

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

**CAROTENOIDES DEL ACEITE Y SUBPRODUCTOS
DE PALMA AFRICANA COMO FUENTE DE PIGMENTACION
PARA YEMA DE HUEVO**

ALVARO MOLINA CRUZ

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Trabajo de investigación presentado para optar
al grado académico de Licenciado en Bioquímica**

Guatemala

1987

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

**CAROTENOIDES DEL ACEITE Y SUBPRODUCTOS
DE PALMA AFRICANA COMO FUENTE DE PIGMENTACION
PARA YEMA DE HUEVO**

ALVARO MOLINA CRUZ

**BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Trabajo de investigación presentado para optar
al grado académico de Licenciado en Bioquímica**

Guatemala

1987

**CAROTENOIDES DEL ACEITE Y SUBPRODUCTOS
DE PALMA AFRICANA COMO FUENTE DE PIGMENTACION
PARA YEMA DE HUEVO**

Vo. Bo.:

(f) Concepción (nde Bosque)
Licenciada Concepción de Bosque
Asesora

Tribunal:

(f) Concepción (nde Bosque)
Licenciada Concepción de Bosque

(f) Margarita Selle
Licenciada Margarita Selle
Coasesora

(f) Ricardo Bressani
Doctor Ricardo Bressani

Fecha de aprobación: 31 de julio de 1987.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

A mis padres, amigos,
y maestros.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Faint, illegible text in the middle section of the page.

Agradezco la colaboración y ayuda brindada
para la realización de este trabajo, en especial

a las siguientes personas e instituciones

Ing. Elvira G. de Mejía
(CIAD, Mexico)

Licda. Concepción de Bosque
(INCAP)

Licda. Margarita Selle
(U. del Valle de Guatemala)

Sr. Ronaldo Pérez Quan
(U. del Valle de Guatemala)

Dr. Ricardo Bressani
(INCAP)

Sr. Jorge Mario González
(INCAP)

Dr. Bud Hudson
(Carroll College, Wisconsin, U.S.A.)

Sr. Humberto Yoc
(U. del Valle de Guatemala)

INCAP, U. del Valle de Guatemala,

ANACAFE, Productos Roche

RESUMEN

Se analizaron los carotenoides del aceite crudo de palma africana, así como también de sus jabones y ácidos grasos, por cromatografía líquida de alta resolución. Se encontró en estos materiales un alto contenido de beta-caroteno y alfa-caroteno; y contenidos menores de licopeno y xantofilas.

Diferentes condiciones en el proceso de acidulación para obtener ácidos grasos a partir de los jabones de aceite de palma, no provocaron conversión significativa de carotenos a xantofilas.

Realizando análisis por cromatografía líquida de alta resolución, se encontró que la gallina ponedora incorpora en la yema de huevo los pigmentos principales del aceite de palma (beta-caroteno, alfa-caroteno, gama-caroteno, licopeno y xantofilas).

El aceite de palma y los ácidos grasos obtenidos a partir de jabones de este aceite, son una buena fuente de grasa, provitamina A y base de pigmentación para suplementar con otra fuente de pigmentos la dieta de gallinas ponedoras.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>)	3
1. Descripción	3
2. Potencial del aceite de palma	4
3. Composición del aceite de palma	4
4. Jabones como subproductos del refinamiento del aceite de palma	10
5. Acidos grasos a partir de jabones de desecho	10
B. Pigmentación de la yema de huevo de gallina ponedora	11
1. Niveles de vitamina A y carotenoides requeridos por gallinas ponedoras	13
2. Repleción y depleción de pigmentos	15
3. Efectos de la grasa en la ración para aves	16
4. Pigmentación por combinación de carotenoides rojos y amarillos	18

	Página
C. Aceite de palma y subproductos como fuente de pigmentos para gallina ponedora	18
D. Determinación de carotenoides	19
1. Métodos de análisis para carotenoides	19
2. Principios del análisis por cromatografía líquida de alta resolución	20
3. Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución	24
III. OBJETIVOS	29
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	30
A. Experimentos de acidulación de jabones	30
B. Ensayo biológico y seguimiento de los carotenoides	32
C. Materiales e instrumentacion	35
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
A. Experimentos de acidulación de jabones y seguimiento de carotenoides	37
B. Ensayo biológico	48
VI. CONCLUSIONES	62
VII. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS FUTUROS	64
VIII. LITERATURA CITADA	65
APENDICES	69
A. Carotenoides y su biopotencia como presursores de vitamina A.	70

B. Procedimientos experimentales. 72

C. Metodología HPLC para análisis de carotenoides. 75

D. Estadística realizada. 79

1. Caracterización de los aceites de palma africana	8
2. Determinación de los ácidos grasos saturados en la composición de los lípidos de aceites de palma africana	9
3. Determinación de carotenos en el aceite de palma	9
4. Caracterización de los aceites de palma	9
5. Porcentaje de carotenos en la dieta que se depositan en la carne	10
6. Efecto de la suplementación con aceites de palma en la producción de carne de reses	13
7. Composición de los lípidos y carotenos en la carne de reses	19
8. Caracterización de los lípidos y carotenos en la carne de reses	25
9. Caracterización de los lípidos y carotenos en la carne de reses	31
10. Caracterización de los lípidos y carotenos en la carne de reses	34
11. Caracterización de los lípidos y carotenos en la carne de reses	38
12. Caracterización de los lípidos y carotenos en la carne de reses	40
13. Caracterización de los lípidos y carotenos en la carne de reses	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Contenido de ácidos grasos en aceite de palma africana	6
2.	Porcentaje de ácidos grasos saturados en la posición B de los triglicéridos de varios aceites	7
3.	Contenido de carotenoides en aceite de palma	8
4.	Carotenoides en el aceite de palma	9
5.	Porcentaje de carotenoides de la dieta que se depositan en la yema	14
6.	Niveles de xantofilas en raciones de gallinas ponedoras para lograr pigmentación adecuada de la yema de huevo	15
7.	Composición de ácidos grasos en varias fuentes de grasa para alimento de aves de engorde	17
8.	Condiciones de distintos sistemas para cromatografía líquida de alta resolución empleados en separación de carotenoides	25
9.	Dieta basal	33
10.	Suplemento de la dieta basal	34
11.	Carotenoides en aceite de palma y subproductos	38
12.	Análisis de cromatogramas de aceite y subproductos	46
13.	Carotenoides en aceite de palma africana y subproductos	47

Tabla

Página

14.	Nivel de carotenoides y color en yemas	48
15.	Control de producción, peso de huevos y consumo de alimento	56
16.	Cálculos teóricos de provitamina A de las dietas	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Componentes básicos de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución	22
2. Cromatograma HPLC No. 1. Extracción de aceite de palma crudo (fresco)	41
3. Cromatograma HPLC No. 2. Extracción de jabón de aceite de palma (fresco)	42
4. Cromatograma HPLC No. 3. Extracción de ácidos grasos por acidulación de jabones de aceite de palma con ácido clorhídrico 2N.	43
5. Cromatograma HPLC No. 4. Extracción de ácidos grasos por acidulación de jabones de aceite de palma con ácido sulfúrico 1N.	44
6. Cromatograma HPLC No. 5. Mezcla de patrones de carotenoides	45
7. Cromatograma HPLC No. 6. Extracción de yemas provenientes de gallinas con la dieta de aceite de palma crudo	53
8. Cromatograma HPLC No. 7. Extracción de yemas provenientes de gallinas con la dieta de ácidos grasos al 10%	54
9. Cromatograma HPLC No. 8. Extracción de yemas provenientes de gallinas en la dieta blanco	55

I. INTRODUCCION

El aceite de palma africana (Elaeis guineensis) representa para Guatemala un producto natural con alto potencial químico-alimenticio y se espera que tome un papel importante para solucionar los problemas de abastecimiento de aceite comestible en nuestro medio. Por otra parte, durante el refinamiento del aceite de palma pueden obtenerse subproductos como jabones y tierras activadas, las cuales presentan un alto contenido de carotenoides. Es indispensable realizar investigación para el mejor aprovechamiento de estos subproductos, ya que poseen características únicas. El presente trabajo es continuación de las investigaciones de Edgar Arriaga (1985) y Guerda Huertas (1987). Los tres estudios fueron iniciados y dirigidos por la Ing. Elvira de Mejía con fondos proporcionados por International Foundation for Science, Suecia. En la realización de los trabajos se ha contado con la valiosa participación de Ronaldo Pérez Quan, Edwin Castellanos y el Dr. Bud Hudson.

Los jabones resultantes del refinamiento del aceite de palma fueron propuestos como fuente de pigmento para yema de huevo de gallina ponedora (Arriaga, 1985; Huertas, 1987). Faltaba sin embargo, realizar una caracterización más detallada de los carotenoides presentes en el aceite de palma que se produce en Guatemala, y en los jabones provenientes del

refinamiento alcalino de este aceite. Hacia falta también conocer cuales carotenoides se logran incorporar en la yema de huevo de gallina ponedora, cuando se utiliza aceite de palma o sus jabones acidulados como fuente de grasa y pigmentos en la dieta de estos animales. Son estos dos últimos aspectos los que se investigan en el presente trabajo.

La palma africana o palma oleaginosa (*Elaeis guineensis* L.) pertenece a la familia de las Palmaeaceae, tribu de las Coccothales y género *Elaeis*. Su cultivo es propio de la zona tropical húmeda, y para ello se utiliza un híbrido con *E. guineensis*, logrando por esta manera la altura de la palma.

Los frutos de la palma se dan en racimos, con un número promedio de 1,000 a 1,500 frutos por racimo. La producción de frutos ocurre a todo lo largo del año, es de alrededor de 15 racimos anuales por palma y empieza desde los cuatro años de vida de la palma hasta los 20 o 25 años.

En Guatemala se cultiva la variedad Túcora, la cual tiene un fruto con un número de racimos de 1000 a 1500.

El principal producto de la palma africana es el aceite. En la palma se obtienen 2 tipos de aceite: el llamado aceite de palma y el llamado aceite de palma refinado. El aceite de palma contiene un 80% de carotenoides, mientras que el aceite de palma refinado contiene un 10% de carotenoides. El aceite de palma refinado se utiliza en la industria de la alimentación y en la industria de la cosmética. El aceite de palma se utiliza en la industria de la alimentación y en la industria de la cosmética. El aceite de palma se utiliza en la industria de la alimentación y en la industria de la cosmética.

II. ANTECEDENTES

A: Palma africana (*Elaeis guineensis*)

1. Descripción

La Palma africana o palmera oleaginosa (*Elaeis guineensis*) pertenece a la familia de las Palmáceas, tribu de las Coccoineae y género *Elaeis*. Su cultivo es propio de la zona tropical húmeda, y para ello se utiliza un híbrido con *E. melanococca*, logrando con esto reducir la altura de la palmera.

Los frutos de la palma se dan en racimos, con número promedio de 1,200 a 1,500 frutos/racimo. La producción de racimos ocurre a todo lo largo del año, es de alrededor de 15 racimos anuales por palmera y empieza desde los cuatro años de vida de la palmera hasta los 20 o 25 años.

En Guatemala se cultiva la variedad Ténera, la cual tiene frutos con cáscara de menos de 2mm de grosor.

El principal producto de la palma africana es aceite. De su fruto se obtienen 2 tipos de aceite: el llamado aceite de palma, con alto contenido de carotenoides, proviene del mesocarpio o pulpa (45 a 50% de su peso es aceite); el otro aceite, conocido como aceite de palmiste, se extrae del endospermo de la semilla (Surre, et al, 1969).

El aceite de palma es comestible, puede ser utilizado en margarinas y mantecas o, como el aceite de palmiste, en la fabricación de jabones y pintura (Kuksis, 1978).

2. Potencial del aceite de palma

Como fuente de aceite, Elaeis guineensis posee características muy convenientes a nuestro país:

- a) Es la oleaginosa de mayor rendimiento de aceite por área de terreno cultivada.
- b) Posee buena resistencia a plagas.
- c) Guatemala posee el medio adecuado para su cultivo.

En 1981 las zonas cultivadas con Palma africana en Guatemala eran de 3782.3 manzanas, contándose con 3 plantas para la extracción del aceite. Actualmente se cuenta con una planta de refinamiento físico, y se ha propuesto metodología para el refinamiento alcalino (Arriaga, 1985).

3. Composición del aceite de palma

El aceite de palma está compuesto principalmente por triglicéridos. La composición de ácidos grasos en los triglicéridos varía dependiendo de la procedencia del aceite (Maclellan, 1983; Kuksis, 1978; Mazuelos, 1986). La Tabla 1 presenta el resultado de un análisis típico de ácidos grasos en el aceite de palma.

Debido al contenido de ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico principalmente, el aceite es sólido a tempe-

ratura ambiente (Punto de fusión: 38-45 C). La gran proporción de ácidos saturados también provoca que en la posición B del glicerol, donde suelen predominar los ácidos grasos insaturados, exista una mayor cantidad de ácidos grasos saturados en relación a otros aceites, ver Tabla 2. Esta característica ha sido utilizada para detectar mezclas con el aceite de oliva, ya que se aprovecha el bajo costo del aceite de palma para diluirlo (Mazuelos, 1986).

Además de los triglicéridos, el aceite de palma crudo contiene impurezas solubles definidas como gomas. Entre estas tenemos fosfolípidos y complejos metálicos, peróxidos y sus productos, carotenoides (Ver Apéndice A), ácidos grasos libres y diglicéridos (Maclellan, 1983).

Con respecto al contenido de carotenoides totales en el aceite de palma, generalmente expresados como equivalentes de B-Caroteno, en la Tabla 3 se presentan algunas cuantificaciones reportadas.

En una publicación sobre la composición de alimentos (Flores, et al, 1969) se reporta que el 65% de los carotenoides presentes en el aceite de palma esta constituido por beta-caroteno. El tipo de carotenoides que predominan, como puede verse en la tabla 4, son beta-, alfa- y gama-Caroteno.

TABLA 1
 Contenido de ácidos grasos
 en aceite de palma africana

Acido graso	g/100 g aceite*
Laúrico (12:0)	0.2 ± 0.1
Mirístico (14:0)	1.1 ± 0.4
Palmítico (16:0)	42.0 ± 4.8
Esteárico (18:0)	4.3 ± 1.5
Araquídico (20:0)	0.3 ± 0.1
total saturados	47.9
Palmitoleico (16:1)	0.5 ± 0.5
Oleico (18:1)	37.9 ± 6.9
Linoleico (18:2)	9.0 ± 2.3
Linolénico (18:3)	0.3 ± 0.2
total insaturados	47.7

(Kuksis, A. 1978)

*Desviación estandar de 20 muestras analizadas.

TABLA 2

Porcentaje de ácidos grasos saturados en la
posición B de los triglicéridos de varios aceites

Aceite (ppm)	Procedencia del aceite	% de ácidos grasos saturados en la posición β	Referencia
Aceite de Palma	Brasil	19	(Lato, 1959)
Aceite de girasol	Malasia	1	(Seara, 1978)
Aceite de cártamo	Malasia	0.8	(Ser-Mulloc, 1978)
Aceite de algodón	Malasia	4	(Jacobsberg, 1975)
			(Mazuelos, 1986)
			(Lato, 1946)
			(Lencin, 1973)
			(Arriaga, 1985)
			(Arriaga, 1985)

TABLA 3

Contenido de carotenoides en aceite de palma

Carotenoides totales (ppm)	Procedencia del aceite	Referencia
330	Brasil	(Pinto, 1959)
800	Malasia	(Meanra, 1976)
404-828	Malasia	(Muller-Mullot, 1975)
567	Malasia	(Jacobsberg, 1975)
500-700	Malasia	(Maclellan, 1983)
1070-668	Africa	(Hunter, 1946)
500-700	Africa	(Loncin, 1972)
540	Guatemala	(Arriaga, 1985)

(Arriaga, E. 1985)

3. Sechones como subproductos del refinamiento del aceite de palma

Extraído el aceite de la pulpa del fruto (para detalles ver Arriaga, 1986) es necesario refinarlo para utilizarlo en alimentos.

Existen dos procesos principales de refinamiento: el proceso llamado físico y el proceso llamado alcalino. En el refinamiento físico se elimina el exceso de materia grasa, se remueven

TABLA 4

Carotenoides en el aceite de palma*

Carotenoide	% del total
beta-Caroteno	62
alfa-Caroteno	29
gamma-Caroteno	4
Xantofilas	3
Licopeno	2

(Maclellan, 1983)

* Aceite de Malasia.

4. Jabones como subproductos del refinamiento del aceite de palma

Extraído el aceite de la pulpa del fruto (para detalles ver Arriaga, 1985) es necesario refinarlo para utilizarlo en alimentos.

Existen dos procesos posibles de refinamiento: el proceso llamado físico y el proceso llamado alcalino. En el refinamiento físico se utiliza ácido fosfórico para desgomar, y luego son separados los ácidos grasos volátiles con altas temperaturas y vacío.

El refinamiento alcalino consiste en neutralizar los ácidos grasos libres del aceite con una base, generalmente hidróxido de potasio. Esta operación da lugar a la formación de jabones de desecho, sales de ácidos grasos, que son separados por decantación o centrifugación. Finaliza el refinamiento blanqueando con tierras activadas.

5. Ácidos grasos a partir de jabones de desecho

Los jabones de desecho del refinamiento alcalino, pueden ser utilizados como fuente de grasa en raciones para animales. Sin embargo no son suministrados como tales. Primero son transformados en ácidos grasos, ácidos carboxílicos, por medio de una acidulación. La literatura no reporta condiciones experimentales específicas para el proceso de la acidulación. Básicamente se trata de la adición de ácido a los jabones, para luego lavar los ácidos grasos resultantes del ácido en exceso. Tampoco se conocen datos gene-

rales de transformaciones que sufren los carotenoides presentes.

La utilización de ácidos grasos, a partir de jabones de desecho, en raciones para aves también se ha realizado con aceite de semilla de algodón (Bartov, et al, 1974) y aceite de soya (Bartov, et al, 1974; Lipstein, et al, 1967; Budowski, et al, 1964).

Durante el proceso de acidulación de los jabones, los carotenoides pueden sufrir reacciones. Se tiene el caso de la formación del 3'-hidroxi-3,4,-dehidro-B-caroteno a partir de la luteína presente en los jabones del aceite de soya, acidulando con ácido sulfúrico. Este nuevo compuesto tiene carácter de provitamina A2 para pollos (Budowski, et al, 1963; Budowski, et al, 1964). También, se menciona la formación de xantofilas durante el proceso de acidulación de los jabones del aceite de soya (Lipstein, et al, 1966). Formación de isómeros y cambios estructurales pueden ocurrir bajo las condiciones en que se lleva a cabo la acidulación (Goodwin, 1980).

B. Pigmentación de la yema de huevo de gallina ponedora

El color que se observa en la yema de huevo se debe a pigmentos, carotenoides, que son absorbidos por la gallina al alimentarse. No todos los carotenoides son absorbidos en la misma proporción, algunos permanecen iguales químicamente dentro del ave y otros son transformados.

Las principales fuentes naturales de pigmentos en las dietas de gallinas ponedoras, son el maíz amarillo, la alfalfa y los derivados de pastos. Contienen principalmente luteína, zeaxantina, violaxantina, neoxantina y otras xantofilas (ver apéndice A) (Smith, et al, 1965).

Son varios los alimentos naturales que se han investigado como fuente de pigmento. Existen investigaciones con algas marinas (Jensen, 1963), chile, Capsicum sp. (Mackay, et al, 1962), flor de muerto, Tagetes erecta (Brambilla, et al, 1962; Fletcher, et al, 1981), follaje de camote (Garlich, et al, 1974), jabones acidulados de aceite de soya (Lipstein, et al, 1966), jabones acidulados de aceite de palma (Huertas, 1987). Los últimos dos materiales tienen la ventaja de proporcionar grasa vegetal, de mayor valor alimenticio que el sebo comunmente utilizado en raciones para aves.

Las xantofilas, carotenoides con oxígeno en su estructura química, son los pigmentos mas efectivos para colorear las yemas, sin embargo, como lo muestra la Tabla 5, no son depositadas en la yema en iguales proporciones (Marusich, et al, 1970). Sin embargo la utilización de xantofilas por las aves no es un fenómeno constante y aun con aves genéticamente similares se ha demostrado que su aprovechamiento varía (Portsmouth, 1970; Jensen, 1963).

En el caso de los carotenoides con valor de provitamina A (Ej. beta-, alfa- y gama-Caroteno), la mayor parte son transformados a vitamina A y debido a esto no resultan una buena fuente de pigmento (Morrison, 1959; Williams, et al, 1963).

Los pigmentos de mejor capacidad pigmentante han sido aprovechados para su comercialización, son vendidos bajo los nombres de Carophyll-Yellow y Carophyll-Red (éster etílico del ácido B-apo-8'-Carotenoico y cantaxantina, respectivamente) por la compañía Hoffmann-La Roche.

1. Niveles de vitamina A y carotenoides requeridos por gallinas ponedoras

Un buen suplemento de vitamina A y carotenoides no solo es necesario para la producción de yemas bien pigmentadas. Las aves lo requieren para un normal crecimiento y desarrollo (Morrison, 1959).

Con un buen margen para tomar en cuenta degradación, se recomiendan 3,000 unidades U.S.P.* de vitamina A por libra de comida para gallinas ponedoras (Morrison, 1959). En clima cálido se requiere de mayor concentración de vitamina A debido a un menor consumo de alimento.

A pesar de las variaciones que se observan en la utilización de xantofilas y carotenoides, se han estimado cantidades adecuadas de pigmentos. La Tabla 6 muestra los niveles recomendados de xantofilas recomendados en raciones de gallinas ponedoras para lograr pigmentación adecuada de la yema de huevo.

* En el caso de las aves 1 U.S.P. (United States Pharmacopea) equivale a 1 I.U. (International Unit) suministrado como vitamina A, esto es equivalente a 0.6 mcg de B-Caroteno o 0.3 mcg de vitamina A (alcohol) (Marusich, et al, 1953).

TABLA 5

Porcentaje de carotenoides de la dieta
que se depositan en la yema

Carotenoide	% de Carotenoide de la dieta depositado en la yema
Ester etilico del acido B-apo-8'-carotenoico(Carophyll-yellow)	34
Cantaxantina (Carophyll-red)	20
Eter isozeaxantindimetil	11
B-apo-8'-carotenal	9
Citranaxantina	8
Zeaxantina	7
Astaxantina	4
Capsantina	3.5
Torularhodina	3.5
Equinenona	3.5
Violaxantina	3
B-Caroteno	1

(Hoffman-La Roche. 1974)

TABLA 6

Niveles de xantofilas en raciones de gallinas ponedoras para lograr pigmentación adecuada de la yema de huevo

Clasificación de la gallina	alimento diario aprox. (onzas)	Xantofilas necesarias de acuerdo a dos niveles de color de yema (mg/kg alimento)	
		muy bueno	buen promedio
Liviana	3.5 - 4.22	15	12.5
Media	4.25- 4.92	12.5	10.4
Pesada	5.0 o mas	10.4	8-9

(Portsmouth, J. 1970)

Respecto a la cantidad de carotenoides totales que típicamente se encuentran en una yema de huevo bien pigmentada se ha reportado 0.015, 0.19, 1.79 mg/100 g de yema para caroteno, criptoxantina, y zeaxantina respectivamente, utilizando maíz amarillo como fuente de pigmento (Williams, et al, 1963).

2. Repleción y depleción de pigmentos

Las gallinas que han sido depletadas de carotenoides depositan rápidamente los pigmentos al agregárseles de nuevo en su alimento. Varios investigadores han encontrado que el

tiempo necesario para que se establezca la concentración de carotenoides en la yema es de 8 a 10 días (Williams, et al, 1963; Brambila, et al, 1963; Mackay, et al, 1963). Utilizando aves que han sido alimentadas con una dieta libre de xantofilas durante todo su crecimiento, han encontrado que se requiere 10 días para repleción (Hinton, et al, 1974).

En 3 semanas de producción son removidas las xantofilas almacenadas en el cuerpo de la gallina y son utilizadas para pigmentar la yema (Hinton, et al, 1974). Otros trabajos reportan 2 semanas para el tiempo de depleción (Suárez, 1969; Livingston, et al, 1969; Budowski, et al, 1964).

Al parecer, las xantofilas pigmentantes no son necesarias para el crecimiento de las gallinas ponedoras (Hinton, et al, 1974) incluso se propone alimentarlas con pigmentos a partir de la cuarta semana antes del inicio de la producción.

3. Efectos de la grasa en la ración para aves

La grasa de la dieta, además de fuente calórica, tiende a proteger los carotenoides de oxidación (Lipstein, et al, 1966). Grasa extra en la dieta puede provocar un incremento en la absorción de carotenoides al servir como acarreador (Mackay, et al, 1963). Sin embargo en cantidades demasiado altas puede disminuir el consumo de alimento por estarse suministrando mucha fuente calórica (Lipstein, et al, 1966). El anterior efecto puede traducirse en disminución de producción y peso de las aves (Bornstein, et al, 1963).

Se ha demostrado que el grado de saturación de la grasa corporal de pollos de engorde se ve afectada por el tipo de grasa consumida en la dieta. Un mayor grado de insaturación, grasa mas líquida, provoca que la carne sea más inestable en el almacenamiento debido a rancidez oxidativa en las insaturaciones. Experimentos con jabones acidulados de aceite de semilla de algodón y aceite de soya han mostrado que el primero da lugar a grasa corporal muy similar a la que se obtiene alimentando con Cebo animal (Bartov, et al, 1974). El contenido de acidos grasos que presentan los jabones acidulados del aceite de semilla de algodón, aceite de soya y Cebo animal se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

Composición de acidos grasos en varias fuentes de grasa para alimento de aves de engorde

Fuente de grasa	acidos grasos(1)(% p/p del total de ac. grasos)							
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Sebo	--	3.5	27.4	5.7	21.7	37.5	4.1	--
Jabones ac. de aceite de algodón	2.1	1.3	20.4	1.0	3.0	21.6	49.5	1.0
Jabones ac. de aceite de soya	0.2	0.2	21.1	1.0	2.4	22.1	48.2	4.8

(2) Número de átomos de carbono en la cadena: dobles enlaces.
(Bartov, et al. 1974)

Niveles bajos de jabones acidulados en la dieta, aún con alto grado de insaturación (Ej. de aceite de soya) dan origen a grasa saturada en las aves. Al parecer esto se debe a baja disponibilidad y no al bajo contenido (Bartov, et al, 1974).

4. Pigmentación por combinación de carotenoides rojos y amarillos

Una forma de aumentar el color de pigmentación en yemas es utilizando mezclas de carotenoides rojos y amarillos. Teniendo como base el pigmento amarillo, es necesario agregar cantidades mínimas de pigmento rojo para mejorar el color hasta niveles logrados solo con cantidades muy altas de pigmento amarillo. La fuente de pigmento rojo puede ser sintética (cantaxantina = Carophyll-Red) o natural (el chile pimiento, que contiene capsantina y capsorubina).

Para la evaluación de estos pigmentos en material biológico, existen problemas con los métodos comunmente usados. Entre las ventajas que pueden obtenerse al agregar pigmentos rojos tenemos: mejoramiento de la calidad del color, mayor capacidad de intensidad, habilidad de predecir el color de la yema, mayor flexibilidad para formulaciones y reducción de costos en base a color (Fletcher, et al, 1981).

C. Aceite de palma y subproductos como fuente de pigmentos para gallinas ponedoras

Investigaciones anteriores (Arriaga, 1985; Huertas, 1987)

destacan el uso potencial del aceite de palma y sus jabones de desecho acidulados como fuente de pigmentación para yema de huevo de gallina ponedora.

El aceite crudo, con los niveles de carotenoides antes mencionados (ver Tabla 4) parece ser una fuente adecuada de pigmentación. E. Arriaga (op cit.) presenta un contenido de 393 ± 32 ppm como nivel máximo de carotenoides totales en jabones de desecho recién separados y considera adecuado emplear los ácidos grasos de éstos materiales en raciones de gallinas ponedoras. Otros investigadores han reportado que el contenido de xantofilas en jabones acidulados del aceite de Soya esta entre 168-260 ppm, y lo consideran adecuado para utilizar el material como fuente de pigmento en dietas de gallinas. Sin embargo debe tenerse en cuenta que mucho del carotenoide presente en el aceite de palma es de tipo no pigmentante (beta y alfa-Caroteno aprox. 91%), no restándole esto su importante potencial de provitamina A.

D. Determinación de carotenoides

1. Métodos de analisis para carotenoides

Los carotenoides (ver apendice A) son extraídos con solventes apolares, excepto si se encuentran formando complejos con proteínas o glicósidos. En un tejido seco se utilizan solventes no miscibles con agua (Ej. eter dietilico, eter de petroleo) y en tejido fresco, un solvente como acetona o etanol actuará como agente deshidratador y extractante.

Si existe gran cantidad de lípidos neutros en el extracto será necesario saponificar el material (hidrólisis alcalina).

Los fraccionamientos preliminares del extracto con carotenoides, comunmente se realizan por cromatografía de columna abierta o por partición entre solventes no miscibles. Subsecuente separación de fracciones se realiza por cromatografía en papel o en capa fina. Los productos aislados son cristalizados o analizados en sus propiedades físicas directamente (espectro UV-Vis de absorción, espectro IR, espectrómetro de masas, resonancia magnética nuclear, dispersión rotatoria óptica y dicroísmo, cristalografía de Rayos-X).

La cromatografía líquida de alta resolución ha empezado a emplearse desde hace algunos años para separar mezclas complejas de carotenoides, y parece estar obteniendo gran popularidad por su gran potencial analítico (Goodwin, 1980).

2. Principios del análisis por cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es conocida también como cromatografía líquida moderna o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Como cualquier otra técnica cromatográfica, es una separación física de sustancias entre una fase estacionaria y otra móvil. En este caso la fase estacionaria es un material de partículas pequeñas que se encuentra empacado en una columna metálica (diámetro de 2-5 mm) La columna es reutilizable, y por lo compacto de la fase estacionaria, la fase móvil requiere de presiones mayores a la

atmosférica para que fluya por ella. La versatilidad de la técnica se debe a la gran cantidad de diferentes fases estacionarias que pueden ser utilizadas.

En base a la naturaleza de la fase estacionaria y al tipo de proceso de separación, la cromatografía líquida de alta resolución se ha dividido en 4 clases:

a.- Cromatografía por adsorción (o líquida-sólida).

Su fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en procesos repetidos de adsorción-deadsorción.

b.- Cromatografía de partición (o líquida-líquida).

La fase estacionaria tiene moléculas unidas a un soporte. La separación ocurre por partición entre esta fase "líquida" de la fase estacionaria y la fase móvil.

c.- Cromatografía por intercambio iónico.

La fase estacionaria tiene cargas iónicas en su superficie. Las partículas cargadas de la muestra son separadas al ser retenidas o no retenidas debido a su tipo y magnitud de carga, la cual puede controlarse con un buffer en la fase móvil.

d.- Cromatografía por exclusión (cromatografía en gel o tamiz molecular).

La fase estacionaria posee poros de tamaño controlado, las moléculas son separadas por su peso molecular.

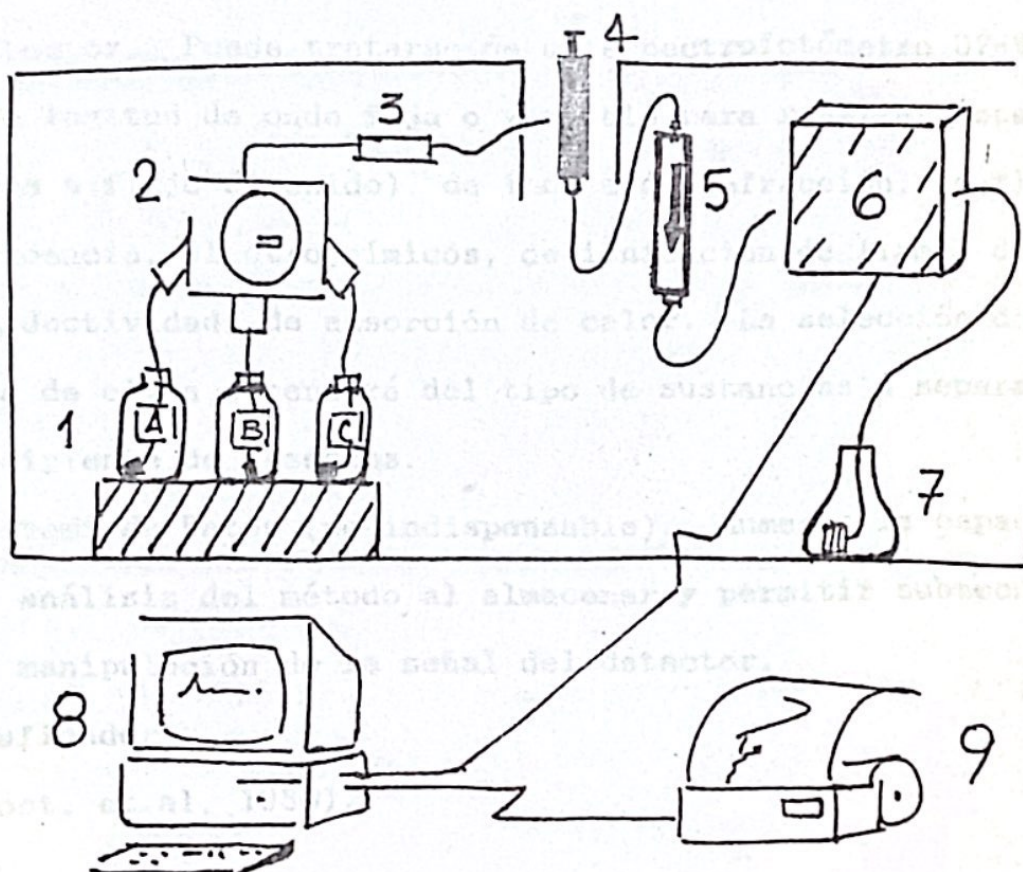
Con respecto a la relación de polaridades fase móvil-fase estacionaria, en cromatografía de Fase Normal, la segunda es más polar que la primera y la Fase Reversa se refie-

re al contrario.

La Figura 1 muestra los componentes básicos de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución.

FIGURA 1

Componentes básicos de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución



(Componentes identificados en la página siguiente)

3. Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución

1. Recipientes conteniendo la fase móvil.
2. Sistema de Bombeo. Algunos sistemas pueden realizar mezclas programadas, cambiando en el tiempo la concentración de los solventes (gradiente) o mantenerla constante (isocrático).
3. Amortiguador de pulsos de bombeo (no indispensable).
4. Puerto y válvula de inyección. Generalmente de 10 o 50 μ l.
5. Columna.
6. Detector. Puede tratarse de un espectrofotómetro UV-Vis (de longitud de onda fija o variable para realizar espectros a flujo detenido), de índice de refracción, de fluorescencia, electroquímicos, de ionización de llama, de conductividad, de adsorción de calor. La selección de uno de ellos dependerá del tipo de sustancias a separar.
7. Recipiente de desechos.
8. Sistema de Datos (no indispensable). Aumenta la capacidad de análisis del método al almacenar y permitir subsecuente manipulación de la señal del detector.
9. Graficador.

3. Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución.

Siendo los carotenoides sustancias solubles en líquidos apolares, resulta conveniente utilizar la Cromatografía Líquida de Alta resolución para su análisis. Respecto a otras técnicas presenta las siguientes ventajas:

- Rapidez y facilidad de análisis. Se reduce drásticamente el tiempo requerido en los sistemas clásicos de columna abierta, los que a menudo no lograban buenas separaciones por degradación debida a la larga exposición al oxígeno, la luz, los solventes y los adsorbentes (Zakaria, 1979).
- Alta resolución y reproducibilidad.
- Hace posible la separación de pigmentos muy similares.
- Requiere de poca cantidad de muestra.

Los sistemas comunmente empleados son de fase reversa (fase móvil más polar que la estacionaria) y con gradiente en la composición del solvente o isocrático. El detector seleccionado es el Espectrofotométrico UV-Vis, aprovechando la alta absorción de los carotenoides, en la región de 450 a 470 nm.

En la Tabla 8 se presenta una revisión de métodos desarrollados para el análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución.

TABLA 8

Condiciones de distintos sistemas para Cromatografía Líquida de alta Resolución empleados en separación de Carotenoides

Material extraído (Pigmentos) Longitud de onda del detector	Columna	Fase móvil	Ref.
Tomate (licopeno, alfa-B-Caroteno) 470nm	Partisil-PXS 5/ODS(Whatman)	CHCl3 en AN (8%) 2 ml/min	Zacaria, et al 1979
Mora, zanahoria, papa (alfa, B-Caroteno) 470 nm	Partisil-5 ODS (Whatman)	AN:THF:H2O (85:12.5:2.5) 2ml/min	Bushway, et al 1982
Estandares (luteína, zeaxantina, cantaxantina, B-criptoxantina, equinenona licopeno, toruleno, alfa y B-Caroteno) 450 nm	Zorbax-ODS (Du Pont)	AN:CH2Cl2:CH3OH (70:20:10) 1 ml/min	Nells, et al 1983
Follaje de col (B-Caroteno, clorofila A, clorofila B)	MicroPak Si-5 (Silica) MicroPak MCH-10	isooctano:iso-propanol(99:1 a 85:15 v/v) 1ml/min	Silveira, et al 1984
Suero (alfa y B-Caroteno) 462 nm	Bondapak C-18-micro	AN:CHCl3 (92:8) 2 ml/min	Katrangi, et al 1984
Plasma humano(alfa y B-Caroteno, licopeno) 450 nm	Ultraspher ODS (Altex) Supelcosil LC-18 (Supelco)	5% H2O en CH3OH a 4% THF en " bas a 2 ml/min	Tangney, 1984

TABLA 8 (continuación 1)

Carotenoides aislados	Spherisorb 5mcm	O a 40% Acet en hexano:CH3OH (99:1)	*
Cloroplastos de espinaca	Nuclosil 50-55 mcm	isooctano 98% en hexano:etanol (99:10)	*
Hojas de espinaca	Silica gel SS-05 0.5 mcm	1 a 10% isopropanol en hexano	*
Algas verdes	Sorb-Sil 60-D 10 C18	50 a 100% CH3OH en etanol, O a 15% H2O en CH3OH	*
Carotenoides aislados	Nucleosil 10 C18	40 a 50% H2O en Acetona	*
Algas verdes y espinaca	Lichrosorb RP-8 10 mcm Sil 60-RP 18 10 mcm	75 a 100% AN-CH3OH en H2O	*
Queso	Lichrosorb Si 60 5 mcm	Metil-etil cetona hexano (10:90)	*
Espinaca	Lichrosorb RP-18 10 mcm	AN-CH3OH (85-15) Hexano-CH3OH (25-75)	*

*(Tomado de Krinsky, N., y Welankiwy, S. 1984. "Assay of Carotenoids". Methods in Enzymology. 105 pp 155-162.)

TABLA 8 (continuación 2)

Plasma humano (Retinol, alfa-tocoferol, lycopeno, alfa y B-Caroteno) 280 y 436 nm	Radial Pack C18 10 mcm (Waters)	100% CH3OH seguido CH3OH:AN:CHCl3 (47:42:11) 2ml/min	Miller, et al 1984
Plasma humano (Retinol, alfa-tocoferol, lycopeno, zeaxantina, alfa- y B-Caroteno) 280 y 436 nm	Radial Pack C18 5 mcm, (Waters)	CH3OH:AN:CHCl3 (25:60:15) 1.5 ml/ min	Miller, et al 1984
Plasma y suero humano (B-caroteno) 436 nm	AlteX ultraspherre ODS, 5 mcm	AN:THF:CH3OH:1% acetato de amonio (65:25:6:4) 2.7ml/ min	Nieremberg, et al 1985
Frutas y vegetales (alfa B- y gama-Caroteno, crip-toxantina, lycopeno, can-taxantina) 470 y 450 nm	5 mcm amino(IBM) 5 mcm Spherisorb alumina(Phenomenex)	99.5% isooctano y 0.5 THF 1ml/min	Bushway, 1985
	5 mcm Vydac 201-TP54	CH3OH:CHCl3(90:10)	
	5 mcm Vydac 218-TP54	AN:CH3OH:THF (40:52:8) 1 ml/min	
	5 mcm NovaPak C18	AN:CH3OH:THF (58:35:7) 1 ml/min	
	Zorbax ODS (Phenomenex)	AN:CH3OH:THF (50:35:15) 1 ml/min	

TABLA 8 (continuación 3)

Zanahorias (alfa, B- γ - ma y Caroteno, B-zeaxa- roteno y licopeno) 436nm	Partosil 5 ODS-3 (Whatman)	AN:CH2C12:CH3OH (82:12:16)2ml/min	Simon, et al 1986
Frutas y vegetales (alfa, y B-Caroteno, B-Cripto- xantina) 470 nm	Partisil 5 ODS (Whatman)	AN:THF:H2O (85:12.5:2.5) 2 ml/min	Bureau, et al, 1986
Frutas y vegetales (alfa, y B-Caroteno) 470 nm	Vydac 218TP54	AN:CH3OH:THF (40:56:4) 1 ml/min	Bushway, 1986
Chile pimienta (capsoru- bina, violaxantina, cap- santina y zeaxantina, criptocapsina, criptoxan- tina, B-Caroteno) 510, 480, 460, 428 nm	Zorbax C-18	Acetona:H2O (75:25) pasando a Acetona:CH3OH (75:25) 1 ml/min	Fisher, et al
CHCL3 = cloroformo	AN = acetonitrilo	THF = tetrahidrofurano	
CH2C12 = diclorometano	H2O = agua	CH3OH = metanol	
Acet. = acetona	mcm = micrometros		

III. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- Analizar los carotenoides presentes en el aceite de palma crudo, en sus jabones de desecho y en los ácidos grasos producto de la acidulación de los jabones.
- Establecer condiciones adecuadas para la acidulación de los jabones de desecho del aceite de palma, y analizar los cambios en la composición de carotenoides durante el proceso.
- Evaluar los efectos que el almacenamiento a temperatura ambiente tiene sobre el contenido de carotenoides en el aceite de palma y sus jabones.
- Evaluar la capacidad para pigmentación de yema de huevo que tiene el aceite de palma y los ácidos grasos obtenidos por la acidulación de sus jabones, cuando se utilizan como única fuente de grasa en la dieta de las aves. Al mismo tiempo analizar cuales pigmentos, presentes en la dieta, son incorporados a la yema de huevo.
- Evaluar los efectos que esta nueva fuente de grasa para gallinas ponedoras pueda tener sobre el consumo de alimento, producción, y peso promedio de huevos.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se desarrolló en dos fases:

- Experimentos variando condiciones de acidulación de jabones de aceite de palma para una mejor recuperación de ácidos grasos y para detectar cambios que sufre la composición general de carotenoides durante el proceso.
- Ensayo biológico con gallinas ponedoras para evaluar el aceite de palma crudo, y tres niveles de ácidos grasos como fuente de pigmento y grasa.

A. Experimentos de acidulación de jabones

En un experimento preliminar se compararon acidulaciones con ácido clorhídrico 1N, 2N, y ácido sulfúrico 1N y 2N (grado analítico) midiendo carotenoides totales tanto en el aceite de palma, jabones y ácidos grasos resultantes. En esta prueba se determinaron qué variantes podrían estudiarse para el proceso, estas se presentan a continuación:

- Comparar el efecto que los ácidos clorhídrico y sulfúrico grado industrial y analítico, tienen sobre los carotenoides del aceite de palma.
- Determinar el pH que en el proceso de acidulación permite lograr una separación adecuada entre los ácidos grasos y la fase acuosa.

- Ensayar un procedimiento de extracción de carotenoides de aceite crudo, jabones y ácidos grasos que no involucre saponificación.

Experimento 1

Se experimentó con 4 tratamientos de acidulación de jabones, para determinar si existen diferencias en el contenido de carotenoides en los ácidos grasos resultantes. Se introdujo un procedimiento de extracción de carotenoides sin saponificación (ver apéndice B), para cuantificar los presentes en aceite crudo de palma (fresco y almacenado por un año a temperatura ambiente), jabón del aceite y en los ácidos grasos resultantes de la acidulación.

Los tratamientos de acidulación ensayados fueron:

1. Tratamiento con Acido clorhídrico grado industrial 1N.
2. Tratamiento con Acido sulfúrico grado industrial 1N.
3. Tratamiento con Acido clorhídrico grado analítico 1N.
4. Tratamiento con Acido sulfurico grado analítico 1N.
5. Tratamiento blanco, sin adición de ácido.

El procedimiento de acidulación consistió en calentar el jabón de desecho (Jabón del refinamiento alcalino de aceite de palma proveniente de la finca Buena Vista, Retalhuleu, (obtenido un año antes del experimento y almacenado a temperatura ambiente en toneles cubiertos) hasta 60 C, agregar el ácido en cantidad calculada por titulación para llegar a un pH de 3. Se mantuvo durante una hora esa temperatura con agitación. Seguidamente se dejó el material 12 horas en re-

reposo para que se separaran los ácidos grasos de la fase acuosa. Luego se realizaron 3 lavados con agua (este fue el número de lavados que se determinó adecuado con pruebas para detectar restos de ambos ácidos).

Se midió el porcentaje de humedad a los ácidos grasos resultantes (ver apéndice B) y se le extrajeron los carotenoides para cuantificarlos como equivalentes de B-Caroteno con un espectrofotómetro (ver apéndice B).

Se realizaron inyecciones de extracciones de aceite, jabones y varios tratamientos de acidulación, en un sistema HPLC utilizando columna NovaPak C18 (acetonitrilo:metanol:tetrahidrofurano, 58:35:7). Estas extracciones incluían saponificación para evitar problemas en la columna del sistema (Ver apéndice C para la metodología HPLC).

Experimento 2

Utilizando ácido clorhídrico 1N grado industrial se realizaron acidulaciones en triplicado hasta llegar a valores de pH de 7, 5 y 3, con el procedimiento antes descrito, utilizando los jabones del aceite de palma almacenados por un año a temperatura ambiente.

B. Ensayo biológico y seguimiento de los carotenoides

108 gallinas ponedoras raza Shaver Starcross, de 75 semanas de edad, se repartieron al azar en 12 grupos de 9 gallinas cada uno. Las gallinas habían sido utilizadas en un experimento similar un año antes, (Huertas, 1987).

Los grupos de gallinas fueron colocados en compartimientos

separados de 2 x 3 m dentro de un mismo gallinero. Se les suministró como base el alimento que se muestra en la Tabla 9 luego de 3 semanas depletando pigmentos (dieta sin fuente de pigmentos y sebo animal como fuente de grasa).

TABLA 9

Dieta basal
Composición de la base alimenticia que recibieron las gallinas durante las tres semanas del experimento

Ingrediente	% del peso total de la dieta
Maicillo molido	55.00
Harina de algodón 38%	10.00
Harina de Soya	14.00
Harina de carne	8.00
Melaza	3.08
Carbonato de calcio	7.00
Sal	0.25
Grit	1.00
Premezcla vitaminica	0.25
Cloruro de colina 50%	0.125
Metionina	0.15
Afrecho de arroz	
como vehículo de premezcla	1.145

Llevo registro diario de producción, peso promedio de huevos y consumo de alimento para cada grupo.

Cada dos grupos tuvieron en su dieta las variantes que se muestran en la Tabla 10 durante las tres semanas del experimento.

TABLA 10

Suplemento de la Dieta Basal.

Variantes en la dieta de los distintos grupos de gallinas ponedoras

Trat. No.	Grupo	fuentes de grasa	% grasa'	fuentes de pigmento
1	1,2	cebo animal	5	carophyll yellow 15ppm
2	3,4	ácidos grasos*	6	natural^
3	5,6	ácidos grasos*	8	natural^
4	7,8	ácidos grasos*	10	natural^
5	9,10	aceite de palma crudo~	6	natural^
6	11,12	cebo animal	5	ninguna

* ácidos grasos de la acidulación de jabones de aceite de palma almacenados por un año a temperatura ambiente.

^ Carotenoides presentes en la fuente de grasa.

~ Aceite de palma fresco.

' % de grasa, sin humedad.

Las dietas se prepararon cada 15 días utilizándose una mezcladora para adicionarles la fuente de grasa.

De los huevos producidos semanalmente se seleccionaron 15 huevos al azar por grupo (i.e. 30 por tratamiento) y se llevo registro diario de producción, peso promedio de huevos y consumo de alimento para cada grupo.

Con los 30 huevos provenientes de una misma dieta se formó al azar 3 grupos de 5 huevos. Estos fueron abiertos, y separadas la yema de la clara se evaluó visualmente su grado de pigmentación con el abanico de color Roche. Luego fueron mezclados los 5 huevos de cada grupo para realizar extracciones con acetona por triplicado (ver apéndice B). Los carotenoides totales se cuantificaron como equivalentes de B-Caroteno espectrofotométricamente (ver apéndice B).

Además se realizó análisis HPLC, bajo las condiciones descritas, de muestras seleccionadas (ver en Apéndice C el método y sistema usado).

C. Materiales e instrumentación

Los materiales y aparatos empleados en los experimentos realizados se indican a continuación.

- Aceite de palma crudo (fresco) de la finca Buena Vista, Retalhuleu, Guatemala. Aceite de palma proveniente de la misma finca pero almacenado durante un año a temperatura ambiente en toneles cubiertos.
- Jabones de aceite de palma frescos y otros almacenados durante un año a temperatura ambiente en toneles cubiertos, ambos obtenidos con el procedimiento descrito por Arriaga (1985).
- Reactivos grado analítico marca Merck: hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, sulfato de sodio, fenolftaleína, ftalato ácido de potasio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico.

co, metanol, acetona, éter de petróleo (30-55 C), éter dietílico, hexano, etanol al 95%.

- Reactivos grado industrial: ácido sulfúrico, ácido clorhídrico.

- Balanza analítica Metler H80, horno al vacío GCA, horno Blue M Modelo OV-18A. Estufas y agitadores Corning. Baños de temperatura controlada Fisher Vresa-Bath. Refrigeradora Frigidaire General Motors (a 5 C).

- Kit para síntesis orgánica Corning. Rotaevaporador Büchi Laboratoriums-Technick AG.

- Nitrógeno Fabrigas.

- Papel filtro Wathman No. 4. Beakers de 1l, 500 ml, 250 ml, 100 ml, y 50 ml. Varillas de vidrio, embudos plásticos.

- Abanico de color Roche, para evaluación de yemas, con escala de 1 a 15.

- Espectrofotómetro Spectronic 21 UVD, Bausch & Lomb.

- Sistema de cromatografía Líquida de alta resolución: Varian Vista 5500, detector UV-Vis con longitud de onda variable. Sistema para analizar datos 600 Data System Varian. Impresora Thinkjet Hewlett Packard. Solventes grado HPLC: acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano.

- Patrones: B-caroteno (Sigma), licopeno 90-95% (Sigma) alfa-caroteno (Sigma, tipo V), Carophyll-Yellow o B-Apo-8"-carotenal (Roche), gama-caroteno (Sigma).

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Experimentos de acidulación de jabones y seguimiento de carotenoides

Los resultados del Experimento 1 y de la cuantificación de carotenoides totales (equivalentes de B-caroteno) en aceite de palma fresco y en jabon fresco, se muestran en la tabla 11. Los jabones almacenados durante un año fueron los empleados en el experimento biológico.

En titulaciones por duplicado resultaron necesarios 0.78 ml de ácido sulfúrico 1N y 1.16 ml de ácido clorhídrico 1N para llevar a pH 3 un gramo de jabón almacenado un año.

Puede observarse en la Tabla 11 que el aceite crudo fresco resultó con un contenido de equivalentes de B-caroteno similar al reportado por E. Arriaga (1985) (540 ± 55 para aceite crudo y 393 ± 32 para jabon).

El aceite almacenado presenta 64% de los carotenoides en el aceite fresco mientras que el jabón almacenado tiene 52% de los del jabón fresco.

E. Arriaga (1985) reportó que el jabón presentaba una concentración 72% la del aceite. El mismo parámetro con nuestros datos para aceite y jabon fresco muestran un 52%, mientras que en los materiales almacenados un año es de 42%.

TABLA 11

Carotenoides en aceite de palma y subproductos.
Carotenoides totales como equivalentes de B-caroteno ($\mu\text{g/g}$) en aceite de palma fresco, jabones de aceite fresco, aceite almacenado por un año, jabones almacenados por un año (a temperatura ambiente ambos) y ácidos grasos del jabón almacenado, obtenidos por 4 tratamientos

Material	Réplica	Carotenoides* totales($\mu\text{g/g}$)	Promedio por tratamiento ($\mu\text{g/g}$) [~]
aceite fresco	1	562	550 \pm 32
	2	575	
	3	514	
jabón de aceite fresco	1	302	286 \pm 22
	2	271	
aceite almacen. un año temp. am.	1	309	350 \pm 36
	2	366	
	3	376	
jabón almacenado un año temp. am.	1	117	148 \pm 41
	2	195	
	3	132	
ácidos grasos x HCl 1N industrial	1	114	151 \pm 32
	2	173	
	3	166	
ácidos grasos x H ₂ SO ₄ 1N indust.	1	133	120 \pm 12
	2	110	
	3	116	
ácidos grasos x HCl 1N analítico	1	113	135 \pm 26
	2	163	
	3	128	
ácidos grasos x H ₂ SO ₄ 1N analít.	1	142	140 \pm 6
	2	133	
	3	144	
Blanco, sin ácido (calentamiento)	1	96	121 \pm 25
	2	147	
	3	121	

* Equivalentes de B-caroteno en base a peso seco

[~] Medias con su desviación estándar

Es probable que la razón de ésta disminución se encuentre en el mecanismo por el cual quedan carotenoides en el jabón.

El jabón almacenado por un año presentó formación de grandes burbujas de aceite. Esto sugiere que los carotenoides contenidos en el jabón se deben en gran parte a pequeñas burbujas de aceite atrapadas durante el refinamiento alcali-alcalino. Si fuera así, la disminución en concentración de carotenoides al pasar de aceite a jabón podría explicarse como una simple dilución. (Incluso a nivel de ácidos grasos fue posible separar por centrifugación una capa rojiza superior similar al aceite, de otra mas sólida y blanca.)

Los cuatro tratamientos de acidulación realizados no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) en contenido de carotenoides para los ácidos grasos resultantes, incluso con el mismo jabón y el blanco (ver tabla de ANOVA en apéndice D). Sin embargo esto no quita la posibilidad que los carotenoides puedan ser transformados o destruidos en parte, por las condiciones de la acidulación.

Debe notarse que, en base seca, por cada gramo de jabón se obtenía aproximadamente 0.85 g de ácidos grasos. Este resultado se debe seguramente a pérdidas en los lavados.

Por último, los resultados del Análisis de Varianza de una vía, también muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con ácidos grado analítico y grado industrial para ácido clorhídrico y sulfúrico. Esto da la posibilidad de reducir costos de ácido considerablemente. El ácido clorhídrico industrial se utilizó en la fabricación de

ácidos grasos para el ensayo biológico ya que el sulfúrico puede presentar contaminantes peligrosos (plomo, arsénico y ácido nítrico).

Respecto al Experimento 2, el jabón llevado a un valor de pH de 5 presentó características físicas adecuadas para facilitar la separación de la fase acuosa y los ácidos grasos. El jabón llevado a pH 7 no logró separar, seguramente por acidulación incompleta, y a pH 3 no mejoró considerablemente, lo que no amerita una acidulación en exceso que puede dañar los carotenoides. Además se determinó que luego de 3 lavados con agua abundante ya no es detectable el ácido clorhídrico.

Los cromatogramas No 1, 2, 3, 4, y 5 presentan parte del análisis por HPLC de aceite crudo, jabón y ácidos grasos (ver método HPLC en apéndice C).

Todos los cromatogramas presentan un mismo patrón de picos. Los primeros en aparecer corresponden a las sustancias más polares de la muestra que absorben a 460 nm (típicamente xantofilas) los otros picos aparecen identificados si concordan con alguno de los patrones. (El tiempo de retención de los picos varía dependiendo del tiempo de lavado entre inyección.)

Los compuestos que se logró identificar (B-, alfa- y gama-caroteno, y licopeno) concuerdan bien con los carotenoides reportados por Maclellan (1983) (ver tabla 4).

La Tabla 12 presenta el porcentaje del área total bajo los cromatogramas, que corresponden a B-, alfa y gama-caroteno, licopeno y a las xantofilas.

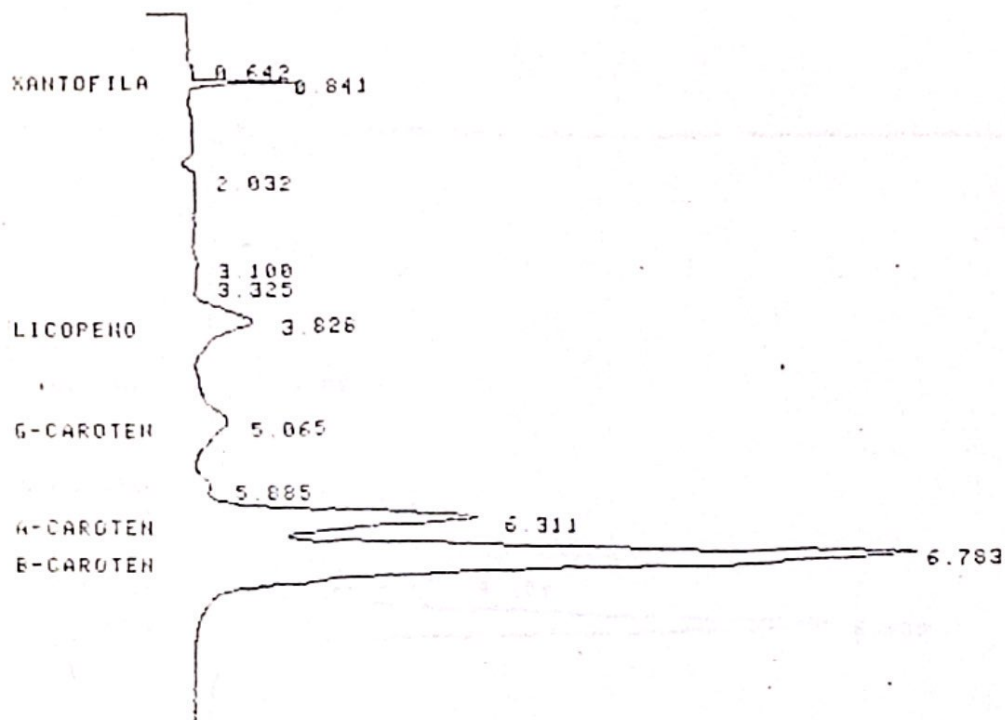


Figura 2
CROMATOGRAMA HPLC No. 1
Extraccion de Aceite de Palma Crudo (fresco).

RECALCULATE ON FILE: 5R1023

CHANNEL: 1A - 1 TITLE: ACEITE FRESCO

17:38 11 SEP 86

SAMPLE: ANI-2

METHOD: CAROTENITO

CALCULATION: A% - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.0771	0.642	269	BV
2		0.1209	0.725	422	VV
3	XANTOFILA	0.0522	0.776	217	VV
4		1.5612	0.841	5449	VB
5		0.2315	2.032	808	BB
6		0.2415	3.100	843	BV
7		0.2155	3.325	752	VV
8	LICOPENO	6.1020	3.828	21298	VV
9	G-CAROTEN	4.7978	5.065	16746	VV
10		1.0541	5.885	3679	VV
11	A-CAROTEN	20.3301	6.311	70959	VV
12	B-CAROTEN	65.2063	6.783	227592	VB

TOTALS: 100.0000 349034

MULTIPLIER: 1.00000

NOTES:

COLUMNA: NOVAPAK C18 (WATERS)
FASE MOVIL: ACETONITRILO/METANOL/THF (58:35:7)
FLUJO: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS A 460 NM
PRESION DEL SISTEMA: 66 ATM

CHART SPEED 1.0 CM/MIN

ATTEN: 8 ZERO: 5%

42

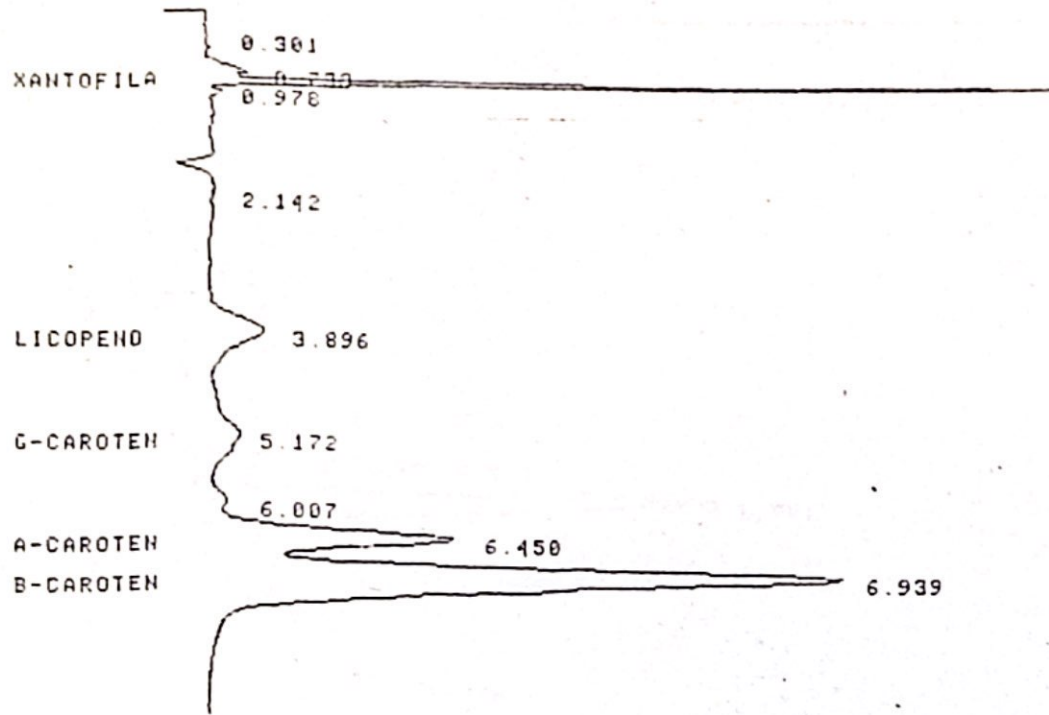


Figura 3

CRONATOGRAMA HPLC No. 2

Extraccion de Jabon de Aceite de Palma (fresco).

RECALCULATE ON FILE: SR1008

CHANNEL: 1A - 1

TITLE: JABON DE ACEITE FRESCO

15:22

11 SEP 86

SAMPLE: JN2-1

METHOD: CAROTENITO

CALCULATION: A% - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.0352	0.301	62	BV
2		0.0796	0.436	140	VV
3	XANTOFILA	1.2297	0.733	2164	VV
4		10.8692	0.836	19127	VV
5		0.2142	0.978	377	T
6		1.3917	2.142	2449	BB
7	LICOPENO	6.0088	3.896	10574	BV
8	G-CAROTEN	4.6387	5.172	8251	VV
9		1.0905	6.007	1919	VV
10	A-CAROTEN	17.5104	6.450	30814	VV
11	B-CAROTEN	56.8619	6.939	100098	VB

TOTALS: 100.0000

175975

MULTIPLIER: 1.00000

NOTES:

COLUMNA: NOVAPAK C18 (WATERS)

FASE MOVIL: ACETONITRILLO/METANOL/THF (58:35:7)

FLUJO: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS A 460 NM

PRECISION DEL SISTEMA: 86 ATM

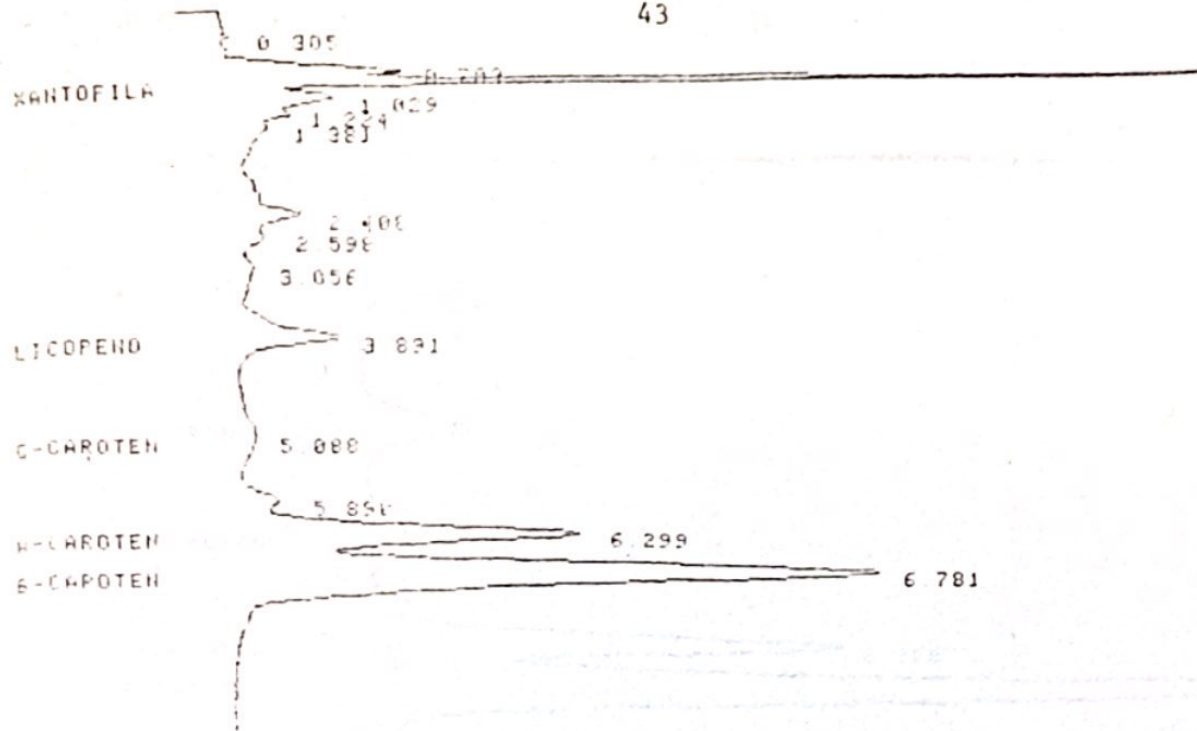


Figura 4

CRUMATOGRAMA HPLC No. 3

Extracción de Ácidos Grasos por Acidulación de Jabones de Aceite de Palma con Ácido Clorhídrico 2 N

RECALCULATE ON FILE: 3R1005

CHANNEL: 1A - 1

TITLE: ACIDOS GRASOS X HCL 2N

16:16 10 SEP 88

SAMPLE: 3R1-2

METHOD: CAROTENITO

CALCULATION: A% - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.0497	0.305	59	BV
2		3.8381	0.709	4552	VV
3		1.3525	0.784	1604	VV
4	XANTOFILA	15.0010	0.832	17791	VV
5		3.8761	1.029	4597	VV
6		1.4975	1.224	1776	VV
7		1.5995	1.381	1897	VB
8		2.5477	2.408	3496	BV
9		0.8272	2.598	981	VV
10		0.8903	3.056	1044	VV
11	LICOPENO	5.2412	3.891	6216	VB
12	G-CAROTEN	1.7041	5.088	2021	BV
13		1.9784	5.890	2344	VV
14	H-CAROTEN	17.2450	6.299	21164	VV
15	B-CAROTEN	41.3638	6.781	49057	VB

TOTALS: 120.0000

118599

MULTIPLIER: 1.00000

NOTES:

(COLUMN: MURAKAW C18 (MATERIAL))

FLOW: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS 460NM

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
ATTEN: 4 ZERO: 5

44

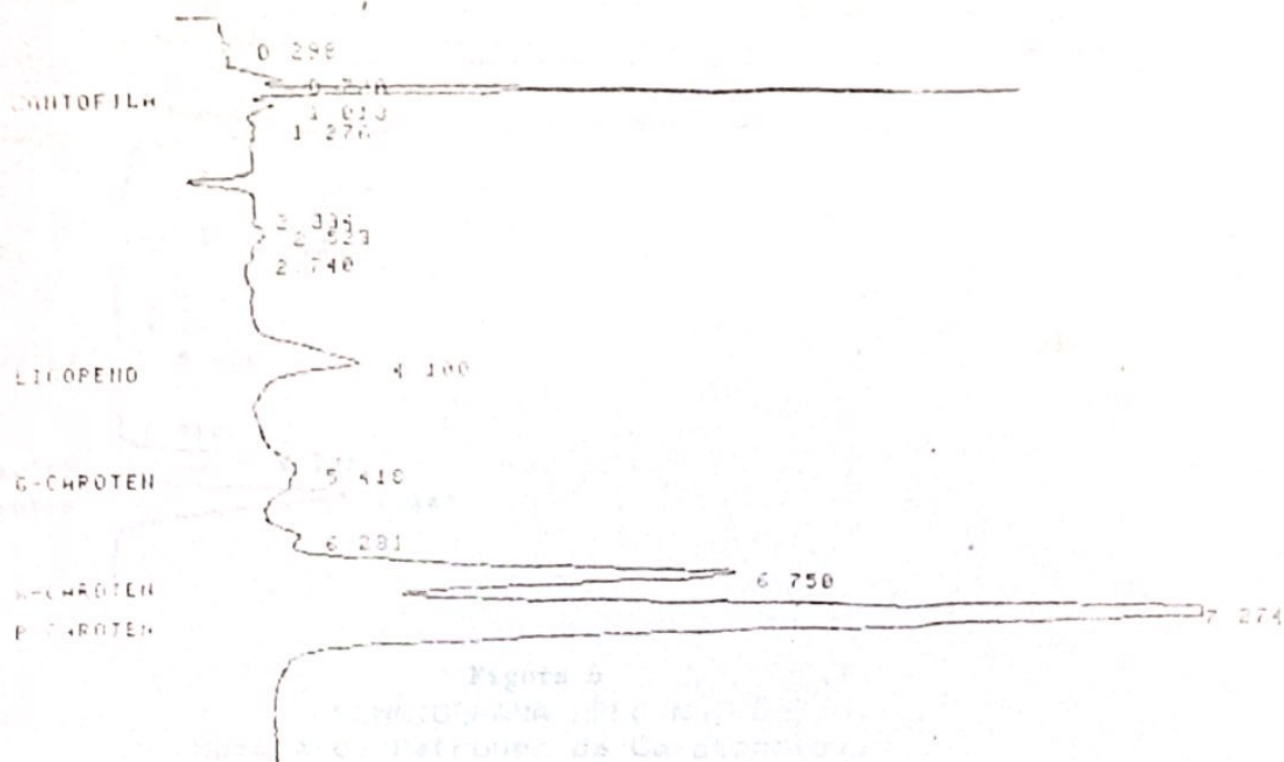


Figura 5

CRONATOGRAMA HPLC No. 4

Extracción de Ácidos Grasos por Acidulación de Jabones de Aceite de Palma con Ácido Sulfúrico 1 N

RECALCULATE ON FILE: 5R1011

CHANNEL: 1A - 1 TITLE: ACIDOS GRASOS X AC. SULF. 1N 13:07 11 SEP 96

SAMPLE: 5R1-C METHOD: CAROTENITO CALCULATION: A% - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.0705	0.298	106	BV
2		0.0909	0.720	1324	VV
3	XANTOFILA	6.1271	0.840	9209	VV
4		0.6514	1.018	979	VV
5		0.0285	1.276	103	VB
6		3.4917	2.334	5248	BV
7		1.9554	2.523	2939	VV
8		0.5323	2.740	800	VB
9	LICOPENO	5.4112	4.100	8133	BB
10	B-CAROTEN	2.5236	5.410	3793	BV
11		1.2641	6.201	1930	VV
12	H-CAROTEN	10.1478	6.750	30282	VV
13	E-CAROTEN	55.8553	7.274	85453	VB

TOTALS: 100.0000 150299

MULTIPLIER: 1.00000

NOTES:

COLUMN NOVAPAK C18 (WATERS)

FLUJO: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS 46C

CHARI 32 ZERO: 5%

45

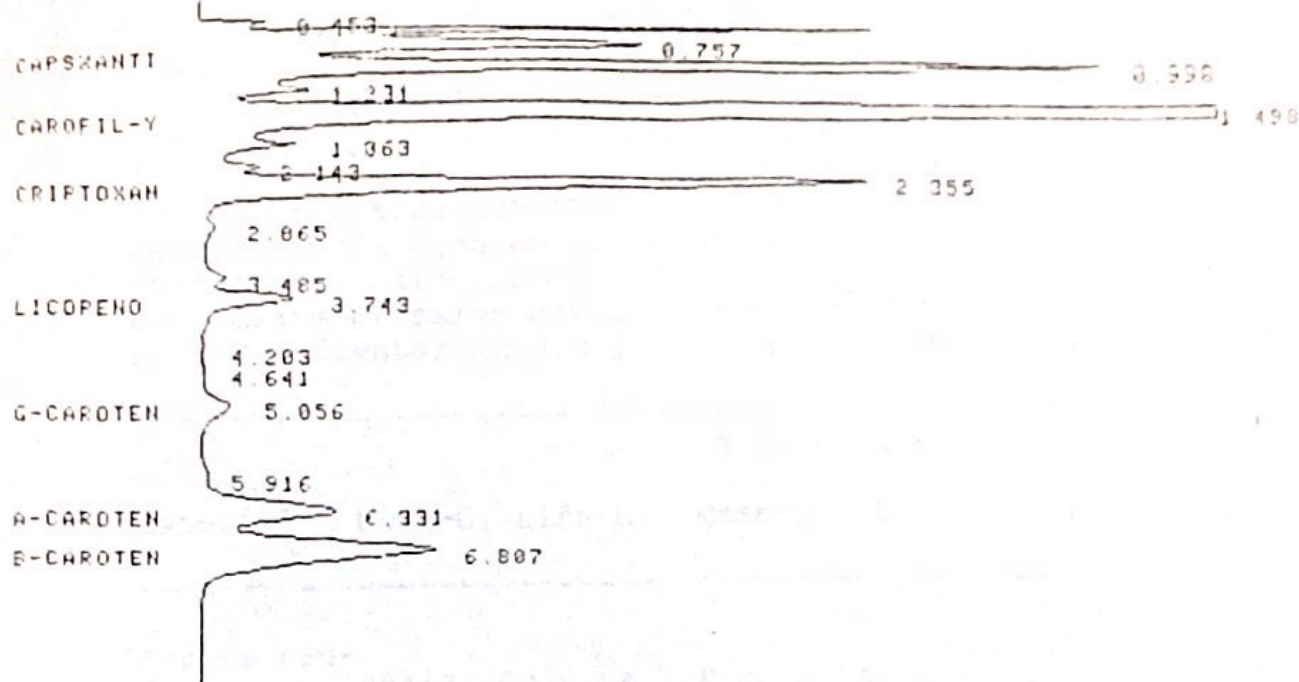


Figura 6
CROMATOGRAMA HPLC No. 5
Mezcla de Patrones de Carotenoides

RECALCULATE ON FILE: SR1021

CHANNEL: 1A - 1 TITLE: ESTANDARES DE CAROTENOIDE 16:32 11 SEP 86

SAMPLE: MEZCLA CAROT METHOD: CAROTENITO CALCULATION: A% - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.4952	0.453	10014	BV
2		2.7662	0.582	55943	VV
3	CAPXSANTI	5.8742	0.757	118799	VV
4		8.2996	0.998	167850	VV
5		0.2480	1.149	5015	VV
6		0.9773	1.231	19764	VV
7	CAROFIL-Y	58.0574	1.498	1174151	VV
8		0.4534	1.863	9372	T
9		0.1637	2.143	3311	T
10	CRIPTOXAN	10.1138	2.355	204541	VV
11		0.1076	2.865	2176	T
12		0.1100	3.485	2224	T
13	LICOPENO	1.6002	3.743	32363	VV
14		0.0055	4.203	112	T
15		0.0273	4.641	553	T
16	G-CAROTEN	0.6391	5.056	14139	VV
17		0.1113	5.916	2251	VV
18	A-CAROTEN	3.1978	6.331	64673	VV
19	B-CAROTEN	6.6824	6.807	135145	VB

TOTALS: 100.2000 2022396

MULTIPLIER: 1.00000

COLUMN NOVAPAK C18 (WATERS)

FLUJO 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS 460NM

TABLA 12

Análisis de cromatogramas de aceite y subproductos. Porcentaje de área en los cromatogramas para B-, alfa-, gamma-caroteno, licopeno y xantofilas según el análisis HPLC del aceite de palma crudo fresco, jabones frescos y sus correspondientes ácidos grasos. Extracciones saponificadas.

% de area total*						
Material	beta-C.	alfa-C.	gama-C.	Lic.	Carotenos	Xantof.

Aceite cru- do fresco	64±2	20.3±.4	5.0±.6	6.6±.8	96±1	4
Jabón de a- ceite fres.	53±4	16 ± 1	5 ± 2	7 ± 3	82±4	18
Acidos gra- sos del ja- bon fresco	46±6	19 ± 3	4 ± 3	7 ± 3	76±9	24

*Los valores para aceite y jabón son media y desviación estándar de 2 muestras inyectadas en duplicado; para los ácidos grasos son medias y desviación estándar de 3 tratamientos en duplicado: ac. clorhídrico 2N, ac. sulfúrico 1N y 2N inyectadas también en duplicado.

Puede observarse en la Tabla 12, que el % de área correspondiente a alfa-, beta-, gama- caroteno y licopeno en aceite crudo de palma concuerda con la composición reportada por Maclellan (los anteriores carotenoides son según su análisis, 97% del total, ver Tabla 3) y con la reportada en la Tabla de composición de Alimentos para uso en America Latina (esta tabla reporta 65% para B-caroteno y 35% para otros carotenoides; Flores, et al, 1969). También puede observarse que en los jabones el porcentaje de carotenos ha disminuido significativamente ($p < 0.05$). En el paso de jabon a ácidos grasos no existe variación significativa para el area de ca-

rotenos ($p < 0.05$) (Ver en Apéndice D detalle de las pruebas estadísticas).

Para comparación de las medidas de porcentaje de área de los distintos carotenoides con mediciones absolutas de ellos por HPLC, se presenta la Tabla 13 con resultados de cuantificaciones realizadas por Hudson y Molina (1986) de aceite de palma, sus jabones y ácidos grasos resultantes de su acidulación (todos estos materiales habían sido almacenados a temperatura ambiente por un año).

TABLA 13 .

Carotenoides en aceite de palma africana y subproductos

Muestra	Carotenoides* totales ug/g	Carotenos $\mu\text{g/g}$			Área [~] total
		alfa-	Beta-	gama-	
Aceite	366	60	226	4.9	80
jabón	128	30	108	3.9	74
ácidos grasos	256	39	157	3.8	78

* equivalentes de beta-caroteno en material seco, extracciones con saponificación, coeficiente de extinción: 2300.

[~] Porcentaje de área bajo los cromatogramas que corresponde a los tres compuestos.

En la Tabla 13 puede observarse que en el aceite de palma almacenado un año, el beta-caroteno alcanza un 62% de los carotenoides totales.

B. Ensayo Biológico

A continuación, en las tablas 14 y 15, aparecen los resultados del experimento con las gallinas ponedoras. Para observar el comportamiento de los resultados se presentan las gráficas 1, 2, 3 y 4 donde aparecen las concentraciones de carotenoides y el color de la yema por el abanico Roche graficados con cada semana del experimento.

TABLA 14

Nivel de Carotenoides y Color en Yemas.

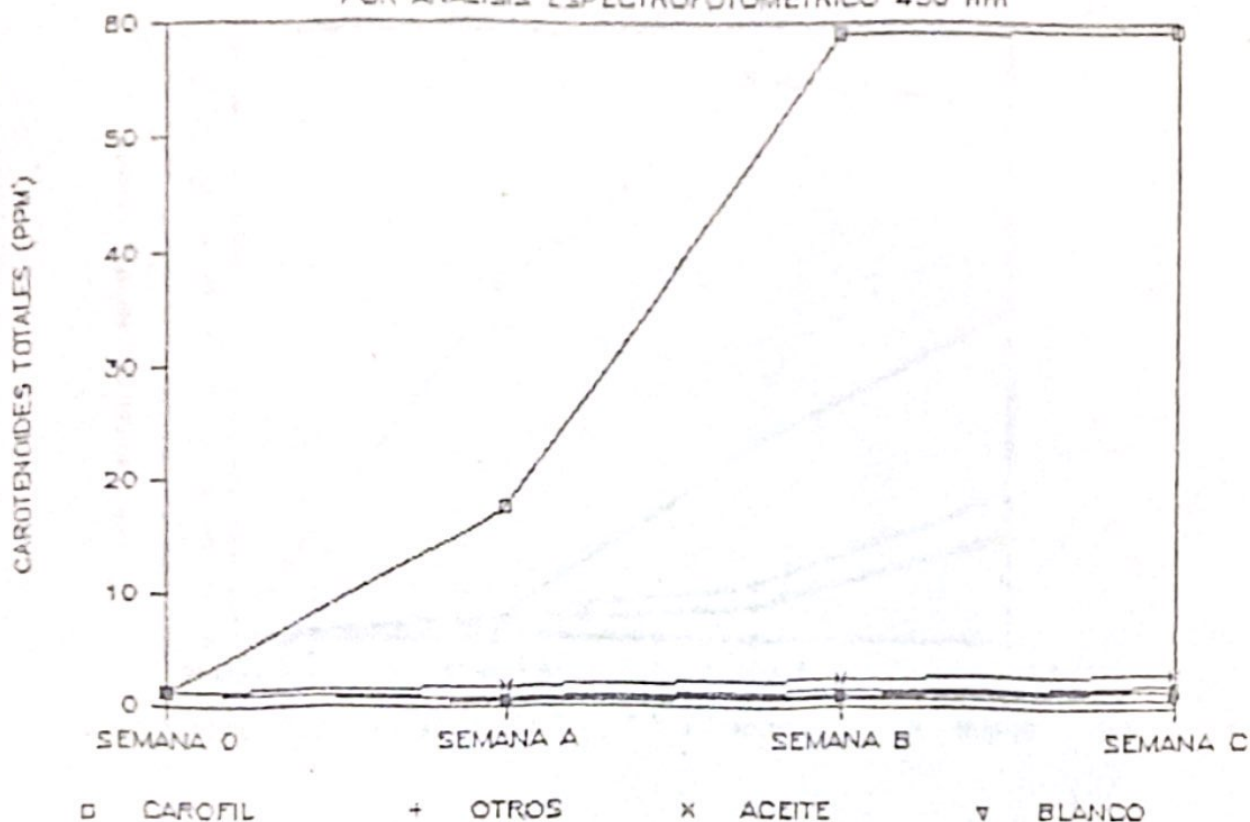
Resultados del experimento biológico para evaluar al aceite de palma crudo y sus ácidos grasos provenientes de acidulación del jabon (con HCl 1N a pH5) como fuente de pigmento para yema de huevo. Carotenoides totales en yema (equivalentes de B-caroteno, ppm) medidos por absorbancia a 450 nm y coeficiente de extinción 2500, color visual de la yema medido con el abanico de color Roche (Aban)

Semana	Carofil 15ppm	Color de yema y carotenoides (ppm) en huevos provenientes de cada tratamiento: ácidos grasos				
		6%	8%	10%	Aceite 6%	Blanco
1 Aban	7.9±1.6	1.3±.5	1.4±.5	1.5±.6	1.4±.5	1.1±.5
	17.2±.3	0.9±.2	0.9±.1	0.7±.1	1.7±.2	0.6±.2
2 Aban	12.1±.4	1.6±.5	1.7±.5	2.1±.4	4.9±.3	1.0±0
	59.0±5	1.5±1	1.1±.2	1.0±.1	2.6±.5	0.9±.1
3 Aban	11.5±1	3.2±.4	3.0±0	3.9±.6	7.6±.5	1.0±0
	59.2±2	1.7±.6	2.0±.1	1.7±.3	3.2±.5	.75±.1

(El valor del Abanico corresponde a la media y desviación estandar de 15 huevos; el valor de carotenoides totales ppm corresponde a la media y desviación estandar de 3 muestras de 5 huevos cada una extraída en triplicado).

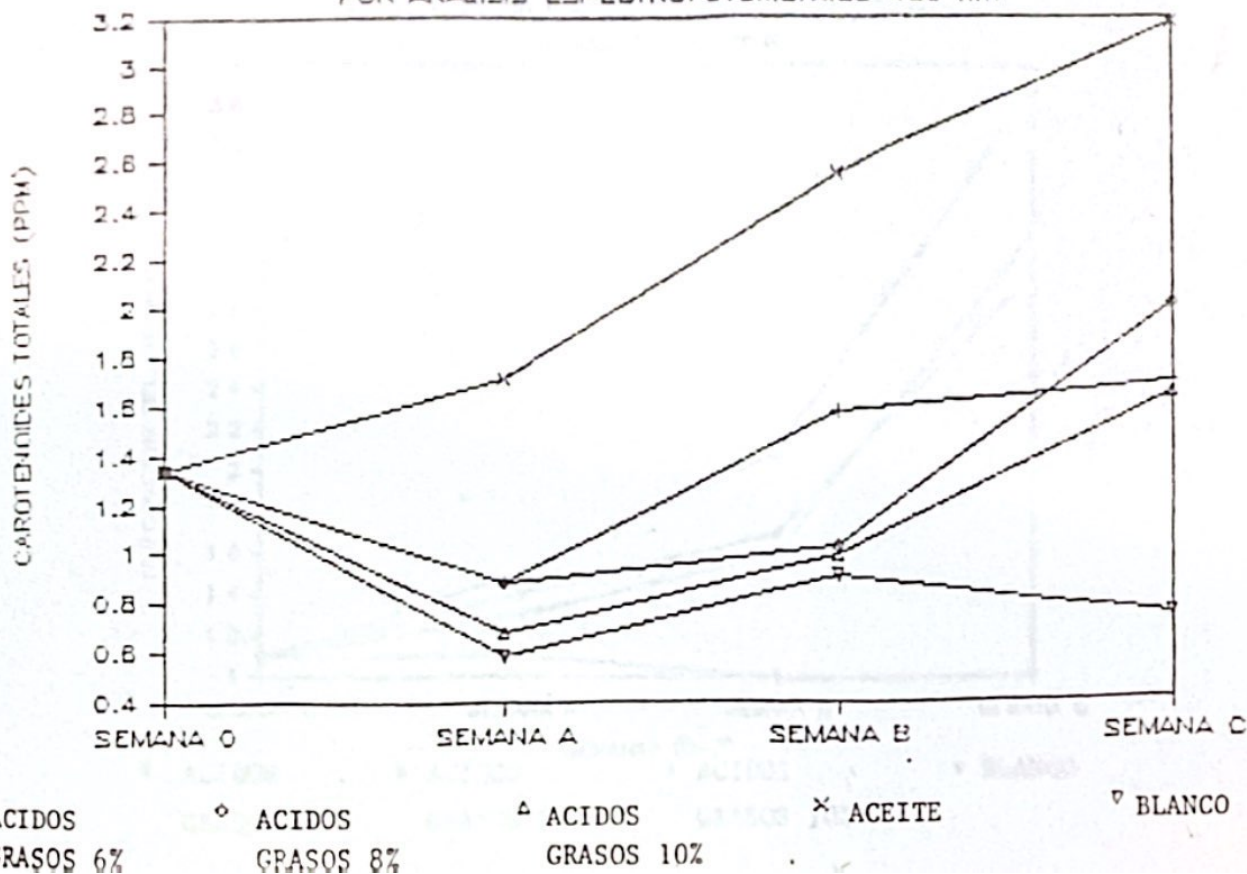
CAROTENOIDES TOTALES EN YEMAS

POR ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO 450 nm



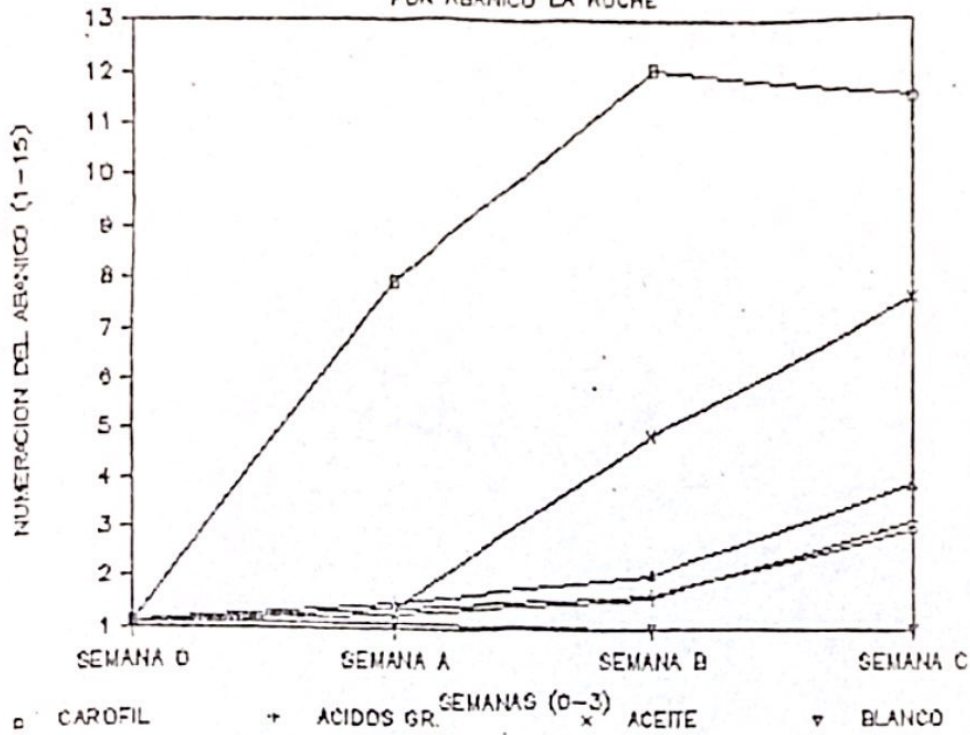
CAROTENOIDES TOTALES EN YEMAS

POR ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO 450 nm



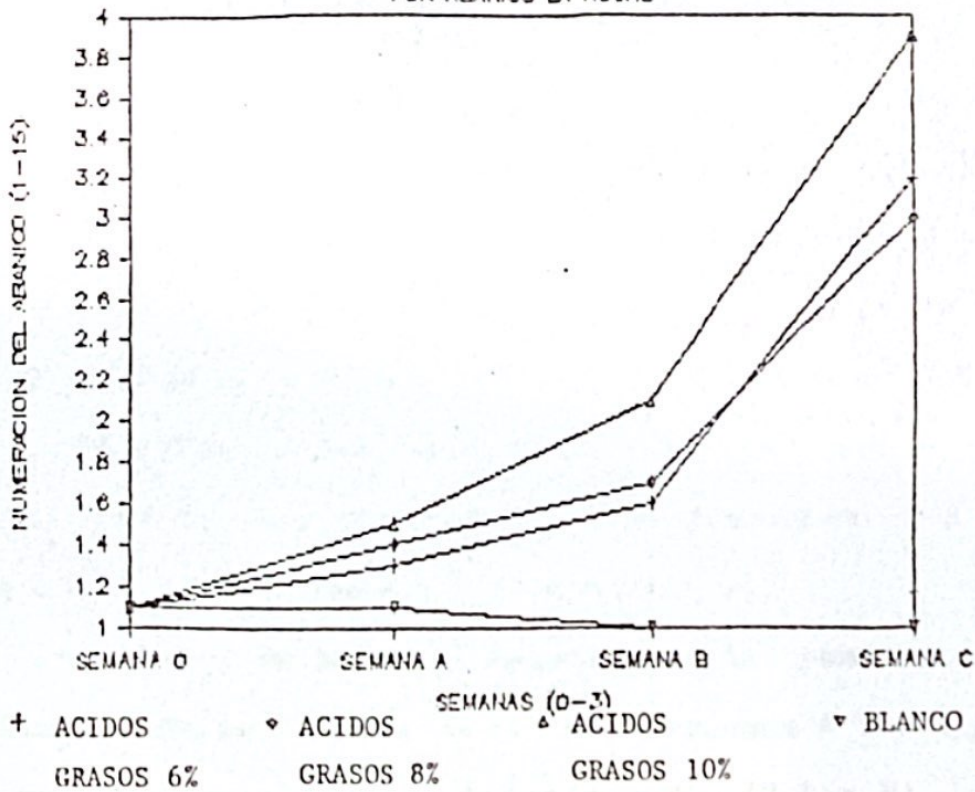
COLOR APARENTE EN YEMAS

POR ABANICO LA ROCHE



COLOR APARENTE EN YEMAS

POR ABANICO LA ROCHE



El análisis de varianza (ver apéndice D) mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) para los 6 tratamientos durante las 3 semanas, analizadas por separado, tanto en carotenoides totales como en color por abanico Roche.

La prueba de Student-Newman-Keuls para la primera y segunda semana no detectó diferencia entre los tratamientos distintos del carofil en cuanto a carotenoides totales en yema. Las yemas con carofil si difieren significativamente ($p < 0.05$) de las otras. En la tercera semana el análisis encontró que el contenido de carotenos en yemas de dieta de aceite de palma era significativamente mayor ($p < 0.05$) al de las yemas de ácidos grasos y estas significativamente mayores al blanco. Las yemas con carofil siempre fueron significativamente mayores en concentración a todos los demás tratamientos.

Con los datos del abanico de color Roche y la prueba de Student-Newman-Keuls, la primera semana resultó similar a la de carotenoides totales. Solo las yemas provenientes de carofil fueron significativamente mayores en coloración.

La segunda semana, sin embargo, resultó con mayor coloración en las yemas del tratamiento de aceite de palma sobre las de ácidos grasos al 10%, y éstas sobre las de ácidos grasos al 6% y 8%. Estas dos últimas resultan mayores que el blanco. La tercera semana muestra un comportamiento similar a la de la segunda semana (ver apéndice D).

Los niveles de color alcanzados por las yemas con tratamiento de aceite de palma están muy cercanos a los que se encuentran comercialmente en nuestro medio (7,8 y 9). Las ye-

mas provenientes de tratamientos de ácidos grasos les falta bastante coloración para llegar a los niveles mencionados.

Seguidamente se presentan cromatogramas de extracciones de yema, correspondientes a los tratamientos de aceite de palma crudo, ácidos grasos del jabón almacenado 1 año (acidulación con HCl 1N grado industrial hasta pH5) y el blanco (cromatogramas No. 6, 7, y 8).

Las yemas de la dieta de aceite presentaron los carotenoides característicos del aceite de palma. Sin embargo el porcentaje de área es mayor para las supuestas xantofilas, cuando se compara con la composición del aceite. Además, aparece mayor cantidad de picos en esta región.

Las yemas de tratamientos con ácidos grasos de aceite de palma presentan compuestos solo en la región de las xantofilas, seguramente debido a la poca cantidad de carotenos del material. Los picos corresponden a picos encontrados en las yemas de tratamientos de aceite, al parecer las xantofilas pigmentantes son las mismas para ambos materiales. Estas parecen ser cuatro fracciones separadas, no siendo fáciles de identificar en los cromatogramas de aceite crudo de palma y sus jabones, éstos presentan un pico principal de xantofilas pero no coincide con alguno de los de las yemas. Sin embargo se debe recordar que algunos carotenoides pueden sufrir transformaciones al ser incorporados en la yema.

Los picos de cromatogramas correspondientes a la dieta blanco muestran solo xantofilas. Cuatro de sus picos (seis en total) coinciden con los de las yemas de dietas de áci-

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
 ATEN: 1 ZERO: 5%

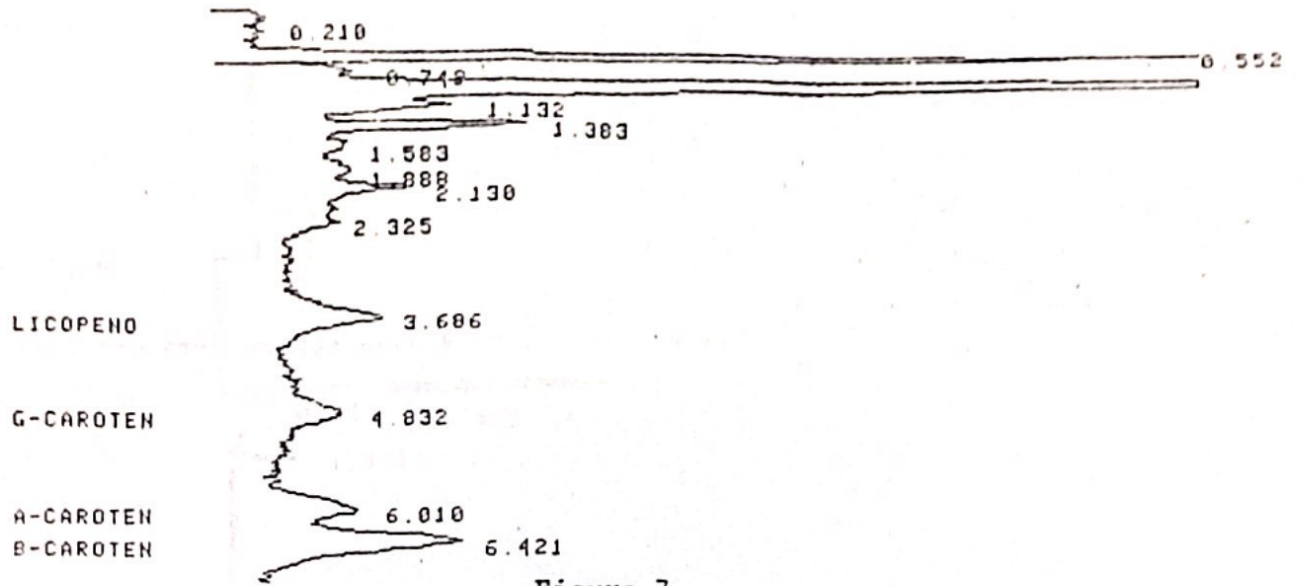


Figura 7
 CROMATOGRAMA HPLC No. 6
 Extraccion de Yemas Provenientes de Gallinas con la Dieta
 de Aceite de Palma Crudo

RECALCULATE ON FILE: EXTR.YEMA037

CHANNEL: 1A - 1 TITLE: EXTRACCIONES DE YEMA 21:29 20 JUL 87

SAMPLE: C511 METHOD: CAROTENITO CALCULATION: AZ - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.0995	0.210	37	BV
2		0.4327	0.227	161	VV
3		9.8726	0.552	3673	VV
4		3.3034	0.596	1229	VV
5		3.0185	0.749	1123	VV
6		30.2333	0.916	11248	VV
7		4.9484	1.132	1841	VV
8		6.1472	1.383	2287	VV
9		3.1475	1.583	1171	VV
10		4.1259	1.888	1535	VV
11		4.4431	2.130	1653	VV
12		3.0427	2.325	1132	VB
13	LICOPENO	4.6689	3.686	1737	BB
14	G-CAROTEN	2.7497	4.832	1023	BB
15	A-CAROTEN	4.7656	6.010	1773	BV
16	B-CAROTEN	11.0633	6.421	4116	VV

NOTES:

COLUMNA: NOVAPAK C18 (WATERS)
 FASE MOVIL: ACETONITRILLO/METANOL/THF (58:35:7)
 FLUJO: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS A 460 NM
 PRESION DEL SISTEMA: 96 ATM

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
ATTEN: 2 ZERO: 5%

54

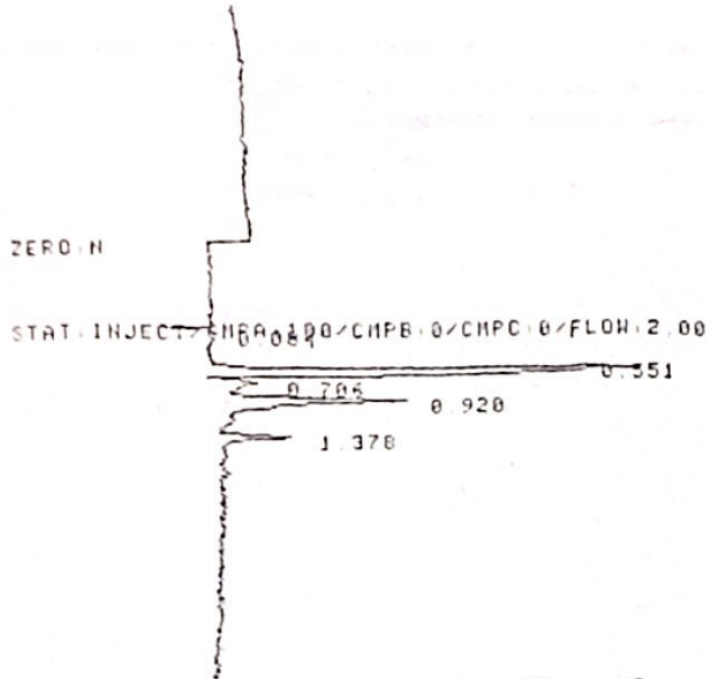


Figura 8

CROMATOGRAMA HPLC No. 7
Extraccion de Yemas Provenientes de Gallinas con la Dieta
de Acidos Grasos al 10%

CHANNEL: 1A - 1 TITLE: EXTRACCIONES DE YEMA 20:03 20 JUL 87

SAMPLE: DIETA AC.GRA METHOD: CAROTENITO CALCULATION: AX - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		0.6915	0.084	63	BB
2		53.3465	0.551	3770	BV
3		9.2026	0.706	656	VV
4		28.1307	0.920	1988	VB
5		8.3487	1.378	590	BB
TOTALS:		100.0000		7067	

MULTIPLIER: 1.00000

NOTES:

COLUMNA: NOVAPAK C18 (WATERS)
FASE MOVIL: ACETONITRILLO/METANOL/THF (58:35:7)
FLUJO: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS A 450 NM
PRESION DEL SISTEMA: 86 ATM

POST RUN:

SAVE FILE: RAW EXTR.YEMA032

CHART SPEED 1.0 CM/MIN
ATTEN: 2 ZERO: 5%

55

STAT INJECT C/MPA 100/CMPB 0/CMPC 0/FLOW 2.00

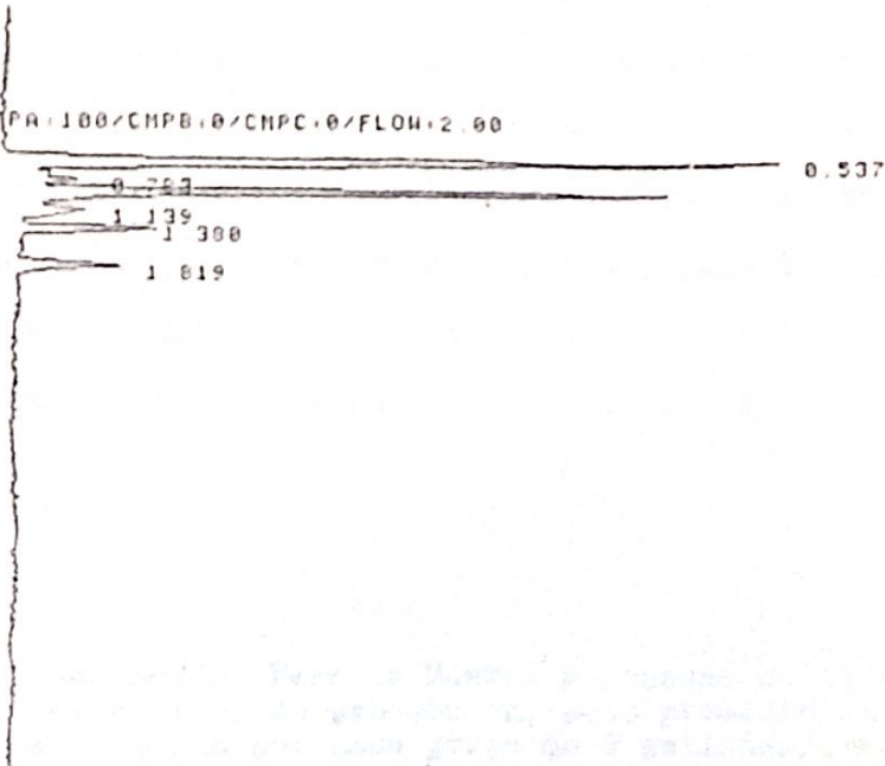


Figura 9
CROMATOGRAMA HPLC No. 8
Extraccion de Yemas Provenientes de Gallinas con la Dieta
Blanco

CHANNEL: 1A - 1 TITLE: EXTRACCIONES DE YEMA 20:18 20 JUL 87

SAMPLE: BLANCO 8612 METHOD: CAROTENITO CALCULATION: A% - ANALYS

PEAK NO	PEAK NAME	RESULT AREA%	TIME (MIN)	AREA COUNTS	SEP CODE
1		43.4018	0.537	7331	BV
2		5.6421	0.783	953	VV
3		32.3249	0.926	5460	VV
4		5.7190	1.139	956	VV
5		6.7018	1.380	1132	VB
6		6.2104	1.819	1049	BB

TOTALS: 100.0000 16891

MULTIPLIER: 1.00000

NOTES:

COLUMNA: NOVAPAK C18 (WATERS)
FASE MOVIL: ACETONITRILLO/METANOL/THF (58:35:7)
FLUJO: 2ML/MIN; DETECTOR UV-VIS A 460 NM
PRESION DEL SISTEMA: 86 ATM

POST RUN:

SAVE FILE: RAN

FYTR YFMA033

dos grasos y aceite, esto parece indicar que esos picos, por lo menos en parte son debido a alguna fuente del blanco.

La tabla 15 presenta los resultados del control de ovipostura, peso promedio de huevos y consumo de alimento. Analisis de varianza (una vía con replicas) para los tres parámetros no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los 6 tratamientos ninguna de las tres semanas (ver apéndice D).

TABLA 15

Control de Producción, Peso de Huevos y Consumo de Alimento. Resultados del control de producción, peso promedio de huevos y consumo de alimento por cada grupo de 9 gallinas/semana en cada tratamiento

Semana	Carofil 15ppm	Tratamiento ácidos grasos			Aceite 6%	Blanco	
		6%	8%	10%			
1	(a)	36±2	35±5	27±7	30±7	29±3	32±3
	(b)	63.6±.1	63±1	67.3±.6	66±5	67.3±.1	63±2
	(c)	6.6±.5	6.6±.5	6.9±.5	7.1±.1	6.5±.4	6.3±.7
2	(a)	37±4	44±9	38±4	43±4	27±4	33±4
	(b)	65.6±.9	63.8±.1	69±1	67±3	68±2	64±2
	(c)	7.3±.3	7.3±.7	7.5±.7	7.8±.2	7.2±.9	6.3±.4
3	(a)	41±8	36±4	36±1	40±8	28±5	34±5
	(b)	66.3±.6	63.5±.4	68±2	68±3	68.7±.7	66±2
	(c)	7.4±.5	7.4±.2	6.9±.6	7.5±.4	6.7±.8	6.1±1

(a) ovipostura semanal de 9 gallinas, 2 replicas. (Número de huevos)

(b) peso medio de 30 huevos. (g)

(c) alimento (Kg) de 9 gallinas/semana, 2 réplicas.

Todos los valores son media y desv. estándar.

Los métodos de extracción de carotenoides con saponificación pueden ser necesarios según el material a analizar. Su desventaja es el mayor tiempo y reactivos requeridos. En Vegetales como la zanahoria se ha determinado que no es necesario saponificar la extracción de carotenoides (Simon, no publicado). Los resultados de la cuantificación espectrofotométrica de carotenoides en aceite de palma fresco, parecen indicar que el material no requiere de saponificación para extraerlo. Sin embargo, en el análisis por HPLC solo se inyectaron muestras saponificadas para evitar posibles contaminaciones de la columna.

Según los resultados de carotenoides totales, durante la obtención del jabón se reduce significativamente ($p < 0.05$) el contenido de carotenoides que resultarán en los ácidos grasos. En promedio, el jabón presenta una concentración de carotenoides que es 50% la del aceite.

El análisis HPLC de aceite de palma, sus jabones y ácidos grasos derivados, muestran disminución en la proporción de carotenos. Durante la saponificación se reduce significativamente ($p < 0.05$) la cantidad de carotenos, pero no es posible concluir que exista una conversión a xantofilas ya que se pierden la mitad de los carotenoides. La disminución de carotenos podría deberse a mayor destrucción, debe notarse que no aparecen nuevos picos en los cromatogramas.

En el proceso de acidulación, donde la concentración de carotenoides totales parece mantenerse de jabón a ácidos grasos, no se detecta una conversión importante de carotenos a xantofilas. La conversión, si ocurre, no crea xantofilas separables por HPLC de las presentes en el jabón.

El material almacenado 1 año (tanto aceite como jabones) mantiene en cierto grado los carotenoides. La conservación de carotenoides en estos materiales es al rededor del 50%.

Se puede observar en las gráficas No. 1, 2, 3, y 4 que luego de la segunda semana a niveles altos de pigmentos en la dieta (tratamiento de carofil) las yemas han alcanzado un nivel estable tanto de coloración como en contenido de carotenoides totales. Las dietas con menor contenido de pigmentos (tratamientos de aceite y ácidos grasos) parecen requerir de más tiempo, sin embargo se esperaba su estabilización luego de la tercera semana según experimentos anteriores (Huertas, 1987).

El análisis espectrofotométrico de carotenoides totales como equivalentes de beta-caroteno no parece detectar el buen grado de pigmentación alcanzado por el aceite con el abanico Roche de color. Esto puede deberse a la presencia de xantofilas rojas, mal detectadas por este método (Fletcher, 1981).

Los resultados de consumo de alimento, ovipostura y peso promedio de huevos no evidencian problemas con el aceite de palma y ácidos grasos derivados de sus jabones, como fuente de grasa en la dieta. Analizando la composición de ácidos grasos del aceite de palma y comparándola con la del sebo, a-
↳ (ver Tablas 1 y 2)

ceite de semilla de algodón y de soya (ver tabla 7), se puede observar que el aceite de palma presenta un nivel alto de saturación (especialmente por su contenido de ácido palmitíco). Según esto no se esperaría mucho desarrollo de grasa insaturada, que da problemas de rancidez, en carne de pollos de engorde alimentados con aceite de palma como fuente de grasa.

El análisis HPLC muestra que la gallina incorpora a la yema los principales carotenoides del aceite de palma. Beta-alfa- y gama-caroteno (90% de los carotenoides del aceite de palma) siendo provitamina A no son incorporados tan eficientemente como las xantofilas, son estas últimas las que predominan en la yema (aprox. 80% de los carotenoides encontrados en la yema son xantofilas).

Las dietas de ácidos grasos no alcanzan niveles cercanos a los comerciales en el abanico de color Roche y en su contenido de xantofilas estan por debajo del 50% de los requerido para una buena pigmentación según los niveles de Portsmouth (ver tabla 6).

La dieta de aceite al 6% alcanza niveles de xantofilas recomendados, esto concuerda con los resultados del abanico de color Roche.

En experimentos anteriores (Huertas, 1987) se detectaron posibles problemas en el hígado de las gallinas que habían estado consumiendo aceite y ácidos grasos como fuente de grasa en altos porcentajes (10, 15 y hasta 20%). Tomando en cuenta los carotenoides totales que presenta el aceite de

palma (aprox. 550 ppm) ^(ver Tabla 11) y su composición según porcentajes de área en cromatogramas HPLC (aprox. 64% beta-caroteno, 20% ^(ver Tabla 12) alfa-caroteno) y ~~la de~~ ^{los carotenoides presentes con} los ácidos grasos (aprox. 151 ppm, 46% ^{provenientes del aceite} beta-caroteno y 19% alfacaroteno) es posible estimar cuántos equivalentes de vitamina A se les esta proporcionando a las aves en la dieta. En la tabla 16 se presentan los resultados del cálculo para varios niveles de grasa en la dieta.

Puede observarse que los valores de equivalentes de vitamina A en las dietas de aceite sobrepasan lo recomendado 6 y hasta 20 veces. Las dietas de ácidos grasos (al 6 y 8%) de jabones de aceite de palma almacenados un año tienen niveles muy cercanos al recomendado. En el presente experimento no se realizó análisis de hígado de gallinas luego de los tratamientos, pero según lo expuesto, no era de esperarse problemas de sobredosis de vitamina A en ^{el caso de} las dietas de ácidos grasos de aceite de palma.

TABLA 16

Calculos teóricos de provitamina A de las dietas.

Cantidad de equivalentes de vitamina A (I.U.) en dietas con distintos porcentajes de aceite de palma o sus ácidos grasos de jabón almacenado un año como fuente de grasa y pigmentos. Los carotenoides totales del aceite se tomaron como 550ppm y los de los ácidos grasos 151 ppm.

		% de grasa en la dieta				
		6%	8%	10%	15%	20%
Carotenoides totales	aceite	33	44	55	82	110
	ac.gr.	9	12	15	23	30
B-caroteno ppm	aceite	21	28	35	53	70
	ac.gr.	4	6	7	10	14
alfa-caroteno ppm	aceite	7	9	11	16	22
	ac.gr.	2	2	3	4	6
Equivalentes de Vit.A (I.U.) por libra de alimento	aceite	18538	24591	30645	46157	61290
	ac.gr.	3783	5297	6432	9080	12863

Nivel de equivalentes de Vit. A recomendado
por libra de alimento (Morrison, 1959) 3000 I.U.

(1 I.U. = 0.3 mcg retinol = 0.6 mcg B-caroteno = 1.2 mcg
alfa-caroteno)

VI. CONCLUSIONES

- El aceite de palma (variedad tenera) crudo, producido en Guatemala, presenta un contenido de carotenoides como equivalentes de beta-caroteno de 550 ± 32 ppm, y según porcentajes de área en cromatogramas HPLC $64 \pm 2\%$ es beta-caroteno, $20.3 \pm 0.4\%$ es alfa-caroteno, $5.0 \pm 0.6\%$ es gama-caroteno, 6.6 ± 0.8 es licopeno y un 4% restante parece ser xantofilas.
- Al parecer no hay una evidente conversión de carotenos a xantofilas durante el proceso de acidulación, según los análisis realizados.
- No se detectó diferencia significativa ($p < 0.05$) en conservación de carotenoides con acidulaciones de ácidos analítico e industrial para ácido clorhídrico y sulfúrico, tampoco se detectó degradación de carotenoides debida a calentamiento durante la acidulación. Parece ser que durante la acidulación no disminuyen significativamente ($p < 0.05$) los carotenos siendo significativa la reducción durante la obtención del jabón.
- El aceite crudo, agregado al 6% en dietas de gallinas ponedoras, posee la capacidad de pigmentar adecuadamente la yema de huevo. Sin embargo, a ese porcentaje, la cantidad de provitamina A que se está suministrando al ave es alrededor de 6 veces lo recomendado.
- Los ácidos grasos de la acidulación de jabones (almacenados un año) del aceite de palma, como fuente única de grasa en dietas de gallinas suministran los niveles requeridos de vi-

tamina A y pueden ser una base de color para suplementar con otra fuente de xantofilas.

- Las xantofilas pigmentantes del aceite de palma parecen comportarse como xantofilas rojas.
- El aceite de palma y sus ácidos grasos resultan ser una fuente adecuada de grasa para gallinas ponedoras o aves de engorde. Su grado de saturación no parece provocar problemas de rancidez durante almacenamiento, puede proveer la vitamina A requerida en la dieta y, agregado en un porcentaje que no contribuya con demasiada provitamina A puede ser una base de pigmento para suplementar con otras xantofilas.

VII. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS FUTUROS

- Por la insuficiencia de vitamina A que existe en la dieta de muchos guatemaltecos, resulta importante averiguar si puede aumentarse el contenido de vitamina A en la yema de huevo de gallina ponedora con fuentes de grasa como el aceite de palma o los ácidos grasos de la acidulación de los jabones.
- Según los resultados obtenidos, podría experimentarse suplementación de dietas de gallina ponedora con aceite de palma o sus ácidos grasos con otras fuentes, comerciales o naturales, de xantofilas.
- Por el alto contenido de provitamina A que presenta el aceite de palma y sus desechos, se considera importante realizar estudios encaminados a su utilización en la industria de alimentos. Sin embargo, también sería conveniente buscar, por medio de análisis químico, si alguna variedad de *E. guineensis* genéticamente distinta, forma un aceite más insaturado mejorando su calidad alimenticia para consumo humano, o si por otro lado presenta diferente composición de carotenoides.

Fisher, C. y Kacin, J.A. "The separation of the egg yolk
by HPLC". Artículo a publicarse.

Fletcher, B.L. y Halloran, E.H. "The utilization of a Carotenoid
1961. chiefly Xanthophylls and Concentrate and Paprika
Oleoresin in Egg Yolk Pigmentation". Poultry Science
40: 70 pp 1961-1963

VIII. LITERATURA CITADA

- Arriaga, E. A. Cuantificación de Carotenoides en el Aceite de Palma y en los Desechos de su Refinamiento. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 1985
- Bartov, I. y Bornstein, S. "Depletion and Repletion of Body Xanthophylls' Reserves as Related to Broiler Pigmentation". *Poultry Science*. 49 (2) pp 495-504. 1969
- ; Lipstein, B. y Bornstein, S. "Differential Effects of Dietary Acidulated Soybean Oil Soapstock, Cottonseed Oil Soapstock and Tallow on Broiler Carcass Fat Characteristics". *Poultry Science*. 53 pp 115-124. 1974
- Bornstein, S. y Lipstein, B. "The Use of Underprocessed Soya-Bean Oil Meal in Practical Layer Rations". *J. Sci. Ed. Agric.* 14 (10) pp 719-724. 1963
- Budowski, P.; Ascarelli, I., Gross, J. y Nir, I. "Provitamin A2 from Lutein". *Science*. 142 pp 969-971. 1963
- ; Ascarelli, I., Gross, J., Nir, I. y Bondi, A. "Vitamin A Activity of Acidulated Soybean Soapstocks in Chicks". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41 pp 441-445. 1964
- Bureau, J.L. y Bushway, R.J. "HPLC Determination of Carotenoids in Fruits and Vegetables in the United States". *Journal of Food Science*. 51 (1) pp 128-130. 1986
- Bushway, R.J. y Wilson, A.M. "Determination of Alfa and Beta Carotene in Fruit and Vegetables by High Performance Liquid Chromatography". *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15 (3) pp 165-169. 1982
- Brambila, S.; Pino, J.A. y Mendoza, C. "Studies with a Natural Source of Xanthophylls for the Pigmentation of Egg Yolks and Skin of Poultry". *Poultry Science*. 42 (2) pp 294-300. 1963
- Fisher, C. y Kocis, J.A. "The Separation of Paprika Pigments by HPLC". Artículo a publicarse.
- Fletcher, D.L. y Halloran, H.R. "The Evaluation of a Commercially Available Marigold Concentrate and Paprika Oleoresin on Egg Yolk Pigmentation". *Poultry Science*. 60 pp 1846-1853. 1981
- Livingston, A.L., Gussack, O.D., Ebbles, R.L. y Miller, G. O. "The Nature and Deposition of the Carotenoids from Alfalfa and Corn Gluten Meal in Chicken Skin". *Poultry Science*. 49 (6) pp 1179-1185. 1969

- Flores, M.; Menchu, M.T., Lara, M.Y. y Arroyave, G. "Contenido de Vitamina A en los Alimentos Incluidos en la Tabla de Composición de Alimentos para uso en América Latina". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. XIX (3). 1961
- Forsythe, R.H. "Report on Color Eggs". Journal of the AOAC. 1958 41 (2) pp 274-275.
- Garlich, J.D.; Bryant, D.M., Covington, H.M., Chamblee, D.S. y Purcell, A.E. "Egg Yolk and Broiler Skin Pigmentation with Sweet Potato Vine Meal". Poultry Science. 53 (2) pp 693-699. 1974
- Goodwin, T.W. The Biochemistry Of The Carotenoids. Vol 1. Plants. Chapman and Hall: London. pp 23-27.
- Hinton, C.F.; Fry, J.L. y Harms, R.H. "Influence of a Xanthophyll-free Pullet Grower Diet on Subsequent Egg Yolk Pigmentation". Poultry Science. 53 (1) pp 223-226. 1974
- Hoffman-La Roche. Egg yolk pigmentation with Carophyll. 1974 2a ed. Baste Switzerland.
- Huertas, G.M. Evaluación de la Capacidad Pigmentante de Carotenoides en Jabones de Desecho del Refinamiento del Aceite de Palma Africana (E. Guineensis) en la Yema de Huevo. Tesis U.V.G. 1987
- Jensen, A. "The Effect of Seaweed Carotenoids on Egg Yolk Coloration". Poultry Science. 42 (4) pp 912-916. 1963
- Katrangi, N.; Kaplan, L.A. y Stein, E.A. "Separation and Quantitation of Serum B-Carotene and other Carotenoids by High Performance Liquid Chromatography". J. Lipid. Res. 25 pp 400-406. 1984
- Krinsky, N. y Welankiwr, S. "Assay of Carotenoids". Methods in Enzymology. 105 pp 155-162. 1984
- Kuksis, A. (editor). "Fatty Acids and Glycerides". Handbook of Lipid Research. Vol 1. Plenum Press. New York pp 362-363. 1978
- Lipstein, B.; Bornstein, S. y Budowski, P. "By-Products of the Refining of Soybean Oil as Pigment Sources for Poultry". Poultry Science. 46 pp 627-638. 1966
- Livingston, A.L.; Kuzmicky, O.D., Knowles, R.E. y Kohler, G. O. "The Nature and Deposition of the Carotenoids from Alfalfa and Corn Gluten Meal in Chicken Skin". Poultry Science. 49 (6) pp 1678-1685. 1969

- Mackay, E.; Mountney, G.J. y Naber, E.C. "Yolk Color Resulting from Different Levels of Paprika Extract in the Ration". Poultry Science. 42 (1) pp 32-36.
1963
- Maclellan, M. "Palm Oil". Journal of American Oil Chemical Society. 60 (2) pp 320A-325A.
1983
- Manz, U. Methods for the Determination of Carotenoids in Carotenoid Preparations, Presmixes, Feedstuffs and Egg Yolks. Roche. Switzerland.
1983
- Marusich, W.; De Ritter, E. y Bauerfeind, J.C. "Evaluation of Carotenoid Pigments for Coloring Egg Yolks". Poultry Science. 39 pp 1338-1345.
1960
- y Bauerfeind, J.C. "The Biological Activity of B-Carotene in Poultry and Rats". Poultry Science. 42 (4) pp 949-957.
1963
- y Bauerfeind, J.C. "Oxycarotenoids in Poultry Pigmentation". Poultry Science. 49 (6) pp 1555-1579.
1970
- Maynard, L.A. y Loosli, J.K. Animal Nutrition. 5a ed. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York. pp 448-449.
1962
- Mazuelos, F. "Acidos Grasos de la Posicion B de los Gliceridos de Aceite de Palma "Elaeis guineensis" JACQ". Grasas y Aceites. 37 (6) pp 348-350.
1986
- Miller, K.W.; Lorr, N.A. y Yang, Ch.S. "Simultaneous Determination of Plasma Retinol, alfa-Tocopherol, Lycopene, alfa-Carotene, and B-Carotene by High-Performance Liquid Chromatography". Analytical Biochemistry. 138 pp 340-345.
1984
- Morrison, F.B. Feeds & Feeding. 22 ed. The Morrison Publishing Co., Clinton, Iowa. pp 930-931.
1959
- Nells, H.J.C.F. y Leenheer, A.P. "Isocratic Nonaqueous Reversed Phase Liquid Chromatography". Anal. Chem. 55 pp 270-275.
1983
- Nirenberg, D.W. "Serum and Plasma B-Carotene Levels Measured with an Improved Method of High Performance Liquid Chromatography". Journal of Chromatography. 339 pp 273-284.
1985
- Portsmouth, J. "Egg Yolks. Some Coloured Thinking". Fertiliser, Feed & Pesticide Journal. 66 (11) pp 4-5.
1970

- Silveira, A.; Koehler, J.A., Beadel, E.F. y Monroe, P.A.
1984 "HPLC Analysis of Chlorophyll a, Chlorophyll b, and B-Carotene in Collard Greens". Journal of Chemical Education. 61 pp 264-265.
- Simon, P.W. y Wolf, X.Y. "Carotenes in Typical and Dark Oranges Carrots". Artículo a publicarse, Freimpreso proporcionado por el autor.
- Smith, I.D. y Perdue, H.S. "Isolation and Tentative Identification of the Carotenoids Present in Chicken Skin and Egg Yolks". Poultry Science. 45 pp 577-580.
1965
- Suarez, D. "Incorporation of Lycopene in Egg Yolk". Poultry Science. 49 pp 733-735.
1969
- Surre, C. y Ziller, R. La Palmera de Aceite. Editorial Blume. Barcelona.
1969
- Tangney, C.C. "Individual Carotenoid Determinations in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Liquid Chromatography. 7 (13) pp 2611-2630.
1984
- Williams, W.P.; Davies, R.E. y Couch, J.R. "The Utilization of Carotenoids by the Hen and the Chick". Poultry Science. 42 (3) pp 691-699.
1963
- Wu Leung, W.T. y Flores, M. Tabla de Composición de Alimentos para uso en América Latina. INCAP-ICNND.
1961
- Yost, R.W.; Ettore, L.S. y Conlon, R.D. Practical Liquid Chromatography - An Introduction. Perkin-Elmer. Norwalk.
1980
- Zakaria, M. y Simpson, K. "Use of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for the Determination of Provitamin A Carotenes in Tomatoes". J. Chromat. 176 pp 109-117.
1979

APENDICES

A. Carotenoides y su biopotencia como precursores de vitamina A

Los carotenoides es uno de los grupos de pigmentos naturales mas importantes y distribuidos, tanto en plantas superiores como en animales (Fisher, et al; Swartz, 1982). Son sintetizados por las plantas y algunos animales (Katrangi, 1984).

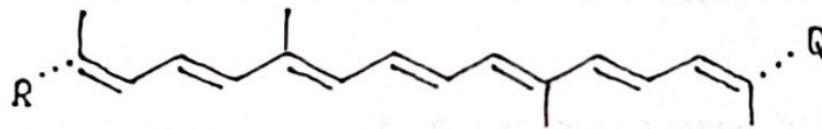
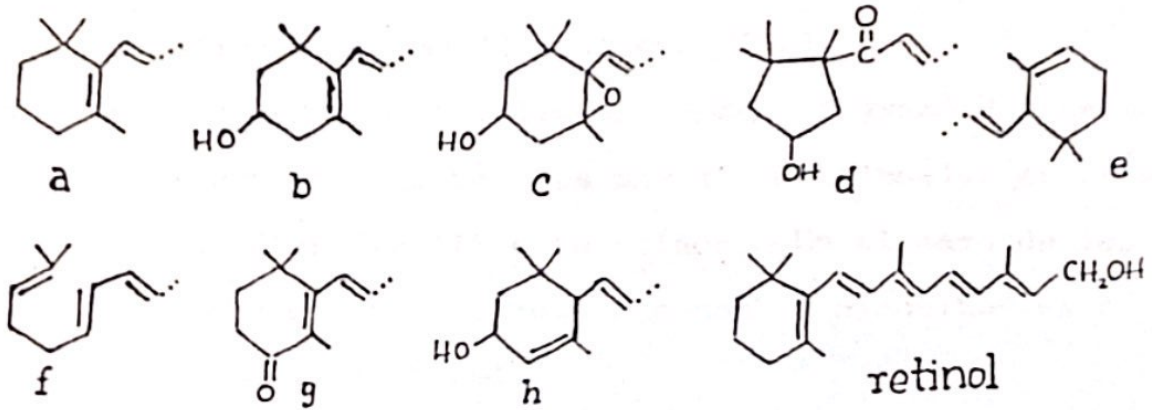
Quimicamente son moléculas solubles en lípidos, compuestas por unidades de isopreno. La diferencia en sus estructuras se debe a hidrogenación, deshidrogenación, ciclización y oxidación de las unidades isoprenoides (Swartz, 1982). Están divididos en:

- Carotenos: sin oxígeno en su estructura química.
- Xantofilas: con oxígeno en su estructura química.

En la figura 2 puede verse la estructura de los carotenoides más comunes y la vitamina A.

Su biopotencia como precursores de vitamina A depende de su estructura. Solo 10 carotenoides poseen actividad de provitamina A y en distintos grados. Estos son beta-caroteno (100% provitamina A), alfa-caroteno (50% provitamina A) sus estereoisómeros, además gamma-caroteno (50% provitamina A) y criptoxantina (50% provitamina A) (Bushway, 1982).

Estructura de los Principales Carotenoides
y compuestos relacionados



NOMBRE	R	Q
beta-caroteno	a	a
alfa-caroteno	a	e
gama-caroteno	a	f
licopeno	f	f
capsantina	b	d
violaxantina	c	c
criptoxantina	a	b
capsorubina	d	d
criptocapsina	a	d
zeaxantina	b	b
anteraxantina	b	c
luteina	b	h
cantaxantina	g	g
B-apo-8"-carotenal	a	CHO

B. Procedimientos Experimentales.

1. Extracción de Carotenoides con Saponificación.

(Empleado con aceite, jabón y ácidos grasos en muestras a ser analizadas con HPLC).

- a. Se pesa, en triplicado, aprox. 1 gramo de aceite derretido en baño de maría. Se disuelve en 25 ml de éter dietílico destilado. En el caso de los jabones, son pesados 5 gramos y disueltos en 50 ml de agua destilada.
- b. Se burbujea nitrógeno 10 minutos con luz tenue.
- c. Se adicionan 8 ml de KOH al 60% peso/peso, continua el burbujeo.
- d. Se calienta en baño de maría con agua hirviendo por 10 minutos. Continúa el burbujeo de nitrógeno.
- e. Se adicionan 75 ml de agua destilada y se continúa el burbujeo de nitrógeno mientras se enfría el material.
- f. Se trasvasa el material a una ampolla de decantación de 200 ml y se extrae con 25 ml de éter dietílico. Se debe adicionar etanol al 95% para disolver emulsiones.
- g. Se separa la fase etérea y la fase acuosa se vuelve a extraer dos veces con porciones de 25 ml de éter dietílico.
- h. Se lava la fase etérea con dos porciones de agua destilada (30 ml), luego se pone a secar media hora.

ra sobre sulfato de sodio anhidro.

- i. Se filtra el extracto en papel filtro ordinario y se rotoevapora hasta 25 o 10 ml.
 - j. Se afora con eter dietílico destilado.
- (Tomado de Arriaga, 1985)

2. Extracción de Carotenoides sin Saponificación y Cuantificación espectrofotométrica de carotenoides.

(Empleado con yemas, aceite, jabón y ácidos grasos para la determinación espectrofotométrica de carotenoides totales como equivalentes de beta-caroteno).

- a. Se pesan 1 a 2 gramos del material (en yemas se llevo a pesar 10 gramos para las menos pigmentadas) en un beaker de 50 ml. Se le adicionan 2 ml de acetona analítica agitando hasta formar una pasta.
- b. Se adicionan de 15 a 20 ml de acetona. se mezcla bien y se filtra con papel filtro Whatman No. 4.
- c. Se lava el material con porciones sucesivas de acetona hasta dejarlo libre de pigmentos. Se recibe directamente el filtrado en un balón de 50 ml.
- d. Se lee la absorbancia a 450 nm (Debe estar entre el 20 y 80 % de transmitancia). Se toma 2,500 (1% , 1 cm) como coeficiente de extincion, y se calculan los carotenoides totales con la ecuacion:

$$\text{ppm de Carot.} = \frac{\text{Abs.}}{2500} \times \frac{(\text{volumen total})}{(100 \text{ ml})} \times \frac{(1000000 \text{ mcg})}{1 \text{ g}} \times \left(\frac{1}{\text{peso muestra}} \right)$$

3. Determinación de Humedad en aceites, jabones y ácidos Grasos.

- a. Se pesan 10 gramos del material en una balanza analítica.
- b. Se coloca la muestra en horno de vacío y se calienta a 50 C y 22 pulgadas de Hg de vacío por 12 horas.
- c. Se determina el peso perdido y se calcula el porcentaje de pérdida.
- d. En el caso de jabones se hace en un horno de ventilación forzada a 100°C por un día.

C. Metodología HPLC para análisis de carotenoides

Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución modelo Vista 5500, marca Varian, con un sistema computarizado para almacenar y manipular cromatogramas, 600 Data System, marca Varian. Se utilizó el detector espectrofotométrico a 460nm, y una columna NovaPak C18 (5mcm) con acetonitrilo:metanol:tetrahidrofurano (58:35:7, v:v:v) como fase líquida. El método empleado fue el descrito por Bushway (1985).

El volumen inyectado de muestra era de 10mcl para las extracciones de aceite de palma, sus jabones o ácidos grasos. Las extracciones de yemas fueron inyectadas en volúmenes de 50mcl.

A continuación se presenta el programa computarizado que se empleó en el cromatógrafo. El método isocrático descrito, también ha sido utilizado para la separación de pigmentos en extracciones de otros materiales vegetales como amaranto, maíz común, chipilín y hierba mora. Estos extractos fueron preparados por E. Castellanos e inyectados con A. Molina en el sistema de cromatografía líquida de alta resolución arriba descrito, lográndose una separación bastante eficiente en lo que a carotenos se refiere.

SINGLE CHANNEL METHOD: CAROTENITO

11:10 23 JUL 87

SECTION 1: GENERAL

PAGE 1

ANALYSIS PARAMETERS

CHANNEL: 1A

DETECTOR: 1

CALCULATION: A%

HT/AREA: A

STOP TIME: 20.00

NUMB EXPECTED PKS: 40

EQUILIBRATION TIME: 0

UNRETAINED PK TIME: 0.00

UNIDENT PK FACTOR: 0.000000

SLICE WIDTH: 10

PAGE 2

SAMPLE PARAMETERS

RUN TYPE: A

SAMPLE ID: TRANSRETINOL

DIVISOR: 1.000000

AMT STD: 1.000000

MLTPLR: 1.000000

PAGE 3

REPORT INSTRUCTIONS

WHERE TO REPORT: P1

COPIES: 1

TITLE: CAROTENOIDES EN YEMA

FORMAT: N

DECIMAL PLACE: 4

RESULT UNITS:

REPORT UNIDENT PKS: Y

REPORT INSTRUMENT CONDITIONS: N

PAGE 4

PLOT INSTRUCTIONS

PLOT: Y

RELOT WITH BASELINES: N

RAW DATA LOCATION: F

ZERO OFFSET: 5

ANNOTATION

RETENTION TIME: Y

PLOT CONTROL: Y

TIME TICKS: Y

TIME EVENTS: Y

PK START/END: Y

PAGE 5

CHART SPEED
 PAGES OR CM/MIN: C
 INIT VALUE: 1.0

PAGE 6

PLOT ATTEN
 INIT PLOT ATTEN: 1

SECTION 2: TIME EVENTS

PAGE 1

LINE#	TIME	EVENT	VALUE
1	0.00	PR	50
2	0.00	SN	2
3	0.00	TX	5.0
4	0.00	WI	4.0

SECTION 3: PEAK TABLE

PAGE 1

STD PK#: 0
 RELATIVE RETEN PK#: 0
 RESOLUTION PK#: 0
 RESOLUTION MINIMUM: 0.0
 FACT%: 5.0
 REF
 IDENTIFICATION TIME WINDOWS +/-
 REF
 %: 10
 MIN: 0.00
 NON REF
 %: 5
 MIN: 0.00

PAGE 2

SECTION 5: LC INSTRUMENT CONTROL

PAGE 1

LINE#	TIME	%A	%B	%C	FLOW
1	0.00	100	0	0	2.0

PAGE 2

SET CONDITIONS
 PMAX: 250
 PMIN: 10
 COL TEMP: 0
 AUX TEMP: 0
 ANALOG OUT: %B
 DET TIME CONSTANT: .5
 END TIME: 20.00
 LINK TO LC METHOD#: .
 EQUILIBRATION TIME: 0.00

PAGE 3

DETECTOR

ACTIVE: Y

LN#	TIME	NM	AU/MV	A/Z
1	0.00	325 460	2	Y

PAGE 4

DET SCANNING

ACTIVE: N

LN#	TIME	MAX	MIN	NM/MIN	STOP FLOW
1	MANUAL	350	200	50	Y

PAGE 5

RELAY CONTROL

ACTIVE: N

LN#	TIME	RELAY ON
1	0.00	0

SECTION 7: POST RUN

PAGE 1

LINE#	ACTION	VALUE1	VALUE2	VALUE3
1	SF	RAW	F	ANAL.YEMA

SECTION 10: NOTE PAD

PAGE 1

LINE#	VALUE
1	COLUMNA: NOVA PAK C-18 (WATERS) 3.9MMX1.5CM
2	FASE MOVIL AN/METANOL/TFE 58:35:7
3	2 ML/MIN DETECTOR A 325 460 NM
4	PRESIO: DEL SISTEMA 64 ATM

PROGRAMA *** ANALISIS DE VARIANZA *** UNA VIA CON REPLICAS
 NOMBRE DEL ARCHIVO: ANOVAA.BAS
 USUARIO: ALVARO MOLINA CRUZ
 PROGRAMA CREADO POR: R. PEREZ

```

10 CLS
20 CLEAR: DIM A(100,100)
30 FOR I=1 TO 6
40 FOR J=1 TO 9
50 READ A(I,J)
60 T=T+A(I,J)
70 TT=TT+A(I,J)^2
80 T(I)=T(I)+A(I,J)
90 NEXT J
100 G=G+T(I)^2
110 NEXT I
120 CT=(T^2)/(6*9)
130 SST=TT-CT
140 SSG=G/9-CT
150 SSE=SST-SSG
160 MSG=SSG/(6-1)
170 MSE=SSE/(6*(9-1))
180 F=MSG/MSE
190 DATA 17.03,18.11,15.55,14.76,12.86,14.83,19.68,19.11,22.66
200 DATA 0.83,0.88,0.83,0.70,0.67,0.70,1.1,1.1,1.1,
210 DATA .96,.78,.89,.76,.97,1.03,.66,.92,.82
220 DATA .77,.87,.85,.65,.57,.58,.47,.57,.73,
230 DATA 1.79,1.79,1.38,2.11,1.62,1.92,1.73,1.42,1.68
240 DATA .37,.61,.50,.55,.41,.18,.88,.88,.86
430 PRINT "*** MENU ***"
440 PRINT "(1) VER RESULTADOS"
450 PRINT "(2) IMPRIMIR RESULTADOS"
460 INPUT "SU ELECCION":N
470 IF N=1 THEN 490 ELSE IF N=2 THEN 640
480 END
490 CLS:GOSUB 780:PRINT
500 PRINT TAB(20)"*** ANALISIS DE VARIANZA ***"
510 PRINT TAB(20)"* UNA VIA & REPLICACIONES *"
520 PRINT:GOSUB 780
530 PRINT "FUENTE DE","GRADOS DE","SUMATORIA DE","MEDIA DE","VALOR DE"
540 PRINT "VARIACION","LIBERTAD ","CUADRADOS ","CUADRADOS","F"
550 PRINT:GOSUB 780
560 PRINT "GRUPOS "," " 5",SSG;MSG,F
570 PRINT
580 PRINT "ERROR "," " 48",SSE;MSE
590 PRINT
600 GOSUB 780
610 PRINT
620 PRINT "TOTAL "," " 53",SST
630 GOSUB 780:GOTO 430
640 CLS:GOSUB 790:LPRINT
650 LPRINT TAB(20)"*** ANALISIS DE VARIANZA ***"
660 LPRINT TAB(20)"* UNA VIA & REPLICACIONES *"
670 LPRINT:GOSUB 790
680 LPRINT "FUENTE DE","GRADOS DE","SUMATORIA DE","MEDIA DE","VALOR DE"
690 LPRINT "VARIACION","LIBERTAD ","CUADRADOS ","CUADRADOS","F"
700 LPRINT:GOSUB 780
710 LPRINT "GRUPOS "," " 5",SSG;MSG,F
720 LPRINT
730 LPRINT "ERROR "," " 48",SSE;MSE
740 LPRINT
750 GOSUB 790
760 LPRINT "TOTAL "," " 53",SST
770 GOSUB 790:GOTO 430
780 PRINT "-----";
RETURN
790 LPRINT "-----";
RETURN

```

Análisis de varianza (una vía, 3 réplica) para el contenido de carotenoides (ppm) en 6 muestras: jabón almacenado un año, sus ácidos grasos por acidulación con HCl 1N industrial y analítico, H₂SO₄ 1N industrial y analítico, blanco sin ácido.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	2596.969	519.3938	.7354546
ERROR	12	8474.656	706.2214	
TOTAL	17	11071.63		

$$F(12,5).05 = 4.68$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	2596.969	519.3938	.7354546
ERROR	12	8474.656	706.2214	
TOTAL	17	11071.63		

Análisis de varianza (una vía, 9 réplicas) para el contenido de carotenoides (ppm) en yemas de huevo de gallinas alimentadas con 6 distintas dietas (análisis realizada para cada una de las 3 semanas de experimentación).

SEMANA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	1989.999	397.9999	237.527
ERROR	48	80.42871	1.675598	
TOTAL	53	2070.428		

$$F(5,48).05 = 2.41$$

SEMANA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	24919.26	4983.853	1072.166
ERROR	48	223.1231	4.648397	
TOTAL	53	25142.39		

$$F(5,48).05 = 2.41$$

SEMANA 3

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	24659.01	4931.802	5506.017
ERROR	48	42.99414	.8957112	
TOTAL	53	24702		

$$F(5,48).05 = 2.41$$

Prueba de Student-Newman-Keul para el contenido de carotenoides (ppm) en yemas de huevo de gallinas alimentadas con 6 distintas dietas (prueba realizada para cada una de las 3 semanas de experimentación).

SEMANA 1

	K				
	2	3	4	5	6
Q.05(K, 48)	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20
LSR	1.23	1.48	1.63	1.73	1.81

$$S_y = \frac{1.68}{9} = 0.432$$

$$LSR = Q * S_y$$

	Blanco	ac.g.10%	ac.g.6%	ac.g.8%	Aceite	Carofil
Media	0.6	0.7	0.9	0.9	1.7	17.2

comparación de medias

Carofil >> Aceite = ac.g.8% = ac.g.6% = ac.g.10% = Blanco

SEMANA 2

	K				
	2	3	4	5	6
Q.05(K, 48)	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20
LSR	2.05	2.46	2.71	2.89	3.02

$$S_y = \frac{4.65}{9} = 0.72$$

$$LSR = Q * S_y$$

	Blanco	ac.g.10%	ac.g.8%	ac.g.6%	Aceite	Carofil
Media	0.9	1.0	1.1	1.5	2.6	59

comparación de medias

Carofil >> Aceite = ac.g.8% = ac.g.6% = ac.g.10% = Blanco

SEMANA 3

	K				
	2	3	4	5	6
Q.05(K, 48)	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20
LSR	0.90	1.08	1.19	1.27	1.33

$$S_y = \frac{0.90}{9} = 0.316$$

$$LSR = Q * S_y$$

	Blanco	ac.g. 6%	ac.g.10%	ac.g.8%	Aceite	Carofil
Media	0.75	1.7	1.7	2.0	3.2	59.2

comparación de medias

Carofil >> Aceite > ac.g.8% = ac.g.6% = ac.g.10% > Blanco

Análisis de varianza (una vía, 15 réplicas) para la coloración de yemas (medición con el abanico de color Roche) de huevo de gallinas con 6 dietas distintas (análisis realizado para cada semana).

SEMANA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	545.5666	109.1133	162.126
ERROR	84	56.53333	.6730158	
TOTAL	89	602.1		

$F(5,84).05 = 2.32$

SEMANA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	1359.956	271.9912	2015.949
ERROR	84	11.33325	.1349197	
TOTAL	89	1371.289		

$F(5,84).05 = 2.32$

SEMANA 3

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	1094.233	218.8466	689.3648
ERROR	84	26.66675	.3174613	
TOTAL	89	1120.9		

$F(5,84).05 = 2.32$

Prueba de Student-Newman-Keul para la coloración de yemas (medición con el abanico de color Roche) de huevo de gallinas alimentadas con 6 dietas distintas (prueba para cada semana).

SEMANA 1

	K				
	2	3	4	5	6
Q.05(K, 84)	2.82	3.39	3.72	3.96	4.14
LSR	0.60	0.72	0.79	0.84	0.88

$$S_y = \frac{0.673}{15} = 0.212$$

$$LSR = Q * S_y$$

	Blanco	ac.g. 10%	ac.g. 6%	ac.g. 8%	Aceite	Carofil
Media	1.1	1.3	1.4	1.4	1.5	7.9

comparación de medias

Carofil >> Aceite = ac.g. 8% = ac.g. 6% = ac.g. 10% = Blanco

SEMANA 2

	K				
	2	3	4	5	6
Q.05(K, 84)	2.82	3.39	3.72	3.96	4.14
LSR	0.27	0.32	0.35	0.38	0.39

$$S_y = \frac{0.135}{15} = 0.0948$$

$$LSR = Q * S_y$$

	Blanco	ac.g. 6%	ac.g. 8%	ac.g. 10%	Aceite	Carofil
Media	1.0	1.6	1.7	2.1	4.9	12.1

comparación de medias

Carofil >> Aceite > ac.g. 10% > ac.g. 8% = ac.g. 6% > Blanco

SEMANA 3

K

	2	3	4	5	6
Q.05(K, 84)	2.82	3.39	3.72	3.96	4.14
LSR	0.41	0.49	0.54	0.58	0.60

$$S_y = \frac{0.317}{15} = 0.1455 \quad LSR = Q * S_y$$

	Blanco	ac.g. 8%	ac.g.6%	ac.g.10%	Aceite	Carofil
Media	1.0	3.0	3.2	3.9	7.6	11.5

comparación de medias

Carofil >> Aceite > ac.g.10% > ac.g.6% = ac.g. 8% > Blanco

Análisis de varianza (una vía, 2 réplicas) para el control de ovipostura semanal de gallinas alimentas con 6 dietas distintas (análisis realizado para cada semana del experimento).

SEMANA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	139.667	27.9334	1.155865
ERROR	6	145	24.16667	
TOTAL	11	284.667		

$F(5,6).05 = 4.39$

SEMANA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	388.667	77.7334	2.933336
ERROR	6	159	26.5	
TOTAL	11	547.667		

$F(5,6).05 = 4.39$

SEMANA 3

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	208	41.6	1.273469
ERROR	6	196	32.66667	
TOTAL	11	404		

$F(5,6).05 = 4.39$

Análisis de varianza (una vía, 2 réplicas) del peso promedio de huevos de gallinas alimentadas con 6 dietas distintas (análisis realizado para cada semana del experimento).

SEMANA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	39.71485	7.942969	1.885979
ERROR	6	25.26953	4.211589	
TOTAL	11	64.98438		

$$F(5,6).05 = 4.39$$

SEMANA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	38.4375	7.6875	2.23298
ERROR	6	20.65625	3.442708	
TOTAL	11	59.09375		

$$F(5,6).05 = 4.39$$

SEMANA 3

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	38.92578	7.785157	2.990248
ERROR	6	15.62109	2.603516	
TOTAL	11	54.54688		

$$F(5,6).05 = 4.39$$

Análisis de varianza (una vía, 2 réplicas) del consumo de alimento de gallinas alimentadas con 6 dietas distintas (análisis realizado para cada semana de experimentación).

SEMANA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	715648	143129.6	.6386369
ERROR	6	1344704	224117.3	
TOTAL	11	2060352		

$F(5,6).05 = 4.39$

SEMANA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	2379584	475916.8	1.315948
ERROR	6	2169920	361653.4	
TOTAL	11	4549504		

$F(5,6).05 = 4.39$

SEMANA 3

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F
GRUPOS	5	2819776	563955.2	1.260569
ERROR	6	2684288	447381.4	
TOTAL	11	5504064		

$F(5,6).05 = 4.39$

Pruebas para diferencia de medias. Se utilizó como estadístico de prueba la t de Student dada por:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} ; \quad s = \sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

grados de libertad: $n_1 + n_2 - 2$

- Aceite crudo vs. Jabón (% de carotenos en los cromatogramas)

aceite	$\bar{X}_1 = 96$	$s_1 = 1$	$n_1 = 4$	$s = 3.37$
jabon	$\bar{X}_2 = 82$	$s_2 = 4$	$n_2 = 4$	
	$t = 5.86^*$	$t(6, 0.05) = 2.45$		

Si existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los porcentajes de area analizados.

- Jabon vs. Acidos grasos (% de carotenos en los cromatogramas)

jabon	$\bar{X}_1 = 82$	$s_1 = 4$	$n_1 = 4$	$s = 8.57$
ac.g.	$\bar{X}_2 = 76$	$s_2 = 9$	$n_2 = 11$	
	$t = 1.19$	$t(6, 0.05) = 2.16$		

No existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los porcentajes de area analizados.