hizo, pues iba más allá de los objetivos originales de la presente tesis.

Como era de esperarse, el espectro IR de la grasa del nij de Rabinal–Guatemala, corrido el mismo día bajo las mismas condiciones que el de la grasa del nij de Rabinal, fue cualitativamente similar por lo que la asignación de las bandas discutida hasta el momento también es válida para este espectro.

En la literatura (Lottmann, 1981) sólo se encontró el espectro IR del aceite de semilla de hule *Hevea brasiliensis* (semi–secante) (ver espectro IR correspondiente en Apéndice C, hay corrimiento en la escala de este espectro) que, según análisis anteriores, es similar a la grasa del nij. En el presente trabajo, se corrieron, como referencia, espectros de aceite de soya y aceite de oliva comerciales (ver Figura 15), aceites que también han resultado similares a la grasa del nij en análisis anteriores. Al comparar los espectros de estos tres aceites entre sí, y con el inicial de la grasa del nij de Rabinal, se observó que poseían básicamente las mismas bandas. Según Link (1959), la identificación por IR de aceites secantes y semi–secantes naturales, como los de hule, soya y oliva no es práctica porque sus espectros IR son indistinguibles. La banda J (Chapman, 1964; Conley, 1972; Hannah and Swinehart, 1974; Silverstein et al., 1981) del espectro de la grasa del nij es la única banda importante que está ausente en los espectros de los aceites de hule, soya y de oliva. Los dobles enlaces en

configuración *trans* no son comunes en las grasas y aceites naturales, así que su presencia en la grasa del nij, si es que la asignación es correcta, puede deberse a una isomerización del doble enlace. Dichas isomerizaciones pueden suceder en el proceso de preparación de la muestra de grasa para análisis, que involucró un calentamiento alrededor de su punto de fusión justo antes de extenderla en forma de película, o durante el proceso de autooxidación y polimerización de esta película.

En la literatura no se encontraron espectros IR de acilglicerolos, pero sí de ácidos grasos insaturados y sus correspondientes metil ésteres (ver en el Apéndice C). Al comparar el espectro inicial de la grasa del nij de Rabinal con éstos, como se esperaba, se observó que el espectro de la grasa del nij es muy similar a los de los metil ésteres, incluyendo la región de huella digital, a aproximadamente $1430\text{--}830\text{ cm}^{-1}$ (Conley, 1972); esto implicaría que las absorciones de la grasa del nij en la región de huella digital son principalmente debidas a la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados y al grupo éster.

Uno de los objetivos principales del análisis IR era ver si era posible determinar la desaparición de los dobles enlaces como resultado del proceso de autooxidación y polimerización de la grasa. Según esto, se procedió a correr el espectro de la película a lo largo del tiempo de estar expuesta al aire seco. Para evitar que la película se humedeciera, así como el opacamiento de las ventanas de KCl donde estaba adherida la película, éstas se colocaron en la desecadora, entre corridas. En las Figuras 14 y 15 se presentan los espectros IR de muestras de grasa del nij de Rabinal y de Rabinal-Guatemala, respectivamente, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta la grasa al aire seco; en las Figuras 21 y 22 se presentan estos mismos espectros pero superpuestos. Como se esperaba según la literatura (van de Voort et al., 1994), se observó la disminución de la intensidad de la banda B de estiramiento de C-H en C=C-H hasta su desaparición, lo que implicaría una disminución en el número de dobles enlaces en la grasa a lo largo del tiempo de exposición al aire.

La banda A, asignada al estiramiento del enlace O-H en los hidroperóxidos (C-O-O-H), se observó desde la primera vez que se corrió el espectro de la grasa del nij. Ya que en ese número de onda también absorbe el enlace O-H del agua (H-O-H), como se mencionó al inicio de esta sección, se decidió repetir el análisis al colocar desecante nuevo en la desecadora; se confirmó la asignación pues la banda se mantuvo. Se observó un aumento en la intensidad de la banda A durante el mismo período de exposición al aire seco, como resultado de la reacción de autooxidación de la grasa. La asignación de la banda A se hizo ya eliminada la sospecha del agua y comparando la forma y posición de esta banda con aquella en los espectros IR de la literatura del hidroperóxido de *ter*-butilo y, de los alcoholes glicerol y *ter*-butanol (estos espectros se incluyen en el Apéndice C). El aumento de la intensidad de la banda A, de hidroperóxidos, sugiere que la película de grasa se polimeriza con formación de enlaces peróxido entre las cadenas de los ácidos grasos insaturados, por medio de mecanismo de reacción en cadena de radicales libres.

Figura 2.1

Superposición de espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco

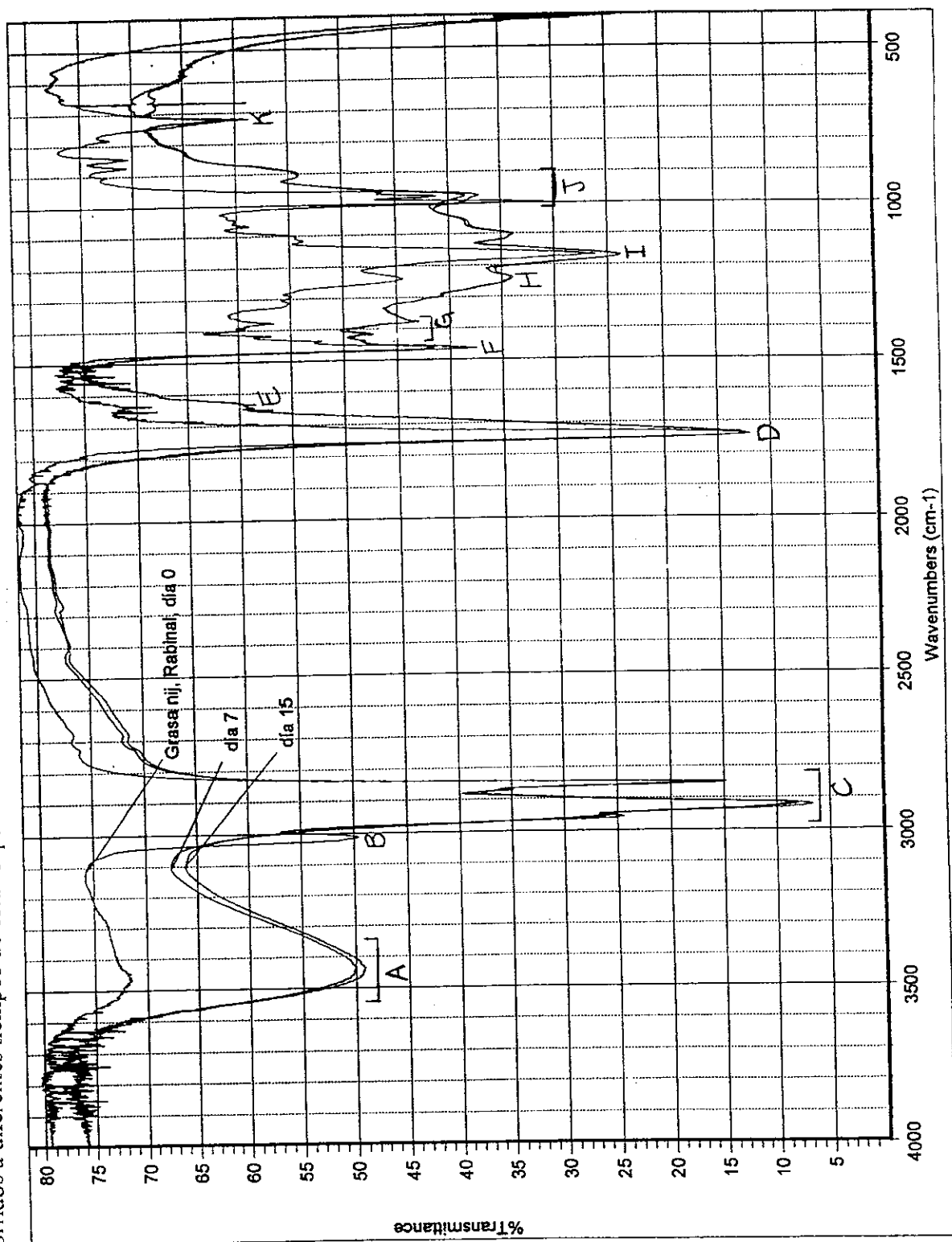
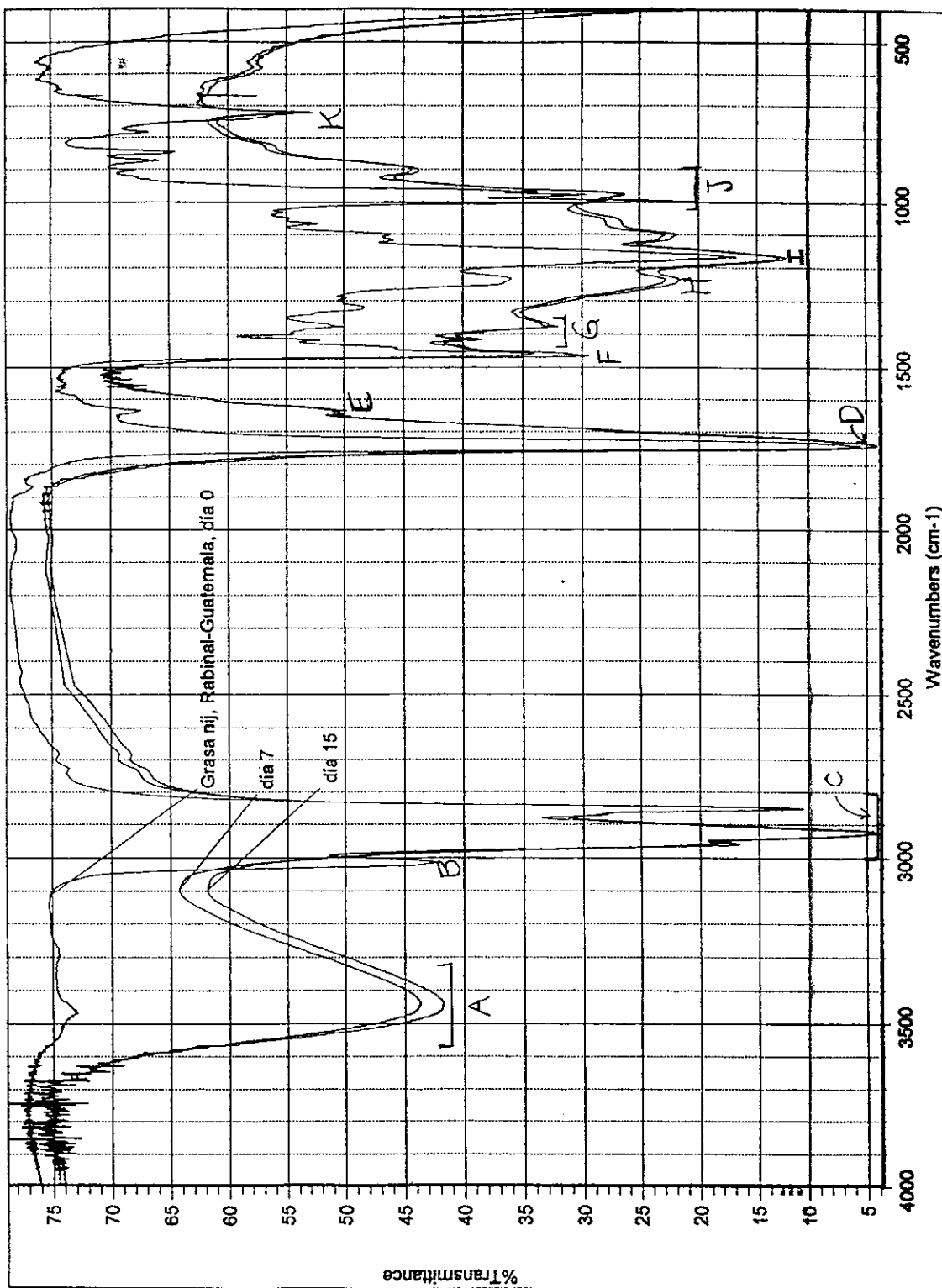


Figura 22

Superposición de espectros de absorción infrarroja de grasa del nij de Rabinal-Guatemala, aplicada como película delgada sobre ventanas de KCl, corridos a diferentes tiempos de estar expuesta al aire seco



No está completamente claro el proceso de polimerización de la grasa del nij porque según la literatura disponible (Lillard, 1983; Lundberg, 1962) los hidroperóxidos son los productos iniciales e intermediarios de la reacción de autooxidación de la grasa y se descomponen para dar peróxidos conforme el proceso avanza. Según esto, se esperaría el aumento de la banda A, correspondiente al estiramiento del enlace O-H en los hidroperóxidos (C-O-O-H), al principio y luego su desaparición; al mismo tiempo se esperaría la aparición y aumento de la banda correspondiente a los enlaces C-O-O-C, entre 890-820 cm^{-1} (Conley, 1972). Eso no es lo que ocurrió sino que, después de su aumento de intensidad, la banda A, ya no pareció sufrir cambio; tal vez por haber quedado hidroperóxidos atrapados en el interior de la película polimérica que ya no estarían expuestos al aire y, por lo tanto, ya no podrían continuar reaccionando. Además, no se logró ubicar la banda del enlace C-O-O-C, que según la literatura es muy débil (Conley, 1972).

Respecto de la banda E, correspondiente al estiramiento C=C, se esperaba que disminuyera en la misma proporción que lo hizo la banda B pero éste no fue el caso; aún no está claro este aspecto. La absorción de la banda J, correspondiente a la flexión C-H en C=C-H no conjugado *trans*, pareció disminuir ligeramente a lo largo del tiempo lo que es congruente con su asignación, pues se cree que debido al proceso de oxidación y polimerización disminuye el número de dobles enlaces. Sin embargo, si así fuera debería haber desaparecido completamente como lo hizo la banda B; es posible que su desaparición se deba al traslape de esta banda con otras en esta región de huella digital.

Al analizar el comportamiento de las diferentes bandas a lo largo del tiempo en la región de huella digital, se observó que hubo un aumento de absorción y el espectro pareció perder resolución. Se cree que el aumento en la absorción en esta región se debe al aumento en la concentración de ciertos grupos funcionales como resultado de la polimerización.

Para decidir a qué tiempo parar el seguimiento del espectro IR de la película de grasa, se esperaba que los espectros sucesivos ya no cambiaran cualitativamente, indicando esto que ya había terminado el proceso de autooxidación y polimerización de la película. En esto, se observó un efecto del grosor de la película aplicada sobre la ventana de KCl: la primera vez que se realizó el análisis, aun después de cuatro semanas de estar expuesta la película al aire, el espectro seguía cambiando. La segunda vez que se realizó el análisis, la capa fue mas delgada, ya no se observó cambio en el espectro entre la primera y la segunda semana, lo que indica que la película se polimerizó completamente en el transcurso de la primera semana de estar expuesta al aire. Este segundo tiempo coincide bastante bien con el de seis días correspondiente al tiempo en el cual deja de disminuir del índice de yodo de la película de grasa del nij expuesta al aire (ver Cuadro 13 y Gráfica 1). Esta comparación de IR con índice de yodo debe tomarse con cuidado, pues las películas preparadas para ambos análisis no eran de grosor idéntico.

En la literatura (van de Voort et al., 1992) se encontró un método numérico para la cuantificación de la disminución de las bandas del espectro IR, relacionadas con los dobles

enlaces, al exponer la película al aire y para el cálculo del índice de yodo a partir del espectro IR del aceite o la grasa. Se sugiere intentar este método en estudios futuros, ya que eliminaría la necesidad de llevar a cabo la determinación directa del índice de yodo, que involucra la utilización de reactivos tóxicos y requiere más tiempo que correr un espectro IR.

3. Resonancia magnética nuclear de protones de fracciones de grasa del nij solubles en acetona y en cloroformo

Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR) de las fracciones de grasa del nij solubles en acetona y cloroformo deuterados. Este análisis constituyó una primera aproximación del ^1H NMR de la grasa del nij; no se intentó trabajar con fracciones más específicas, como la del pigmento, porque no era uno de los objetivos de la tesis.

Lo primero que se observa en estos espectros ^1H NMR (ver Figuras 16 y 17) es su falta de resolución debida a que, como cualquier grasa o aceite, la grasa del nij es una mezcla compleja de acilgliceroles con diferentes combinaciones de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, siendo los triacilgliceroles los compuestos mayoritarios. Además, los compuestos alifáticos de cadena larga, como es el caso de la grasa del nij, presentan espectros ^1H NMR poco resueltos, ya que las señales correspondientes a la mayoría de los protones de la cadena alifática son muy similares; entonces, al traslaparse producen bandas anchas en vez de bien definidas (Ault and Dudek, 1976). De estos espectros solamente se pueden clasificar los tipos de protones presentes en las moléculas por las regiones del espectro donde salen las bandas.

La grasa del nij, como cualquier grasa de origen natural, está constituida por triacilgliceroles como componentes mayoritarios, y monoacilgliceroles, diacilgliceroles, ácidos grasos libres y glicerol, provenientes de la degradación de los triacilgliceroles, como componentes secundarios. Según esa composición, se analizó los espectros obtenidos para la grasa y se asignó las bandas correspondientes a cada uno de los tipos de protones presentes en los ésteres de los ácidos grasos que en orden creciente de desplazamiento químico son: protones de los metilos vecinos a metilenos, banda A; protones de metilenos, banda B; protones de metilenos vecinos a dobles enlaces y vecinos a grupo carbonilo, banda C; protones de metilenos vecinos a oxígeno del éster del glicerol, que no es del carbonilo, banda D; protones de metilenos vecinos al grupo éster, $-\text{OC}(\text{C}=\text{O})\text{R}$, banda E; protones de los metinos, banda F.

Cualitativamente, los espectros de las fracciones de la grasa del nij de Rabinal-Guatemala solubles en cloroformo y en acetona deuterados son muy similares. A la banda más intensa del espectro en acetona, en alrededor de 3.50 ppm, y que no está presente en el espectro en cloroformo, no se le asignó ninguna letra, pues se cree que corresponde a

impurezas de acetona sin deuterar. Las concentraciones de las mezclas, la apariencia de las fracciones solubles y las amplitudes necesarias para correr los espectros, sugieren que el cloroformo fue un mejor solvente para la grasa que la acetona.

No se encontró en la literatura espectros ^1H NMR de acilgliceroles, tanto saturados como insaturados, sino solamente de algunos ácidos grasos de cadena larga, y de algunos metil y étil ésteres de ácidos grasos de cadena larga (ver algunos de estos en Apéndice C). La asignación de las bandas en los espectros ^1H NMR de la grasa del nij de Rabinal-Guatemala, presentada en el Cuadro 16, corresponde bastante bien con la estructura de un acilglicerol diinsaturado. De los espectros presentados, los que poseen mayor similitud con el espectro de la grasa del nij de Rabinal-Guatemala, tanto en multiplicidad y desplazamiento químico de las bandas como en su intensidad relativa, son los del etil éster del ácido linoleico y del metil éster del ácido esteárico; ambos ácidos grasos esterificados con glicerol (como acilgliceroles) son mayoritarios en la grasa del nij según la composición ya citada.

Los mono y diacilgliceroles son resultado de la hidrólisis parcial de los triacilgliceroles, así que otro producto de esta reacción son los ácidos grasos libres. El protón correspondiente a los ácidos grasos libres aparece alrededor de 10–13 ppm. Se corrió el espectro de la grasa del nij en esta región y no fue posible detectar ninguna banda. Se desconoce la razón de que no haya sido posible observarla pues, según la determinación del índice de acidez, la grasa del nij posee una elevada proporción de ácidos grasos libres.

Respecto del pigmento de la grasa, se esperaban bandas correspondientes a protones aromáticos alrededor de 7–9 ppm (ver espectros ^1H NMR de algunas naftoquinonas y antraquinonas en Apéndice C); no fue posible determinar la presencia de este tipo de pigmento. La banda G, sólo presente en el espectro de acetona, se asignó a los protones aromáticos de este pigmento; esta asignación fue únicamente tentativa, pues la banda sólo se observó en amplitud 6×1000 y podría ser simplemente ruido de la línea base, dada la gran amplitud. La explicación más probable es que el pigmento está en una concentración mucho más baja que 1% en la grasa. Por lo anterior, se sugiere extraer y purificar el pigmento para caracterizarlo, lo cual va más allá de los propósitos de esta tesis.

El hecho que no haya sido posible la detección de la estructura antraquinona del pigmento presente en la grasa del nij en sus espectros IR y ^1H NMR, pero sí en sus espectros UV-VIS, pudo deberse, además de a la baja concentración en la que probablemente se encuentra el pigmento en la grasa, a la intensidad característica de las bandas de los diferentes grupos funcionales en cada una de estas regiones del espectro. En UV-VIS las diferencias en intensidad de absorción entre diferentes grupos funcionales se deben más a sus tipos de enlaces que a su concentración. Así, los anillos aromáticos absorben muchísimo en esta región, pues tienen absorptividad molar (ϵ) arriba de 20000 L/mol·cm, mientras que la absorción del enlace éster es muy débil, con ϵ alrededor de 70 L/mol·cm. En IR, la intensidad de algunas de las bandas de absorción características de los anillos aromáticos suele ser muy

pequeña por lo que serían difíciles de detectar si la concentración de estos grupos es baja. En $^1\text{H NMR}$, la intensidad de las bandas de absorción de los diferentes tipos de protones sí es directamente proporcional a su concentración.

C. Determinación de composición de la grasa del nij de Rabinal en triacilgliceroles

Al igual que el análisis de $^1\text{H NMR}$, la determinación de composición de la grasa del nij en triacilgliceroles constituyó una primera aproximación; no se continuó con la optimización de la separación, pues no era uno de los objetivos de la tesis.

El método de separación de triacilgliceroles por cromatografía líquida de alta resolución de fase invertida con detección ultravioleta (RP-HPLC-UV), AOCS Official Method Ce 5b-89 (ver Apéndice A), indica que es especialmente aplicable para la detección de la presencia de pequeñas cantidades de ácido linoleico ($18:2(\Delta^{9,12})$), característico de los aceites semi-secantes, en aceites vegetales que contienen el ácido oleico ($18:1(\Delta^9)$) como ácido graso insaturado predominante (AOCS, 1989).

En un estudio realizado en Colorado State University se determinó, a partir de cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), de los metil ésteres de los ácidos grasos totales de la grasa del nij de Rabinal, el porcentaje de área de los ácidos grasos totales de la grasa del nij: 1.83% (16:0)Me, 1.194% ($16:1(\Delta^9)$)Me, 34.30% (18:0)Me, 32.75% ($18:1(\Delta^9)$)Me, 19.10% ($18:2(\Delta^{9,12})$)Me y, trazas de (14:0)Me y 10.82% (22:0)Me (Selle, 1993). En el Apéndice F se incluyen, los cromatogramas con detector de ionización en llama (GC-FID) y con detector de masas (GC-MS). Por esta composición, y por la determinación de su índice de yodo, que hizo que se la clasificara como una grasa con propiedades secantes, al inicio se consideró particularmente apropiado el método de AOCS antes indicado, para el análisis de la grasa del nij.

Al usar una columna con una fase estacionaria apolar de octadecilsilano y una fase móvil polar con acetonitrilo (ACN) y tetrahidrofurano (THF) (ACN / THF 73 / 27 % (v/v)), primero eluyen de la columna los compuestos más polares y de peso molecular menor. Según esto, salen primero los ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés), monoacilgliceroles (MG) y diacilgliceroles (DG), que son resultado de la hidrólisis parcial o total de los triacilgliceroles, y luego los triacilgliceroles, en orden de número de carbonos equivalentes.

El tiempo de retención de un triacilglicerol dado, se ha definido en términos de su número de carbonos equivalentes (ECN, por sus siglas en inglés) o número de partición; el ECN está dado por la expresión $ECN = CN - 2n$, donde CN = número real de átomos de carbono en los residuos alifáticos y n = número de dobles enlaces (los átomos de carbono del glicerol no se toman en cuenta en este cálculo) (Christie, 1987).

El método de RP-HPLC-UV, AOCs Official Method Ce 5b-89 (AOCs, 1989), sugiere fijar el detector en 220 nm. La literatura menciona 215 nm como la longitud de onda correspondiente a la banda de absorción del grupo éster, pero no indica el solvente. En el caso de los triacilgliceroles, la misma fuente también indica que, a esta longitud de onda, no se han encontrado diferencias mayores del 5% en las absorptividades molares de los diferentes triacilgliceroles comúnmente presentes en las grasas y aceites naturales, por lo que la absorbancia da una buena idea de la abundancia relativa de los diferentes triacilgliceroles en una muestra, al usar un detector UV. (Christie, 1987)

Tanto para la separación de la grasa del *nij*, como del aceite de soya y del aceite de oliva, por RP-HPLC-UV, se fijó el detector UV en 250 nm. Como ya se mencionó en la sección B.1. de esta discusión, correspondiente a la espectrometría realizada en UV-VIS, se escogió esta longitud de onda por observarse un máximo en la misma, en los espectros de las soluciones en THF de las tres muestras analizadas. No se consideró apropiado fijar el detector en 220 nm porque en esta longitud de onda la absorción de dichas soluciones era muy baja para las tres muestras. Se asumió que 250 nm correspondía a la banda de absorción del grupo (C=O)O; según esto, fue posible detectar ácidos grasos libres, mono-, di- y triacilgliceroles.

Al comparar el cromatograma obtenido para el aceite de soya (ver Figura 19) con los encontrados para este aceite en Plattner (1981) (ver Apéndice D), que incluyen uno donde sólo pudieron separarse los triacilgliceroles por ECN (número de carbonos equivalentes) y otro donde sí fue posible separarlos por TCN (número teórico de carbonos), fue evidente que en el presente análisis sólo había sido posible separar los triacilgliceroles por ECN (de ahí en parte la anchura de las bandas), aunque no completamente pues se observó traslape entre las bandas eluidas. Sabiendo ésto, y a partir de los cromatogramas para aceite de soya de la literatura, se asignaron las regiones de ECN en el cromatograma experimental para aceite de soya.

A partir de los cromatogramas obtenidos al inyectar únicamente el solvente de las muestras, el THF, se determinó que el primer pico observado en los cromatogramas de las soluciones de las muestras, correspondía al THF. Según los cromatogramas del Apéndice D y los Cuadros 17 y 18, el primer triacilglicerol que eluye en el aceite de soya es LLnLn (18:2($\Delta^{9,12}$) - 18:3($\Delta^{9,12,15}$) - 18:3($\Delta^{9,12,15}$)), ECN 38, por lo que todos los picos con tiempos de retención (t_R) menores a éste pueden considerarse como una mezcla de FFA, DG y MG. En el cromatograma experimental para el aceite de soya, se identificó la primera región del cromatograma, posterior al solvente, como una mezcla de los triacilgliceroles con ECN 38 + FFA + MG + DG. El ensanchamiento de bandas observado en este cromatograma a lo largo del tiempo fue típico de una elución isocrática (Christie, 1987); el traslape de estas mismas bandas hizo que el porcentaje de área asignado a los triacilgliceroles fuera sólo aproximado.

En el caso del cromatograma experimental para el aceite de oliva (Figura 20), también se observó ensanchamiento de bandas y traslape de las mismas a lo largo del tiempo, lo que se atribuyó a los mismos factores que en el de aceite de soya. Se intentó asignar las regiones de ECN en el cromatograma de aceite de oliva, a partir de los t_R del de aceite de soya, considerando que las condiciones de elución fueron las mismas pero, al hacerlo así y compararlo con los ECN del cromatograma de aceite de oliva de la literatura, (ver Apéndice D) parecía haber un corrimiento de un ECN. Por esta razón, se decidió asignar los ECN para el cromatograma de aceite de oliva de la misma manera en que se había hecho para el de aceite de soya, es decir, a partir del cromatograma reportado en la literatura. El corrimiento en los t_R entre los dos cromatogramas experimentales, de aceites de soya y de oliva, corridos bajo las mismas condiciones, puede atribuirse a que no se controló la temperatura de la columna sino que se hizo a temperatura ambiente; el método utilizado para el análisis recomienda mantener la columna a temperatura constante de 20.00 ± 0.05 °C durante la elución.

En el cromatograma de la grasa del nij de Rabinal (Figura 18), se asignaron las regiones de ECN a partir de los t_R del cromatograma experimental del aceite de soya con lo que la banda con un t_R de 31.692 min le correspondería un ECN = 56; esta banda parece ser la mayoritaria en la región de triacilgliceroles según su porcentaje de área. Según la composición en ácidos grasos totales de los triacilgliceroles posibles para la grasa del nij (ver Cuadro 18), los ECN mayoritarios deberían ser 54 y, en menor proporción, 48. Tomando en cuenta esto, la asignación de las regiones de ECN quedaron como se muestra en la Figura 18. Considerando otra vez los triacilgliceroles más probables para la grasa del nij según el Cuadro 18, se consideró que las bandas por debajo de ECN 44 podrían corresponder a triacilgliceroles con ECN 42 (cuya concentración probable sería baja) + FFA + DG + MG e hidroperóxidos.

Continuando con el cromatograma de la grasa del nij de Rabinal (Figura 18), la elevada absorbancia de la región de ECN, identificada como 42 + FFA + MG + DG, en comparación con los cromatogramas de aceite de oliva y aceite de soya, podría atribuirse principalmente a dos razones:

- Mayor concentración de FFA, MG y DG que en muestras de aceite de soya y aceite de oliva, ya que las áreas relativas son mayores. El parámetro de índice de acidez da una idea de la concentración de FFA en una muestra. El valor de índice de acidez obtenido para las muestras de grasa del nij a las que se les determinó este parámetro, de Rabinal y de Chiapas, resultó ser mucho mayor que los reportados en la literatura para los aceites de soya y de oliva (ver Cuadro 19). La presencia de FFA en una grasa o aceite implica la presencia de DG y MG (a menos que se lleve a cabo un proceso de extracción para eliminarlos, lo que no fue el caso en los análisis de la grasa del nij), ya que éstos tres tipos de compuestos son el resultado de la hidrólisis parcial o total de los triacilgliceroles en una grasa o aceite.

- Presencia de hidroperóxidos en la grasa del nij que saldrían en esta primera región del cromatograma por ser más polares; estos compuestos fueron identificados en los espectros IR de la grasa del nij y se los relacionó con el proceso de autooxidación y polimerización de la grasa. No se identificó la presencia de hidroperóxidos en los espectros IR de los aceites de soya y de oliva; se cree que de haberlos sería en una concentración muy baja. Un análisis de la grasa nij (Selle, 1993), el cual no considera la presencia de hidroperóxidos, indica que los componentes mayoritarios de la grasa del nij, comparados con FFA, MG y DG, son los triacilgliceroles por lo que la elevada absorbancia de la primera región del cromatograma podría deberse no a la concentración de FFA, MG y DG en esta primera región, sino a la elevada absorptividad molar del grupo hidroperóxido en comparación al grupo éster y el grupo carboxilo a 250 nm. Para tener una idea de la gran diferencia en absorptividad molar entre estos grupos funcionales, las cetonas α, β -insaturadas (que existen en equilibrio ceto-enol) absorben longitudes de onda (λ) de entre 215–250 nm con absorptividades molares (ϵ) características de 10,000–20,000, el ácido esteárico (18:0) absorbe en 210 nm con ϵ de 49 y el metil éster del ácido mirístico (14:0) absorbe en 212 nm con ϵ 71; dependiendo de la polaridad del solvente, tanto ϵ como λ pueden variar ligeramente (Robinson, 1991; Silverstein et al., 1981). La formación de hidroperóxidos es catalizada por la luz UV y por peróxidos provenientes del medio. La presencia de hidroperóxidos en la grasa del nij se podría explicar como asociada a, al menos, dos procesos: el efecto que sobre la grasa tiene los peróxidos del THF sin estabilizador, que se utilizó como solvente de las muestras y como parte de la fase móvil; la degradación por autooxidación de la muestra de grasa del nij de Rabinal analizada, que no era recién preparada sino de 1993, y que desde ese momento se almacenó al aire ambiental.

A lo largo del análisis se presentaron varias dificultades:

- Era necesario premezclar la fase móvil (ver procedimiento en Apéndice A) porque de no hacerlo se observaba mucha inestabilidad en la línea base; también era necesario desgasificarla frecuentemente para eliminar los picos debidos a aire ya que el oxígeno absorbe en la región alrededor de los 250 nm, longitud de onda a la cual se fijó el detector UV.
- Aunque el método utilizado no lo sugiere, se hicieron pruebas de elución con gradiente para tratar de mejorar la separación de los componentes de la grasa del nij al ir disminuyendo la polaridad de la fase móvil al aumentar la proporción de THF en ella. No fue posible este modo de trabajo ya que el THF absorbe bastante en la longitud de onda de interés, 250 nm, y por lo tanto la línea base de cero de absorbancia se pierde.
- Ya que la elución isocrática establecida en el método RP-HPLC-UV AOCS Official Method Ce 5b-89 producía mucho ensanchamiento en las bandas de los cromatogramas, se intentó disminuir este efecto calentando la columna a 33°C. Esto

no pareció mejorar la separación; sólo disminuyó ligeramente el tiempo de elución.

- En la elución isocrática realizada, se observó un marcado aumento de la presión del sistema durante cada corrida de la grasa del nij. Se cree que el aumento de presión se debió a compuestos más saturados y/o de cadena más larga que pudieran haberse quedado atrapados en la columna, por su baja solubilidad en la fase móvil (ACN/THF 73/27). Para hacer disminuir la presión del sistema a aproximadamente su valor inicial, antes de empezar una nueva corrida, era necesario llevar a cabo un gradiente en el cual se disminuía la polaridad de la fase móvil. Como desde el inicio la fase móvil (ACN/THF 73/27) estaba premezclada y colocada en el reservorio que llamaremos "A", para disminuir la polaridad de esta fase se colocaba THF puro en el reservorio "B" y se hacía un gradiente, comenzando con 100% de A y 0% de B hasta llegar a 90% de A y 10% de B que daría una composición de ACN/THF 65.7/34.3. Después de hacer este gradiente era necesario desaguar el sistema durante aproximadamente 1.5 horas con la fase móvil ACN/THF 73/27 para lograr la estabilización de la línea base y llevar a cabo otra corrida.
- En algunas corridas, de aceite de oliva, de soya y de grasa del nij, se observaron picos "fantasmas". Para asegurarse que no eran remanentes de corridas anteriores de estas muestras, se inyectaba hexano (antes de hacer una nueva corrida de muestra) unas tres veces sucesivas, para eluir cualquier sustancia que por ser muy apolar se hubiera quedado atrapada en la columna, dada la mayor polaridad de la fase móvil respecto del solvente de la muestra.

En otras fuentes de la literatura, para el análisis cromatográfico de aceites y grasas, se presentan condiciones de elución diferentes a las utilizadas en este trabajo y se estudia el efecto que tiene modificar algunas de estas condiciones de elución (El-Hamdy and Perkins, 1981a y b; Heršlōf et al., 1979; Plattner, et al., 1977; Plattner, 1981). A continuación se sugieren algunas modificaciones que podrían hacerse para intentar mejorar la separación de los triacilglicerolos de la grasa del nij; la primera y la segunda eran factibles de realizar por las características del equipo con el que se trabajó pero no se exploraron por ir más allá de los objetivos de esta tesis.

- Remover los hidroperóxidos de la grasa antes de someterla a HPLC, eluyéndola con hexano a través de una columna empacada con sílica gel y eliminando el solvente por evaporación con flujo de nitrógeno. Los hidroperóxidos, por ser más polares, no son solubles en hexano e interaccionan en alto grado con la sílica gel; por lo que no eluirían de la columna. (van de Voort et al., 1994).
- Buscar un solvente o mezcla de solventes donde sean completamente solubles tanto la grasa del nij como los patrones; esto con el fin de utilizarlo, ya sea para inyectar la muestra o para eluirla. Se sugiere probar: CHCl_3 puro y CHCl_3 : acetona 1:1 según Plattner (1981); también CHCl_3 : CH_3OH 2:1, según lo hizo Selle (1993) para extraer

los triacilgliceroles de la grasa del nij con el fin de analizar sus ácidos grasos totales por GC; y también CH_2Cl_2 puro, según lo utilizó Selle (1993).

- Buscar un método de HPLC que sea adecuado para separación de grasas con ECN mayor que 50 y conseguir patrones de TG con ECN de 50 a 56, que es la región de interés para la grasa del nij.
- En el método escogido o modificado, se debe usar una columna con mejor eficiencia pues según Plattner (1981) y El-Hamdy and Perkins (1981a) esta es la variable más importante para mejorar la separación de los pares críticos de triacilgliceroles, por ser una serie homóloga con características de solubilidad muy parecidas. La eficiencia de la columna es mejor si los diferentes triacilgliceroles residen más tiempo en ésta, lo que se logra al utilizar una columna con menor tamaño de partícula, con mayor porcentaje de recubrimiento de octadecilsilano y/o colocando dos columnas, una a continuación de la otra.
- En el método escogido o modificado se debe utilizar detección que no se vea afectada por la composición de la fase móvil. Esto se logra en UV-VIS con una longitud de onda adecuada o con el detector de masas. De esta manera se podría probar la opción de elución con gradiente.

VIII. CONCLUSIONES

A partir de las hipótesis planteadas, de los resultados obtenidos y de lo discutido sobre ellos, a continuación se presentan las conclusiones a las que se llegó. Donde es apropiado, se indica si se aceptó o no la hipótesis correspondiente.

- Se encontró mucha similitud entre las observaciones reportadas por Bloede (Schott, 1869) y las reportadas aquí para la grasa del nij, en cuanto a los colores de los sobrenadantes al disolver la grasa en los solventes o mezclas de los mismos y el cambio de color de la mezcla de grasa durante el proceso de saponificación.
- Las propiedades de gravedad específica, intervalo de fusión, solubilidad, índice de acidez, índice de saponificación, índice de yodo, las características espectrométricas y la composición en triacilgliceroles, aquí reportadas para la grasa del nij, no pueden ser comparadas con valores esperados, pues no se encontró ningún reporte al respecto en la literatura que está disponible para dicha grasa. En cuanto al intervalo de fusión, el valor de 49°C reportado en la literatura (Schott, 1869) correspondería al límite superior del intervalo, según los valores determinados para éste, que van de 50.8 a 52.2°C.
- Se estableció que a 25°C la solubilidad de la grasa del nij en acetona, éter de petróleo y una mezcla de acetona:éter de petróleo 1:1 (v/v), es de (9–10), (12) y (12) g grasa/100 g solvente, respectivamente. Los resultados anteriores y el análisis estadístico correspondiente indican que el mejor solvente es el éter de petróleo. La solubilidad a 25°C en etanol y en una mezcla de etanol:éter de petróleo 1:1 (v/v) es de (<7) y (<12) g grasa/100 g solvente, respectivamente. Estos resultados no pudieron darse como $x \pm lc_{95\%}$ por no haberse logrado separar completamente el material disuelto, del sobrenadante.

Al comparar los valores obtenidos para las diferentes propiedades de la grasa del nij con los de otros aceites, grasas y ceras, se encontraron las similitudes indicadas a continuación; se dan los valores promedio mínimos y máximos obtenidos para dichas propiedades.

- La gravedad específica de la grasa del nij a 25°C, (0.957–0.963), es similar a la de la manteca de semilla de cacao y a la de la cera de la China.
- El intervalo de fusión de la grasa del nij es de (33.7–35.3)–(50.8–52.2)°C. Según esto, se aceptó la primera hipótesis planteada en relación a que el límite inferior del intervalo de fusión de la grasa es alrededor de 37°C, ya que este valor está dentro del intervalo de fusión determinado para la grasa. Además, el límite inferior determinado de alrededor de 34°C explica que la grasa adquiriera una consistencia semifluida al

frotarla entre los dedos y que sea fácil su aplicación sobre la superficie deseada. Respecto de este parámetro, las muestras de grasa del nij analizadas son similares al del aceite de palma africana, el lardo de cerdo y la manteca de semilla de cacao; las muestras no fueron similares a ninguna cera con la que se comparon, pues éstas últimas tienen intervalos de fusión muy superiores a los de aceites y grasas.

- No se encontraron en la literatura valores de solubilidad para aceites, grasas y ceras por lo que, con base en esta propiedad, no fue posible comparar ningún material con la grasa del nij. En términos generales, como es de esperarse para los materiales lipídicos, la grasa del nij fue soluble en solventes apolares, que es el caso del éter de petróleo.
- El índice de acidez de la grasa del nij, (27–35) mg KOH/g muestra, es muy superior al reportado para la mayoría de aceites, grasas y ceras. Respecto de este parámetro, sólo se encontró similitud entre la muestra de grasa del nij de Rabinal, (27) mg KOH/g muestra, y el aceite de semilla de hule; esta similitud probablemente se debe a que a ninguno de los dos se les había llevado a cabo un proceso de purificación, el que involucra la neutralización del aceite o grasa.
- La grasa del nij es similar a los aceites de linaza, semilla de hule, soya, oliva y palma africana, y a la manteca de semilla de cacao y al lardo de cerdo, en cuanto a su índice de saponificación (196) mg KOH/g muestra.
- Los resultados de gravedad específica, intervalo de fusión e índice de saponificación hicieron que se aceptara la segunda hipótesis planteada que se refería a la similitud de las propiedades físicas y químicas de la grasa del nij con las de otras grasas naturales como: el lardo de cerdo, la manteca de semilla de cacao y la mantequilla de leche de vaca.
- El índice de yodo de la muestra de grasa del nij de Rabinal (145) g yodo/100g muestra, de su fracción soluble en éter de petróleo (143) g yodo/100g muestra, y de la muestra de grasa del nij de Chiapas (126) g yodo/100g muestra, son similares a los reportados para el aceite de soya. Por otro lado, el índice de yodo de la fracción insoluble en éter de petróleo de la muestra de grasa del nij de Rabinal (57) g yodo/100g muestra, es similar al del aceite de palma africana y al del lardo de cerdo.
- Según su índice de yodo, la grasa del nij de Rabinal y su fracción soluble en éter de petróleo, deben ser clasificadas como grasas con propiedades secantes; esto confirma lo dicho por Bloede al respecto y hace que se acepte la tercera hipótesis planteada, que se refería a que podía clasificarse como una grasa con propiedades secantes por el comportamiento observado de formación de películas al aplicarla sobre diferentes superficies. Esta propiedad secante explica que la grasa sea apropiada para darle un acabado lustroso a la madera y a las jicaras producidas artesanalmente. También

sugiere que entre los posibles estudios de propiedades y comportamiento como material, se deberían explorar aquellos relacionados con los usos de los aceites secantes en: pinturas, barnices, esmaltes, lacas e impermeabilización de telas.

- En el espectro de absorción ultravioleta–visible de la grasa del nij en tetrahidro-furano y de la fracción soluble en hexano, la absorción de la región de 300–350 nm reveló la presencia de un pigmento tipo antraquinona. Se descartó la presencia de pigmentos tipo carotenoide en la grasa del nij porque no se observó absorción más allá de 400 nm, que es donde absorben estos pigmentos. No fue posible confirmar la presencia del pigmento tipo antraquinona en los espectros de absorción infrarroja y de resonancia magnética nuclear de protones, probablemente por la baja concentración de éste en relación a los triacilgliceroles, que son los componentes mayoritarios en la grasa. Según lo anterior, no se pudo aceptar ni rechazar la cuarta hipótesis planteada.
- El espectro de absorción infrarroja de la grasa del nij coincidió, en términos de posición y forma de bandas, con los espectros de los aceites de soya, de oliva y de semilla de hule. Todos estos son materiales lipídicos con ácidos grasos predominantemente insaturados.
- Al igual que el espectro de absorción infrarroja de la grasa del nij, el de resonancia magnética de protones de las fracciones de la grasa solubles en acetona y cloroformo deuterados, fue similar, en términos generales, a los espectros típicos de materiales lipídicos con ácidos grasos predominantemente insaturados. Según esto, se aceptó la quinta hipótesis planteada en relación a la similitud de las características espectrométricas. Debido a la similitud, estos espectros no son útiles para distinguir la grasa del nij de otros materiales lipídicos.
- La determinación, a lo largo del tiempo, del índice de yodo y del espectro de absorción infrarroja de las películas de grasa del nij expuestas al aire permitió seguir el proceso de "secado" de la grasa. El índice de yodo, que está relacionado con la concentración de dobles enlaces entre carbonos en la muestra, disminuyó considerablemente entre los 0 y los 6 días de exposición al aire ambiental. En este tiempo, el valor de índice de yodo llegó a ser 65.5 g yodo/100 g muestra, que es el 45% del valor inicial, y después ya no experimentó cambios importantes, lo que indica que el proceso de "secado" y formación de la película "seca" correspondiente estaba casi terminado. En el espectro de absorción infrarroja de la película de grasa expuesta al aire seco durante siete días, se observó un aumento considerable del porcentaje de transmitancia de la banda en 3030 cm^{-1} , relacionada con los dobles enlaces entre carbonos, y una disminución del porcentaje de transmitancia de la banda en 3450 cm^{-1} , relacionada con los hidroperóxidos. La presencia de esta última banda, originalmente ausente, sugiere que el proceso de formación de la película de la grasa del nij involucra autooxidación y polimerización por un mecanismo de radicales libres, siendo los hidroperóxidos los productos iniciales e intermediarios de esta reacción en

cadena. Este espectro ya no sufrió un cambio considerable más allá de los siete días. Lo anterior hizo que se aceptara la sexta hipótesis planteada relacionada con la presencia de hidroperóxidos como parte del proceso de formación de película.

- La separación lograda para los triacilgliceroles de la grasa del nij por cromatografía líquida de alta resolución, y la detección ultravioleta realizada, permitieron distinguir regiones de triacilgliceroles con un número de carbonos equivalentes dado pero no triacilgliceroles individuales. La región de número de carbonos equivalentes mayoritaria para la grasa del nij en tetrahidrofurano es la de 54 carbonos equivalentes, que puede incluir a los siguientes triacilgliceroles: 18:0–18:0–18:0, 18:0–18:1(Δ^9)–20:0 y/o 18:2($\Delta^{9,12}$)–20:0–20:0. La región de 48 carbonos equivalentes también es importante, aunque está en menor proporción que la anterior, y puede incluir a los siguientes triacilgliceroles: 18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9)–18:1(Δ^9), 18:0–18:1(Δ^9)–18:2($\Delta^{9,12}$) y/o 18:2($\Delta^{9,12}$)–18:2($\Delta^{9,12}$)–20:0. Estos resultados hicieron que se aceptara la séptima hipótesis planteada, que se refería a la longitud de cadena de los ácidos grasos mayoritarios y su presencia en los triacilgliceroles de la grasa del nij.
- El método de cromatografía líquida de alta resolución, con detección ultravioleta, utilizado para la separación de triacilgliceroles de la grasa del nij parece no ser apropiado en cuanto a la composición de la fase móvil, acetonitrilo/tetrahidrofurano 73/27, porque en ésta no son solubles los triacilgliceroles completamente saturados y/o de cadena más larga, con número de carbonos equivalentes mayor de 56. La grasa del nij fue completamente soluble en tetrahidrofurano; éste se usó para disolver la grasa para inyectarla y fue parte de la fase móvil. La mezcla de patrones de triacilgliceroles no fue soluble en tetrahidrofurano; esta mezcla contenía cuatro triacilgliceroles completamente saturados y uno insaturado, el número de carbonos equivalentes de estos triacilgliceroles está entre 48 y 66.

IX. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS FUTUROS

A partir de las hipótesis planteadas en este trabajo de investigación, los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se llegó, se plantean sugerencias para estudios futuros y preguntas adicionales que surgieron, además para profundizar en los aspectos que ya no eran parte de los objetivos de esta tesis. Como referencia guía para algunas de las sugerencias se mencionan fuentes bibliográficas.

- Determinar el procedimiento a seguir para purificar y almacenar adecuada y eficientemente la grasa del nij. La purificación de la grasa sería indispensable si interesara estudiar sus propiedades fisicoquímicas y su comportamiento como material recién preparado, en vez de degradado. En este trabajo de investigación se caracterizaron muestras de grasa como recibidas de los artesanos, sólo se fundieron y filtraron para eliminar, en lo posible, la “cáscara” ya formada por estar expuesta al aire ambiental.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de una muestra de grasa de nij, obtenida a partir de insectos recién colectados y almacenada al vacío hasta el momento de su uso, para determinar el efecto que tiene la forma de almacenamiento y edad de la grasa en sus propiedades y degradación. Para respaldar mejor los estudios de polimerización se recomienda trabajar en conjunto con especialistas de la industria de grasas.
- Mejorar la preparación de la muestra y la subsiguiente separación de los triacilglicerolés de la grasa del nij, por cromatografía líquida de alta resolución. Estas son algunas de las modificaciones que se sugieren intentar: remover los hidroperóxidos, para evitar su interferencia en la determinación de los triacilglicerolés; buscar un método de cromatografía líquida de alta resolución que sea adecuado para la separación individual de triacilglicerolés con número de carbonos equivalentes de 44 a 56, que es la región de mayor interés para la grasa del nij; conseguir patrones de triacilglicerolés con número de carbonos equivalentes en la región de interés. Este método solventará los problemas que se tuvieron en este trabajo en cuanto a eficiencia de separación, solubilidad y longitud de onda de detección. Se sugiere consultar como guía lo planteado por El-Hamdy y Perkins (1981a y 1981 b), Herslöf et al. (1979), Plattner et al. (1977), Plattner (1981) y van de Voort et al. (1994).
- Cuantificar, por medio de cromatografía líquida de alta resolución, los hidroperóxidos de la grasa del nij, tanto fresca como en diferentes estados de degradación, para relacionar su presencia con las propiedades de la grasa como material. Se sugiere consultar como guía lo planteado por van de Voort y et al. (1994).

- Aislar y caracterizar el pigmento de la grasa del nij por medio de espectrometría y cromatografía líquida de alta resolución, tomando como referencia inicial la información de los derivados de antraquinonas encontrada en la literatura (ver Apéndice C).
- Extraer y caracterizar las sustancias volátiles que le dan el olor característico a la grasa del nij. Considerar el posible interés de desodorizar la grasa, para poderla utilizar en aplicaciones que lo requieran.
- Determinar indirectamente el valor de índice de yodo de la grasa del nij a partir de la cuantificación, por medio de espectroscopía infrarroja, del cambio en la intensidad de las bandas relacionadas con los dobles enlaces entre carbonos, según lo planteado por van de Voort et al. (1992).
- Tomando como base la caracterización fisicoquímica de la grasa del nij realizada en este trabajo, estudiar las propiedades y el comportamiento de la grasa como material, para lo cual se sugiere trabajar en conjunto con el sector industrial. De esta experiencia, se podrían establecer parámetros fisicoquímicos de calidad o especificaciones para cada una de las aplicaciones industriales de interés.
- Caracterizar muestras frescas de grasa del nij, elaboradas bajo un mismo proceso pero a partir de insectos colectados en diferentes hospederos, para determinar si este factor tiene algún efecto en las características y propiedades fisicoquímicas de la grasa y, por ende, en sus propiedades como material. De ser así, se podría seleccionar la mejor fuente, dependiendo de la aplicación de interés.

X. FUENTES CITADAS

- American Oil Chemists Society (AOCS). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 4th. ed., AOCS, U. S. A. 1989.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). "Paint-Fatty Oil and Acids, Solvents, Miscelaneous; Aromatic Hydrocarbons, Section 6, Vol. 06.03. In Annual Book of ASTM Standards. ASTM, U. S. A. 1992. p. 266-268.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). "Oils and Fats". Chapter 41. In Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16 th. ed., AOAC, U. S. A. 1995.
- Ault, A., Dudek G. O. NMR: An Introduction to Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Holden-Day, U. S. A. 1976. 141 p.
- Bailey, A. E. Industrial and Fat Products. Interscience Publishers, U. S. A. 1945. 735 p.
- Banks, H. J. "Pigments of the Coccoidea, Current Knowledge and Chemotaxonomic Implications". In Studies on the Morphology and Systematics of Scale Insects, No.9. Virginia Polytechnic Institute and State University, U. S. A. 1977. p. 51-67.
- Bennett, H. "Industrial Waxes". In Vol. I. Natural and Synthetic Waxes. Chemical Publishing, U. S. A. 1963. 324 p.
- Borror, D., Triplehorn, C., Johnson, N. An Introduction to the Study of Insects. 6th. ed., Saunders College Publishing. U. S. A. 1989. 875 p.
- Brown, D. W., Flayd, A. J., Sainsbury, M. Organic Spectroscopy. John Wiley & Sons, U. S. A. 1988. 250 p.
- Budavari, S. (Ed.). The Merck Index. 11th. ed., Merck & Co., U. S. A. 1989.
- Chapman, D. "Infrared Spectroscopy of Lipids". Part II. in 15th. Annual Summer Program Symposium of Quantitative Methodology in Lipid Research. J. Am. Oil Chem. Soc. 1964, 42, 353-371.
- Chapman, R. F. The Insects: Structure and Function. 3rd. ed., Harvard University Press, U. S. A. 1982. 919 p.
- Christie, W. W. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. Pergamon Press, England. 1982. 207 p.

- Christie, W. W. High-Performance Liquid Chromatography and Lipids: A Practical Guide. Pergamon Press, U. S. A. 1987. 272 p.
- Christie, W. W. Gas Chromatography and Lipids. The Oily Press, Scotland. 1994. 307 p.
- Conley, R. T. Infrared Spectroscopy. 2nd. ed., Allyn and Bacon, U. S. A. 1972. 355 p.
- Coulter, T. P. Food: The Chemistry of Its Components. 2nd. ed., Royal Society of Chemistry, England. 1990. 325 p.
- de Landa, D. Relación de las Cosas de Yucatán. Producción Editorial Danta, México. 1941. 153 p.
- Deuel, H. J. The Lipids: Their Chemistry and Biochemistry. Interscience Publishers, U. S. A. 1951. 982 p.
- de Sahagún, B. Historia General de las Cosas de Nueva España. 6a. ed., Editorial Porrúa, México. 1985. 1093 p.
- Dirección General de Agricultura de Guatemala. Ilustrando al Agricultor: El Níge, su Preparación y Empleo. 3a. ed., Tipografía Nacional de Guatemala, Guatemala. 1940. 3 p.
- DMS. UV Atlas of Organic Compounds. Vols. I–V. Plenum–Press, U. S. A. 1966.
- Dutton, H. J. "Research Methods of Analysis of Drying Oils". In Lectures of the 1959 Short Course on Drying Oils, American Oil Chemists Society. J. Am. Oil Chem. Soc. 1959, 36, 513–518.
- Egan, H., Kirk, R. S., Sawyer, R. Análisis Químico de Alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental (CECSA), México. 1987. 586 p.
- El–Hamdy, A. H., Perkins, E. G. "High Performance Reversed Phase Chromatography of Natural Triglyceride Mixtures". J. Am. Oil Chem. Soc. 1981a, 58, 49–53.
- El–Hamdy, A. H., Perkins, E. G. "High Performance Reversed Phase Chromatography of Natural Triglyceride Mixtures: Critical Pair Separation". J. Am. Oil Chem. Soc. 1981b, 58, 867–872.
- Frankel, E. N. "Hydroperoxides". In Schultz, H. W. (Ed.). Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation. Avi Publishing, U. S. A. 1962. p. 51–78.
- Gunstone, F. D. (Ed.). Palm Oil. John Wiley & Sons, U. S. A. 1987. 100 p.

- Haggin, J. "Careers in Materials Science Promoted". C & E News 1990, Nov. 12, 27.
- Hall, C. Polymer Materials: An Introduction for Tehnologists and Scientists. 2nd ed., John Wiley & Sons, U. S. A. 1989. 243 p.
- Hannah, R. W., Swinehart, J. S. Experiments in Techniques of Infrared Spectroscopy. Perkin Elmer Corporation, Infrared Applications Laboratory, U. S. A. 1974. 21 p.
- Herrera, A. "El Aje". La Naturaleza. 1884, Tomo VI, 198–200.
- Herslöf, B., Podlaha, O., Töregård, B. "HPLC of Triglycerides". J. Am. Oil Chem. Soc. 1979, 56, 864–866.
- Hewlett–Packard. Understanding your Chemstation. 3rd. ed., Hewlett–Packard, U. S. A. 1995. 259 p.
- Holden, C. "Entomologists Wane as Insects Wax". Science 1990, 246, 754–756 p.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Part 1, Sections I and II. 6th. ed., Pergamon Press, U. S. A. 1979. 170 p.
- Jackson, L. L., Arnold, M. T. "Insect Lipid Analysis". In Turner, R. N. (Ed.). Analytical Biochemistry of Insects. Elsevier Scientific, Holland. 1977. 135 p.
- Jenkins, K. D. Aje or Ni-in (The Fat of a Scale Insect) Painting Medium and Unguent. XXX Congreso Internacional de Americanistas, México. 1964. p. 625–636.
- Kates, M. "Techniques on Lipidology". Volume 3, part 2. in Burdon, R. H., van Knippenberg, P. H. (Eds.). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Scientific, Holland. 1986. 464 p.
- Keeney, M. "Secondary Degradation Products". In Schultz, H. W. (Ed.). Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation. Avi Publishing, U. S. A. 1962. p. 79–89.
- Kirk, R. E., Othmer, D. F. (Eds.). Encyclopedia of Chemical Technology. Vols. 7, 9. 3rd. ed., John Wiley & Sons, U. S. A. 1984.
- Lea, C. H. "The Oxidative Deterioration of Food Lipids". In Schultz, H. W. (Ed.). Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation. Avi Publishing, U. S. A. 1962. p. 3–27.

- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Principles of Biochemistry. 2nd. ed., Worth Publishers, U. S. A. 1993. 1013 p.
- Lide, D. R. (Ed.). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 71st. ed., CRC Press, U. S. A. 1990–1991.
- Lillard, D. A. "Effect of Processing on Chemical and Nutritional Changes in Food Lipids". J. of Food Protection. 1983, 46, 61–67.
- Link, W. E. "General Methods of Analysis of Drying Oils". In Lectures of the 1959 Short Course on Drying Oils, The American Oil Chemists Society. J. Am. Oil Chem. Soc. 1959, 36, 477–482.
- Linstromberg, W. W, Baumgarten, H. E. Organic Experiments for a Brief Course. 2nd. ed., Heath, U. S. A. 1970. 261 p.
- Lottmann, G. Extracción y Caracterización del Aceite de la Semilla de Hule *Hevea brasiliensis*. Tesis, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 1981. 124 p.
- Lundberg, W. O. "Mechanisms". In Schultz, H. W. (Ed.). Symposium on Foods: Lipids and Their Oxidation. Avi Publishing, U. S. A. 1962. p. 31–50.
- MacVean, C. Identification of Nij Insects and their Wax: Deriving a Sustainable Industry from Biological Resources Used by the Maya. Biodiversity Support Program/World Wildlife Found (BSP/WWF) Project No. 7577. Interim Report No. 1. Universidad de Valle de Guatemala, Guatemala. 1992. 22 p.
- MacVean, C. Identification of Nij Insects and their Wax: Deriving a Sustainable Industry from Biological Resources Used by the Maya. Biodiversity Support Program/World Wildlife Found (BSP/WWF) Project No. 7577. Interim Report No. 2. Universidad de Valle de Guatemala, Guatemala. 1993a. 12 p.
- MacVean, C. Identification of Nij Insects and their Wax: Deriving a Sustainable Industry from Biological Resources used by the Maya. Biodiversity Support Program/World Wildlife Found (BSP/WWF) Project No. 7577. Interim Report No. 3. Universidad de Valle de Guatemala, Guatemala. 1993b. 17 p.
- Martin, D. W., Mayes, P. A., Rodwell, V.W. Bioquímica de Harper. 9a. ed., Editorial El Manual Moderno, México. 1984. 660 p.
- Mathews, C. K., van Holde, R. L. Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing, U. S. A. 1990. 1129 p.

- Mathieson, D. W. (Ed.). Interpretation of Organic Spectra. Academic Press, England. 1965. 179 p.
- Mazuelos, F. "Acidos Grasos de la Posición β de los Glicéridos de Aceite de Palma *Eleaëis guineensis* JACQ". Grasas y Aceites. 1986, 37, 6, 348–350.
- McBryde, F. "The Black Lacquer Mystery of the Guatemala Maya Indians". Sci. Monthly 1943, 57, 113–118.
- Mehlenbacher, V. C. The Analysis of Fats and Oils. Garrard Press, U. S. A. 1960. 616 p.
- Nicolet. Impact 420, FT-IR Spectrometer, Optical Bench User's Guide. Nicolet Instrument Corp., U. S. A. 1995. 88 p.
- Nicolet. Omnic, FT-IR Software, User's Guide. Nicolet Instrument Corp., U. S. A. 1996.
- Norusis, M. J. SPSS for Windows, 6.0. SPSS. U. S. A.
- Pérez, R. A., Williams, M. L. Report for the United Nations of Education Science Culture Organization/International Committee Scientific Unions/Third World Academy of Science (UNESCO/ICSU/TWAS) Short-Term Fellowship in Basic Science Committee. Applied Entomology, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 1995. 10 p.
- Pérez, R. A., Williams, M. L. A Study of Size Variation in Genus *Llaveia* Signoret, and its Value as a Taxonomic Character. Internal Report. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 1996. 10 p.
- Perkin-Elmer. Lambda 5, UV/VIS Spectrophotometer, Operator's Manual. Perkin-Elmer, Germany. 1982.
- Perkins, E. G. "Nutritional and Chemical Changes Occurring in Heated Fats: A Review". Food Technology. 1960, 14, 508–514.
- Plattner, R. D., Spencer, G. F., Kleiman, R. "Triglyceride Separation by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography". J. Am. Oil Chem. Soc. 1977, 54, 511–515.
- Plattner, R. D. "High Performance Liquid Chromatography of Triglycerides: Controlling Selectivity with Reverse Phase Columns". J. Am. Oil Chem. Soc. 1981, 58, 638–642.
- Pouchert, C. J., Campbell, J. R. (Eds.). The Aldrich Library of NMR Spectra, XI Vols. Aldrich Chemical Company, U. S. A. 1974.

- Pouchert, C. J., Campbell, J. R. (Eds.). The Aldrich Library of Infrared Spectra. 2nd. ed., Aldrich Chemical Company, U. S. A. 1975. 1576 p.
- Przybytek, J. T. (Ed.). High Purity Solvent Guide: Specifications, Applications, Physical Properties, Safety Data. 2nd. ed., Burdick & Jackson Laboratories, U. S. A. 1982. 153 p.
- Robinson, J. W. (Ed.). Practical Handbook of Spectroscopy. CRC Press, U. S. A. 1991. 928 p.
- Roque, J. M. "El Nij y sus Aplicaciones". En Luján Muñoz, L., Toledo Palomo, R. Jícaras y Guacales en la Cultura Mesoamericana. Subcentro Regional de Artesanías y Artes Populares, Guatemala. 1986. 389 p.
- Schott, A. "The Niin of Yucatan". In Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1868. (Report to the 3rd. session of the 40th. Congress, 1868–1869) Government Printing Office, U. S. A. 1869. p. 268–271.
- Selle, M. Identification of Nij Insects and their Wax: Deriving a Sustainable Industry from Biological Resources used by the Maya. Biodiversity Support Program/World Wildlife Fund (BSP/WWF). Project No. 7577. Internal Report and Laboratory Notes. Universidad del Valle de Guatemala–Colorado State University, Guatemala. 1993.
- Selle, M., Sabán, R., Ramos, J., Llorca, A. "Extracción de la Grasa del Nij". Notas de laboratorio. En Identification of Nij Insects and their Wax: Deriving a Sustainable Industry from Biological Resources used by the Maya. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 1993.
- Selle, M., Larios, J. M. "Pruebas para la Separación de la Grasa del Nij". Informe Interno. En Insectos Nij y su Cera: Fomento de una Industria Artesanal Basada en Biodiversidad Nativa de Guatemala. Programa de Análisis Químico, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 1995. 21 p.
- Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 4th. ed., John Wiley & Sons, U. S. A. 1981. 442 p.
- Skoog, D. A., Leary, J. J. Análisis Instrumental. 4a. ed. (en inglés), McGraw–Hill, España. 1994. 935 p.
- Skoog, D. A., West, D. M. Fundamentals of Analytical Chemistry. 4th. ed., CBS College, U. S. A. 1982. 859 p.

- Stanley-Samuelson, D. W., Jurenka, R. A., Cripps, C., Blomquist, G. J., de Renobales, M. "Fatty Acids in Insects: Composition, Metabolism and Biological Significance". Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1988, 9, 1-33.
- Swern, D. (Ed.). Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 3rd. ed., John Wiley & Sons, U. S. A. 1964. 1103 p.
- Swinehart, J. S. Waxes. Perkin-Elmer Applications Study. The Perkin-Elmer Corporation, U. S. A. 1968. 4p.
- Terao, J., Matsushita, S. "Products Formed by Photosensitized Oxidation of Unsaturated Fatty Acid Esters". Am. Oil Chem. Soc. 1977, 54, 234-238.
- van de Voort, F. R, Sedman, J., Emo, G., Ismail, A. A. "Rapid and Direct Iodine Value and Saponification Number Determination of Fats and Oils by Attenuated Total Reflectance/Fourier Transform Infrared Spectroscopy". J. Am. Oil Chem. Soc. 1992, 69, 1118-1123.
- van de Voort, F. R, Sedman, J., Emo, G., Ismail, A. A. "Monitoring the Oxidation of Edible Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy". J. Am. Oil Chem. Soc. 1994, 71, 243-253.
- Varian. EM-360L NMR, Spectrometer System. Varian, U. S. A. 1979.
- Varian. Vista 5560, Liquid Chromatograph, Operator's Manual. Varian, U. S. A. 1983.
- Walcott, E. The Badianus Manuscript (Codex Barberini, Latin 241): An Aztec Herbal of 1552. John Hopkins Press, U. S. A. 1940. p. 29-41.
- Wharh, A. H. The Chemistry and Technology of Waxes. 2nd. ed., Reinhold Publishing, U. S. A. 1956. 940 p.
- Willard, H. H., Merritt, L. L., Dean, J. A., Settle, F. A. Métodos Instrumentales de Análisis. 7a. ed. (en inglés), Grupo Editorial Iberoamérica, México. 1991. 879 p.
- Wingrove, A. S., Caret, R. S. Química Orgánica. Harper & Row Latinoamericana (HARLA), Mexico. 1984. 1570 p.
- Zar, J. H. Biostatistical Analysis. 2nd. ed., Prentice-Hall, U. S. A. 1984. 718 p.

APENDICES

APENDICE A

Procedimientos y materiales utilizados para la caracterización de la grasa del nij

Los procedimientos indicados a continuación, se tomaron de alguna de las siguientes fuentes de métodos oficiales: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society (AOCS, 1989), Annual Book of the American Society for Testing and Materials Standards (ASTM, 1992) y Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1979). No fue posible encontrar un método oficial para la determinación de solubilidad de aceites y grasas, por lo que se realizó el análisis según el procedimiento "Solubility test on waxes" indicado por Wharh (1956).

A continuación se indica la procedencia y año de las muestras de grasa del nij que fueron analizadas. Muestra de grasa del nij de Rabinal, Guatemala; elaborada por artesanos de Rabinal, en octubre de 1993 (MacVean, 1992). Se le identifica como grasa del nij de Rabinal. Muestra de grasa del nij de Rabinal, Guatemala; elaborada en los laboratorios de la Universidad del Valle Guatemala, en octubre de 1993 (Selle et al., 1993). Se le identifica como grasa del nij de Rabinal-Guatemala. Muestra de grasa del nij de Chiapa de Corzo, Chiapas, México; comprada a artesanos de esta localidad, en septiembre de 1992 (se cree que fue elaborada un año antes) (MacVean, 1992). Se la identifica como grasa del nij de Chiapas.

Por disponibilidad de cantidad de muestra en cada caso, no se utilizaron las tres muestras en todas las determinaciones; en cada procedimiento se indica qué muestras se analizaron. Todas las determinaciones se llevaron a cabo en triplicado para cada muestra analizada, con excepción de la determinación del índice de yodo de la grasa del nij a lo largo del tiempo al exponerla al aire en forma de película. A partir de estos triplicados se calcularon, manualmente, medias e intervalos de confianza; además, se realizaron análisis de varianza, con el paquete estadístico SPSS para Windows (Norusis, 1993), para comparar las medias de estas determinaciones y establecer si existe o no, diferencia estadísticamente significativa entre ellas (ver análisis de varianza en Apéndice E). En el caso de la determinación del índice de yodo de la grasa del nij a lo largo del tiempo al exponerla al aire en forma de película, lo que se calculó fue la incertidumbre de cada una de las mediciones a partir de fórmulas de propagación del error (ver fórmulas en Apéndice E).

A.1 Preparación de las muestras para análisis

Para la preparación de las muestras de grasa del nij se siguió el método "2.001. Preparation of the Sample" (IUPAC, 1979) que es aplicable a aceites y grasas animales y vegetales. La principal modificación consistió en la utilización de vacío, durante la fundición de las muestras, para extraerles el aire y la humedad y para minimizar la autooxidación y polimerización de las mismas al reaccionar con oxígeno. A continuación se detalla el procedimiento seguido.

Se partieron los bloques originales de grasa del nij en pedazos de tamaño apropiado para poder meter toda la muestra a fundir en un beaker. Se hizo de esta manera para intentar obtener una muestra homogénea ya que la diferencia de color y textura entre la capa externa y el interior de cada bloque indica que la composición química puede variar por el diferente grado de exposición al aire.

A fin de lograr la homogenización de las muestras de grasa, éstas fueron calentadas lentamente hasta 60°C para fundirlas en beakers de 250 ml, en un horno al vacío. La presión de trabajo fue de 20 plg (508 mm) Hg de vacío (presión por debajo de la presión atmosférica, de \approx 640 mm Hg en la Universidad del Valle, lugar donde se llevaron a cabo las pruebas) utilizando para ello una bomba de vacío. Fue necesario circular cierto flujo de aire seco a través del horno, para mantener una presión aproximadamente constante, no mayor del valor indicado; no se podía regular directamente la fuerza de succión de la bomba. El calentamiento se llevó hasta 60°C que estaba aproximadamente 10°C arriba del límite superior del intervalo de fusión de las muestras de grasa del nij.

Para secar el aire que fluía a través del horno, se utilizó un tubo con desecante, Drierite con indicador, en la entrada de aire. Para prevenir que la humedad que se estaba extrayendo de las muestras contaminara el aceite de la bomba de vacío, se colocó un tubo con el mismo desecante entre la salida del horno y la bomba de vacío.

Las muestras fundidas se dejaron 15 minutos en el horno a las condiciones antes indicadas; después, aún calientes se filtraron a través de una gasa de algodón (del tipo usado para primeros auxilios). La gasa fue puesta en tres capas, cada una con las tramas en diferente dirección para lograr mejor retención de los sólidos. La filtración se hizo hacia un beaker de 250 ml calentado previamente en el horno junto con la muestra para evitar, durante la filtración, un enfriamiento brusco y atrapamiento de aire por parte de ésta. En la gasa quedaron fragmentos de cutícula y patas del insecto y, la capa externa o "cáscara" de los bloques de grasa, la cual no se fundió. El mesh, número de mallas/plg², de la gasa sin doblar, era de aproximadamente 20, lo que permite el paso de partículas con un diámetro menor a 1.3 mm.

Las muestras ya filtradas, se agitaron con una varilla de vidrio para homogenizarlas y, se dejaron en el horno a las condiciones antes indicadas hasta que ya no se observó

evolución de aire de las mismas; para ésto se requirieron aproximadamente 1.5 horas. Otra vez, para prevenir la degradación de las muestras por el oxígeno, después de sacarlas del horno se las colocó inmediatamente en una desecadora con desecante, sílica gel con indicador, que fue mantenida al vacío. De esta manera las muestras ya homogenizadas quedaron almacenadas hasta el momento de su uso para las diferentes determinaciones de interés.

A.2 Determinación de la gravedad específica

Para la determinación de la grasa del nij se siguió el método "ASTM 1963-8 Standard Test for Specific Gravity of Drying Oils, Varnishes, Resins, and Related Materials al 25/25°C" (ASTM, 1992). Sólo se determinó esta propiedad a las muestras de grasa del nij de Rabinál y de Chiapas, por la cantidad de grasa disponible de cada una de las localidades. El método da la opción de usar un picnómetro tipo Leach o uno tipo Hubbard. Se escogió usar el picnómetro tipo Hubbard (ver Figura 4 en sección de Metodología) porque éste, a diferencia del tipo Leach, puede usarse para muestras que son sólidas o semisólidas a la temperatura a la cual se hace la determinación, que es el caso para la grasa del nij. Se usó una balanza analítica con una precisión de ± 0.01 mg en vez de la sugerida de ± 0.1 mg, por disponibilidad. Se siguió el procedimiento indicado a continuación para primero calibrar los seis picnómetros y luego hacer las determinaciones en ellos.

Calibración de picnómetro

1. Lavar el picnómetro de 30 ml y su tapadera cuidadosamente con "Extran" (jabón Merck); desaguarlo con agua del chorro y luego con agua desionizada.
2. Secar completamente el picnómetro y su tapadera, con papel "Kimwipe".
3. Pesar el picnómetro en balanza analítica. (==> **A gramos**)
4. Llenar el picnómetro con agua desionizada recién hervida, a 25°C; colocarle suavemente el tapón (que no queden burbujas de aire atrapadas).
5. Dejar el picnómetro en baño térmico a 25.0°C, aproximadamente 1 hora; debe estar sumergido de tal manera que el agua del baño térmico llegue hasta aproximadamente una pulgada por debajo del tapón.
6. Tapar firmemente el picnómetro y secar el tapón teniendo cuidado de no sacar el agua, por capilaridad, del agujero del tapón.
7. Sacar el picnómetro del baño térmico y sumergirlo parcialmente en agua a aproximadamente 20°C hasta que baje el nivel del agua en el agujero del tapón.
8. Secar completamente el picnómetro por fuera y pesarlo tapado en balanza analítica. (==> **B gramos**)

Repetir este procedimiento dos veces más y reportar la calibración del picnómetro como $x \pm 1c_{95\%}$

Con esta calibración se pudo determinar la capacidad exacta del picnómetro a 25.0°C, en términos de masa de agua.

Determinación de la gravedad específica de la muestra

1. Agregar unos 50 g de muestra preparada según lo indicado en la sección de preparación de las muestras para análisis, en un beaker de 100 ml, aproximadamente 15 g por réplica.
2. Fundir la muestra a 60°C en horno con vacío (se usó aprox. 20 plg (508 mm) Hg de vacío) bajo las mismas condiciones indicadas en la sección de preparación de las muestras para análisis.
3. Calentar el picnómetro calibrado con su tapadera en baño térmico a 40°C, justo antes de echarle la muestra fundida.
4. Introducir parte de la muestra fundida en el picnómetro caliente, hasta aproximadamente la mitad de su capacidad; hacer ésto usando una varilla de vidrio para asegurarse de echar la muestra por el centro y que no caiga nada en las paredes del picnómetro sobre el nivel de la muestra; tapar el picnómetro.
5. Dejar que el picnómetro con la muestra llegue a temperatura ambiente en la desecadora al vacío.
6. Pesar el picnómetro tapado en la balanza analítica. (==> **C gramos**)
7. Agregar agua desionizada recién hervida, a 25°C, sobre la muestra hasta llenar el picnómetro. Colocarle suavemente el tapón (que no queden burbujas de aire atrapadas).
8. Dejar el picnómetro en baño térmico a 25.0°C, aproximadamente 30 min; debe estar sumergido de tal manera que el agua del baño térmico llegue hasta aproximadamente una pulgada por debajo del tapón.
9. Tapar el picnómetro firmemente y secar el tapón teniendo cuidado de no sacar el agua, por capilaridad, del agujero del tapón.
10. Sacar el picnómetro del baño térmico y sumergirlo parcialmente en agua a aproximadamente 20°C hasta que baje el nivel del agua en el agujero del tapón.
11. Secar completamente el picnómetro por fuera y pesarlo tapado en balanza analítica. (==> **D gramos**)

Repetir este procedimiento dos veces más y reportar la gravedad específica como $x \pm lc_{95\%}$

Cálculos

$$\text{Gravedad específica } 25^{\circ}/25^{\circ}\text{C} = \frac{C - A}{(B - A) - (D - C)} \quad \begin{array}{l} \text{g de muestra} \\ \text{g de agua} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{en un mismo} \\ \text{volumen} \end{array}$$

Explicación de los cálculos

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

$$\text{gravedad específica} = \frac{\text{masa de la muestra} / \text{vol. de la muestra}}{\text{masa del agua} / \text{vol. del agua}}$$

gravedad específica = $\frac{\text{masa de la muestra}}{\text{masa del agua}}$ cuando los volúmenes son iguales

siendo, A = masa del picnómetro tapado vacío, con su tapadera, g

B = masa del picnómetro tapado, llenado con agua, g

C = masa del picnómetro tapado llenado hasta aproximadamente la mitad con muestra, g

D = masa del picnómetro tapado, llenado con muestra y agua, g

C - A = masa de la muestra, g

B - A = masa de agua que cabe llenando el picnómetro, g

D - C = masa de agua que se agregó sobre la muestra, para llenar el picnómetro, g

$(B - A) - (D - C) =$ masa del agua correspondiente al volumen de la muestra agregado al picnómetro, g

$$\text{gravedad específica} = \frac{C - A}{(B - A) - (D - C)}$$

$$\text{gravedad específica} = \frac{\text{masa de la muestra agregada}}{\text{masa del agua correspondiente al volumen de la muestra agregada}}$$

A.3 Determinación del intervalo de fusión

Se utilizaron las muestras preparadas según lo indicado en la sección de preparación de las muestras para análisis para determinación del intervalo de fusión indicado por el método "Cc 1-25 Melting Point, capillary tube method" (AOCS, 1989) dado para grasas animales y vegetales. Se determinó esta propiedad a las tres muestras de grasa del nij. A continuación se detalla el procedimiento seguido.

Se fundió alrededor de 0.1 g de cada una de las tres muestras preparadas según lo indicado en preparación de las muestras para análisis, en beakers de 25 ml. Cuando las muestras ya estaban fundidas, se sumergió un extremo de 3 tubos capilares en cada una permitiendo que la grasa subiera dentro del tubo, por capilaridad, unos 10 mm.

Los tubos capilares se colocaron invertidos en un beaker en el horno, bajo las mismas condiciones indicadas en preparación de las muestras para análisis. Se permitió que la grasa bajara, quedando a unos 10 mm del extremo superior del tubo. Se dejaron enfriar los tubos capilares a temperatura ambiente y se sellaron por el extremo más cercano a la grasa, con ayuda de un mechero de etanol (se usó en vez del de gas, por disponibilidad). El método sugiere sellar el tubo con la grasa justo en el extremo del tubo pero, al tratar de hacerlo, ésta se quema inmediatamente; por eso, se separó del borde del tubo para poder sellarlo sin afectar

la grasa. Los tubos capilares con muestra, ya sellados en un extremo, se dejaron en la refrigeradora a aproximadamente 4°C toda la noche, para permitir que la grasa se solidificara completamente.

Para determinar el intervalo de fusión, se usó un tubo de Thiele con glicerina (ver Figura 5 en sección de metodología), un mechero de etanol, un termómetro con divisiones de 1°C, un tapón de hule y bandas de hule para sujetar el tubo capilar al termómetro. Se procuró que la temperatura subiera aproximadamente 0.5°C por minuto para lograr determinar un intervalo de fusión más preciso. El tubo de Thiele se calentó solamente en el extremo del codo de su brazo como se muestra en la Figura 5 de la sección de metodología. Se tomó como límite inferior del intervalo la temperatura en la cual se observaba la primera fracción líquida de muestra y, como límite superior, la temperatura en la cual ya no se observaba mayor fusión de la muestra, es decir, que la porción de materia sólida parecía aparentemente constante. Se trabajaron tres réplicas individuales para cada muestra y se reportó el intervalo de fusión de cada una, como $x \pm 1c_{95\%}$ de cada uno de los dos límites de intervalo.

Los resultados se expresan como: (a – b)°C

siendo, a = límite inferior del intervalo de fusión

b = límite superior del intervalo de fusión

A.4 Determinación de la solubilidad

La solubilidad se define, en este caso, como los gramos de grasa que se logran disolver en 100 g de solvente a 25.0°C. Por disponibilidad, sólo se le determinó esta propiedad a las muestras de Rabinal y de Chiapas. No fue posible encontrar un método oficial para la determinación de solubilidad de aceites y grasas, por lo que se realizó el análisis según el procedimiento "Solubility test on waxes" indicado por Wharh (1956) al que se le hicieron algunas modificaciones; el procedimiento detallado se indica a continuación.

Esta determinación se hizo en etanol, acetona y éter de petróleo individualmente y en mezclas binarias de estos solventes, es decir, etanol:acetona y acetona:éter de petróleo. Para las determinaciones en solventes individuales se usó una balanza analítica con precisión ± 0.01 mg, por disponibilidad. Para las determinaciones en mezclas binarias, se usó balanza semianalítica, con precisión ± 0.01 g, en vez de la analítica porque se vió en la determinación con solventes individuales que la variación entre las réplicas era mucho mayor que la precisión de la balanza analítica.

Procedimiento

1. Pesar, en balanza analítica, ≈ 2.00000 g de grasa preparada (según se indica en este Apéndice) en un erlenmeyer de 125 ml tarado, con tapón de hule.
 2. Agregar, con una pipeta volumétrica, 25.00 ml del solvente grado reactivo.
 3. Con ayuda de una espátula, reducir el tamaño de los fragmentos de grasa para asegurarse que toda entre en contacto con el solvente.
 4. Tapar firmemente el erlenmeyer.
 5. Pesar cuidadosamente el erlenmeyer en balanza analítica, ya que después debe reemplazarse el solvente perdido por evaporación. (**==>W gramos**)
 6. Colocar el erlenmeyer en baño térmico 2 horas a $\approx 28.0^{\circ}\text{C}$ de tal manera que el agua llegue al mismo nivel que el solvente.
 7. Al cabo de media hora, secar y agitar el erlenmeyer, durante 5 min. usando un agitador eléctrico horizontal a ≈ 150 rpm; regresar al baño térmico. Repetir tres veces este proceso de calentamiento y agitación.
 8. Colocar el erlenmeyer en un baño térmico ≈ 15 min. a $(25.0 \pm 0.3)^{\circ}\text{C}$.
 9. Pesar el erlenmeyer seco y tapado, en balanza analítica. Destapar el erlenmeyer dejando también el tapón sobre la balanza y, con ayuda de una pipeta Pasteur, agregarle suficiente solvente, hasta alcanzar la masa original.
(**==>W gramos**)
 10. Tapar firmemente el erlenmeyer y agitarlo una vez más, bajo las mismas condiciones indicadas en el inciso 7.
 11. Dejar el erlenmeyer una hora en el baño térmico a $(25.0 \pm 0.3)^{\circ}\text{C}$ para que se asiente la parte no disuelta de la grasa.
 12. Decantar el sobrenadante a un tubo para centrifuga cónico, de 50 ml, de vidrio y con tapón de hule; centrifugar 5 min. a ≈ 1500 rpm.
 13. Con una pipeta volumétrica, transferir una alícuota de 20.00 ml del sobrenadante del tubo a un pesasustancias de tamaño adecuado, previamente tarado con su tapadera, en balanza analítica. Tapar el pesasustancias firmemente.
(**==>A gramos**)
 14. Pesar, en balanza analítica, los pesasustancias tapados conteniendo la solución de grasa. (**==>B gramos**)
 15. Destapar los pesasustancias y dejar evaporar el solvente hasta sequedad en la campana de extracción de gases, con ayuda de un suave flujo de nitrógeno (pureza 98.5%) saliendo de una pipeta Pasteur colocada en la boca del pesasustancias.
 16. Cuando ya no parezca haber solvente en el pesasustancias, colocarlo con su tapadera por un lado, en un horno con vacío a $\approx 60^{\circ}\text{C}$ y 25 plg (635 mm) Hg de vacío sin flujo de aire; llevarlo a masa constante (\approx una hora).
 17. Anotar la masa final del pesasustancias tapado con el residuo de grasa obtenido, en balanza analítica. (**==>C gramos**)
- Repetir este procedimiento dos veces más y reportar la solubilidad como $x \pm lc_{95\%}$.

Cálculos

siendo, A = masa del pesasustancias tapado, vacío, g

B = masa del pesasustancias con la solución de grasa, g

C = masa del pesasustancias con la grasa disuelta , después de evaporar el solvente a sequedad, g

C – A = masa de la grasa disuelta, después de evaporar el solvente a sequedad, g

B – A = masa de la solución grasa, g

D – C = masa de agua que se agregó sobre la muestra, para llenar el picnómetro, g

(B – A) – (C – A) = masa del solvente, g

$$\text{Solubilidad} = \frac{(C - A)}{(B - A) - (C - A)}$$

a 25.0°C

Entonces, según la definición de solubilidad dada previamente:

$$\text{Solubilidad} = \frac{\text{masa de la grasa disuelta, g}}{\text{masa del solvente, g}} \times 100$$

a 25.0°C

Notas

1. Los erlenmeyers y los pesasustancias deben manipularse durante todo el proceso con guantes de latex para evitar que la grasa de las manos modifique el peso e introduzca un error en los resultados.
2. Para proteger la bomba de vacío de los solventes extraídos del horno, colocar una trampa fría. Como trampa fría se usó un quitasato sumergido en agua con sal a $\leq 0^\circ\text{C}$ y y luego un tubo con desecante, Drierite con indicador. El desecante se cambiaba cuando el indicador del mismo cambiaba de color por la absorción de humedad.

A.5 Determinación del índice de acidez

Para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij se siguió el método oficial de IUPAC "Method 2.201 determination of the Acid Value and the Acidity, Section 5. Acid Value-Potentiometric Method" (IUPAC, 1979) dado para aceites y grasas vegetales y animales. Por disponibilidad de cantidad de muestra, sólo se le determinó esta propiedad a las de Rabinal y de Chiapas. La principal modificación fue usar 2-pentanona por disponibilidad, en vez de la metilisobutilcetona indicada por el método. Se debe emplear este método de titulación potenciométrica para la determinación del índice de acidez en grasas y aceites muy coloreados como es el caso de la grasa del nij, en vez del método de titulación volumétrica con un indicador.

Procedimiento

1. Pesar, en balanza analítica, ≈ 4.00000 g de grasa preparada (ver preparación de las muestras para análisis en este Apéndice) en un beaker de 100 ml.
(\Rightarrow **m gramos**)
2. Agregar, con una probeta, 50 ml de 2-pentanona, grado reactivo.
3. Con ayuda de una espátula, reducir el tamaño de los fragmentos de grasa para asegurarse que toda entre en contacto con el solvente.
4. Sumergir en la mezcla el electrodo de combinación para pH del sistema potenciométrico y empezar a agitar con agitación magnética. Titular con una solución valorada de KOH $\approx 0.50N$ en 2-propanol, hasta el punto final. Decidir las porciones de titulante a agregar a partir de la pendiente de la curva de titulación que será calculada después de cada adición: porciones de 1 ml lejos del punto de equivalencia y de 0.2 ml en ± 1 ml del punto final. Después de cada adición de titulante, agitar durante 30 segundos, parar y esperar hasta que la lectura de pH sea constante para registrarla.

Repetir el procedimiento dos veces más y reportar el índice de acidez como $x \pm I_{c_{95\%}}$.

Cálculos

Los resultados se expresan como:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{\text{mg KOH}}{\text{g muestra}}$$

Los valores de índice de acidez se pueden calcular usando la expresión indicada a continuación.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(56.1) \times (N) \times (V)}{m} = \frac{\text{mg KOH}}{1 \text{ g muestra}}$$

siendo, V = ml usados de la soln. patrón de KOH para alcanzar el punto final

m = masa, en g, de la porción de masa usada

N = normalidad de la soln. patrón de KOH

56.11 = peso fórmula del KOH

En la sección de metodología se incluye la reacción involucrada en esta determinación y la estequiometría de la cual se deriva la expresión recién indicada.

Notas

1. Es aconsejable mantener sumergido el electrodo de combinación para pH en agua o, mejor aún, en 2-pentanona (se usó 2-propanol) durante 12 horas antes de la titulación, para permitir que el solvente entre en la interfase de la membrana de vidrio

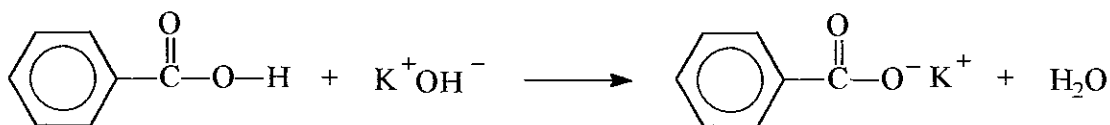
poroso y que así mejore la respuesta del electrodo. También se recomienda secar el electrodo muy suavemente con un trozo de papel "Kimwipe" antes de usarlo; inmediatamente después de la titulación, desaguarlo con 2-pentanona, luego con 2-propanol, y finalmente con agua desionizada.

- Entre titulaciones, para eliminar cualquier resto de grasa adherida al electrodo, y así mejorar su respuesta, éste debe ser sumergido en diferentes medios, como se indica a continuación.

<u>min.</u>	<u>Medio</u>
5	2-pentanona
30	2-propanol
30	Extran alcalino \approx 20%(v/v)
5	agua desionizada 1
5	agua desionizada 2 (revisar y, si es necesario, ajustar calibración con buffers acuosos de pH 7.00 y 10.00).
30	2-propanol
30	2-pentanona

- El punto de equivalencia se puede calcular gráficamente pues es el punto en el cual la primera derivada de la variación del pH como una función de la cantidad de solución de KOH en 2-propanol agregada alcanza un máximo, o el punto en el cual la segunda derivada es cero. (Ver ejemplo en apéndice B).
- La solución titulante de \approx 0.5N de KOH en 2-propanol se prepara disolviendo 35.00 g de escamas de KOH en 2-propanol, ambos grado reactivo, y aforando a 1000 ml con este mismo solvente.
- La solución \approx 0.5N de KOH, usada como titulante en la determinación del índice de acidez, se valora contra ácido benzoico patrón, de la manera indicada a continuación. Pesar cuidadosamente en un beaker de 150 ml, usando balanza analítica, aproximadamente 0.75000 g (\Rightarrow **m₀ gramos**) de el ácido benzoico grado reactivo (no secarlo); disolver en 50 ml de 2-pentanona. Sumergir el electrodo en la solución, empezar a agitar con agitación magnética y titular con la solución de KOH hasta el punto final (\Rightarrow **a₀ ml de soln. titulante**). Decidir las porciones de titulante a agregar a partir de la pendiente de la curva de titulación que será calculada después de cada adición: porciones de 1 ml lejos del punto de equivalencia y de 0.2 ml en \pm 1 ml del punto final. Después de cada adición de titulante, agitar durante 10 segundos, parar y esperar hasta que la lectura de pH sea estable para registrarla. Repetir el procedimiento dos veces más y reportar la normalidad como $x \pm 1c_{95\%}$.

A continuación se muestra la reacción involucrada en la titulación de valoración de la solución de KOH con ácido benzoico (H Φ) y la estequiometría, basa en esta reacción, necesaria para calcular la normalidad de la solución de KOH.



$$\frac{m_o \text{ g de H}\phi \text{ reactivo}}{a_o \text{ ml de soln. KOH}} \times \frac{b \text{ g de H}\phi}{100 \text{ g de H}\phi \text{ reactivo}} \times \frac{1 \text{ mol de H}\phi}{122.1 \text{ g de H}\phi} \times \frac{1 \text{ mol de KOH}}{1 \text{ mol de H}\phi}$$

$$\times \frac{1 \text{ eq. de KOH}}{1 \text{ mol de KOH}} \times \frac{1000 \text{ ml de soln. KOH}}{1 \text{ L soln. KOH}} = \frac{\text{equivalentes de KOH}}{1 \text{ L de solución de KOH}}$$

donde, b = porcentaje de pureza del ácido benzoico, grado reactivo, usado

m_o = masa de ácido benzoico, grado reactivo, g

a_o = ml usados de la soln. de KOH para alcanzar el punto final

H ϕ = ácido benzoico

Esta estequiometría puede reducirse, para calcular la normalidad de la solución de KOH en 2-propanol, a la expresión indicada a continuación.

$$\text{Normalidad} = \frac{(1000) \times (m_o) \times (b)}{(122.1) \times (a_o)} = \frac{\text{eq. KOH}}{1 \text{ L de soln. KOH}}$$

A.6 Determinación del índice de saponificación

Para la determinación del índice de saponificación de la grasa del nij se siguió el método oficial de IUPAC "Method 2.202 determination of the Saponification Value, Section 5. Potentiometric Method" (IUPAC, 1979) dado para aceites y grasas vegetales y animales. Por disponibilidad de cantidad de muestra, sólo se le determinó esta propiedad a las de Rabinal y de Chiapas. Al procedimiento se le hicieron algunas modificaciones, quedando como se indica. Se debe emplear este método de titulación potenciométrica para la determinación del índice de saponificación en grasas y aceites muy coloreados como es el caso de la grasa del nij, en vez del método de titulación volumétrica con un indicador.

Procedimiento

1. Pesar, en balanza analítica, ≈ 2.00000 g de grasa preparada (ver preparación de las muestras para análisis en este Apéndice) en un balón de destilación de 100 ml(==>**m gramos**).
2. Agregar, con pipeta volumétrica, 25.00 ml de la solución $\approx 0.50\text{N}$ de KOH en 2-propanol. Colocar un condensador vertical con circulación de agua, agregar unas cuantas perlas de ebullición y hervir suavemente, durante 60 minutos.
3. Transferir cuantitativamente la solución saponificada, mientras aún está tibia, a un

beaker alto de 100 ml con la ayuda de tres porciones de 10.0 ml de 1,2-etilenglicol, para evitar la solidificación de la solución saponificada al enfriarse. Hacer un enjuague final del balón con 5.0 ml de 2-propanol. Todos estos lavados se hacen agregando el solvente por la boca del condensador.

- Sumergir en la mezcla el electrodo de combinación para pH del sistema potenciométrico y agitar aproximadamente 5 minutos con agitación magnética. Dejar de agitar y cuando la lectura de pH del potenciómetro llegue a ser constante, iniciar la titulación con la solución patrón 0.50N de HCl en 2-propanol hasta unos 2 ml más allá del punto de equivalencia de la curva de neutralización. Decidir las porciones de titulante a agregar a partir de la pendiente de la curva de titulación que será calculada después de cada adición: porciones de 1.0 ml lejos del punto de equivalencia y de 0.2 ml en ± 1.0 ml del punto final. Después de cada adición de titulante, agitar durante 30 segundos, parar y esperar hasta que la lectura de pH sea constante para registrarla.

Repetir el procedimiento dos veces más y reportar el índice de saponificación como $x \pm 1c_{95\%}$. El reflujo y la titulación se llevan a cabo dentro de la campana de extracción de gases. Llevar a cabo la titulación de un blanco (sin muestra) siguiendo el mismo procedimiento. Como se indicó en la introducción de este Apéndice, se debe hacer un triplicado, tanto de la titulación de la muestra como del blanco.

Cálculos

Los resultados se expresan como:

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{\text{mg KOH}}{\text{g muestra}}$$

Los valores de índice de saponificación se pueden calcular usando la expresión indicada a continuación.

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{(56.1) \times (N) \times (V_0 - V_1)}{m} = \frac{\text{mg KOH}}{\text{l g muestra}}$$

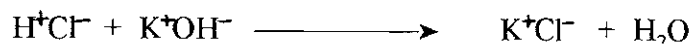
siendo, V_0 = ml usados de la solución patrón de HCl 2-propanol para titular el blanco
 V_1 = ml usados de la solución patrón de HCl 2-propanol para titular la muestra de grasa
 N = normalidad de la solución patrón de HCl en 2-propanol
 m = masa de la porción de muestra usada, g
 56.11 = peso fórmula del KOH

En la sección de metodología se incluye la reacción involucrada en esta determinación y la estequiometría de la cual se deriva la expresión recién indicada.

Notas

1. Es aconsejable mantener sumergido el electrodo de combinación para pH en una mezcla de 1,2-etilenglicol/2-propanol 6/1 (v/v), ambos grado reactivo, durante 12 horas antes de la titulación. También se recomienda secar el electrodo muy suavemente con un trozo de papel "Kimwipe" antes de usarlo; inmediatamente después de la titulación, desaguarlo con la mezcla de 1,2-etilenglicol/2-propanol, luego con 2-propanol, y finalmente con agua desionizada.
2. Si el electrodo no funciona satisfactoriamente, es posible regenerarlo sumergiéndolo durante 24 horas en una solución 0.1 N de HCl en 2-propanol. Después de este tratamiento el electrodo debe ser lavado con agua desionizada, luego con 2-propanol y finalmente con la mezcla de 1,2-etilenglicol/2-propanol.
3. El punto de equivalencia se puede calcular graficamente pues es el punto en el cual la primera derivada de la variación del pH como una función de la cantidad de solución de KOH en 2-propanol agregada alcanza un máximo, o el punto en el cual la segunda derivada es cero. (Ver ejemplo en apéndice B).
4. La solución $\approx 0.5N$ de KOH en 2-propanol se prepara disolviendo 35.00 g de escamas de KOH en 1000 ml de 2-propanol grado reactivo. La solución patrón 0.5N de HCl se prepara mezclando 42.0 ml de HCl con 2-propanol, ambos grado reactivo, y aforando 1000 ml con este mismo solvente.
5. 15.00 ml de solución 0.5N de HCl, usada como titulante en la determinación del índice de saponificación, se valoró contra la soln. patrón de KOH usada en la determinación del índice de acidez, usando como indicador soln. de fenolftaleína al 0.1%(p/v) en etanol al 80%(v/v) (Skoog and West, 1982). El procedimiento de valoración se hizo en triplicado y se reportó la normalidad como $x \pm 1c_{95\%}$. El método oficial de IUPAC "Method 2.202 determination of the Saponification Value, Section 5. Potentiometric Method" (IUPAC, 1979) indicaba valorar la solución de HCl con Na_2CO_3 patrón pero, se prefirió usar la solución patrón de KOH porque ya había sido valorada pues las determinaciones de índice de acidez e índice de saponificación se hicieron en ese orden y, porque este procedimiento de valoración era mucho más sencillo y rápido que el indicado para Na_2CO_3 patrón.

A continuación se muestra la reacción involucrada en la titulación de valoración de la solución de HCl con la solución patrón de KOH y la estequiometría, basa en esta reacción, necesaria para calcular la normalidad de la solución de HCl.



$$\frac{15.00 \text{ ml de soln. KOH}}{V \text{ ml de soln. HCl}} \times \frac{N \text{ eq. de KOH}}{1000 \text{ ml de soln. KOH}} \times \frac{1 \text{ eq. HCl}}{1 \text{ eq. KOH}} \times \frac{1000 \text{ ml soln. HCl}}{1 \text{ L soln. HCl}}$$

$$= \frac{\text{eq. HCl}}{1 \text{ L soln. HCl}}$$

siendo, V = ml usados de la soln. de KOH para alcanzar el punto final
 N = normalidad de la soln. de KOH

Esta estequiometría puede reducirse, para calcular la normalidad de la solución de HCl en 2-propanol, a la expresión indicada a continuación.

$$\text{Normalidad} = \frac{(1000) \times (15.00) \times (N)}{V} = \frac{\text{eq. HCl}}{1 \text{ L de soln. HCl}}$$

A.7 Determinación del índice de yodo

Para la determinación del índice de yodo, indicador del grado de insaturación, de la grasa del nij se siguieron los métodos oficiales de la AOAC "Iodine Absortion Number of Oils and Fats, Hanus Method, Final Action, 28.021–28.022" y "Standard Solutions of Sodium Thiosulfate, Final Action, 50.037–50.038" (AOAC, 1984). Por disponibilidad de cantidad de muestra, sólo se le determinó esta propiedad a las de Rabinal y de Chiapas. Además, se determinó el índice de yodo a las fracciones de grasa del nij de Rabinal, soluble e insoluble en éter de petróleo; estas fracciones se obtuvieron de la determinación de solubilidad en éter de petróleo. Se les hicieron algunas modificaciones a los procedimientos; quedando como se indican.

Siempre que se indique agitar, se hará con agitación magnética.

Preparación de la solución de tiosulfato de sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

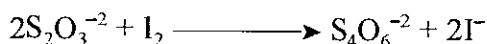
1. Pesar, aproximadamente 25.00 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o 15.80 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ anhidro (el que se usó tenía 99% de pureza).
2. Disolver en 1000 ml de agua desionizada; ésto da una solución aproximadamente 0.1N.
3. Hervir suavemente esta solución durante cinco minutos y transferirla, mientras está caliente, a un frasco de vidrio color ambar con tapón esmerilado perfectamente limpio.

Si el frasco de vidrio no es resistente al calor, calentarlo antes a aprox. 70°C en un horno; si no es color ambar, cubrirlo completamente con papel aluminio. Guardar la solución en un lugar oscuro y fresco; no regresar solución sobrante al frasco. Si se desea una solución con una concentración menor a 0.1N, prepararla por dilución con agua recién hervida. (Soluciones más diluidas que 0.1N son menos estables por lo que deben prepararse justo antes de usarse).

Valoración de la solución de tiosulfato de sodio

1. Pesar, por diferencia hacia un erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado, 0.20000–0.23000 g de dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$ (el que se usó tenía 99.9% de pureza); debe secarse previamente calentándolo 2hrs. a $100^\circ C$ e inmediatamente colocarse en una desecadora, hasta el momento de su utilización.
 2. Disolver el $K_2Cr_2O_7$, con agitación, en 80 ml de agua desionizada libre de cloro conteniendo 2.00 g de KI (esta solución se preparó previamente disolviendo el KI en agua desionizada recién hervida; se guardó en un recipiente forrado completamente con papel aluminio).
 3. Agregar a esta solución, con agitación, 20.0 ml de una solución de HCl aproximadamente 1N. Colocar inmediatamente el erlenmeyer dentro de un beaker de tamaño apropiado tapado con un lado de una caja Petri; tanto el beaker como la caja deben estar forrados con papel aluminio.
 4. Dejar el erlenmeyer dentro del beaker tapado durante 10 minutos, agitando ocasionalmente.
 5. Sacar el erlenmeyer del beaker y titular con la solución de $Na_2S_2O_3$ preparada en la sección anterior, agregando aproximadamente 1 ml de solución acuosa de almidón al 1%(p/v) en el momento en que se ha consumido la mayor parte del yodo.
 6. Continuar titulando hasta que la solución pase de azul índigo a celeste claro.
- Repetir el procedimiento dos veces más y reportar la normalidad como $x \pm I_{C_{95\%}}$.

A continuación se presentan las reacciones involucradas en esta valoración y la estequiometría necesaria para calcular la normalidad de la solución de $Na_2S_2O_3$ a partir de estas reacciones. La primera reacción involucra la formación del I_2 , que ocurre cuando el $K_2Cr_2O_7$ se disuelve en la solución de KI. La segunda reacción es la titulación del I_2 con la solución de $Na_2S_2O_3$ que se desea valorar.



$$\frac{m_0 \text{ g de } K_2Cr_2O_7 \text{ reactivo}}{V \text{ ml de soln. } Na_2S_2O_3} \times \frac{a \text{ g de } K_2Cr_2O_7}{100 \text{ g de } K_2Cr_2O_7 \text{ reactivo}} \times \frac{1 \text{ mol } K_2Cr_2O_7}{294.19 \text{ g de } K_2Cr_2O_7}$$

$$\times \frac{3 \text{ moles de } I_2}{1 \text{ mol de } K_2Cr_2O_7} \times \frac{2 \text{ moles de } Na_2S_2O_3}{1 \text{ mol de } I_2} \times \frac{1 \text{ eq. } Na_2S_2O_3}{1 \text{ mol de } Na_2S_2O_3}$$

$$\times \frac{1000 \text{ ml de soln. } Na_2S_2O_3}{1 \text{ L soln. } Na_2S_2O_3} = \frac{\text{equivalentes de } Na_2S_2O_3}{1 \text{ L de solución de } Na_2S_2O_3}$$

donde, a = porcentaje de pureza del $K_2Cr_2O_7$ usado

m_0 = masa de $K_2Cr_2O_7$ grado reactivo, g

V = ml usados de la soln. $Na_2S_2O_3$ para alcanzar el punto final

294.19 = peso fórmula del $K_2Cr_2O_7$

Esta estequiometría puede reducirse, para calcular la normalidad de la solución de $Na_2S_2O_3$, a la expresión indicada a continuación.

$$\text{Normalidad} = \frac{(m_p) \times (a) \times (6000)}{(V) \times (294.19)} = \frac{\text{equivalentes de } Na_2S_2O_3}{1 \text{ L de solución de } Na_2S_2O_3}$$

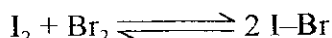
Además de lo indicado en los métodos oficiales AOAC 50.037 y 50.038 (AOAC, 1984), se consultó todo lo relacionado con reacciones, estabilidad y forma de preparación de las soluciones de tiosulfato de sodio (Skoog and West, 1982).

Preparación de la solución de Hanus

Todos los pasos del procedimiento de preparación de la solución de Hanus (Br_2 , I_2 y ácido acético glacial) así como de la determinación del índice de yodo, deben llevarse a cabo en la campana de extracción de gases de donde no debe salir dicha la solución. Se deben utilizar guantes apropiados (de neopreno, por ejemplo) para manipular estas sustancias.

1. Agregar I_2 grado reactivo a un frasco con tapón esmerilado de 500 ml tarado; tapar el frasco, sacarlo de la campana y pesarlo. Repetir éste proceso hasta haber agregado 6.60 g de I_2 .
2. Agregar al frasco, con una probeta graduada, 500.0 ml de ácido acético glacial. Colocar inmediatamente el frasco dentro de un beaker de tamaño apropiado tapado con un lado de una caja Petri. Tanto el beaker como la caja deben estar forrados con papel aluminio.
3. Colocar el beaker tapado con la caja Petri y conteniendo el frasco destapado, en un baño de maría a aproximadamente $70^\circ C$ y agitar hasta disolución completa (aproximadamente 1 hora); taparlo y, sin sacarlo del beaker, dejarlo enfriar a temperatura ambiente sin suspender la agitación.
4. Sacar el frasco del beaker y agregarle, con una pipeta graduada, 1.5 ml de Br_2 grado reactivo. Tapar inmediatamente el frasco, colocarlo de nuevo dentro del beaker y agitar hasta disolución completa (aproximadamente 2–3 minutos). Sacar la barra magnética de la solución.

La preparación del reactivo de Hanus involucra la formación del monobromuro de yodo al mezclar el yodo y el bromo, esta reacción se presenta a continuación. La formación del monobromuro de yodo es evidente por el cambio de color que se observa en la solución al agregar el bromo, de café oscuro a marrón oscuro. Este monobromuro es el que posteriormente reaccionará con los dobles enlaces de la muestra al agregársele.



Determinación del índice de yodo según el método 28.024 (AOAC, 1984)

1. En un erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado, pesar una muestra de grasa de tamaño apropiado, con una precisión de ± 0.01 mg, según el índice de yodo esperado como se indica a continuación. Si no se conoce el índice de yodo esperado, deben hacerse determinaciones preliminares para estimarlo.

Índice de yodo esperado g yodo/100 g muestra	g muestra a usar
10	3.17–2.54
20	1.59–1.27
40	0.79–0.63
80	0.40–0.32
120	0.26–0.21
160	0.20–0.16
200	0.16–0.13

Con estas cantidades de muestra se asegura que el exceso de halógeno, expresado en términos de I_2 , sea igual o mayor a la cantidad agregada inicialmente; esta cantidad inicial se determina con el blanco, como se verá más adelante.

2. Agregar al erlenmeyer 10.0 ml de $CHCl_3$ grado reactivo y disolver la grasa con ayuda de una pequeña espátula.
3. Con una pipeta volumétrica, agregar 25.00 ml de la solución de Hanus, taponar el erlenmeyer y colocarlo inmediatamente en dentro de un beaker de tamaño apropiado tapado con un lado de una caja Petri; tanto el beaker como la caja deben estar forrados con papel aluminio.
4. Dejar el erlenmeyer dentro del beaker durante exactamente 30 minutos, agitando ocasionalmente.
5. Sacar el erlenmeyer del beaker; agregar cuidadosamente, con agitación, primero 10.0 ml de una solución acuosa de KI al 15% (p/v) y luego 100.0 ml de agua recién hervida y enfriada tapada. Con la última porción de agua, enjuagar cualquier residuo de yodo en el tapón hacia el erlenmeyer. Con la adición del KI se formará I_2 . (La soln. de KI al 15% (p/v) preparó previamente disolviendo el KI en agua desionizada recién hervida; se guardó en un recipiente forrado completamente con papel aluminio).
6. Titular el yodo liberado con la solución patrón de $Na_2S_2O_3$, agregándola gradualmente, con agitación constante, hasta que la solución llegue a un color amarillo muy pálido. En ese momento, agregar unas pocas gotas de soln. acuosa almidón al 1%(p/v) con lo que la solución se tornará azul índigo. Continuar titulado hasta que la solución pase de azul índigo a incoloro. Cerca del punto final de la

titulación, tapar el erlenmeyer y agitarlo violentamente, para que el yodo aún disuelto en el CHCl_3 pueda ser atrapado por la solución acuosa de KI.

7. Correr un blanco (sin muestra de grasa) siguiendo el mismo procedimiento.

Repetir el procedimiento dos veces más y reportar e índice de yodo de la muestra como $x \pm \text{lc}_{95\%}$.

Cálculos

Los resultados se expresan como:

$$\text{Índice de yodo} = \frac{\text{g I}_2}{100 \text{ g muestra}}$$

Los valores de índice de saponificación se pueden calcular usando la expresión indicada a continuación.

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(B - S) \times (N) \times (253.81)}{(m) \times (20)} = \frac{\text{g I}_2}{100 \text{ g muestra}}$$

siendo, B = ml usados de la soln. patrón $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para alcanzar el punto final en el blanco

S = ml usados de la soln. patrón $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para alcanzar el punto final en la muestra

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

m = masa de la porción de muestra usada, g

253.81 = peso fórmula del I_2

En la sección de metodología se incluye la reacción involucrada en esta determinación y la estequiometría de la cual se deriva la expresión recién indicada.

A.8 Determinación del espectro de absorción ultravioleta-visible

1. Para la determinación del espectro de absorción de absorción ultravioleta y visible (UV-VIS) de 200 a 450 nm se procedió a la corrección de la línea base por tratarse de un espectrofotómetro de doble haz. Esta corrección se hace, según el manual del equipo usado (Perkin-Elmer, 1982), colocando en los portaceldas las 2 celdas de cuarzo llenas con el solvente en que se ha disuelto la muestra y seleccionando "background correction".
2. Para correr los espectros de las muestras, se deja fija la celda con solvente en el portacelda de referencia y en la otra se sustituye el solvente con la solución de muestra a la que se desea correr el espectro. Al usar diferente solvente para disolver la muestra, se realiza una nueva corrección de la línea base con éste. (Perkin-Elmer, 1982)

3. Condiciones de trabajo

Método	Scan / Manual
Modo de la ordenada	Absorbancia
Ancho de rendija	2 nm
Velocidad de barrido	60 nm / min
Respuesta	0.5 s
Lámpara	Autolamp (en este modo el aparato selecciona automáticamente la lámpara, UV o VIS, según longitud de onda que se esté barriendo el espectro, el cambio de lámpara se hace a 10 nm)
Ciclos / tiempo	1 / 0.05 min
Umbral de pico	0.02 Abs
Modo del graficador	Overlay / Dash 1-4
Ordenada min / max	0.000 / 2.000 ó 0.000 / 3.000
Abscisa min / max	200.0 / 450.0 nm
Formato de la abscisa	20 nm / cm ó 50 nm / cm

Se se corrió el espectro de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS) de trioleína, una mezcla patrones de triacilglicérols (Sigma), aceite de oliva y aceite de soya como patrones y, de grasas del nij de Rabinal-Guatemala y de Rabinal, en el intervalo de 200-450 nm, usando tetrahidrofurano y hexano como solventes. Las muestras de grasa del nij se fundieron justo antes de agregarles el solvente, según lo recomendado en el método de HPLC usado para la separación de los triacilglicérols (AOCS, 1989). Ver procedimiento detallado y condiciones de trabajo de estos métodos en este Apéndice.

Se hicieron diluciones de las soluciones iniciales preparadas para cada una de las muestras, hasta que el máximo de absorbancia fuera igual o menor que 2 unidades de absorbancia; entonces, se trazaron los espectros a estas concentraciones. La mezcla de patrones de triacilglicérols fue la excepción, pues no se hizo dilución; se corrió el espectro de la solución inicial y el máximo fue de aproximadamente 3.5 unidades de absorbancia.

Muestra	Solvente	Concentración de la soln. leída, g/ml
Trioleína	tetrahidrofurano	2.679×10^{-3}
Aceite de Oliva	tetrahidrofurano	2.090×10^{-2}
	hexano	1.022×10^{-3}
Aceite de Soya	tetrahidrofurano	9.474×10^{-3}
	hexano	2.095×10^{-5}
Grasa del nij de Rabinal	tetrahidrofurano	2.047×10^{-5}
	hexano ¹	2.010×10^{-5}

Grasa del nij de Rabinal–Guatemala	tetrahidrofurano	2.001×10^{-5}
Mezcla de patrones de triacilglicérols	hexano ¹	1.500×10^{-2}

¹ Se corrió el espectro de la fracción soluble; en el cálculo de la concentración de las diluciones se asumió disolución completa. sin embargo, no se logró disolución completa de la mezcla primaria.

A.9 Determinación del espectro de absorción infrarroja

Los espectros de absorción infrarroja (IR) de las muestras de grasa del nij se corrieron con un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier en modo de transmisión. Por ser un espectrofotómetro de un solo haz, se corre un espectro del fondo, es decir, sin nada en el haz de radiación infrarroja, antes de correr el espectro de cada muestra (Nicolet, 1995). El paquete Omnic resta el espectro del fondo del de la muestra después de haber corrido ambos espectros y presenta el espectro de la muestra ya corregido (Nicolet, 1996).

1. Se colocaron, sobre vidrios de reloj separados, porciones de grasa del nij de Rabinal y de Rabinal–Guatemala del tamaño de un grano de frijol.
2. Se fundieron las porciones de grasa a aproximadamente 50°C en horno al vacío con flujo de aire seco.
3. Se aplicó una gota de cada una de las muestras fundidas, con ayuda de un gendarme, sobre diferentes ventanas circulares de KCl.
4. La muestra se esparció frotando ventana contra ventana de KCl a manera de obtener una película lo más delgada y regular posible.
5. Se dejaron enfriar las películas de grasa aproximadamente media hora; se dejó la muestra expuesta al aire, sobre la cara de la ventana original usada sin colocar otra ventana encima de ellas (formando un sandwich).
6. Se motaron las ventanas con película de grasa en los portaventanas.
7. Se corrieron los espectros IR de las películas en el intervalo 400–4000 cm^{-1} .
8. Inmediatamente después, las ventanas de KCl con las películas de grasa, se colocaron en la desecadora a presión atmosférica, montadas aún en los portaventanas; a éstos se les hizo una marca para asegurar que los espectros sucesivos siempre se sacaran con la ventana en la misma posición. Esto se hizo porque interesaba volver a obtener los espectros IR de las películas después de transcurrido cierto tiempo.
9. Se corrió el espectro de cada una de las películas sobre las ventanas de KCl una vez a la semana, hasta que el espectro ya no cambió apreciablemente por la exposición de la película al aire (2 semanas). Las ventanas con las películas se mantuvieron dentro de la desecadora y sólo se sacaron el tiempo necesario para correr los espectros.

Además, como referencia, se corrieron espectros IR de aceite de soya y aceite de linaza, colocando una gota de cada uno de éstos sobre diferentes ventanas de KCl, haciendo sandwich con otra ventana.

Condiciones de trabajo

Intervalo barrido	400–4000 cm^{-1}
Modo	de transmisión no dispersivo
Número de barridos para la muestra	8
Número de barridos para el fondo	8
Resolución	2 cm^{-1}
Ganancia para el barrido de la muestra	2.0
Apodización	Happ–Genzel
Rellenado de datos	ninguno
Espaciamiento de los datos	0.964 cm^{-1}

Se encontró mucha dificultad en la limpieza de las ventanas de KCl después de un mes de tener adherida la película de grasa. Después de probar varios procedimientos, lo que mejor funcionó fue:

1. Dejar las ventanas sumergidas durante 3–4 días en éter de petróleo de P. eb. 35–60°C.
2. Dejar las ventanas sumergidas durante 3–4 días en acetona anhidra grado reactivo.

Para ésto, se sumergieron las ventanas en pesasustancias con los solventes; a los pesasustancias se les puso "Parafilm" sobre la unión de la tapadera para reducir la evaporación del solvente, lo cual era un problema principalmente en el caso del éter de petróleo.

A.10 Determinación del espectro de resonancia magnética nuclear de protones

1. Las porciones de muestra de grasa del nij de Rabinal–Guatemala se colocaron en recipientes cilíndricos de vidrio con tapón de rosca, de aproximadamente 5 ml.
2. Se prepararon soluciones de la muestra en acetona y cloroformo deuterados favoreciendo la disolución con ayuda de una espátula para pesadas analíticas; no toda la porción de grasa se disolvió en los solventes. Ya que lo que se tenía eran mezclas y no soluciones, se dejó asentar el sedimento y se transfirió, con una pipeta Pasteur, ≈ 0.4 ml de la fracción soluble hacia un tubo de NMR de fondo redondo.
3. Fue necesario aumentar la concentración de las mezclas preparadas inicialmente para aumentar la señal de la región de protones aromáticos (se cree que están presentes en el pigmento de la grasa, según se explica en discusión). Las concentraciones nominales definitivas de las mezclas que se utilizaron para trazar los espectros fueron: 0.6 g en 1 ml de acetona deuterada y 0.6 g en 0.8 ml de cloroformo deuterado. En el caso de la mezcla con acetona deuterada, la fracción soluble colocada en el tubo NMR aún estaba turbia (posible presencia de partículas suspendidas). Durante el proceso de disolución de las porciones de grasa se observó una disolución más rápida y con menos sedimento relativo, en el cloroformo que en la acetona.
4. Para determinar el espectro de la muestra, el campo del espectrómetro de resonancia magnética nuclear de protones (^1H NMR) utilizado se ajusta colocando en el

portamuestras una solución de referencia de tetrametilsilano (TMS) en cloroformo deuterado y ajustando la señal del TMS a 0.00 ppm (Varian, 1979).

Condiciones de trabajo

Amplitud del espectro	variable (1.5–6.0 X 1000)
Filtro	0.05 s
Poder de radiofrecuencia (rf)	0.048 mG
Tiempo de barrido	5 minutos
Ancho del barrido	10 ppm
Fin del barrido	0.00 ppm
Temperatura de la muestra	ambiente

A.11 Determinación de la composición en triacilgliceroles

Para la determinación de la composición en triacilgliceroles de la grasa del nij se siguió el método oficial de la AOCS "AOCS Official Method Ce 5b-89, Triglycerides in Vegetable Oil by HPLC" (AOCS, 1989) escogiéndose el procedimiento en el que se usaba detector UV en vez del que usaba detector de índice de refracción diferencial. En esta determinación sólo se trabajó con la grasa del nij de Rabinal como muestra problema. Además, se corrieron cromatogramas de muestras comerciales de aceites de soya y de oliva, como referencia.

Procedimiento

1. Preparación de soluciones para cromatografía
Pesar cuidadosamente, en balanza analítica, 40.00–60.00 mg (2–3 gotas) de muestra recién fundida, en horno al vacío a 60°C, en un pequeño recipiente de vidrio con tapón de rosca; si es necesario, calentar ligeramente el vial para fundir la muestra. Agregar, con una pipeta Pasteur, tetrahidofurano grado HPLC, para hacer una solución que sea aproximadamente 5% (p/v) de muestra en tetrahidofurano. La solución de muestra debe pasarse a través de un filtro de jeringa de 0.5 µm hacia un vial de vidrio, para proteger la columna HPLC de contaminación por partículas. Las soluciones se guardaron en recipientes de vidrio con tapón de rosca, forrados con papel aluminio.
2. Inyección
Desaguar el "loop" de inyección de 10 µl con unos 20 µl de la solución filtrada de la muestra y luego llenarlo con esta misma solución.
3. Fase móvil
Preparar una solución de acetonitrilo/tetrahidofurano 73/27 (v/v), agregando volúmenes apropiados de solventes grado HPLC a un beaker y degasificar filtrando con succión.

Condiciones de trabajo

Conc. de las muestras	Entre 2–5%(p/v) (ver cromatogramas en sección de resultados) en THF
Columna analítica	Varian, MCH5-n-cap, 300 mm X 4 mm, tamaño de partícula 5µm
Temperatura de la columna	ambiental
Fase móvil	ACN / THF 73 /27 %(v/v) premezclada, filtrada y degasificada.
Flujo de la fase móvil	1.0 ml / min
Loop de inyección	10 µL
Detector	UV en 250 nm
Sistema para la adquisición, procesamiento y registro de datos	Chemstation Hewlett-Packard

A.12 Listado general de materiales1. Equipo de laboratorio

Agitador horizontal:	Big Bill, Thermolyne, capacidad para 12 erlenmeyers, 25–450 rpm
Baños térmicos:	Blue M, modelo MW, con agitación, intervalo de temperatura 0–100°C
Balanza analítica:	Mettler H51AR, capacidad 160 g, precisión ± 0.01 mg
Balanza semianalítica:	Fisher Scientific, modelo XD–8KD, capacidad 800g, precisión ± 0.01 g, lectura digital
Bomba de vacío:	Sargent Welch duo–seal, modelo 1399, provoca un vacío máximo de 25 plg (635 mm) Hg (en el interior del horno con vacío utilizado)
Campana extractora de gases:	Kewaunne Scientific Equipment Corp.
Centrífuga:	International Equipment Company (IEC), modelo HNS; con timer de 2–60 min, tacómetro de 0–9000 rpm (incrementos de 500 rpm) y con cabezal para 4 tubos de 50 ml
Electrodo para pH:	de combinación, Orion, cat. No. 910500

Espectrofotómetro IR:	FTIR, Nicolet Impact 420, intervalo de número de onda 375–7400 cm^{-1} , con software Omnic, en computadora HP Vectra 100 e impresora HP DeskJet 400
Espectrofotómetro UV–VIS:	Perkin–Elmer, modelo $\lambda 5$, intervalo de longitud de onda 190–900 nm
Espectrómetro ^1H NMR:	Varian, EM–360L, 60 MHz
Estufa con agitador magnético:	Corning modelo PC-320
Horno con vacío:	Precision, modelo 19, temperatura máxima 200°C, vacío máximo 30 plg (760 mm) Hg (según especificaciones del equipo)
Potenciómetro:	Orion Research, modelo 407A
Sistema HPLC:	Varian, modelo Vista 5560 LC; con columna Varian, MCH5–n–cap, 300 mm x 4 mm, tamaño de partícula 5 μm , \approx 14% de recubrimiento de carbono como octadecilsilano en forma de monocapa, está recomendada para triacilglicerolés y aminoácidos; con detector ultravioleta–visible de longitud de onda variable; con sistema HP ChemStation para adquisición, procesamiento y registro de datos, en computadora HP Vectra 100, con impresora HP DeskJet 400

2. Cristalería y otros materiales

Balones volumétricos de: (250.00 \pm 0.12)ml, Kimax A, TC 20°C; (500.00 \pm 0.25)ml, Superior Din A, In 20°C; (1000.00 \pm 0.30)ml, Pyrex A, TC °C

Baño de maría pequeño

Barritas magnéticas para agitadores

Beakers de: 25, 100 (altos), 250 y 1000 ml

Bulbos, con válvulas de seguridad, para pipeta volumétrica o graduada

Bulbos, para pipetas Pasteur

Buretas de: 10.00 ml, graduada en 0.01 ml; 50 ml, graduada en 0.1 ml

Cajas Petri grandes

Celdas de cuarzo, para espectrofotómetro UV–VIS

Celdas para ventanas de KCl

Embudos, de vidrio, de tallo corto

Erlenmeyers de: 125 y 250 ml (éstos últimos, con tapón esmerilado)

Espátula delgada de doble hoja
Frascos goteros de 15 y 25 ml
Frascos de 500 ml, con tapón esmerilado
Frascos de polietileno de: 250, 500 y 1000 ml
Gasa de algodón (de la usada para vendajes)
Guantes de látex
Guantes de neopreno
Kit para química orgánica, tamaño de unión 19/22
Jeringas de 10 y 50 μL , para cromatógrafo HPLC
Mechero de etanol
Papel: encerado y de aluminio
Perlas de ebullición
Pesasustancias de 30 ml
Picnómetros tipo Hubbard
Pinzas para bureta
Pipetas graduadas de 5 ml, de vidrio
Pipetas Pasteur
Pipetas volumétricas de: $(20.00 \pm 0.03)\text{ml}$, Fisherbrand A, TD 20°C; $(25.00 \pm 0.03)\text{ml}$, Fisherbrand A, TD 20°C
Pizetas de: 125 y 250 ml
Portaceldas para IR
Probetas de: 10, 25, 50, 100 y 500 ml
Soportes y pinzas universales
Tapones de hule: No. 5 y No. 6; No. 5, horadado
Termómetro con escala de -10 a 150°C y precisión de $\pm 0.5^\circ\text{C}$
Tubos capilares sin heparina
Tubos cónicos de 50 ml, de vidrio, para centrifuga
Tubo de Thiele
Tubos de vidrio, de fondo redondo, para espectrómetro ^1H NMR
Tubos plásticos para colocar desecante
Varillas de vidrio para agitación
Ventanas de KCl, para espectrometría IR
Viales de 25 ml, con tapón de rosca
Vidrios de reloj

3. Solventes, reactivos y patrones

Acetona, grado reactivo, pureza 99.5%, EM Science
Acetona deuterada, 99.7%D, Stohler Isotope Chemicals, Jones Road Waltham
Acido acético glacial, grado reactivo, Baker Analyzed
Acido benzoico, grado reactivo, pureza 99.95–100.05%, Merck
Acido clorhídrico, grado reactivo, pureza 37%(p/p), EM Science

Agua desionizada, Salvavidas
Almidón soluble, reactivo ACS, Sigma
Bromo, Br₂, grado reactivo, pureza 99.5%, Merck
Nitrógeno, pureza 98.5%, Fabirgas
Cloroformo, grado reactivo, EM Science
Cloroformo deuterado, 99.8%D, Stohler Isotope Chemicals
Dicromato de potasio, grado reactivo, pureza 99.9%, Merck
Drierite con indicador, Merck
Etanol, grado reactivo, pureza 99.8%, Merck
Eter de petróleo, punto de ebullición 35–60°C, grado reactivo, EM Science
1,2-Etilenglicol, grado reactivo, pureza > 99.5 %, Meck
Extran alcalino, jabón, Merck
Glicerina industrial
Hexano, grado reactivo, Baker (no UV)
Hidróxido de potasio, grado reactivo, pureza 87.5%, FisherChemical
2-Pentanona, grado reactivo, pureza >90%, Merck
2-Propanol, grado reactivo, pureza 99%, Aldrich
Soluciones concentradas de buffers pH 4.00 y 7.00, Fisher
Tetrahidrofurano (THF), grado HPLC, Baker (para HPLC y espectrofotometría UV-VIS, sin estabilizador)
Tetrahidrofurano, grado HPLC, Mallinkrodt (sin estabilizador)
Tiosulfato de sodio anhidro, grado reactivo, pureza 99%, Sigma
Yodo resublimado, grado reactivo, pureza 99.8%, Merck
Yoduro de potasio, grado reactivo, Baker Analyzed
Aceite de oliva comestible, Hijos de Ybarra (recién abierto)
Aceite de soya comestible, Wesson (recién abierto)

APENDICE B

Titulaciones potenciométricas a partir de las cuales se calculó
el índice de acidez y el índice de saponificación de la grasa del nij

B.1 Cuadros y gráficas de titulaciones a partir de las cuales se calculó el índice de acidez de la grasa del nij

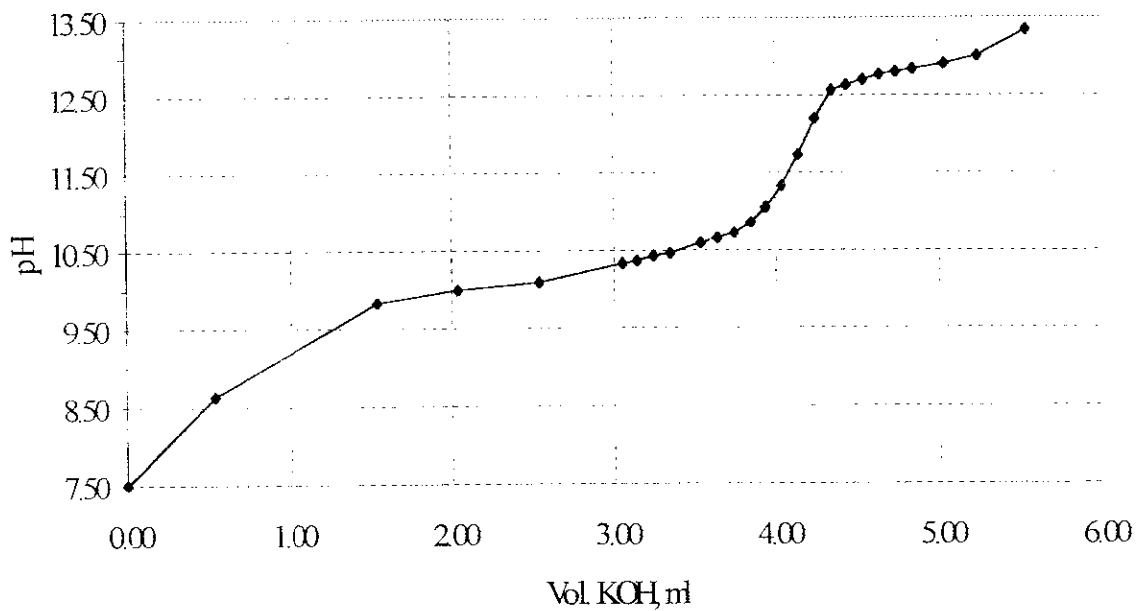
Primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij de Rabinal ^a

soln. KOH patrón					
Vol. consumido ml ± 0.03 ml	Vol. a ^b ml ± 0.03 ml	Vol. b ^b ml ± 0.03 ml	pH ± 0.03	$\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol.}}$	$\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol. a}^2}$
0.00	-----	-----	7.50	-----	-----
0.54	0.27	-----	8.63	2.09	-----
1.54	1.04	0.66	9.85	1.22	-1.13
2.04	1.79	1.42	10.00	0.30	-1.23
2.54	2.29	2.04	10.10	0.20	-0.20
3.05	2.80	2.54	10.35	0.49	0.57
3.14	3.10	2.95	10.37	0.22	-0.89
3.24	3.19	3.14	10.43	0.60	3.98
3.34	3.29	3.24	10.47	0.40	-2.00
3.54	3.44	3.37	10.60	0.65	1.67
3.64	3.59	3.52	10.65	0.50	-1.00
3.74	3.69	3.64	10.73	0.80	3.00
3.84	3.79	3.74	10.87	1.40	6.00
3.94	3.89	3.84	11.05	1.80	4.00
4.04	3.99	3.94	11.33	2.80	10.00
4.14	4.09	4.04	11.73	4.00	12.00
4.24	4.19	4.14	12.20	4.70	7.00
4.34	4.29	4.24	12.55	3.50	-12.00
4.44	4.39	4.34	12.65	1.00	-25.00
4.54	4.49	4.44	12.70	0.50	-5.00
4.64	4.59	4.54	12.77	0.70	2.00
4.74	4.69	4.64	12.80	0.30	-4.00
4.84	4.79	4.74	12.83	0.30	0.00
5.04	4.94	4.87	12.90	0.35	0.33
5.24	5.14	5.04	13.00	0.50	0.75
5.54	5.39	5.27	13.33	1.10	2.40

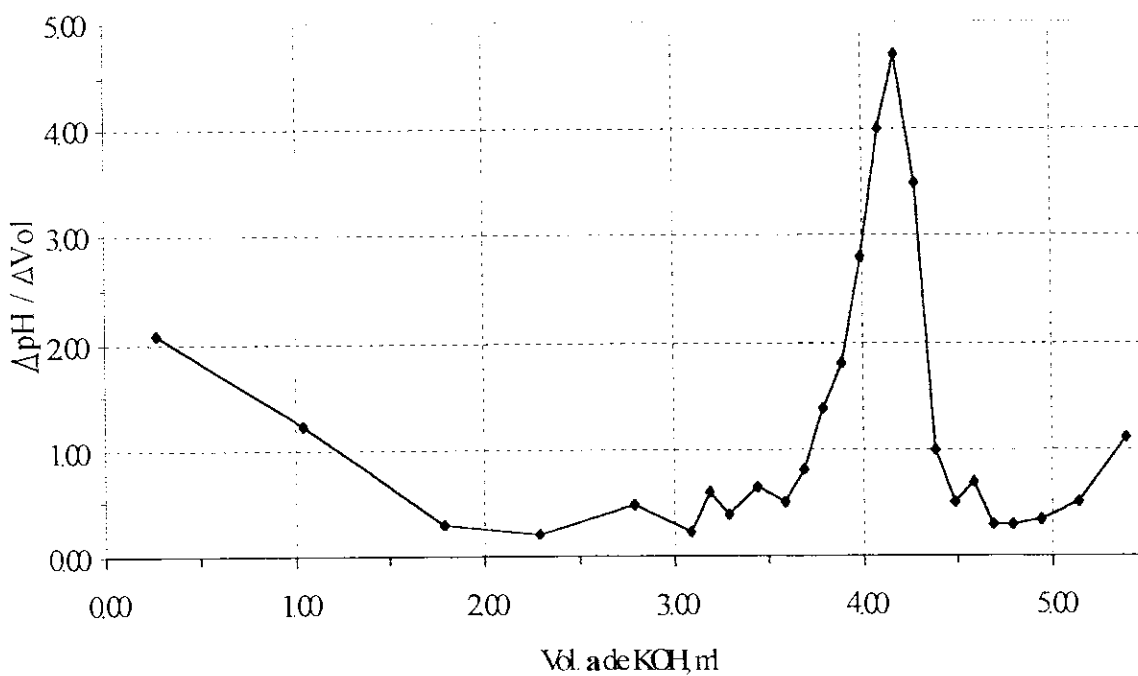
^a Titulación de 4.09761 g ± 0.00001 g de grasa en 2-pentanona con una solución patrón (0.497 ± 0.009)N de KOH en 2-propanol

^b Volúmenes promedio calculados a partir de los datos de la columna anterior. Ver cálculos al final de este apéndice.

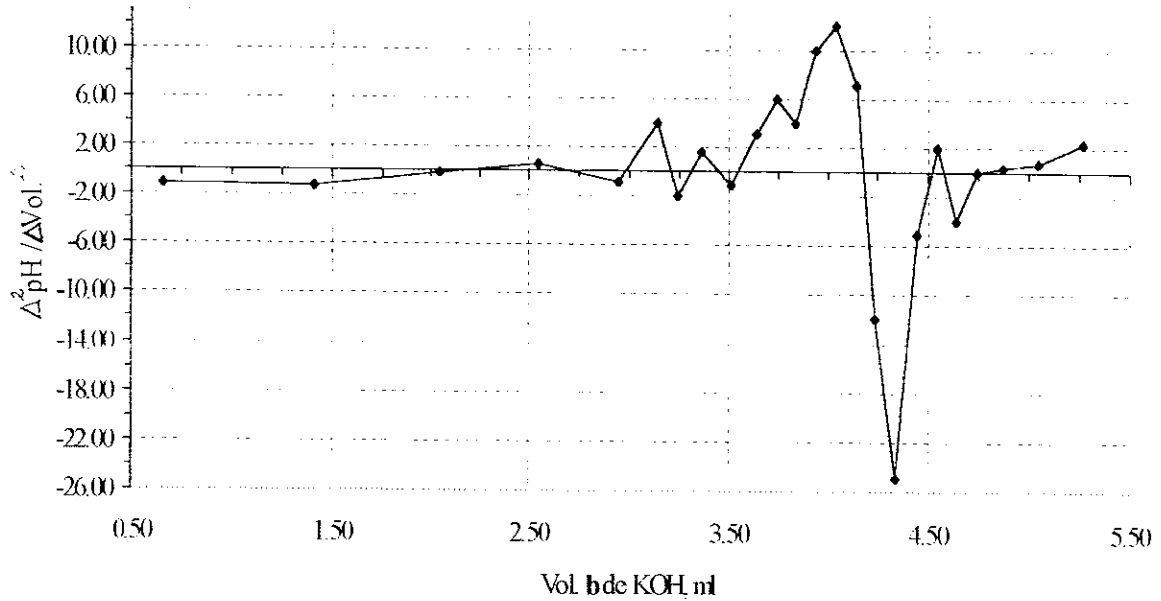
Primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij de Rabinal



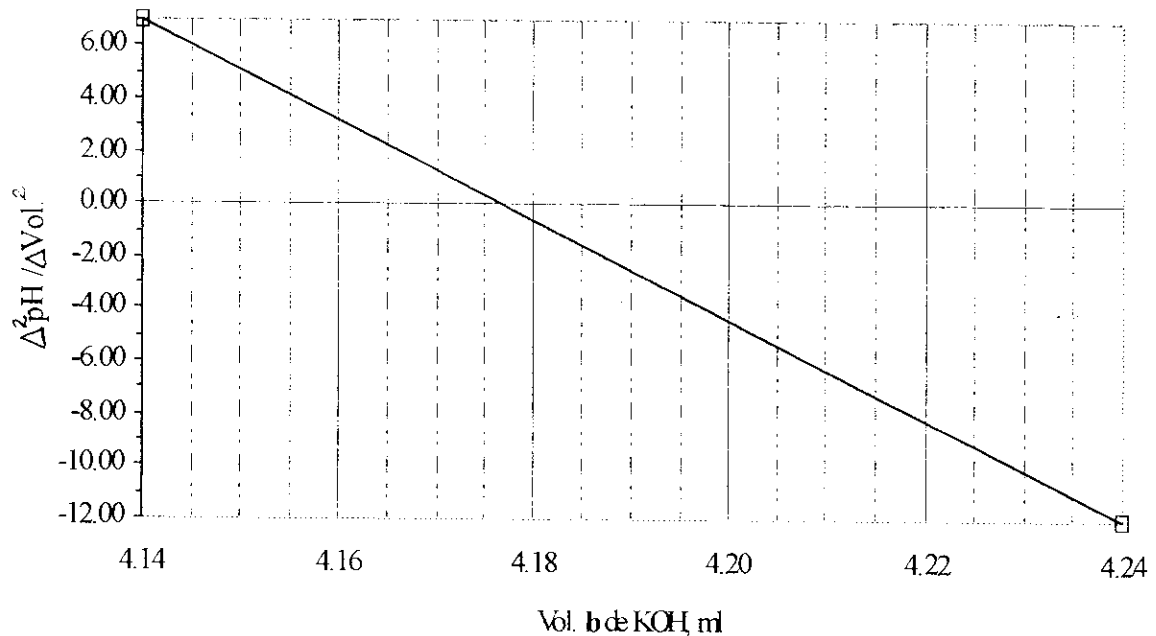
Primera derivada de la primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij de Rabinal



Segunda derivada de la primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij de Rabinal



Región ampliada de la segunda derivada de la primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de acidez de la grasa del nij de Rabinal, para ubicar el volumen de titulante correspondiente al punto final de la titulación.



B.2 Cuadros y gráficas de titulaciones a partir de las cuales se calculó el índice de saponificación de la grasa del nij

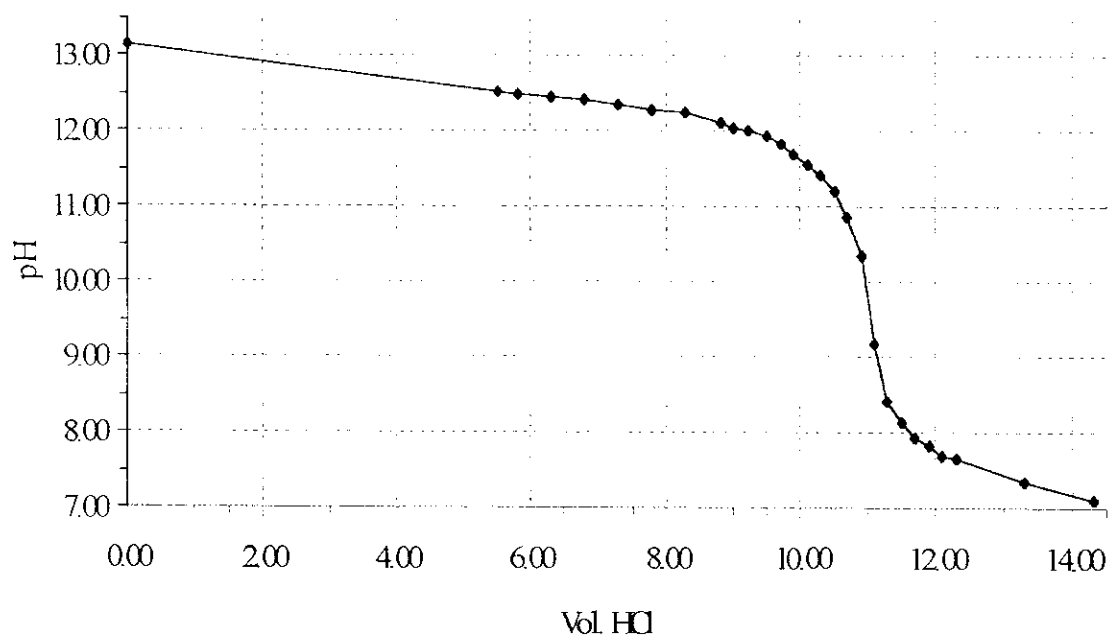
Primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de saponificación de la grasa del nij de Chiapas^a

soln. HCl patrón					
Vol. consumido ml ± 0.03 ml	Vol. a ^b ml ± 0.03 ml	Vol. b ^b ml ± 0.03 ml	pH ± 0.03	$\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol.}}$	$\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol. a}^2}$
0.00	-----	-----	13.15	-----	-----
5.50	2.75	-----	12.53	-0.11	-----
5.80	5.65	4.20	12.50	-0.10	0.00
6.30	6.05	5.85	12.45	-0.10	0.00
6.80	6.55	6.30	12.42	-0.06	0.08
7.30	7.05	6.80	12.37	-0.10	-0.08
7.80	7.55	7.30	12.30	-0.14	-0.08
8.30	8.05	7.80	12.27	-0.06	0.16
8.80	8.55	8.30	12.13	-0.28	-0.44
9.00	8.90	8.73	12.05	-0.40	-0.34
9.20	9.10	9.00	12.00	-0.25	0.75
9.50	9.35	9.23	11.93	-0.23	0.07
9.70	9.60	9.48	11.83	-0.50	-1.07
9.90	9.80	9.70	11.70	-0.65	-0.75
10.10	10.00	9.90	11.57	-0.65	0.00
10.30	10.20	10.10	11.43	-0.70	-0.25
10.50	10.40	10.30	11.23	-1.00	-1.50
10.70	10.60	10.50	10.87	-1.80	-4.00
10.90	10.80	10.70	10.35	-2.60	-4.00
11.10	11.00	10.90	9.17	-5.90	-16.50
11.30	11.20	11.10	8.43	-3.70	11.00
11.50	11.40	11.30	8.15	-1.40	11.50
11.70	11.60	11.50	7.95	-1.00	2.00
11.90	11.80	11.70	7.83	-0.60	2.00
12.10	12.00	11.90	7.70	-0.65	-0.25
12.30	12.20	12.10	7.65	-0.25	2.00
13.30	12.80	12.50	7.35	-0.30	-0.08
14.30	13.80	13.30	7.10	-0.25	0.05
15.30	14.80	14.30	8.63	1.53	1.78

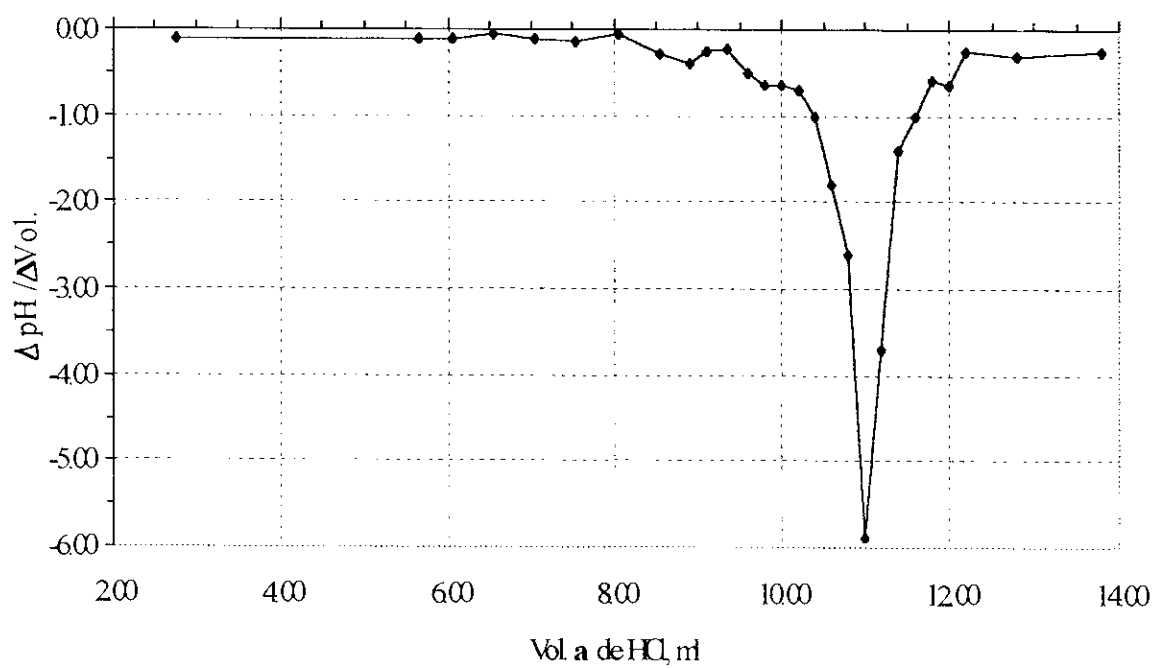
^a Titulación de 2.00149 g ± 0.00001 g de grasa con una solución patrón (0.50 ± 0.01)N de HCl en 2-propanol, después de saponificada 1 hora con una solución (0.497 ± 0.009)N de KOH en 2-propanol.

^b Volúmenes promedio calculados a partir de los datos de la columna anterior. Ver cálculos al final de este apéndice.

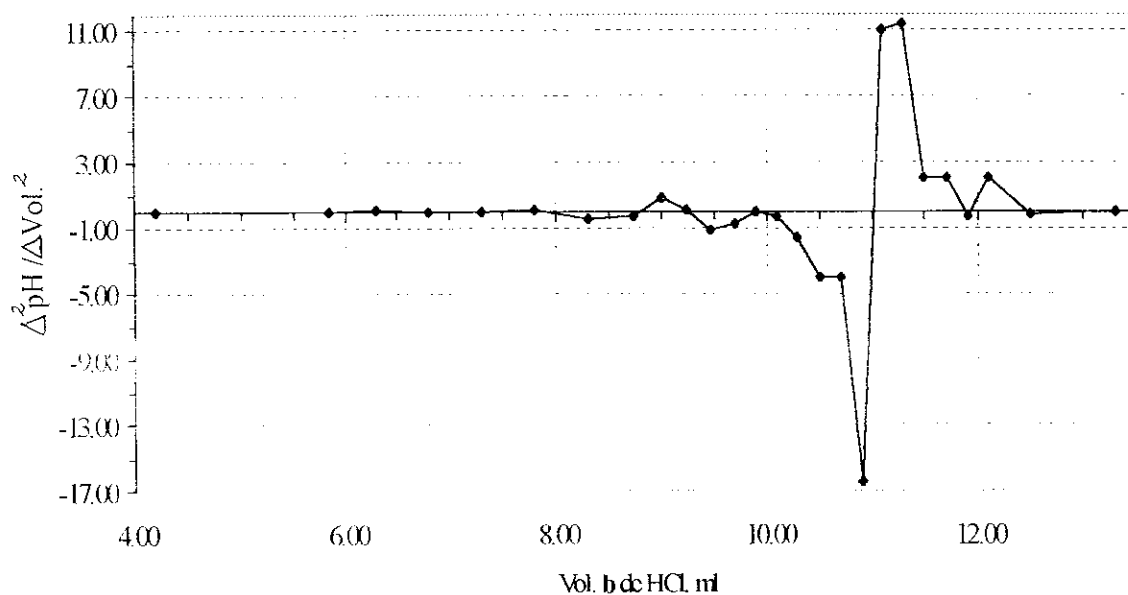
Primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de saponificación de la grasa del nij de Chiapas



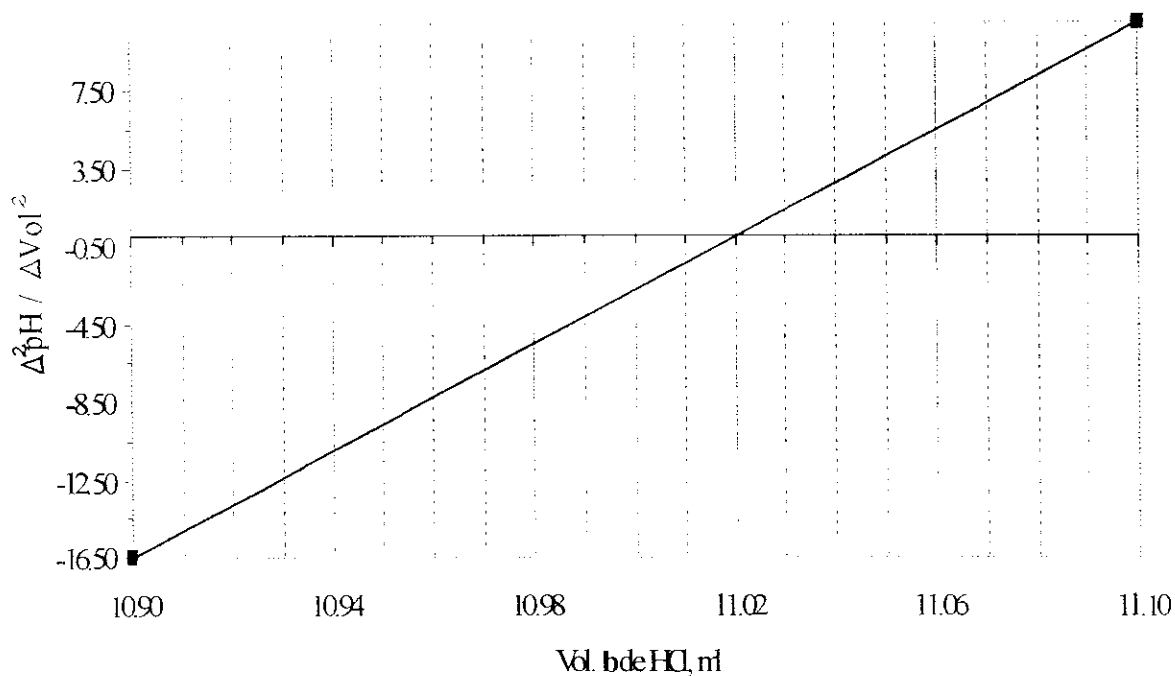
Primera derivada de la primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de saponificación de la grasa del nij de Chiapas



Segunda derivada de la primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de saponificación de la grasa del nij de Chiapas



Región ampliada de segunda derivada de la primera réplica de titulación potenciométrica para la determinación del índice de saponificación de la grasa del nij de Chiapas, para ubicar el volumen de titulante correspondiente al punto final de la titulación.



B.3 Cálculos de cada una de las columnas del cuadro de índice de acidez de la grasa del n_{ij}

Vol. **a** = primer volumen promedio

$$\text{Vol. } \mathbf{a} = \frac{\text{Vol.}_{n-1} + \text{Vol.}_{n+1}}{2}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{a}_1 = \frac{0.00 \text{ ml} + 0.54 \text{ ml}}{2}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{a}_1 = 0.27 \text{ ml}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{a}_2 = \frac{0.54 \text{ ml} + 1.54 \text{ ml}}{2}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{a}_2 = 1.04 \text{ ml}$$

.....

Vol. **b** = segundo volumen promedio

$$\text{Vol. } \mathbf{b} = \frac{\text{Vol. } \mathbf{a}_n + \text{Vol. } \mathbf{b}_{n+1}}{2}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{b}_1 = \frac{0.27 \text{ ml} + 1.04 \text{ ml}}{2}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{b}_1 = 0.66 \text{ ml}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{b}_2 = \frac{1.04 \text{ ml} + 1.79 \text{ ml}}{2}$$

$$\text{Vol. } \mathbf{b}_2 = 1.42 \text{ ml}$$

.....

$$\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol.}} = \frac{\text{pH}_{n+1} - \text{pH}_n}{\text{Vol.}_{n+1} - \text{Vol.}_n}$$

$$\left(\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol.}} \right)_1 = \frac{8.63 - 7.50}{0.54 - 0.00}$$

$$\left(\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol.}} \right)_1 = 2.09$$

$$\left(\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol}}\right)_2 = \frac{9.85 - 8.63}{1.54 - 0.54}$$

$$\left(\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol}}\right)_2 = 1.22$$

$$\left(\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol } \mathbf{a}^2}\right) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol}}\right)_{n-1} - \left(\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{Vol}}\right)_n}{\text{Vol. } \mathbf{a}_{n-1} - \text{Vol. } \mathbf{a}_n}$$

$$\left(\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol } \mathbf{a}^2}\right)_1 = \frac{1.22 - 20.9}{1.04 - 0.27}$$

$$\left(\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol } \mathbf{a}^2}\right)_1 = -1.13$$

$$\left(\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol } \mathbf{a}^2}\right)_2 = \frac{0.30 - 1.22}{1.79 - 1.04}$$

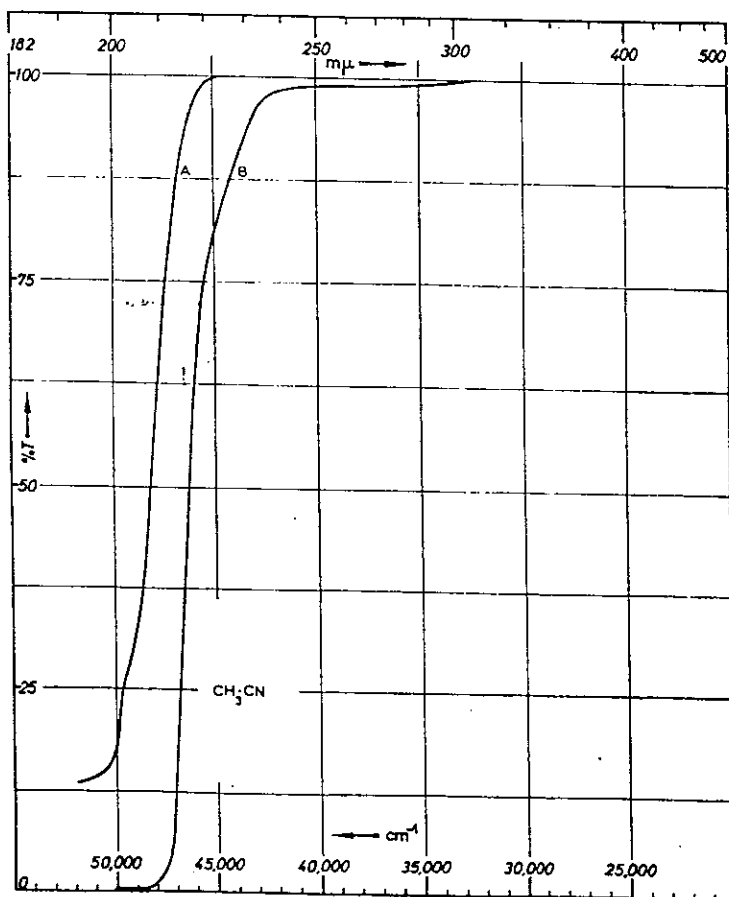
$$\left(\frac{\Delta^2 \text{pH}}{\Delta \text{Vol } \mathbf{a}^2}\right)_2 = -1.23$$

APENDICE C

Espectros de referencia de absorción ultravioleta-visible e infrarroja y de resonancia magnética nuclear de protones

C.1 Espectros de referencia de absorción ultravioleta-visible de solventes y pigmentos obtenidos en la literatura

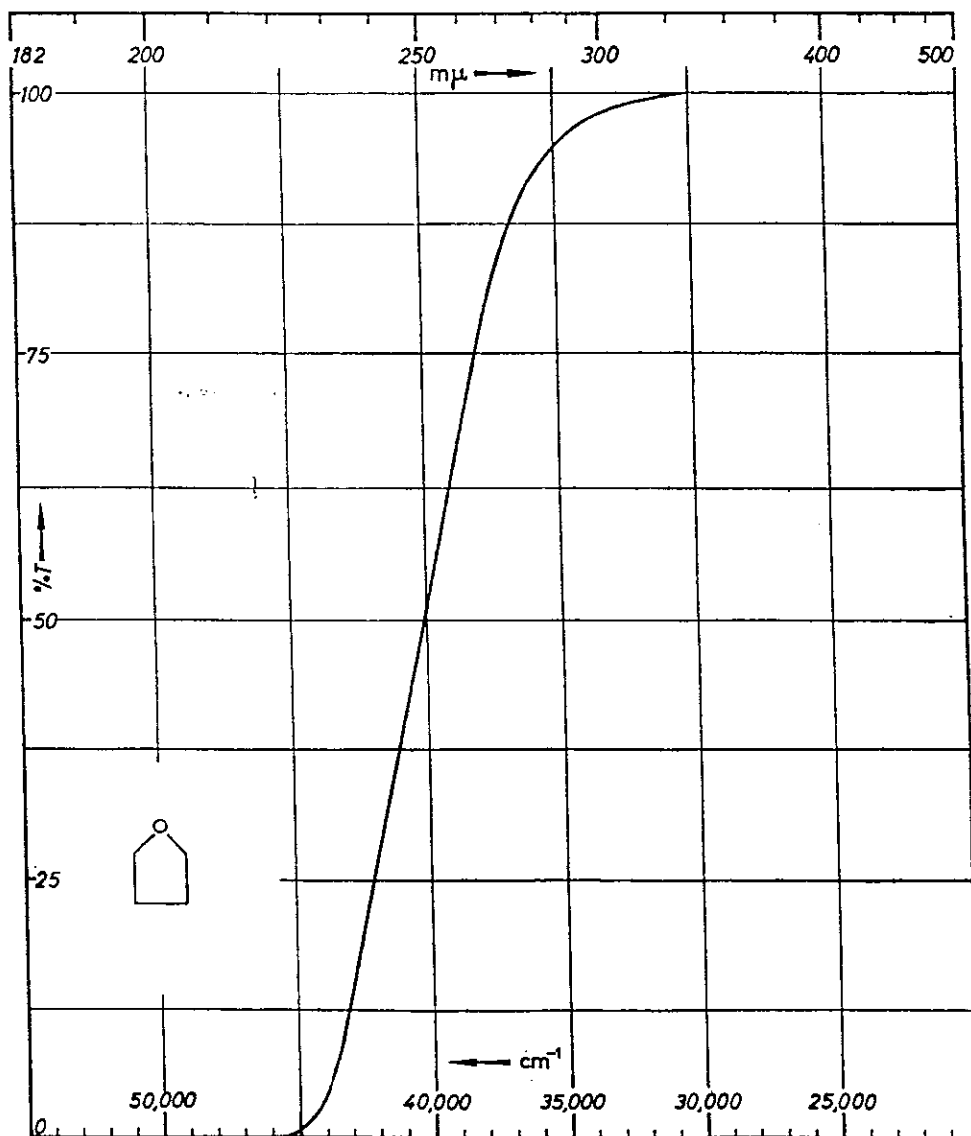
Acetonitrile Acetonitril			M/17
			00.000/00.030
Spectrometer Beckman DK 2A	Spektrometer v	Water	Formula C ₂ H ₃ N
			Mol. wt 41.1
			b.p. 80-81°
Cell length A 0.1 cm B 1.0 cm	Schichtdicke	Purity Fractionated	Reinheit LR 8752
B. Hampel: E. Merck A.G., Darmstadt			



(DMS, 1966)

* 1 mμ = 1 nm

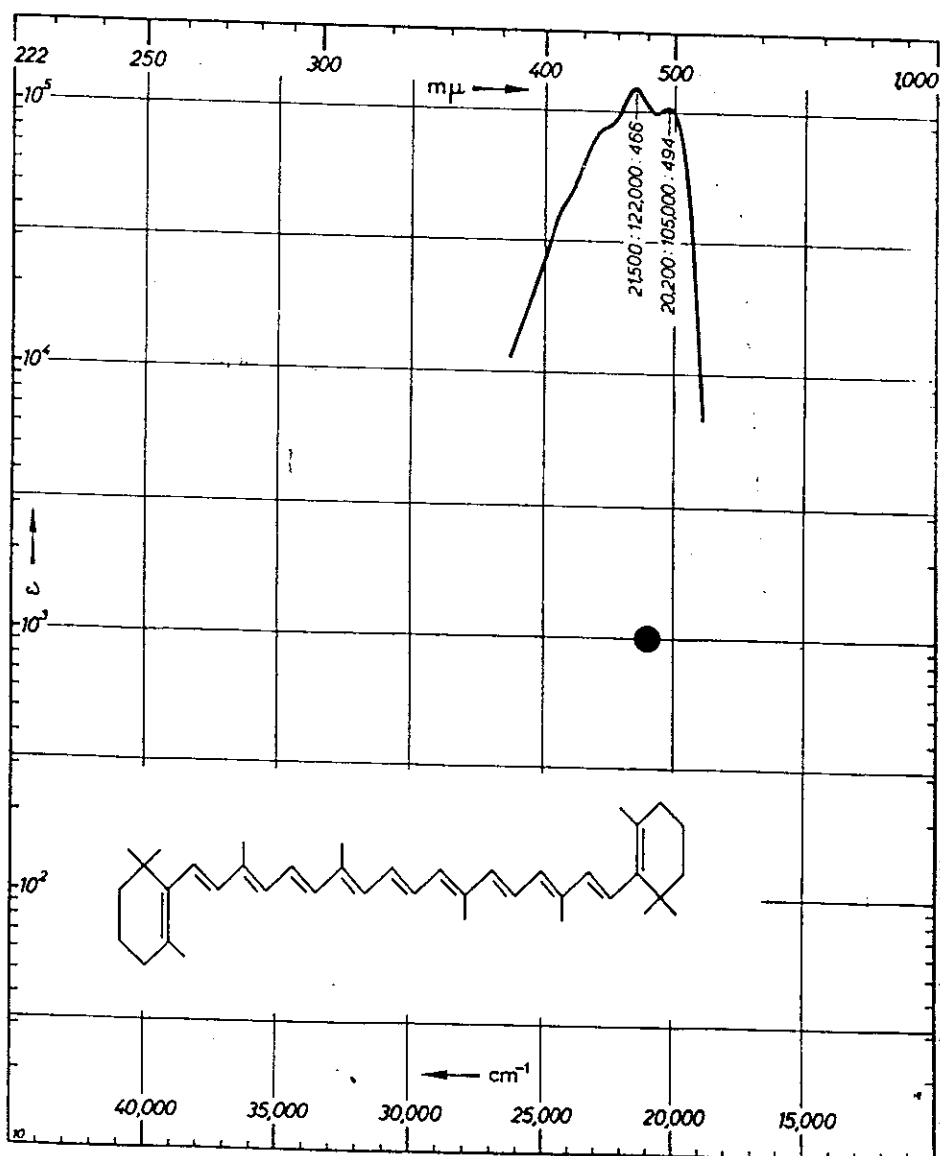
Tetrahydrofuran			M/9
			00.000/20.300
Spectrometer	Spektrometer	v.	Formula
Beckman DK2		Water	C_4H_8O
			Mol. wt
			72.1
			b.p. 65-66.5° d_4^{20} 0.89
Cell length	Schichtdicke	Purity	Reinheit
1.0 cm		Spectroscopic grade	
			IR
			2183, 6815, 6816
B. Hampel: E. Merck A.G., Darmstadt			



(DMS, 1966)

* 1 m μ = 1 nm

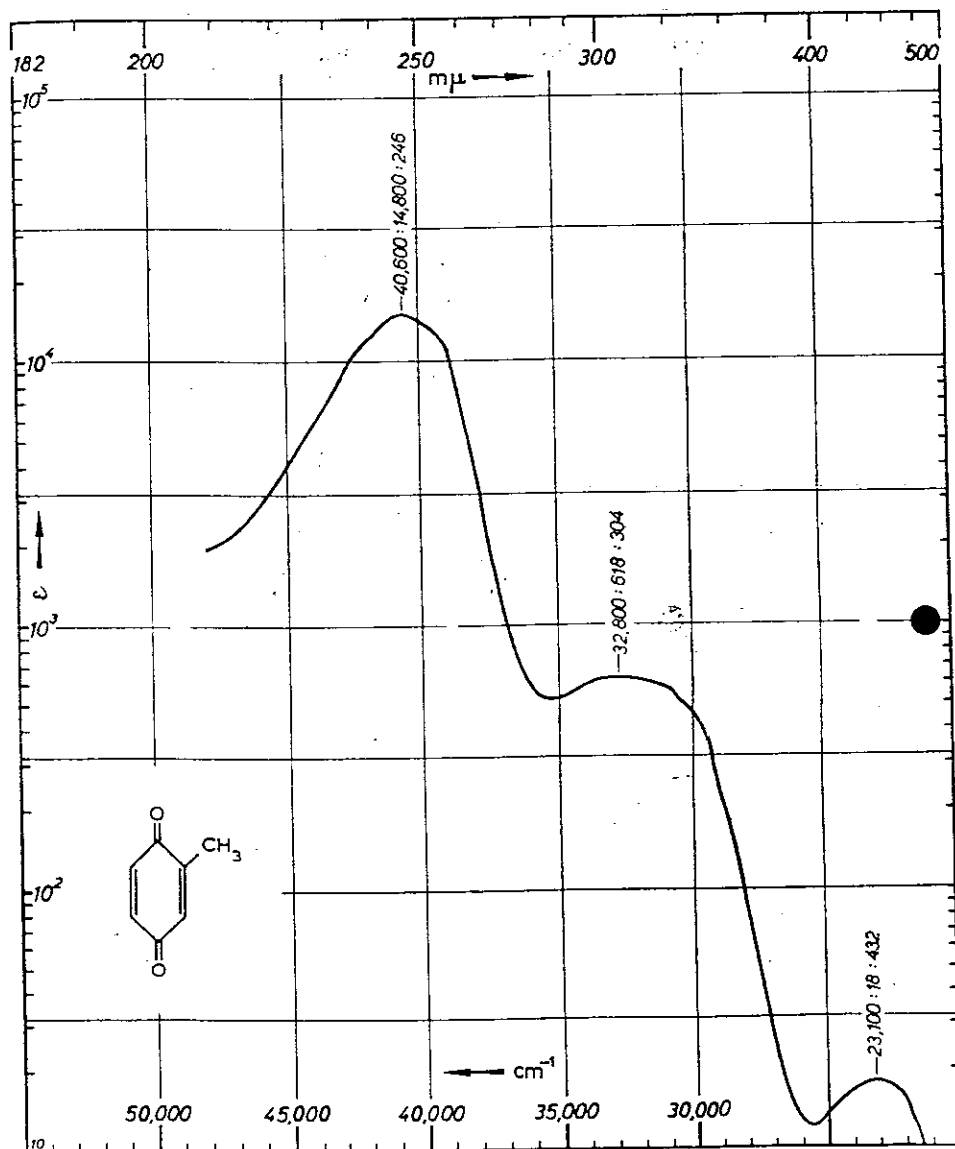
β -Carotene				J9/5	
β -Carotin				20.020/00.200	
Spectrometer	Spektrometer	Solvent	Lösungsmittel	Formula	Formel
Unicam SP.800		Benzene		$C_{40}H_{56}$	
Spec. resn	Spek. Auflösung	Concn	Konz.	Mol. wt	Mol. Gev.
$\sim 35\text{ cm}^{-1}$ at $20,000\text{ cm}^{-1}$		$6.68 \times 10^{-6}\text{ M}$		536.9	
Cell Length	Schichtdicke	Purity	Reinheit	IR	
10 cm		Research sample		2642	
B. C. L. Weeden: Dept. Chem., Queen Mary Coll., London					



(DMS, 1966)

* 1 μ = 1 mm

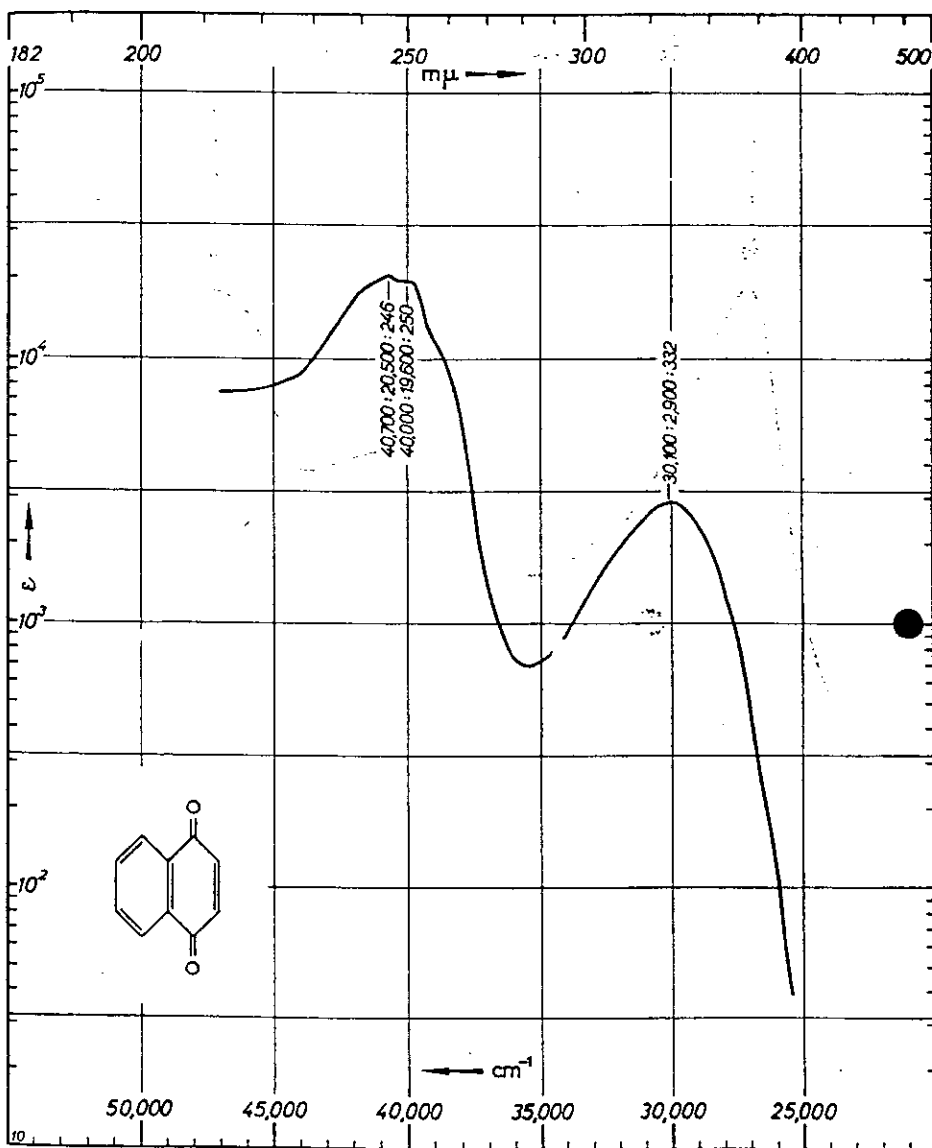
Methyl-p-benzoquinone Methyl-p-benzochinon		B 8 / 3	
		20.323/00.262	
<u>Spectrometer</u>	<u>Spektrometer</u>	<u>Solvent</u>	<u>Lösungsmittel</u>
Unicam SP. 700		Methanol	
		<u>Formula</u>	<u>Formel</u>
		$C_7H_6O_2$	
<u>Spec. resn</u>	<u>Spek. Auflösung</u>	<u>Concn</u>	<u>Konz.</u>
100 cm^{-1}		5×10^{-4} , $5 \times 10^{-3}\text{ M}$	
		<u>Mol. wt</u>	<u>Mol. Gew.</u>
		122.1	
		m.p. 66°	
<u>Cell length</u>	<u>Schichtdicke</u>	<u>Purity</u>	<u>Reinheit</u>
0.1, 1.0 cm		Sublim.	
		<u>IR</u>	—
H. Fritzsche: Inst. Mikrobiol. exp. Therapie, Deutsche Akad. Berlin, Jena			



(DMS, 1966)

* 1 mμ = 1 nm

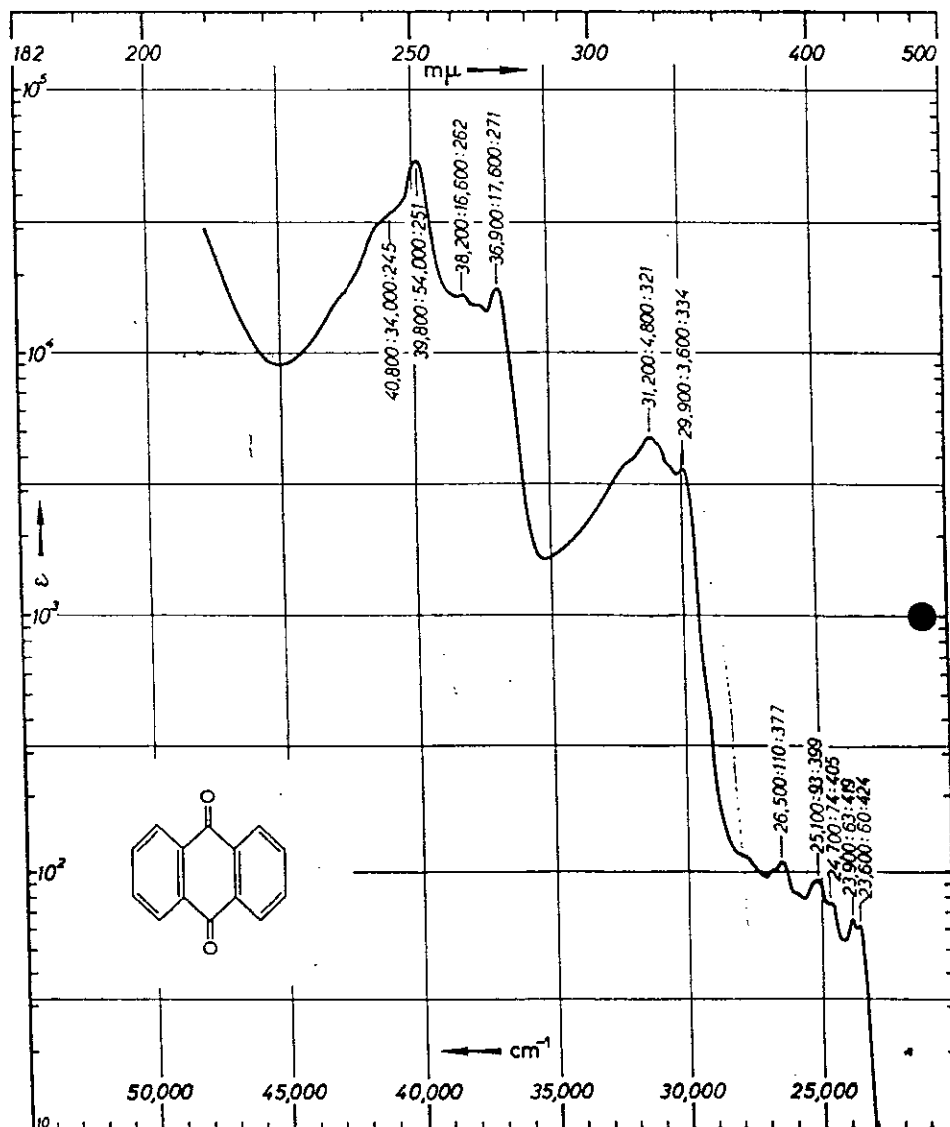
<p><u>p-Naphthaquinone</u> p-Naphthochinon</p>				88/7	
				52.363/00.642	
<u>Spektrometer</u>	<u>Spektrometer</u>	<u>Solvent</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Formula</u>	<u>Formel</u>
Zeiss PMQ II		Methanol		$C_{10}H_6O_2$	
<u>Spec. resn</u>	<u>Spek. Auflösung</u>	<u>Concn</u>	<u>Konz.</u>	<u>Mol. wt</u>	<u>Mol. Gew.</u>
25 cm^{-1} from 40,000 – 20,000 cm^{-1}		5×10^{-5} , 2.5×10^{-4} M		158.2	
<u>Cell length</u>	<u>Schichtdicke</u>	<u>Purity</u>	<u>Reinheit</u>	mp 127.5°	
1.0, 5.0 cm		Elem. anal.		<u>IR</u> 6136, 6662	
H. -H. Perkampus, G. Orth: Inst. org. Chem, Abt. Molekülspektroskopie, T. H. Braunschweig					



(DMS, 1966)

* 1 μ = 1 nm

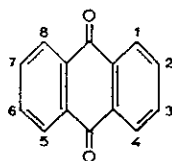
Antraquinone Anthrachinon		B8/10			
		53.363/00.642			
Spektrometer	Spektrometer	Solvent	Lösungsmittel	Formula	Formel
Zeiss PMQ II, M40 II		Cyclohexane		$C_{14}H_8O_2$	
Spec. resn	Spek. Auflösung	Concn	Konz.	Mol. wt	Mol. Gew.
50 cm^{-1}		5.76×10^{-5} , 2.90×10^{-4} M		208.2	
Cell length	Schichtdicke	Purity	Reinheit	m.p. 285–286°	
1.0, 5.0 cm		Elem. anal.		IR	1487
H. Brockmann, jr.: Instl. org. Chem., Göttingen Univ.					



(DMS, 1966)

* 1 $\text{m}\mu$ = 1 mm

Substituted anthraquinones Substituierte Anthrachinone	B 8 / T 4
	53.363 / 00.642



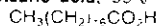
	Formula	Solvent	Wave-number cm ⁻¹	ε l/cm x Mol	Wave-length mμ
(B 8 / 10)	C ₁₄ H ₈ O ₂	Cyclohexane	40,800 39,800 38,200 36,900 31,200 29,900 26,500 25,100 24,700 23,900 23,600	34,000 54,000 16,600 17,600 4,800 3,600 110 93 74 63 60	245 251 262 271 321 334 377 399 405 419 424
1 -CH ₃	*C ₁₅ H ₁₀ O ₂	Cyclohexane	39,700 36,900 31,000 30,000 26,400 26,000 25,000	43,500 14,800 4,100 4,500 200 190 180	252 271 323 333 379 385 400
2 -CH ₃	*C ₁₅ H ₁₀ O ₂	Cyclohexane	39,200 sh 37,800 36,500 31,000 26,600 25,200 23,900	45,000 21,000 17,800 4,600 125 105 66	255 265 274 323 376 397 419
1 -NH ₂	C ₁₄ H ₉ NO ₂	Dioxan	41,300 37,000 33,000 21,500	36,000 12,800 4,950 6,300	242 270 303 465
1 -SO ₃ Na	**C ₁₆ H ₇ NaO ₅ S	Water	49,300 38,900 30,500	25,500 42,000 4,250	203 257 328
1,4 -NH · CH ₃	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	Dioxan	39,500 sh 36,400 sh 31,700 sh 27,800 sh 18,000 16,800 15,500	39,500 18,200 5,100 2,250 8,500 17,200 19,200	253 275 315 360 555 596 644

(DMS, 1966)

C.2 Espectros de referencia de absorción infrarroja de ácidos grasos, de metil y etil ésteres de ácidos grasos, de alcoholes, del *ter*-butilhidroperóxido y del aceite de semilla de hule

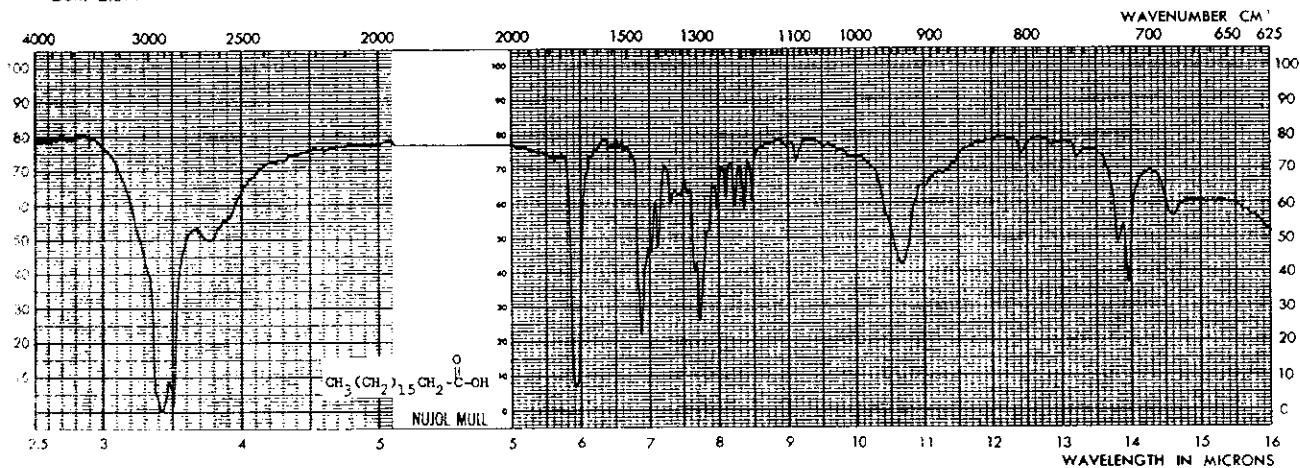
17.536-6

Stearic acid, 95% (Pouchert & Campbell, 1975)

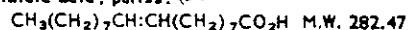


M.W. 284.48 m.p. 67-69° b.p. 361° d 0.845

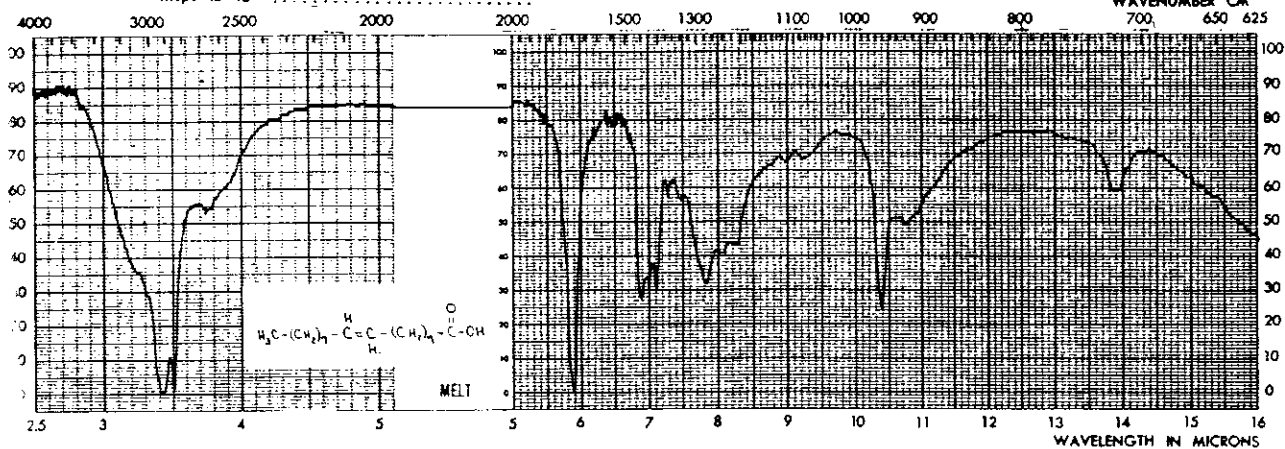
Beil. 2.377



E30-4 Elaidic acid, puriss. (Pouchert & Campbell, 1975)

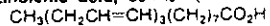


m.p. 43-45°

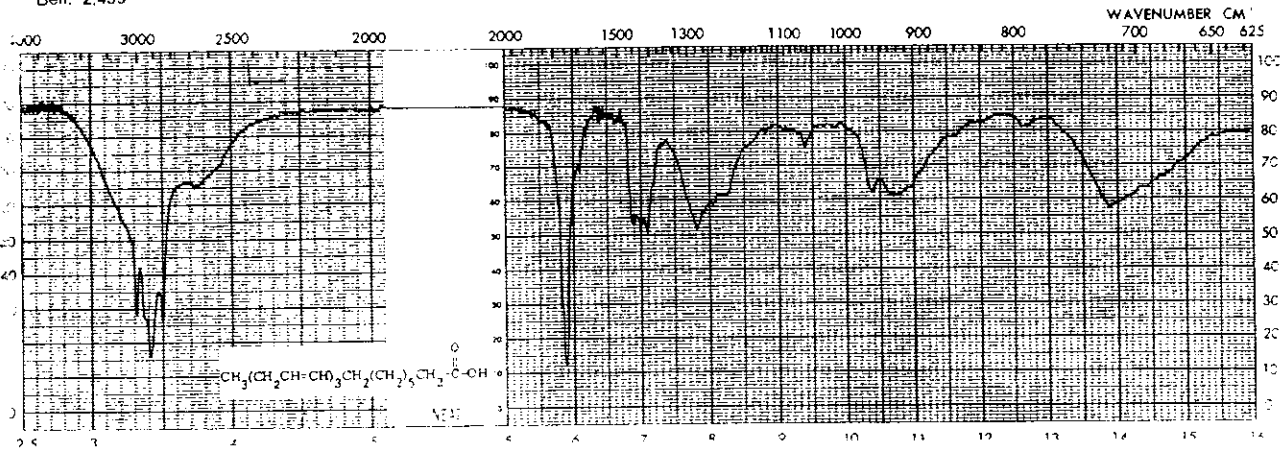


85.601-0

Linolenic acid, 99+% (Pouchert & Campbell, 1975)

M.W. 278.44 b.p. 230-232°/1mm. n_D^{20} 1.4800

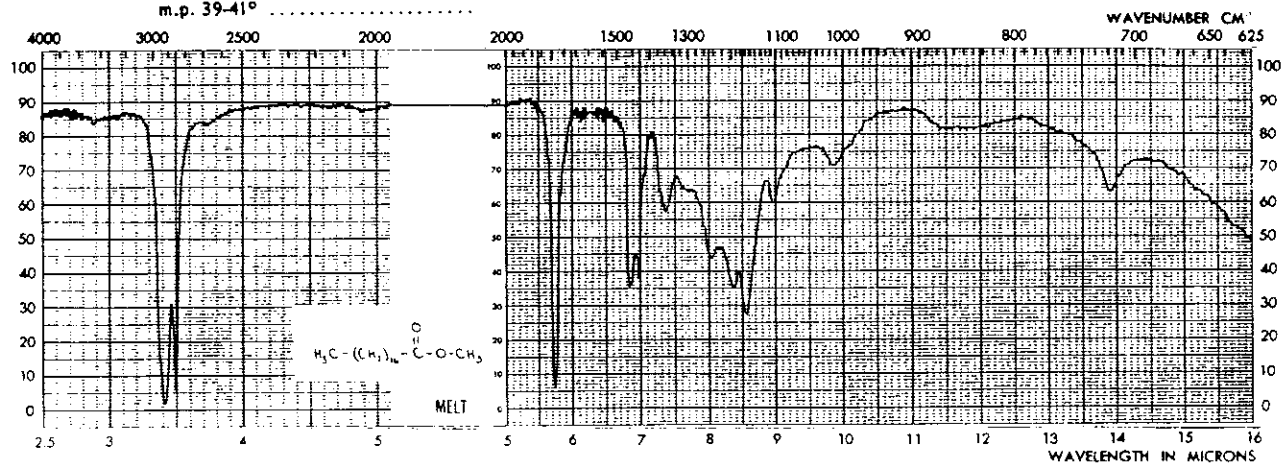
Beil. 2.499



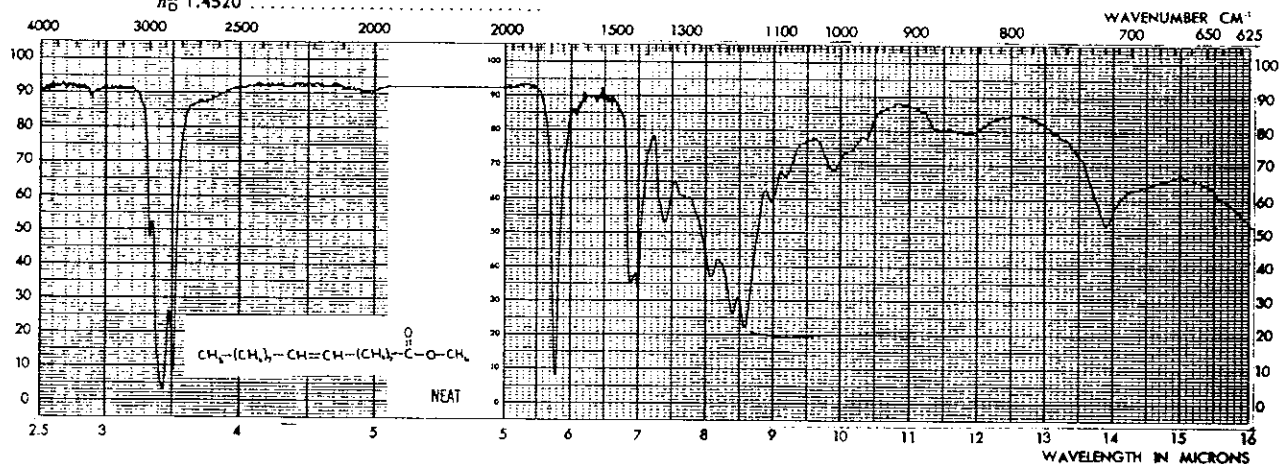
M8070-9 Methyl stearate (Pouchert & Campbell, 1975)

 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{CH}_3$ M.W. 298.51

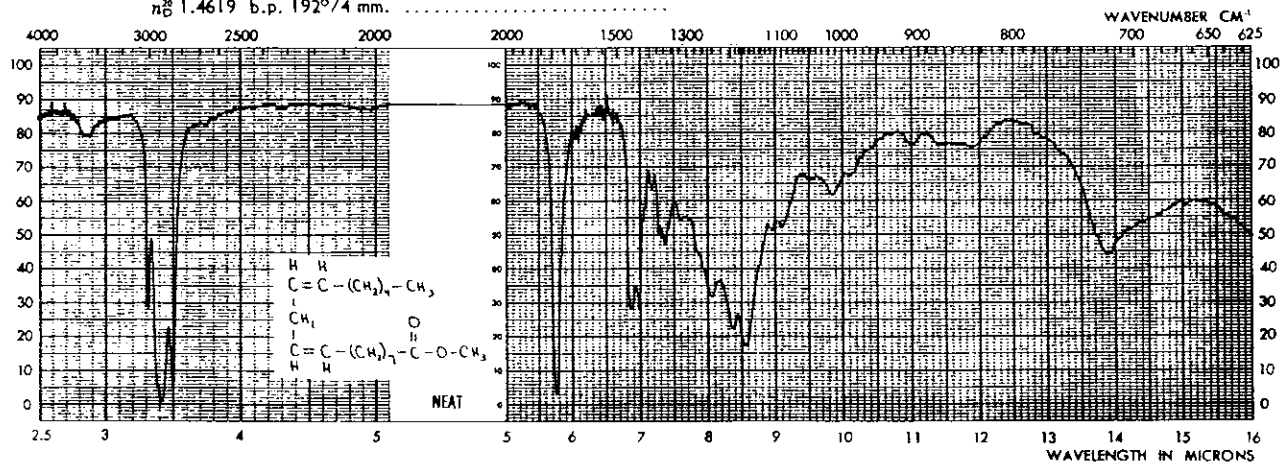
m.p. 39-41°



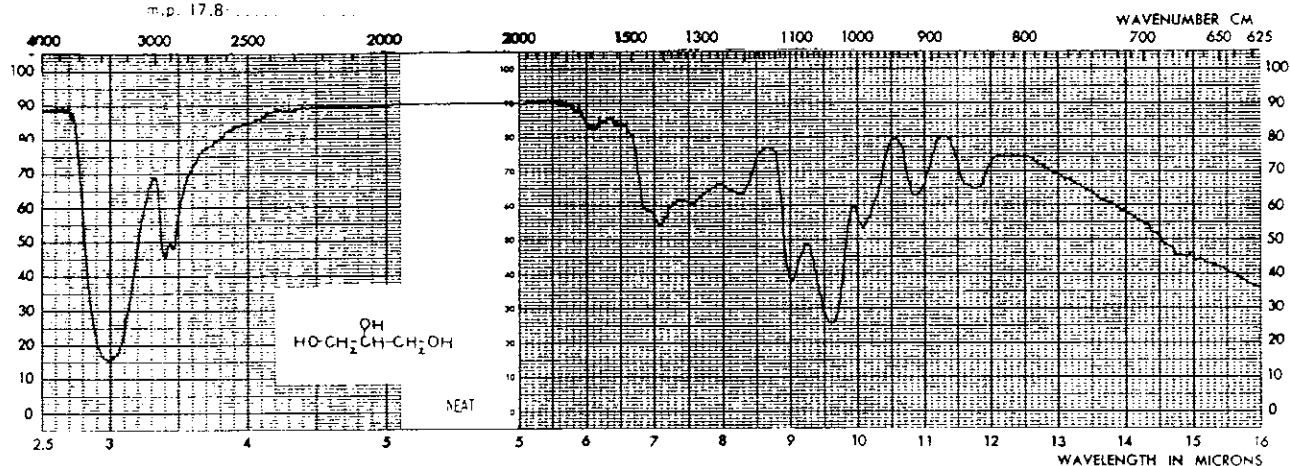
M6575-0 Methyl oleate, tech. (Pouchert & Campbell, 1975)

 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$ M.W. 296.50 n_D^{20} 1.4520

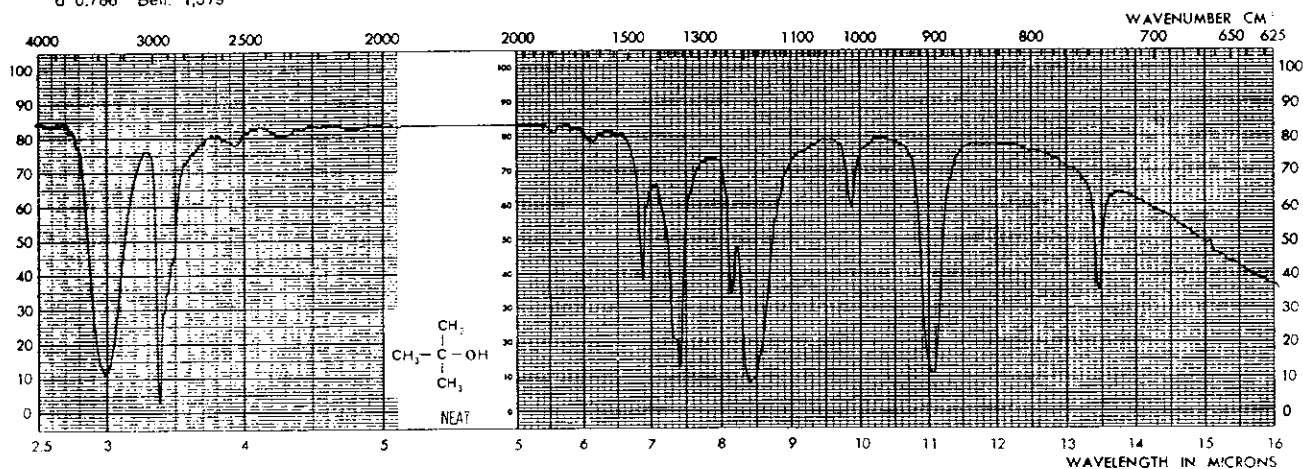
10,335-7 Methyl linoleate, tech. (Pouchert & Campbell, 1975)

 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$ M.W. 294.48 n_D^{20} 1.4619 b.p. 192°/4 mm.

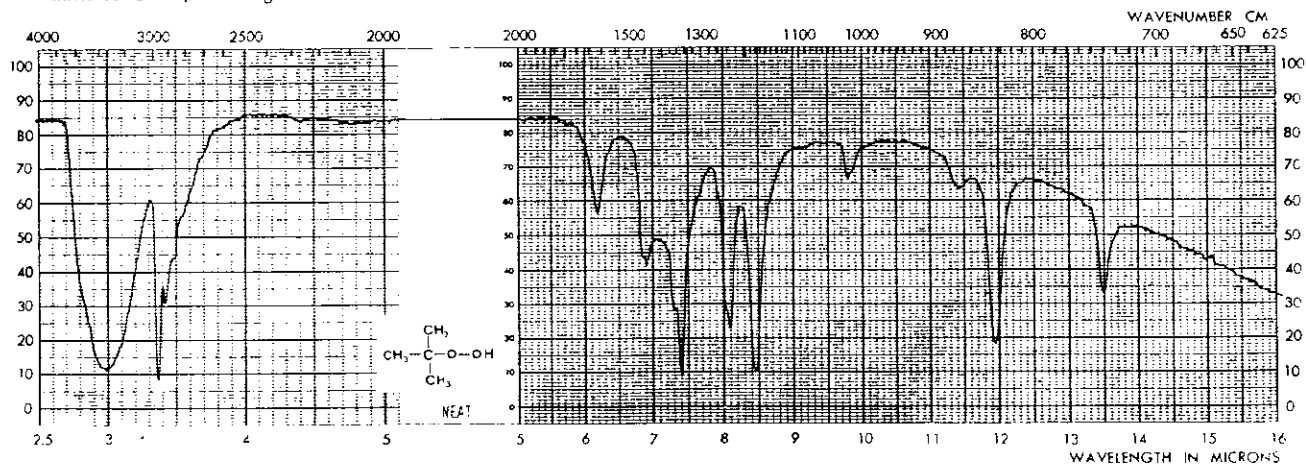
13.487-2 Glycerol, U.S.P. (Pouchert & Campbell, 1975)
 $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ M.W. 92.10 n_D^{25} 1.4746 b.p. 182° 2 mm.
 m.p. 17.8°

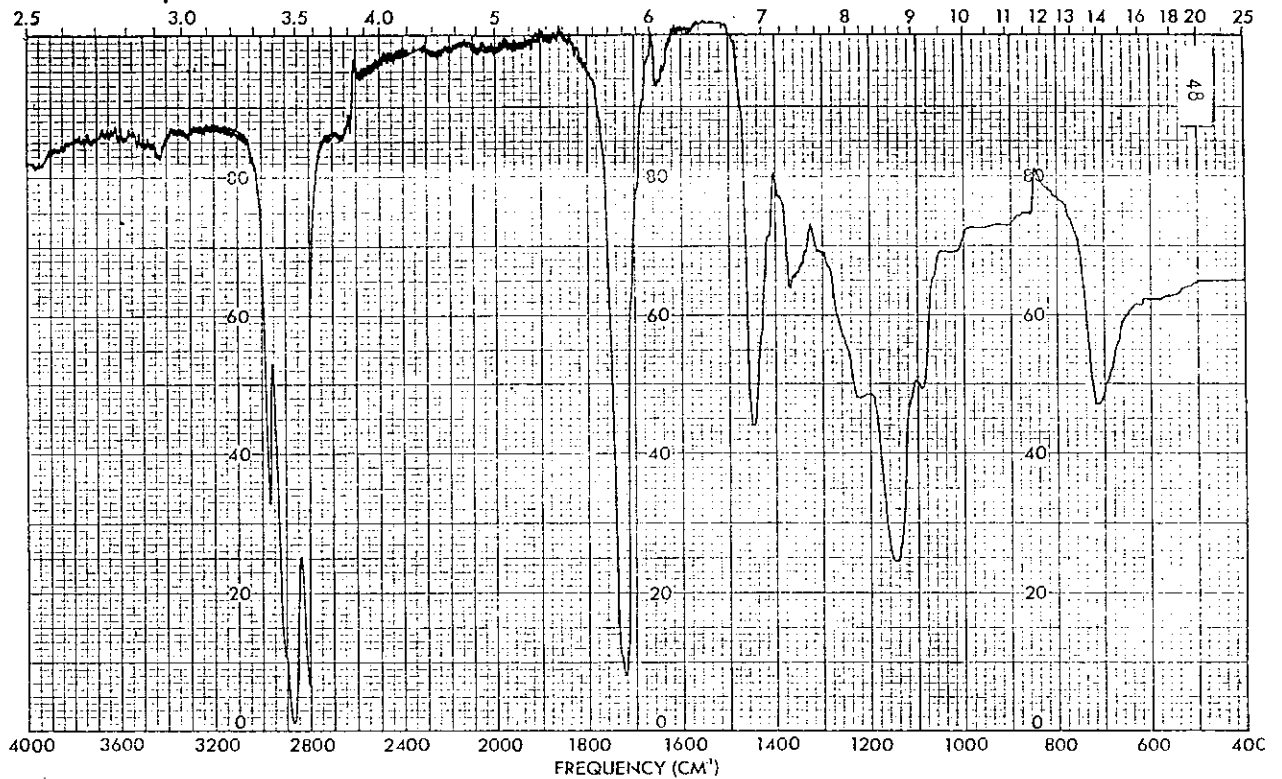


88.592-7 *tert.*-Butanol, 99.5% (*tert.*-butyl alcohol) (Pouchert & Campbell, 1975)
 $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$
 M.W. 74.12 m.p. 25-25.5° b.p. 83° n_D^{20} 1.3860
 d 0.786 Beil. 1,379



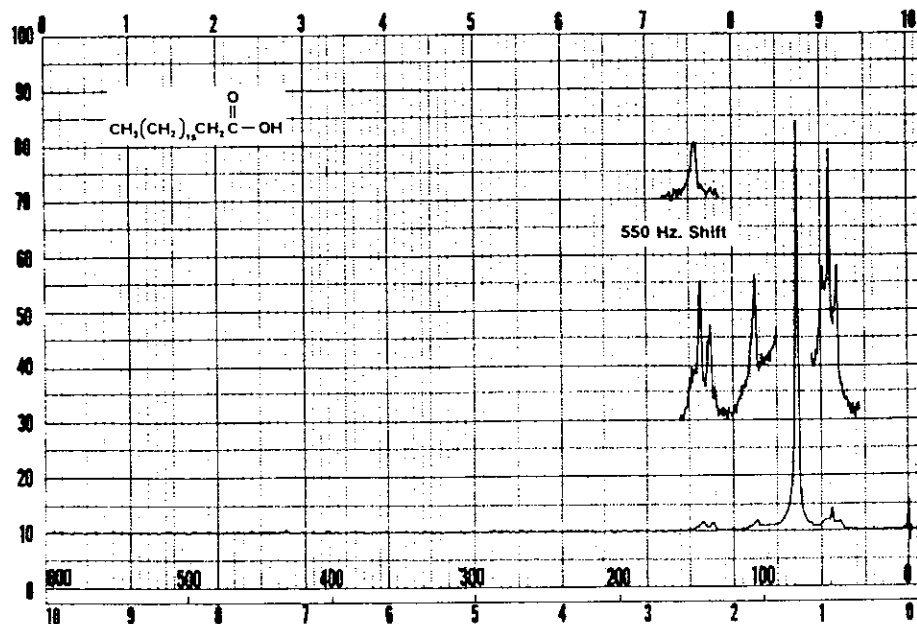
18.471-3 *tert.*-Butyl hydroperoxide, tech. (Pouchert & Campbell, 1975)
 $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$
 M.W. 90.12 m.p. -8° n_D^{20} 1.3975 d 0.896



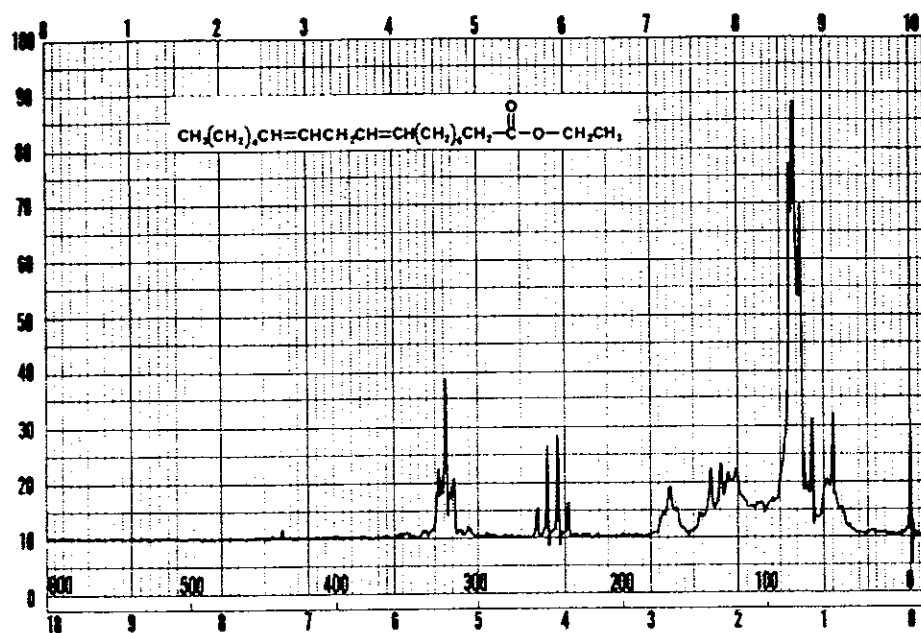


C.3 Espectros de referencia de resonancia magnética nuclear de protones de ácido graso, de etil éster de ácido graso, de glicerol y de antraquinona

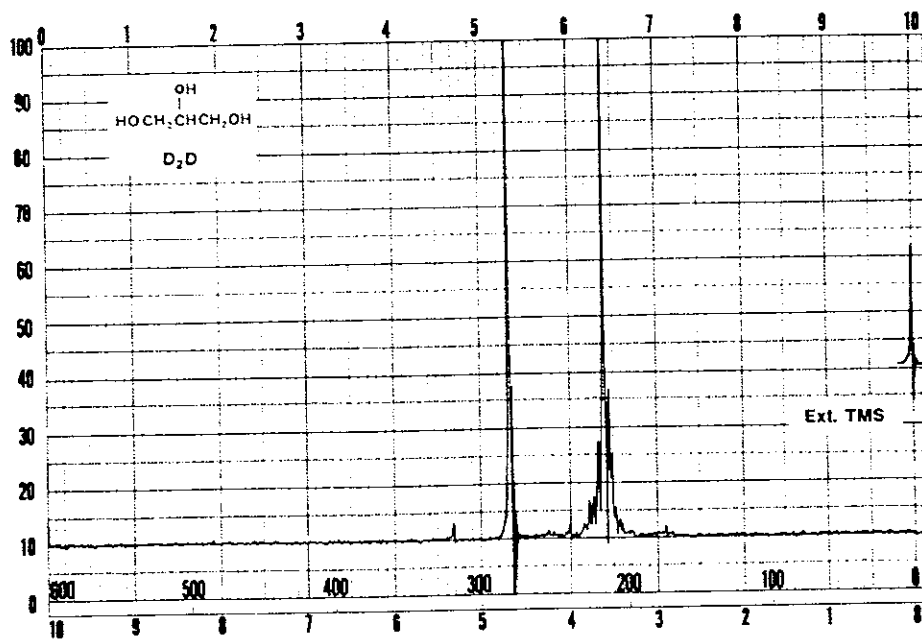
17,536-6
Stearic acid 97% (Pouchert & Campbell, 1974)
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$
M.W. 284.48 m.p. 67-69° b.p. 361° d 0.845
Beil. 2.377



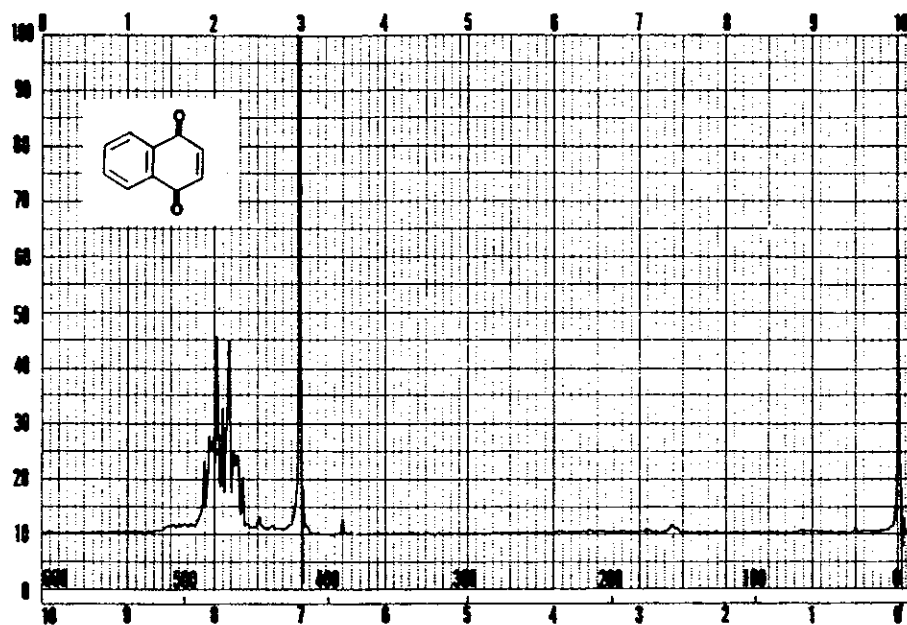
85,776-9
 Linoleic acid ethylester, 98% (ethyl linoleate) (Pouchert & Campbell, 1974)
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$
 M.W. 308.51 n_D^{20} 1.4600



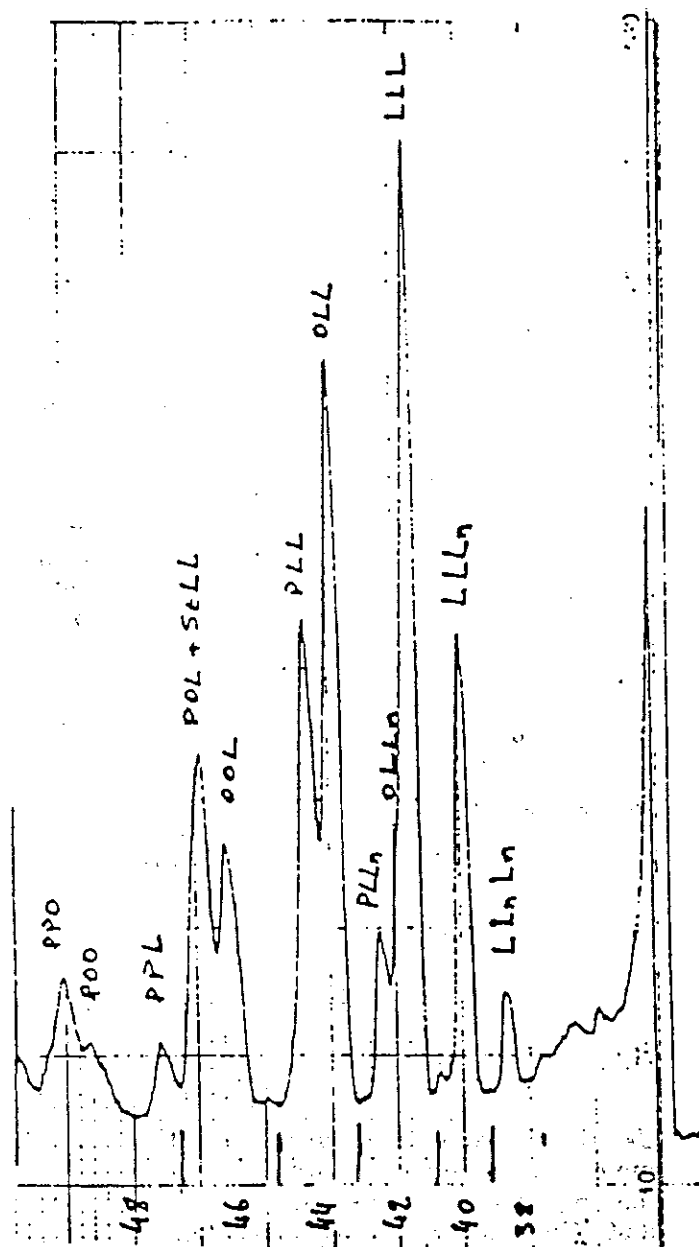
13,487-2
 Glycerol (Pouchert & Campbell, 1974)
 $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
 M.W. 92.09 m.p. 18° b.p. 182°/2mm. n_D^{20} 1.4685
 d_4^{20} 1.261 Refr. 1.502 IR 91H



15,275-
1,4-Naph. ~~quinone~~, tech., (Pouchert & Campbell, 1974)
M.W. 158.16 m.p. 121-122° Boil. 7.724
Fieser 1,714 IR 682C



Cromatograma B de referencia triacilglicerol presentes en aceite de soya¹
(AOCS, 1989)



¹ Condiciones de trabajo

Columna

250 X 4.5 mm. diámetro de partícula 5 µm. sílica gel con 22-23% de carbono como octadecilsilano

Fase móvil

acetonitrilo : tetrahydrofurano. 73 : 27 (v/v)

Velocidad de flujo

1 ml / min

Concentración de la muestra

40-60 mg / mL en tetrahydrofurano

Volumen inyectado

10 µL

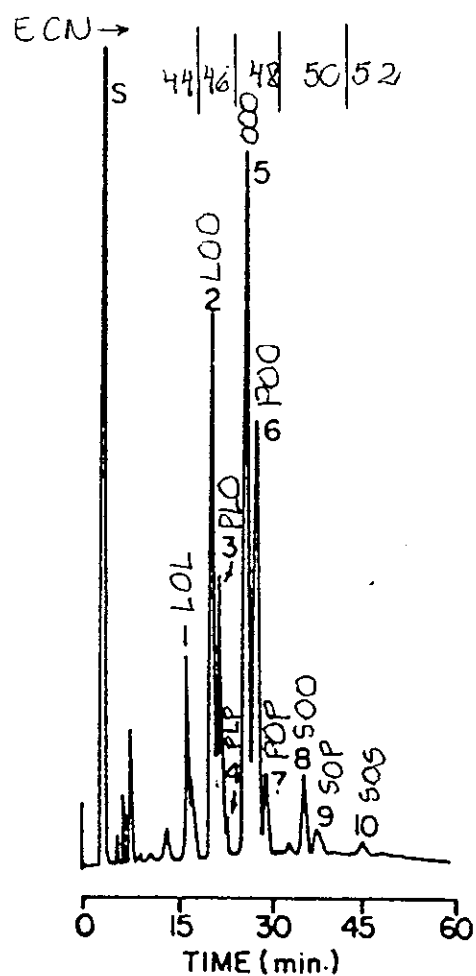
Detector

ultravioleta en 220 nm

² ECN = número de carbonos equivalentes. L = linoleico. Ln = linolénico. O = oleico. P = palmítico.

S = esteárico. M = mirístico

Cromatograma de referencia de triacilglicerolos presentes en aceite de oliva¹
(El-Hamdy and Perkins, 1981b)



¹ Condiciones de trabajo.

Columna	Supelcosil LC-18, 250 X 4.6 mm. tamaño de partícula 5 μ m
Fase móvil	acetona : acetonitrilo, 63.6 : 36.4 (v/v)
Velocidad de flujo	1 ml / min
Concentración de la muestra	200-250 mg / mL en tetrahidrofurano
Volumen inyectado	20 μ L
Detector	refractómetro diferencial

² ECN = número de carbonos equivalentes. L = linoleico, Ln = linolénico, O = oleico, P = palmítico, S = esteárico, M = mirístico

APENDICE E

Análisis de varianza y comparación de medias de los valores de las determinaciones de las propiedades físicas y químicas las muestras de grasa del nij

Todos los análisis estadísticos presentados a continuación se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS for Windows, versión 6.0 (Norusis, 1993) utilizadnod análisis de varianza de una vía y prueba de comparación de medias de Tukey.

E.1 Intervalo de fusión

----- O N E W A Y -----

Ti = temperatura inicial del intervalo de fusión

Tf = temperatura final del intervalo de fusión

Tm = temperatura media del intervalo de fusión

Localidad 1 = Rabinal

Localidad 2 = Chiapas

Localidad 3 = Rabinal–Guatemala

E.1.1. Variable Ti By Variable Localidad

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	4.3889	2.1944	26.3333	0.0011
Within Groups	6	0.5000	0.0833		
Total	8	4.8889			

Multiple Range Tests: Tukey–HSD (honestly significant difference) test with significance level 0.050

The difference between two means is significant if

$\text{Mean}(J) - \text{Mean}(I) \geq (0.2041) \times (\text{range}) \times (\sqrt{1/N(I) + 1/N(J)})$

with the following value(s) for range: 4.34

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

	G G G
	r r r
	p p p
Mean	Group 3 1 2
33.6667	Grp 3
34.333	Grp 1 *
35.3333	Grp 2 *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3
Mean	33.6667

Subset 2

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	34.8333	35.3333

----- ONE WAY -----

E.1.2. Variable Tf By variable Localidad

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	2.8889	1.4444	17.3333	0.0032
Within Groups	6	0.5000	0.0833		
Total	8	3.3889			

Multiple Range Tests: Tukey–HSD (honestly significant difference) test with significance level 0.050

The difference between two means is significant if
 $\text{Mean}(J) - \text{Mean}(I) \geq (0.204) \times (\text{range}) \times (\sqrt{1/N(I) + 1/N(J)})$
 with the following value(s) for range: 4.34

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G
r r r
p p p

Mean	Group 3 1 2
50.8333	Grp 3
51.8333	Grp 1 *
52.1667	Grp 2 *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

SUBSET 1

Group	Grp 3
Mean	50.8333

SUBSET 2

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	51.8333	52.1667

----- O N E W A Y -----

E.1.3. Variable Tm By Variable Localidad

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	3.5972	1.7986	64.7500	0.0001
Within Groups	6	0.1667	0.0278		
Total	8	3.7639			

Multiple Range Tests: Tukey-HSD (honestly significant difference) test with significance level 0.050

The difference between two means is significant if
 $\text{Mean}(J) - \text{mean}(I) \geq (0.1179) \times (\text{range}) \times (\text{sqrt}(1/N(I) + 1/N(J)))$
 with the following value(s) for range: 4.34

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

		G	G	G
		r	r	r
		p	p	p
Mean	Group	3	1	2
42.2500	Grp	3		
43.3333	Grp	1	*	
43.7500	Grp	2	*	*

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3
Mean	42.2500

Subset 2

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	43.3333	43.7500

Conclusión

Los tres análisis de varianza (Ti, Tf, Tm) indican que hay una probabilidad menor de 0.0032 de que las diferencias de medias entre los grupos analizados se deban al azar; entonces, se acepta la hipótesis de que hay diferencia entre las medias de algunos de los grupos. Las pruebas de comparación de medias de Tukey de Ti, Tf y Tm indica que las muestras de Rabinal y Chiapas no son diferentes entre sí pero, sí son diferentes de la muestra de Rabinal-Guatemala, en cuanto a este parámetro.

E.2 Gravedad específica

----- O N E W A Y -----

E.2.1. Variable gresp By Variable Localidad

gresp = gravedad específica

Localidad 1 = Rabinal

Localidad 2 = Chiapas

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	0.0000	0.0000	67.2024	0.0012
Within Groups	4	0.0000	0.0000		
Total	5	0.0000			

No range tests performed with fewer than three non-empty groups.

Conclusión

El análisis de varianza indica que hay una probabilidad de 0.0012 que las diferencias de medias entre las muestras de Rabinal y de Chiapas se deban al azar; entonces, se acepta la hipótesis de que hay diferencia entre las medias entre estas localidades en cuanto a gravedad específica. No fue necesario hacer comparación de medias por medio de Tukey porque sólo había grupos de datos.

E.3 Solubilidad

***** Analysis of Variance-- design 1 *****

E.3.1. Tests of Significance for Solubilidad using unique sums of squares

Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
Within+residual	5.29	12	0.44		
Localidad	0.30	1	0.30	0.69	0.423
solvente	17.55	3	5.85	13.28	0.000
Localidad By solvente	0.00	1	0.00	0.01	0.939
(Model)	23.37	5	4.67	10.61	0.000
(Total)	28.66	17	1.69		

R-Squared = 0.816

Adjusted R-Squared = 0.739

Conclusión

Este análisis de varianza indica que el factor localidad no parece tener efecto sobre la solubilidad, mientras que el factor solvente sí parece tener efecto sobre esta variable.

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G G
r r r r r
p p p p p

Mean	Group 3	4	5	6	7
9.4863	Grp 3				
9.9957	Grp 4				
11.5588	Grp 5	*			
12.0088	Grp 6	**			
12.5530	Grp 7	**			

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 3	Grp 4
Mean	9.4863	9.9957

Subset 2

Group	Grp 4	Grp 5
Mean	9.9957	11.5588

Subset 3

Group	Grp 5	Grp 6	Grp 7
Mean	11.5588	12.0088	12.5530

Conclusión

El análisis de varianza indica que hay una probabilidad de 0.0014 de que las diferencias de medias entre los grupos analizados se deban al azar; entonces, se acepta la hipótesis de que hay diferencia entre las medias de algunos de los grupos. Con respecto a la prueba de Tukey, ésta no fue capaz de determinar con exactitud de a qué subset pertenecen los grupos 4 y 5, por eso la prueba las colocó en dos subsets al mismo tiempo. Por lo anterior, no puede concluirse nada sobre la similitud de los grupos 4 y 5 con relación a los demás. Para resolver la ambigüedad referida, se debería repetir el experimento haciendo más réplicas de cada grupo, con lo que las conclusiones del análisis estadístico serían más decisivas. Lo que sí puede concluirse es que los grupos 6 y 7 parecen ser similares entre sí y diferentes del grupo 3. (Zar, 1984)

E.4 Indice de acidez

----- O N E W A Y -----

E.4.1. Variable Acidez By Variable Localidad

Acidez = indice de acidez

Localidad 1 = Rabinal

Localidad 2 = Chiapas

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	91.8718	91.8718	188.1479	0.0002
Within Groups	4	1.9532	0.4883		
Total	5	93.8250			

No range tests performed with fewer than three non-empty groups.

Conclusión

El análisis de varianza indica que hay una probabilidad de 0.0002 de que las diferencias de medias entre las muestras de Rabinal y de Chiapas se deban al azar; entonces, se acepta la hipótesis de que hay diferencia entre las medias de las muestras estas localidades en cuanto a índice de acidez. No fue necesario hacer comparación de medias por medio de Tukey porque sólo había dos grupos de datos.

E.5 Indice de saponificación

----- O N E W A Y -----

E.5.1. Variable Saponificacion By Variable Localidad

Saponificacion = indice de saponificación

Localidad 1 = Rabinal

Localidad 2 = Chiapas

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	0.0795	0.0795	0.0182	0.8991
Within Groups	4	17.4407	4.3602		
Total	5	17.5202			

No range tests performed with fewer than three non-empty groups.

Conclusión

El análisis de varianza indica que hay una probabilidad de 0.8991 de que las diferencias de medias entre las muestras de Rabinal y de Chiapas se deban al azar; entonces, se rechaza la hipótesis de que hay diferencia entre las medias de las muestras estas localidades en cuanto a índice de saponificación. No fue necesario hacer comparación de medias por medio de Tukey porque sólo había dos grupos de datos.

E.6. Índice de yodo

----- O N E W A Y -----

E.6.1. Variable Yodo By Variable Localidad

Yodo = índice de yodo

Localidad 1 = Rabinal

Localidad 2 = Chiapas

Localidad 4 = Rabinal, fracción soluble en éter de petróleo

Localidad 5 = Rabinal, fracción insoluble en éter de petróleo

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	15435.1609	5145.0536	21466.7930	0.0000
Within Groups	8	1.9174	0.2397		
Total	11	15437.0783			

Multiple Range Tests: Tukey-HSD (honestly significant difference) test with significance level 0.050

The difference between two means is significant if

$\text{Mean}(J) - \text{mean}(I) \geq (0.3462) \times (\text{range}) \times (\sqrt{1/N(I) + 1/N(J)})$

with the following value(s) for range: 4.53

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

G G G G
r r r r
p p p p

Mean	Group 5 2 4 1
56.8967	Grp 5
126.5867	Grp 2 *
143.0600	Grp 4 * *
144.6433	Grp 1 * * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 5
Mean	56.8967

Subset 2

Group	Grp 2
Mean	126.5867

Subset 3

Group	Grp 4
Mean	143.0600

Subset 4

Group	Grp 1
Mean	144.6433

Conclusión

El análisis de varianza indica que hay una probabilidad de 0.0000 de que las diferencias de medias entre los grupos analizados se deban al azar; entonces, se acepta la hipótesis de que hay diferencia entre las medias de estos grupos, en cuanto a índice de yodo. La prueba de comparación de medias de Tukey indica que todos los grupos son diferentes entre sí.

Fórmulas de propagación de error

Las fórmulas de propagación se utilizan para calcular la incertidumbre asociada a mediciones que se llevan a cabo sin réplicas. En el presente trabajo se utilizaron en el índice de yodo de la grasa del nij de Rabinal a lo largo del tiempo (ver Cuadro 13, sección de Resultados).

Sea $F = (a \pm \Delta a) \times (b \pm \Delta b)$

o $F = (a \pm \Delta a) / (b \pm \Delta b)$

Entonces $\Delta F = F \sqrt{\frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta b}{b}}$

Sea $F = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b)$

o $F = (a \pm \Delta a) - (b \pm \Delta b)$

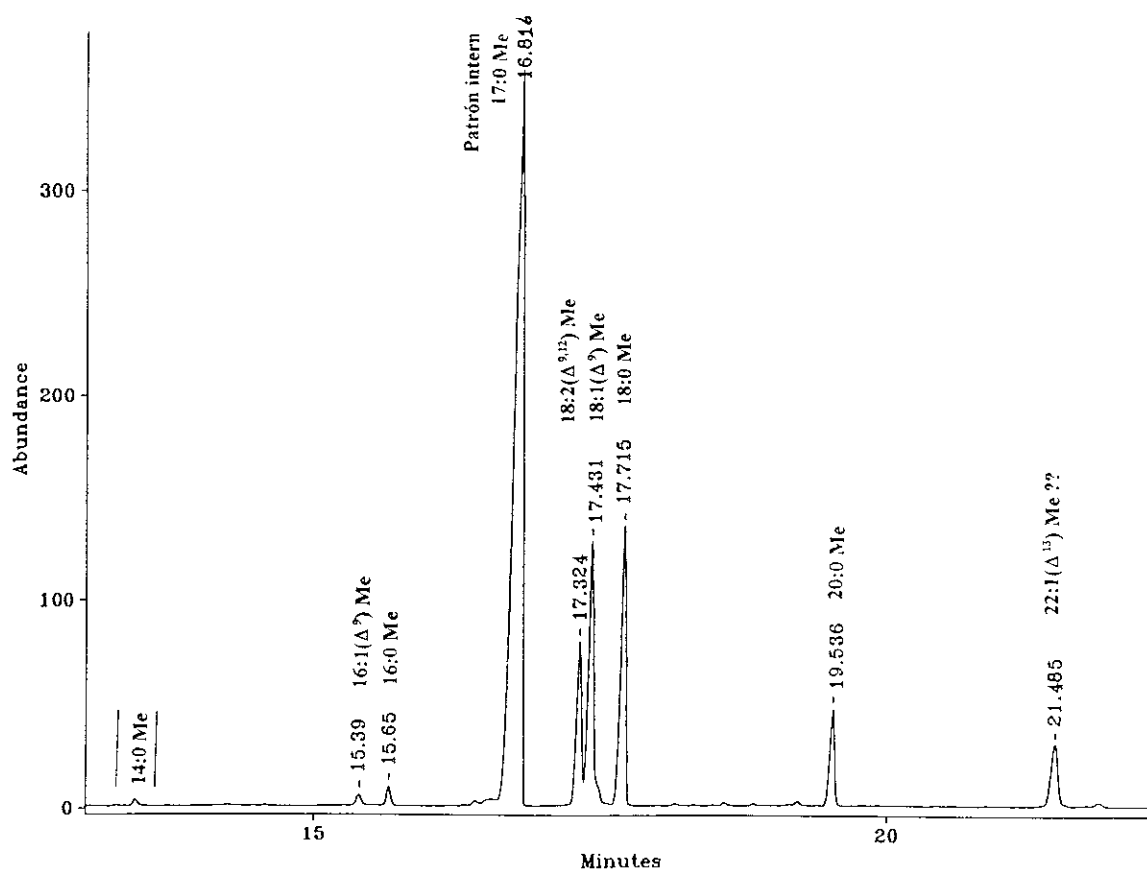
Entonces $\Delta F = \sqrt{\Delta a + \Delta b}$

(Skoog and West, 1982)

APENDICE F

Cromatogramas de referencia de cromatografía de gases de metil ésteres de ácidos grasos de la grasa del nij

Cromatograma de referencia y su correspondiente cuadro de datos, de metil ésteres de ácidos grasos de la grasa del nij con detección de ionización en llama^{1,2} (Selle, 1993)



¹ Condiciones de trabajo

Columna	Altech RSL-150 (capilar, metil silicona), 30 m X 0.25 mm
Solvente de la muestra	hexano
Temperatura del inyector	220°C
Programa en el horno	1. 60°C durante 1 min. 2. 10°C/min hasta 240°C
Detector	de ionización en llama (FID) a 250°C
Cromatógrafo	HP-5890
Software	Lab. calc.

² Muestra

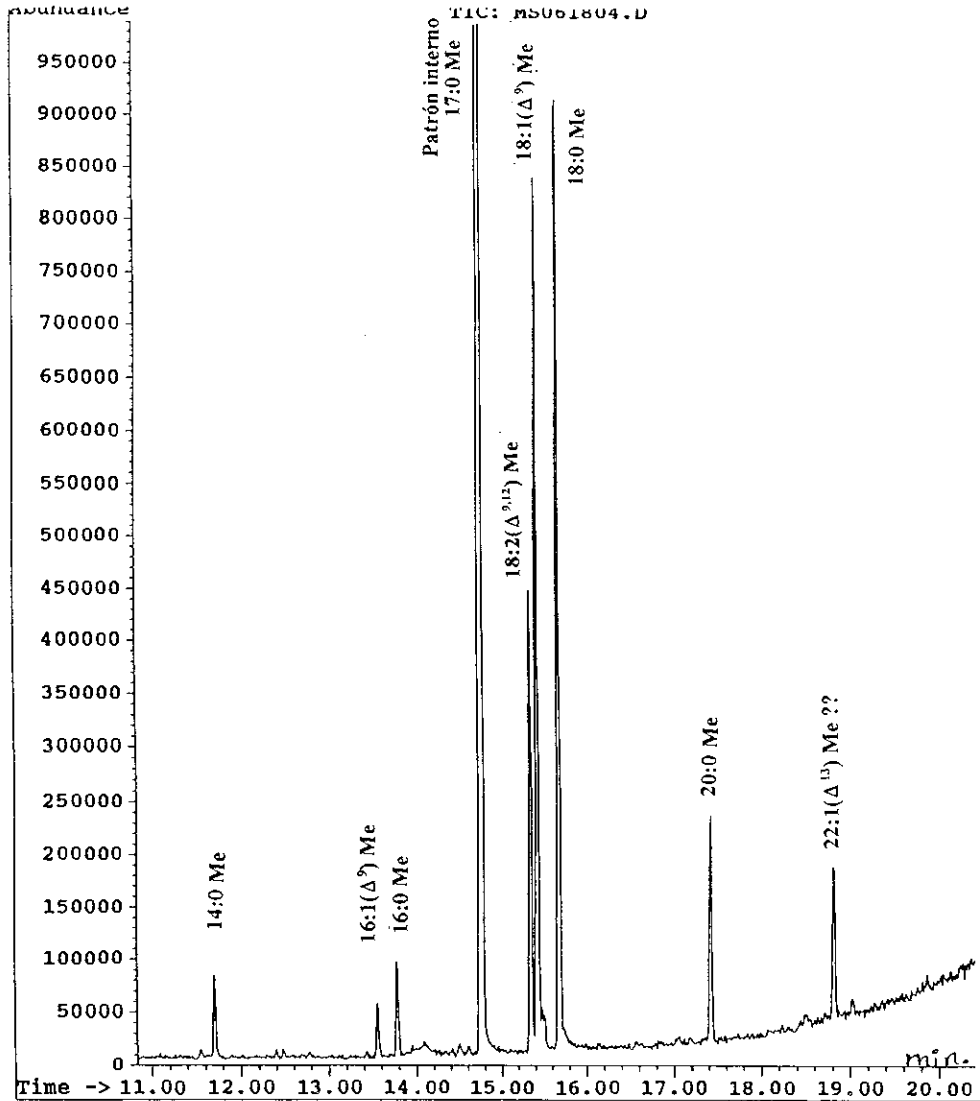
Producto de la derivatización de la parte de la grasa del nij de Rabinal soluble en CHCl₃ : CH₃OH 2 : 1

Name	Center X	Height	%Height	Area	%Area
Peak 1	15.39039	5.3509	.694	.243	.4373
Peak 2	15.64976	8.792	1.1403	.3732	.6717
Peak 3	16.81612	342.26	44.3909	33.0299	59.438
Peak 4	17.32389	78.045	10.1224	3.8893	6.9989
Peak 5	17.43113	126.409	16.3952	6.6682	11.9996
Peak 6	17.71492	134.151	17.3993	6.9834	12.5667
Peak 7	19.53642	46.3027	6.0054	2.2022	3.9629
Peak 8	21.48489	29.7023	3.8523	2.1809	3.9246

Porcentaje de área de métil ésteres de ácidos grasos de grasa del nij, excluyendo el área del patrón interno, 17:0 Me (ver cromatograma anterior)

Pico	área	% de área
16:1(Δ^9) Me	0.2430	1.194
16:0 Me	0.3732	1.833
18:2($\Delta^{9,12}$) Me	3.8893	19.10
18:1(Δ^9) Me	6.6682	32.75
18:0 Me	6.9834	34.30
20:0 Me	2.2022	10.82
Area total	20.3593	100

Cromatograma de referencia y sus correspondientes espectros de masa, de metil ésteres de ácidos grasos de la grasa del nij con detección de masas^{1,2}
(Selle, 1993)



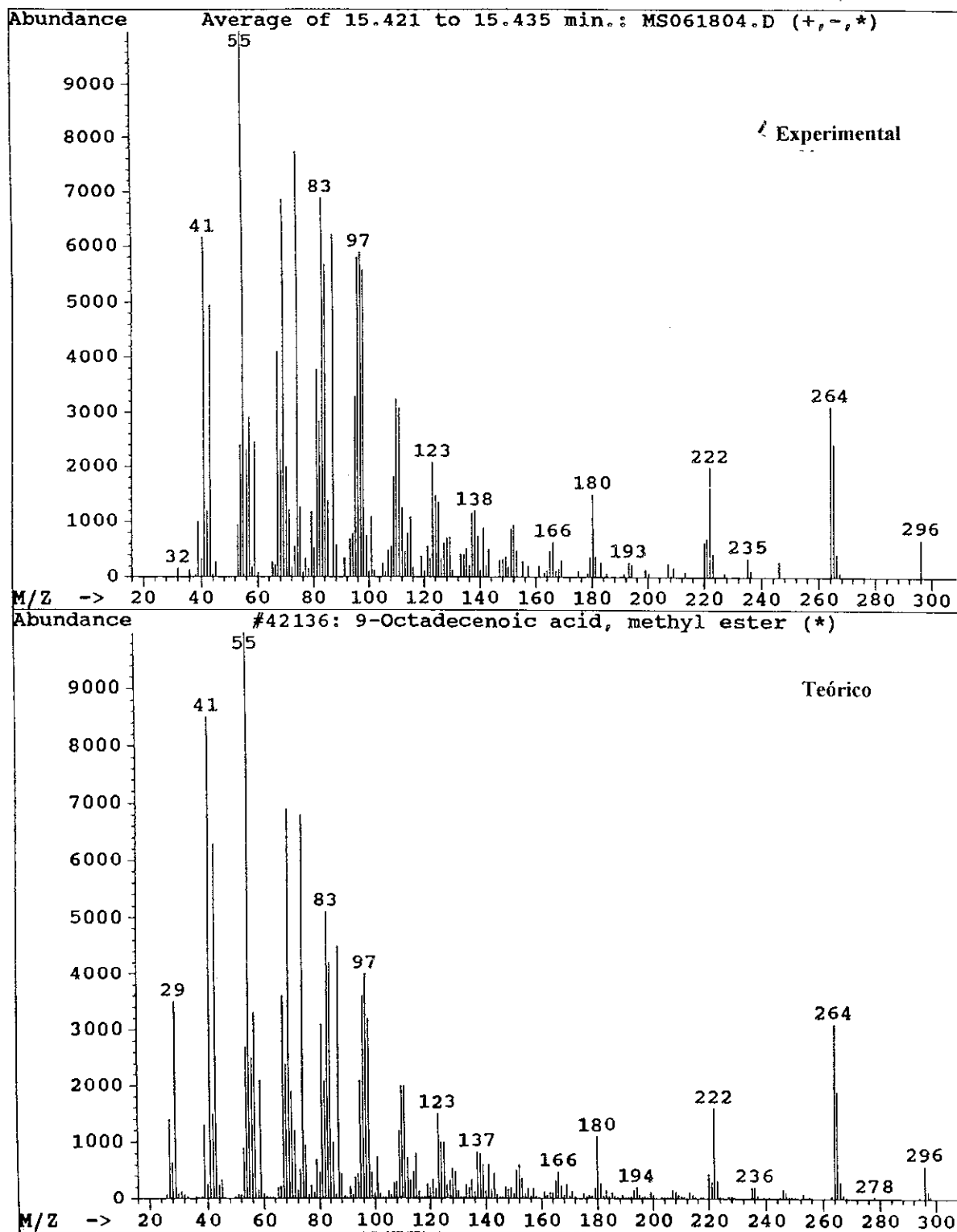
¹ Condiciones de trabajo

Columna	capilar, metil silicona. 25 m X 0.25 mm
Solvente de la muestra	hexano
Temperatura del inyector	220°C
Programa en el horno	1. 100°C durante 1 min. 2. 10°C/min hasta 300°C
Detector	de masas (MS) a 310°C
Cromatógrafo	HP-5890-SII
Software	Chem Station

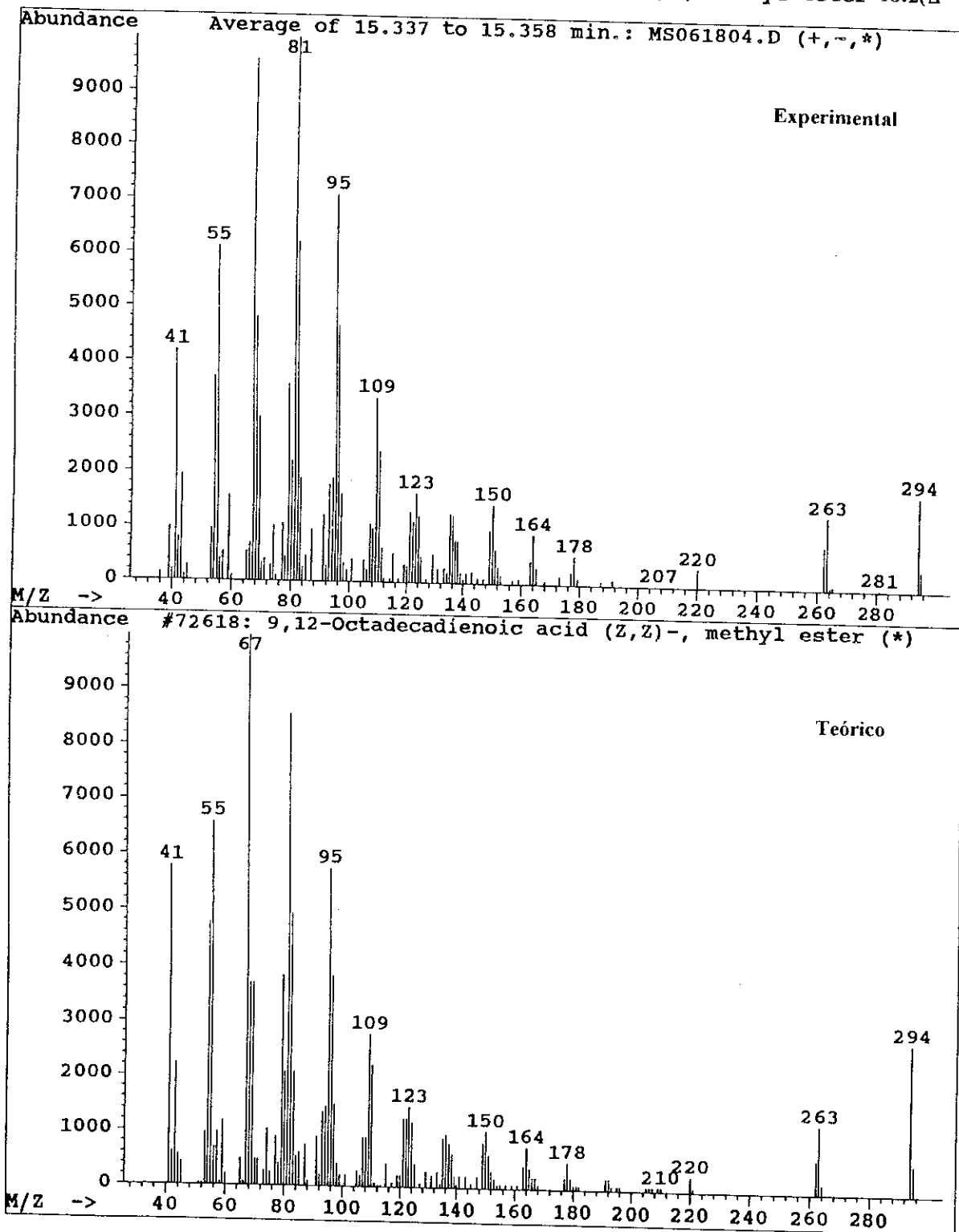
² Muestra

Producto de la derivatización de la parte de la grasa del nij de Rabinal soluble en CHCl_3 : CH_3OH 2 : 1

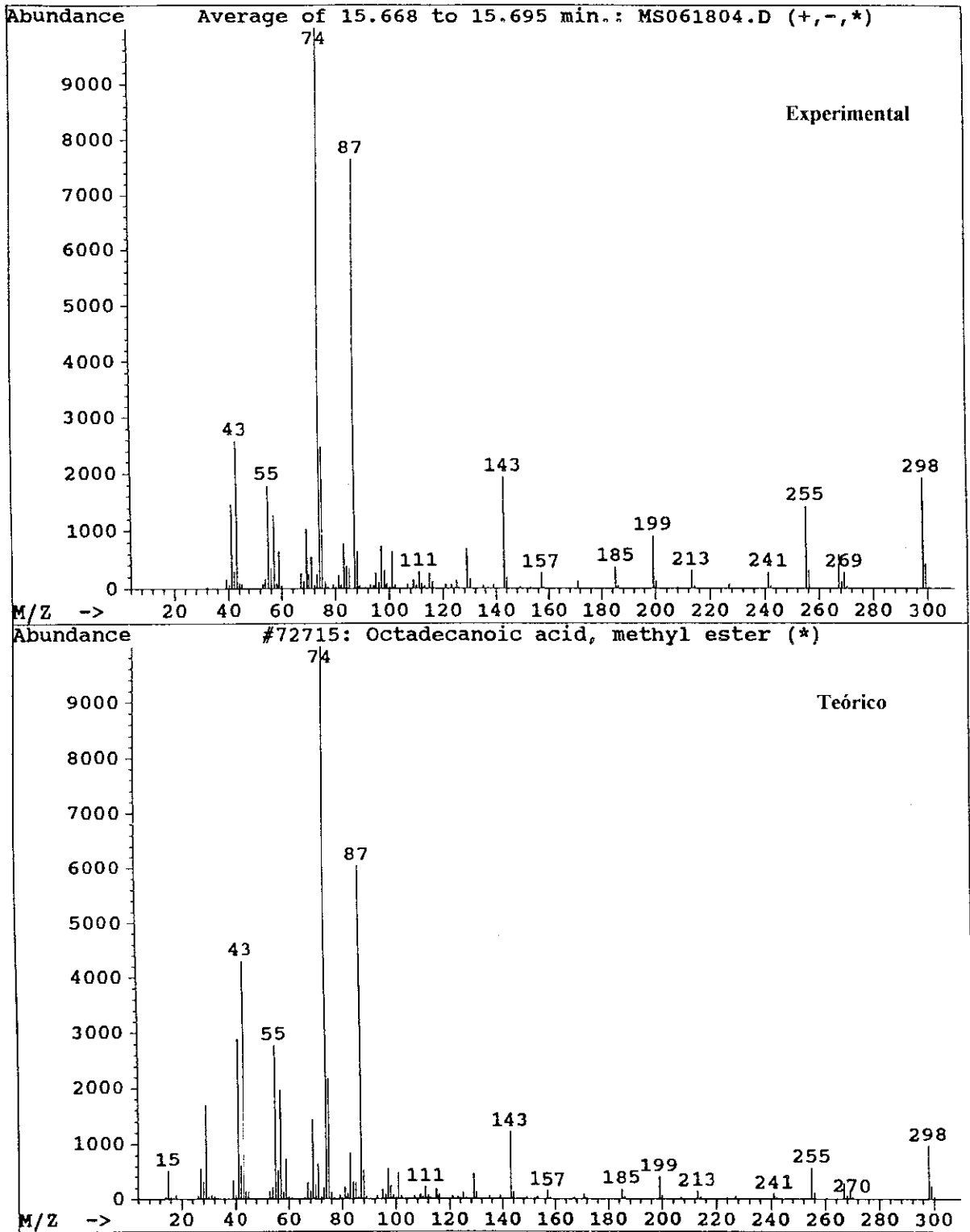
Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L
Quality : 99
ID : 9-Octadecenoic acid, methyl ester 18:1(Δ^9) Me



Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L
Quality : 99
ID : 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester 18:2($\Delta^{9,12}$) Me



Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L
Quality : 98
ID : Octadecanoic acid, methyl ester 18:0 Me



Library Searched : C:\DATABASE\NBS75K.L
Quality : 94
ID : Hexadecanoic acid, methyl ester 16:0 Me

