

Universidad del Valle de Guatemala  
Facultad de Ciencias y Humanidades

Te  
UVG  
Qui  
A 228  
1985

CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES EN EL  
ACEITE DE PALMA Y EN LOS DESECHOS DE  
SU REFINAMIENTO

Edgar Augusto Arriaga Aguilar

Trabajo de investigación presentado  
para optar al grado académico de

Licenciado en Química

Guatemala

1985

Vo. Bo.:

(f) Elvira M. de Mejía  
ING. ELVIRA DE MEJIA  
ASESORA

(f) Elvira M. de Mejía  
ING. ELVIRA DE MEJIA

(f) Concepción del Bosque  
LIC. CONCEPCION DEL BOSQUE

(f) Nicolas Irving  
DR. NICOLAS IRVING

Fecha de Aprobación: 18 de octubre de 1985

Agradezco la iluminación del Creador y la valiosa colaboración a las personas e Instituciones que me ayudaron a realizar este trabajo.

- Ing. Elvira G. de Mejía  
de la Universidad del Valle
- Dr. Luis Mejía  
Instituto de Nutrición de Centro  
América y Panamá
- ANACAFE, ENAPLA, LA ROCHE
- P. Antonio Filippi
- Mercedes García
- Humberto Yoc
- MI FAMILIA

## RESUMEN

El aceite de palma, extraído del fruto de la planta Elaeis guineensis puede ser refinado para consumo humano, dejando como subproductos jabones y tierras activadas, ricos en carotenoides. Estos subproductos constituyen una fuente potencial de carotenoides, los cuales son utilizados como pigmentos en alimentos para humanos y concentrados para animales.

En este trabajo se establecieron condiciones específicas para un refinamiento alcalino del aceite y un blanqueo utilizando Tonsil Optima como agente blanqueador. Las etapas anteriores se ordenaron en dos secuencias de refinamiento del aceite: blanqueo-refinamiento-blanqueo y refinamiento-blanqueo-blanqueo, siendo la primera más efectiva para lograr un número ácido bajo en el aceite final.

Se evaluaron los niveles de carotenoides en cada uno de los materiales de las etapas de las secuencias y se encontró lo siguiente: Aceite crudo:  $540 \pm 55$  ppm; jabones  $393 \pm 32\%$  ppm (nivel máximo encontrado). De estos materiales, los jabones tienen un nivel de carotenoides adecuado para ser utilizados como suplemento de carotenoides en las dietas de gallinas ponedoras.

Se implementó un método para separación de carotenoides utilizando cromatografía de capa fina de fase reversa. Se utilizó como fase fija Sílica Gel recubierta de parafina y como fase móvil mezclas de metanol y acetona. No se logró separar los carotenoides del aceite de palma crudo, sino sólo separar estos carotenoides de otros componentes no identificados.

Fue posible obtener espectros de los extractos etéreos del aceite de palma crudo, jabones y tierras activadas. To-

dos presentaron características diferentes entre sí, por lo que el tipo de carotenoides en cada material es diferente.

## INDICE

I.	Introducción .....	1
II.	Antecedentes .....	3
A.	Palma Africana .....	3
	1. Descripción .....	3
	2. Cultivo de la palma africana en Guatemala .....	3
B.	Extracción y procesamiento del aceite de palma africana.....	5
	1. Esterilización .....	8
	2. Desfrutado.....	8
	3. Digestión .....	8
	4. Prensado .....	8
	5. Decantación .....	8
	6. Procesamiento de la torta .....	8
C.	Usos del aceite de palma y los subproductos del proceso industrial.....	10
D.	Características Físicas y Químicas del aceite de palma.....	12
E.	Utilización de carotenoides.....	16
	1. Uso de carotenoides en alimentos .....	16
	2. Utilización de carotenoides en raciones animales.	18
	3. Uso de carotenoides en farmacéuticos.....	19
	4. Utilización de carotenoides del aceite de palma .	19
	a. Carotenoides en jabones .....	19
	b. Carotenoides en tierras activadas.....	20
	c. Otros procesos para obtener carotenoides....	21

F.	Análisis Químico de carotenoides.....	22
1.	Extracción de carotenoides .....	23
2.	Aislamiento de carotenoides .....	23
a.	Saponificación .....	23
b.	Partición .....	24
c.	Cromatografía .....	24
i.	Cromatografía de columna .....	25
ii.	Cromatografía de capa fina .....	27
iii.	Cromatografía de papel .....	29
iv.	Cromatografía de gases .....	29
v.	Cromatografía de gas líquido de alta presión .....	30
3.	Caracterización de carotenoides .....	30
a.	Pureza .....	30
b.	Coefficiente de partición .....	31
c.	Propiedades espectroscópicas .....	31
i.	Espectrometría ultravioleta visible .....	32
ii.	Resonancia magnética nuclear .....	32
iii.	Infrarojo .....	32
iv.	Espectroscopía de masas .....	33
d.	Preparación de derivados .....	33
4.	Cuantificación de carotenoides .....	34
III.	Objetivos .....	37
IV.	Importancia y Justificación .....	38
V.	Materiales y Métodos .....	40
VI.	Resultados .....	45
A.	Establecimiento del proceso de refinamiento .....	45

1.	Selección del procedimiento y de las condiciones de refinamiento alcalino .....	45
2.	Selección del procedimiento y de las condiciones de blanqueo de aceite .....	46
3.	Establecimiento de otras etapas auxiliares en el proceso del refinamiento del aceite .....	49
a.	Desgomado del aceite .....	49
b.	Lavados del aceite .....	50
4.	Ordenamiento de las etapas del proceso de refinamiento .....	50
B.	Análisis y cuantificación de carotenoides en los materiales de cada una de las etapas del proceso de refinamiento .....	55
1.	Establecimiento del procedimiento de extracción de carotenoides de aceite de palma, jabones y tierras activadas .....	55
2.	Cuantificación de carotenoides totales .....	55
3.	Cuantificación y Balance de carotenoides que se encuentran con los materiales en las distintas etapas del proceso de refinamiento del aceite ....	56
4.	Caracterización de los carotenoides contenidos en el aceite de palma por cromatografía de capa fina y espectrofotometría visible .....	59
a.	Espectros en el intervalo visible .....	59
b.	Separaciones cromatográficas de los extractos etéreos .....	60
VII.	Discusión .....	68
VIII.	Conclusiones .....	77
IX.	Sugerencias para el estudio futuro .....	79
X.	Bibliografía .....	80
	Apéndices .....	85
A -	Estructura y Formulación de Carotenoides .....	85

B - Procedimiento utilizado en etapa experimental .....	87
C - Curva de calibración para cuantificación de carotenoides a partir de un estándar de Beta-caroteno .....	93

### LISTA DE FIGURAS, GRAFICAS Y CUADROS

#### Figura

1. Partes del fruto de la palma africana .....	4
2. Proceso de extracción y purificación del aceite de palma africana en Guatemala .....	9
3. Secuencia de refinamiento de Aceite # 1 (Refinamiento 9) .....	53
4. Secuencia de refinamiento de Aceite # 2 (Refinamiento 10) .....	54

#### Gráfica

1. Espectro visible del extracto etéreo del aceite de palma crudo .....	62
2. Espectro visible del extracto etéreo de aceite procesado .	63
3. Espectro visible del extracto etéreo de los jabones obtenidos en la secuencia de refinamiento de aceite # 2 .	64
4. Espectro visible del extracto etéreo de tierras activadas (Tonsil Optima), utilizadas en la secuencia de refinamiento de aceite # 1 .....	65
5. Espectro visible de las manchas separadas por TLC a partir de una muestra de Beta-caroteno (MCB) .....	66
6. Espectro visible del extracto etéreo del aceite de palma crudo separado cromatográficamente .....	67

#### Cuadro

1. Rendimiento de la fruta procesada en Guatemala período 1976-1980 .....	6
2. Importaciones de aceites y grasas en Guatemala período 1978-1982 .....	7

3.	Propiedades Físicas y Químicas del aceite de palma .....	13
4.	Composición de ácidos grasos de un aceite de palma africana procedente de Malasia .....	14
5.	Composición de los carotenoides del aceite de palma (variedad ténera) .....	15
6.	Contenido de carotenoides totales en aceite de palma .....	17
7.	Adsorbentes utilizados para separar carotenoides en cromatografía de columna .....	26
8.	Absortividad promedio de carotenoides en la longitud de onda de absorción máxima .....	35
9.	Rendimiento de los procesos de refinamiento alcalino .....	47
10.	Ensayo de blanqueo de aceite de palma .....	48
11.	Resultados de la secuencia de refinamiento de aceite # 1 (refinamiento 8) .....	51
12.	Resultados de la secuencia de refinamiento de aceite # 2 (refinamiento 9) .....	52
13.	Cuantificación de carotenoides en la secuencia de refinamiento de aceite # 1 .....	57
14.	Cuantificación de carotenoides en la secuencia de refinamiento de aceite # 2 .....	58
15.	Separación de carotenoides de extracto etéreo del aceite de palma crudo por cromatografía de capa fina .....	61

## I. INTRODUCCION

El aceite de palma africana está siendo extraído actualmente en Guatemala, proceso en el que participan tres plantas extractoras distribuidas en las regiones palmicultoras (Banco de Guatemala, 1981). El uso actual del aceite extraído es la incorporación en las dietas animales como fuente calórica y en las industrias de jabones, donde no se requiere un aceite refinado. Sin embargo, en muchos países, el aceite de palma se utiliza para consumo humano, ya que en términos económicos es el que proporciona el mayor rendimiento de aceite por unidad de área cultivada (Banco de Guatemala, 1981).

Durante el proceso de refinamiento del aceite de palma africana, se pueden obtener como subproductos jabones y tierras activadas con un alto contenido de carotenoides, los cuales son desaprovechados. Uno de los usos potenciales de los carotenoides del aceite de palma contenidos en los subproductos, es como pigmentos en las raciones de aves comerciales, para lograr una coloración aceptable en la piel y en los huevos. el éxito de dicha operación contribuiría a obtener una mayor rentabilidad del proceso de refinamiento del aceite de palma y constituiría una fuente alternativa de colorante para la industria avícola y la industria de alimentos.

Es necesario establecer condiciones específicas para el refinamiento del aceite de palma, con la finalidad de obtener un aceite de buena calidad. Por otra parte, es necesario tener los medios analíticos para evaluar el nivel de carotenoides, tanto en el aceite de palma como en los subproductos del mismo. La identidad de los carotenoides contenidos en el aceite de palma y en los subproductos, también es un aspecto importante para establecer el uso de los desechos del aceite de palma.

En este trabajo se presentan pruebas de refinamiento de aceite de palma (blanqueo y refinamiento), así como condiciones específicas para este proceso. Por otra parte, también se presentan resultados de caracterización y cuantificación de los carotenoides en el aceite de palma y en los desechos del refinamiento.

## II. ANTECEDENTES

### A. Palma Africana

#### 1. Descripción

La palma africana, también conocida como palma de aceite o palma oleaginosa, es de apariencia similar al cocotero: con un sólo tallo robusto y hojas irregulares-pinadas en forma de penacho. Produce sus frutos en forma de racimos, los cuales pesan aproximadamente 50 kgs. y tienen de 1200 a 1500 frutos por racimo. La producción de los frutos comienza a partir del cuarto año, produciendo un promedio de 15 racimos anuales y dura la producción hasta los veinte o veinticinco años.

Las partes de un fruto de palma africana pueden verse en la figura 1.

El aceite de palma se extrae del mesocarpio o pulpa, el cual posee del 15 al 20% de aceite y de 45 a 50% de fibras celulósicas (Banco de Guatemala, 1981). También se extrae aceite del albumen o almendra, el cual contiene de 45 a 50% de aceite y este aceite se conoce como aceite de "Palmiste". El aceite de palma es utilizado para fines alimenticios, mientras que el palmiste se utiliza en jabonería o en la industria de pinturas como aceite secante.

Los frutos tienen un alto contenido de carotenos y antocianinas, lo que explica la coloración pardo-rojiza de los mismos y la fuerte coloración observada en el aceite extraído de la pulpa.

#### 2. Cultivo de la Palma Africana en Guatemala.

En Guatemala, existen dos regiones donde hay plantaciones de palma africana. La primera región es la zona sur-occidental, que incluye los departamentos de San Marcos, Quetzaltenango, Retalhuleu y Suchitepéquez. La segunda región es la zona norte, que incluye los departamentos de Alta Verapaz,

nosidad requerida para el cultivo debe de ser de más de 1500 horas anuales. Debe existir una precipitación pluvial elevada (de 2000 a 3000 mm.). En la zona sur-occidental y norte del país, se observan precipitaciones pluviales de 3000 y 3500 mm. anuales respectivamente. La temperatura adecuada es alrededor de los 25°C, que es aproximada a la temperatura de las dos regiones.

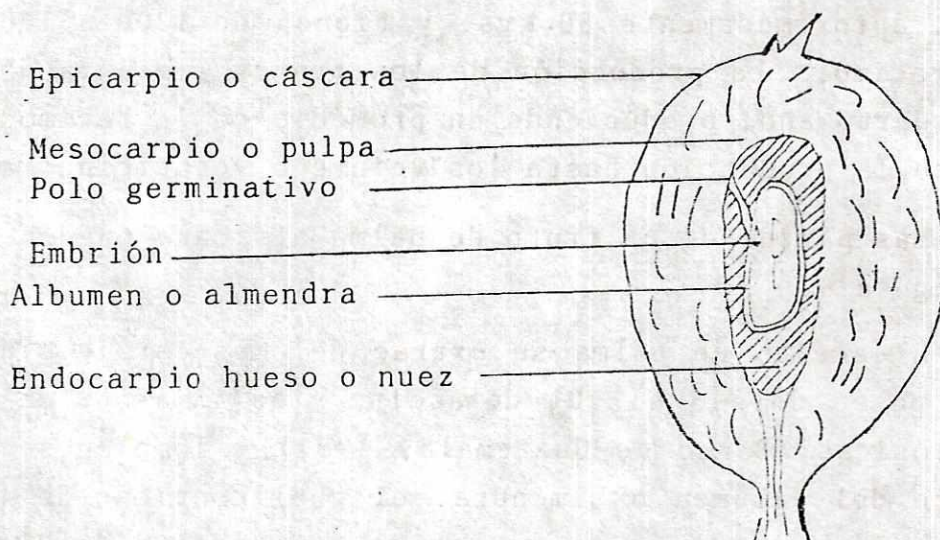


FIGURA 1. PARTES DEL FRUTO DE PALMA AFRICANA

Además, en estas zonas los suelos son fértiles, profundos y bien drenados. La topografía es bastante plana y las tierras son bastante bajas; todas estas condiciones favorecen el desarrollo del cultivo.

La variedad de palma africana cultivada en Guatemala es la Ténera, resultante de la polinización cruzada de las variedades Dura y Picífera.

En 1981 se informó que el área cultivada era de 3782.3 manzanas, 2707.0 en la zona norte y 1075.3 en la zona sur-occidental (Banco de Guatemala, 1981).

Para la extracción del aceite de palma, existen actualmente en Guatemala dos plantas en funcionamiento. La planta

extractora en la finca Buena Vista en San Sebastián, Retalhuleu y la planta en la finca Cabañas en La Tinta, Alta Verapaz. Cada una tiene una capacidad de procesar 1.5 TM de aceite crudo por hora, lo que equivale a procesar los frutos provenientes de 400 Ha. en cada planta. Se está montando otra planta en Coatepeque con una capacidad de 6 TM pr hora, equivalente a 1200 Ha. de plantación.

El volumen de fruta procesada en las dos plantas extractoras para el período 1976-1980 se muestra en el Cuadro 1.

En el período 1979-1980, el aceite procesado equivalió al 38.1% de la capacidad de procesamiento instalada hasta ese año.

En la actualidad, el aceite de palma no se utiliza como aceite comestible para consumo humano en Guatemala debido a que aún no han sido instaladas plantas refinadoras de aceite de palma. Sin embargo, se considera que la palma africana es la mayor alternativa para aliviar la crisis de aceites y grasas que existe en el país debido a que: a) es la oleaginosa que produce el mayor rendimiento de aceite por área cultivada; b) presenta poca susceptibilidad de plagas, y; c) en Guatemala existen tierras apropiadas para el cultivo de la palma africana.

El monto de las importaciones de aceites comestibles y grasas en el período 1978-1982 puede verse en el Cuadro 2.

#### B. Extracción y Procesamiento del Aceite de Palma Africana.

El proceso para la extracción y purificación del aceite de palma africana depende de la tecnología disponible en la región de las plantaciones.

CUADRO 1. RENDIMIENTO DE LA FRUTA PROCESADA  
EN GUATEMALA, EN EL PERIODO DE 1976-1980

PERIODO	FRUTA PROCESADA (TM)	ACEITE CRUDO OBTENIDO (TM)	RENDIMIENTO (%)
1976 - 1977	1484.1	250	16.8
1977 - 1978	2011.1	330	16.4
1978 - 1979	2106.9	355	16.8
1979 - 1980	2632.7	450	17.0

(Tomado de Informe Económico: Estudio sobre el cultivo e industrialización de la palma africana. Banco de Guatemala. Enero-marzo, 1981. pp 1-74).

CUADRO 2. IMPORTACIONES DE ACEITES Y GRASAS  
EN GUATEMALA, PERIODO 1978-1982

---

IMPORTACIONES DE ACEITES Y MANTECA DE  
ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL (miles de Quetzales)

1978	5262.5
1979	8388.2
1980	11129.7
1981	15851.8
1982	24287.7

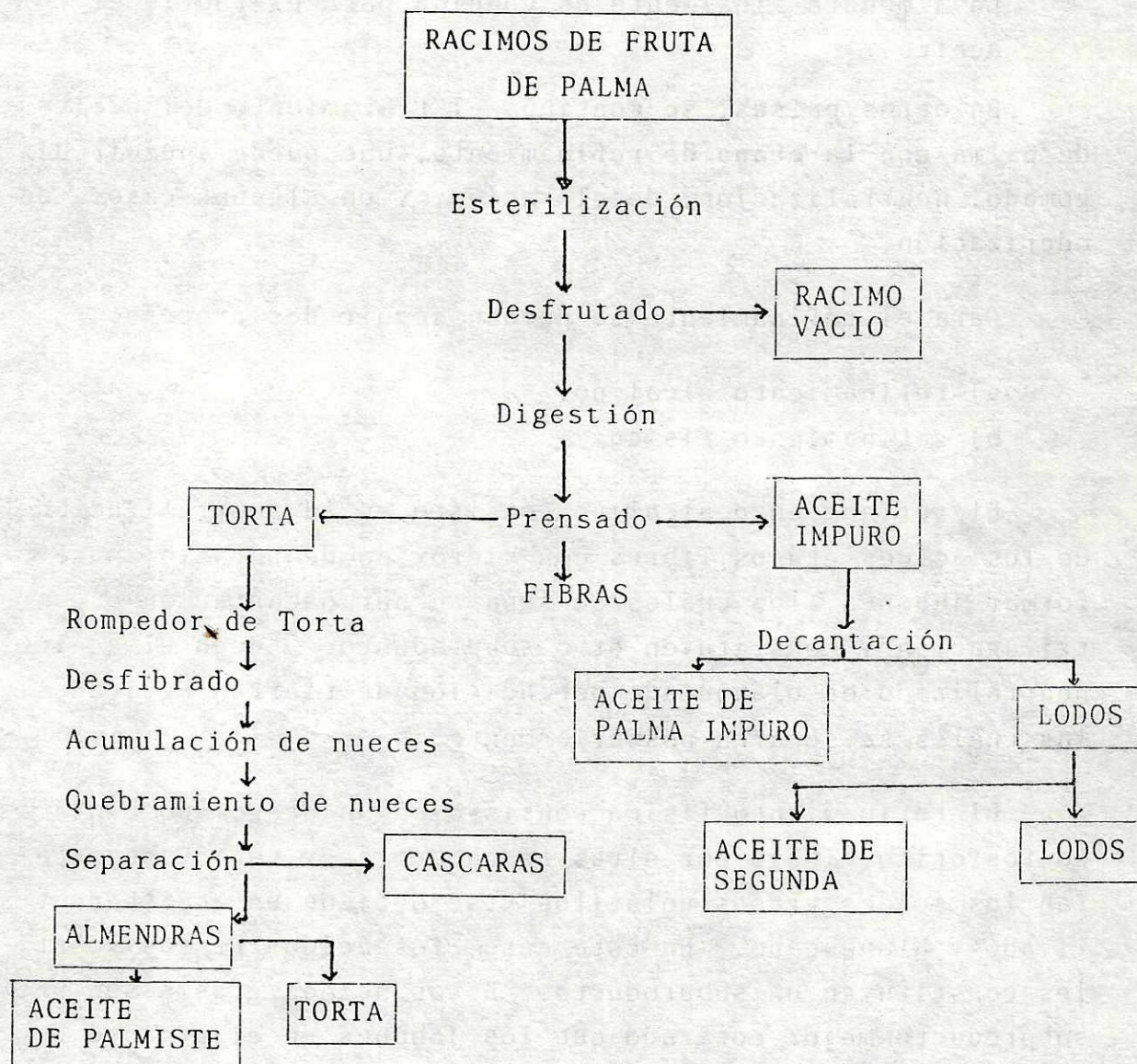
---

(Tomado de Boletín Estadístico. Julio-septiembre, 1983.  
Banco de Guatemala, 1983).

En Guatemala, el proceso de extracción del aceite de palma africana consta de las etapas que se observan esquemáticamente en la Figura 2. Las etapas que incluye este proceso, se describen a continuación.

1. Esterilización. En esta etapa, se somete a calentamiento el racimo por medio de vapor. Esto ocasiona la desactivación de las enzimas desdobladoras del aceite. Además facilita el desprendimiento de los frutos del raquis.
2. Desfrutado. En esta etapa se separa mecánicamente, los frutos del raquis o escobajo; el último constituye un subproducto.
3. Digestión. Consiste en la mezcla de los frutos con agua caliente para remover la pulpa de las nueces y reventar las células vegetales para liberar el aceite. El producto intermedio es una masa fibrosa llamada "magma".
4. Prensado. En esta etapa, se extrae la fase líquida de la torta. En la primera hay aceite, agua e impurezas sólidas y en la segunda se encuentra la fibra de la pulpa y los coquitos.
5. Decantación. En esta etapa, se aprovechan las diferencias de densidades para separar el aceite de los residuos sólidos y el agua. El aceite es separado por rebalse superior de un tanque al que se le adiciona agua por la parte inferior. Se obtiene el aceite crudo, el cual es almacenado para su venta en un tanque. Además, se obtienen lodos, los cuales son drenados del tanque de decantación y son depositados en unas "trampas". De estas trampas se recupera el aceite de segunda, que tiene un alto contenido de agua e impurezas sólidas.
6. Procesamiento de la torta. La torta compuesta de fibra

FIGURA 2. PROCESO DE EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ACEITE DE PALMA EN GUATEMALA.



de pulpa y de coquitos, es separada en sus componentes en un desfibrador. Se obtiene como subproducto la fibra de la pulpa y los coquitos. Los coquitos son sometidos a quebrantamiento, separando la cáscara y la almendra. La almendra finalmente es vendida para extraerle el aceite.

En otros países, se continúa el tratamiento del aceite de palma con la etapa de refinamiento, que puede incluir desgomado, neutralización, decoloración, y en algunos casos, deodorización.

Para el refinamiento se pueden seguir dos procesos:

- a) refinamiento alcalino.
- b) refinamiento físico.

El refinamiento alcalino consiste en la neutralización de los ácidos grasos libres con hidróxido de potasio, para formar jabones, los cuales se separan por decantación o centrifugación y constituyen otro subproducto. Luego el aceite neutralizado es blanqueado por adición de tierras activadas, las cuales se separan posteriormente.

El refinamiento físico consiste en un desgomado con ácido fosfórico, luego por altas temperaturas y vacío, se separan los ácidos grasos volátiles y se obtiene un aceite neutralizado y blanqueado. En este caso, los ácidos grasos volátiles constituyen un subproducto. Estos ácidos grasos son un subproducto mejor cotizado que los jabones en el proceso de refinamiento alcalino.

### C. Usos del Aceite de Palma y los Subproductos del Proceso Industrial.

Se pueden elaborar concentrados de carotenoides por destilación al vacío o por saponificación de los ésteres metíli-

cos del aceite de palma. Estos concentrados se pueden utilizar en la coloración de mantequillas, margarinas o en industrias farmacéuticas (Bauernfeind, 1981).

Otras aplicaciones del aceite de palma lo constituyen el uso de los ésteres metílicos, producto de refinamiento físico para obtener alcoholes grasos (usados en detergentes y surfactantes), lubricantes, ésteres y aditivos para tenería (Knaut, J. et. al., 1985).

El aceite de palmiste se utiliza en la industria alimenticia y en la producción de jabones espumosos y cosméticos. También se puede utilizar en la elaboración de resinas alquídicas en la industria de pinturas. En repostería y grasas de chocolate, también se ha generalizado su uso.

En el informe económico del Banco de Guatemala, 1981, también se han mencionado algunas utilidades de los subproductos:

- a) Los escobajos pueden utilizarse como combustible o abonos y fertilizantes, pues tiene un alto contenido de potasio.
- b) Las figuras y las cáscaras de los coquitos se han utilizado para la extracción de gas y la elaboración de carbón (tiene el 50% del poder de combustión del carbón mineral). También se utiliza como combustible para calderas en las plantas extractoras.
- c) La torta de aceite de palmiste se puede utilizar en la elaboración de concentrado para animales.
- d) Los lodos se pueden utilizar como abono o como combustible por tener residuos de aceite.

## D. Características Físicas y Químicas del Aceite de Palma.

### 1. Propiedades Físicas y Químicas del Aceite de Palma.

Las propiedades físicas y químicas del aceite de palma van a depender del estado en que se encuentre el aceite de palma. Sin embargo, cuando se trata de un aceite refinado, las características son relativamente constantes. En el Cuadro 3 pueden verse tabuladas algunas de estas propiedades.

### 2. Composición Química del Aceite de Palma.

El aceite de palma está compuesto de ésteres triglicéridos de ácidos grasos, ácidos grasos libres, diglicéridos, fosfolípidos, complejos metálicos, peróxidos y sus productos de descomposición y pigmentos (Maciellan, 1983).

En el Cuadro 4 puede verse la composición detallada de los ácidos grasos que constituyen el aceite de palma. Esta composición varía dependiendo de la variedad que se tiene cultivada, la región donde se cultiva y el proceso a que se somete el aceite.

El contenido de fosfolípidos varía dependiendo de la variedad y de la estación en que se está cultivando la palma. Las operaciones del procesamiento no ocasionan mayores variaciones. El contenido de fósforo puede variar de 10 ppm a 35 ppm.

Los principales pigmentos del aceite de palma son los carotenoides que se encuentran en un intervalo de 500 - 700 ppm (determinado espectrofotométricamente). Los que se encuentran en mayor proporción son alfa, beta, gama-carotenos, xantófilas y licopeno (Maciellan, 1983. Véase Apéndice A). El porcentaje de estos carotenoides puede verse en el Cuadro 5. En un estudio previo se informa además la presencia de luteína y los neoisómeros de los carotenoides mencionados por Mac-

CUADRO 3. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL  
ACEITE DE PALMA

---

Punto de fusión (varía según el grado de acidez y pureza)	27 a 45 <sup>o</sup> C
Viscosidad absoluta (acidez del 6%), a 40 <sup>o</sup> C *	37.8 centipoises
Indice de refracción a 50 <sup>o</sup> C	1.4553 (1.4546-1.460)
Densidad a 50 <sup>o</sup> C (aceite neutro)*	0.8927 (0.89219-0.8932)
Indice de saponificación *	195.7 (190.1-201.7)
Indice de yodo	53 (48-58)

---

(Datos tomados de Maclellan, M. Palm Oil, JAOCS. 60 (2), 1983,320A - 325A). (Los datos con Asterisco fueron tomados de un boletín publicado por COPALMA, Honduras).

CUADRO 4. COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE UN ACEITE  
DE PALMA AFRICANA PROCEDENTE DE MALASIA.

---

	MEDIA ( $\bar{X}$ )	INTERVALO
Acido Láurico	0.2	0.1 - 1.0
Acido Mirístico	1.1	0.9 - 1.5
Acido Palmítico	44.0	41.8 - 46.8
Acido Esteárico	4.5	4.2 - 5.1
Acido Oleico	39.2	37.3 - 40.8
Acido Linoleico	10.1	9.1 - 11.0
Acido Linolénico	0.4	0 - 0.6
Acido Aradquinónico	0.4	0.2 - 0.7

---

(Tomado de Maclellan, M. Palm Oil. JAOCS, 60 (2), 1983.  
pp 320A - 325A).

CUADRO 5. COMPOSICION DE LOS CAROTENOIDES DEL ACEITE  
DE PALMA (VARIEDAD TENERA).

---

	PORCENTAJE <sup>1</sup>	PORCENTAJE <sup>2</sup>
Alfa-Caroteno	29	36.2
Beta-Caroteno	62	54.4
Gama-Caroteno	4	3.3
Xantofilas	3	2.2
Licopeno	2	3.8

---

1. (Datos tomados de Maclellan, M. Palm Oil. JAOCS. 60 (2), 1983. pp 320A - 325A); 2. (Datos tomados de Loncin, Von M. Uber das Palmitol. JAOCS, 49, 1972. pp 104-112).

lellan (Hunter, 1946), sin embargo, estos pueden atribuirse a que se formaron durante la manipulación de los carotenoides durante el análisis.

En el Cuadro 6 pueden verse diversos valores de niveles de carotenoides informados para el aceite de palma. Es importante notar el amplio intervalo de variación presentada en estos datos.

Otros componentes del aceite de palma son los tocoferoles, los cuales se encuentran hasta 800 ppm. Los tocoferoles en el aceite de palma, son una mezcla de 20% alfa-tocoferol, 25% alfa-tocotrienol, 45% de gama-tocotrienol y 10% de delta-tocotrienol (Maclellan, 1983). Los tocoferoles, además de ser antioxidantes naturales, son fisiológicamente activos como vitamina E.

#### E. Utilización de Carotenoides.

Los carotenoides sintéticos utilizados en alimentos son:

- a) Beta-8'-apocarotenal (Beta-apocarotenal) que es de color amarillo. Se puede utilizar para colorear galletas, crestas de pastelillos, dulces, salsas de queso y aguas gaseosas.
- b) Beta-Caroteno, color amarillo. Se utiliza en industrias de mantequilla, margarina, reposterías, quesos procesados, helados, macarrones, aceites vegetales, aderezos, cremas batidas, pasteles, dulces, pudines, sopas, gelatinas, jugos de fruta y otras bebidas.
- c) Cantaxantina, color vino rojo intenso. Se utiliza en la elaboración de productos de tomate, jugos de fruta, aderezos, embutidos, enlatados y quesos procesados.

CUADRO 6. CONTENIDO DE CAROTENOS TOTALES  
EN ACEITE DE PALMA

---

CAROTENOS (ppm)	PROCEDENCIA DEL ACEITE	REFERENCIA
330	Brasil	(Pinto, 1959 - 60)
800	Malasia	(Meanra, 1976)
404 - 828	Malasia	Müller - Mullot, 1975)
567	Malasia	(Jacobsberg, 1975)
500 - 700	Malasia	(Maclellan, 1983)
1070 - 668	Africa	(Hunter, 1946)
500 - 700	Africa	(Loncin, 1972)

---

- d) También se utilizan extractos de productos vegetales ricos en carotenoides. Entre estos están: extractos de achiote (contienen bixina), se utilizan para colorear mantequilla, queso, cereales y helados de nieve; extractos de papaya (contienen capsantina y capsorubina), se utilizan para colorear salsas, carnes y ensaladas; extractos de aceite de palma que se utilizan para colorear mantequillas y margarinas.

## 2. Utilización de Carotenoides en Raciones Animales.

La finalidad de la utilización de carotenoides en dietas animales es el mejoramiento de la coloración de los productos animales para el consumo humano. Los niveles de carotenoides en las dietas animales es un factor importante en la coloración de los productos derivados, ya que estos pigmentos no son sintetizados en los organismos de los animales (Bauernfeind y colaboradores, 1971).

El efecto de los carotenoides sobre los animales puede manifestarse en coloraciones de piel, grasas, leche, huevos y plumas. Los carotenoides utilizados en la industria avícola para fines de coloración son los oxicarotenoides. Estos proporcionan una coloración apetecible de huevos y de piel (Bauernfeind y colaboradores, 1971).

Entre las fuentes naturales utilizadas para lograr la pigmentación de los productos avícolas están: el maíz, pétalos de caléndula (Tagetes sp.), pimienta roja, fermentos concentrados, algas, extractos de achiote, extractos de papaya (Bauernfeind, 1971). Los principales carotenoides utilizados en la industria avícola son:

- a) Ester etílico del ácido beta-apo-8-carotenóico; conocido como "carofila amarilla". Produce una coloración de ama-

rillo a naranja y puede pigmentar la piel y los huevos.

- b) El beta-apo-8'-carotenal; produce una coloración amarilla o naranja; su efecto pigmentante se da sólo en huevo.
- c) La cantaxantina produce una coloración rojiza, se le conoce como "carofila roja". Su utilización es secundaria pues al utilizarse sólo, produce una coloración rojiza en la piel y en el huevo, lo que los hace menos apetecibles al consumidor.
- d) La citranaxantina tiene efecto pigmentario sólo en huevo.

### 3. Uso de Carotenoides en Farmacéuticos.

En este campo, se han encontrado aplicaciones para los carotenoides sintéticos. Los carotenoides se han utilizado para la coloración de tabletas. Se ha observado buena estabilidad de los carotenoides en el almacenamiento y en presencia de la luz. También se han utilizado en suspensiones farmacéuticas y de cosméticos, emulsiones, cremas y lociones.

### 4. Utilización de Carotenoides de los Desechos del Procesamiento del Aceite de Palma.

Los carotenoides del aceite de palma son separados de éste, principalmente en las etapas de refinamiento y de blanqueo. Los subproductos de estas etapas, los jabones y las tierras activadas, respectivamente, contienen una fuente potencial de carotenoides.

#### a) Carotenoides en jabones.

Se han hecho estudios para la utilización de los carotenoides de jabones provenientes de otros aceites, como el aceite de soya (Lipstein y colaboradores, 1967; Lipstein, 1976). Los jabones, que básicamente son sales de ácidos grasos, son

acidulados para obtener ácidos grasos libres, los cuales pueden ser incorporados a las raciones animales como fuente calórica.

Estos residuos pueden tener un alto contenido de carotenoides, dependiendo del contenido inicial de carotenoides en el aceite y la severidad del proceso de refinamiento. Estos carotenoides están constituidos por los carotenoides presentes en el aceite y por carotenoides derivados de los primeros, como consecuencia de las condiciones en el proceso de refinamiento y acidulación (Lipstein, 1976).

Para el caso del aceite de soya, se ha evaluado el poder pigmentante de los carotenoides de los ácidos grasos provenientes de los jabones acidulados, tanto en pigmentación de la piel como en la coloración de la yema de huevo. Los resultados obtenidos, a pesar de ser positivos, no son muy alentadores en el aceite de soya, porque no todos los pigmentos encontrados en los jabones acidulados son de poder pigmentante importante. Para este aceite, se encontró que la luteína era el responsable principal de la pigmentación de la piel y la yema de huevo (Lipstein, 1976). La utilización relativa de las xantofilas en relación al maíz fue de 20 a 30% para la pigmentación de la yema de huevo (calculado como la razón de la eficiencia de la utilización de xantofilas, 6%, a la eficiencia de la utilización de xantofilas del maíz amarillo, 20%).

#### b) Carotenoides en Tierras Activadas.

La eliminación de carotenoides del aceite de palma por adsorción a tierras activadas o carbón activado, ha sido utilizado entre las técnicas de blanqueo. El subproducto resultante puede aprovecharse para la extracción de carotenoides.

La adsorción de los carotenoides en tierras activadas,

es un proceso de adsorción química. En este proceso sucede algún cambio químico en el carotenoide formando un complejo sobre un catión, el que constituye un sitio activo de adsorción (Khoo, 1979). Las propiedades de absorción de los aluminosilicatos (tierras activadas), depende de la naturaleza de la arcilla, del solvente del carotenoide y de la capacidad de los cationes para formar complejos.

En algunas situaciones, estos carotenoides han sido removidos de las arcillas por un lavado con un solvente no polar como hexano. Luego se han rescatado los carotenoides de este solvente por una extracción con otro solvente, como éter-acetona 1:1 y luego, eliminado el solvente por evaporación (Yoshioka, 1977; Lin 1977; Nishin Oil Mills, 1974).

También se han obtenido concentrados utilizando carbón activado de una manera similar a las tierras activadas (Hock y colaboradores, 1980). En este caso, el carbón activado es tratado con un antioxidante (alfa-tocoferol), y es ajustado a un pH específico. Se obtienen concentrados de seis veces la concentración original.

#### c) Otros Procesos para Obtener Carotenoides.

Actualmente, se está utilizando un método para refinar aceite en el que se obtienen concentrados de carotenoides hasta el 20% del aceite original (Loncin, 1975). Este método es denominado método Graminar. En este método, primero se eliminan los ácidos grasos libres, por destilación de estos, en forma libre o esterificados. El aceite restante se transesterifica con un alcohol y los ésteres formados son destilados, para luego ser reesterificados con glicerol. El residuo no saponificable y rico en carotenoides queda al destilar los ésteres provenientes del aceite.

Otros investigadores se han basado en el mismo principio que el proceso Graminar. Por ejemplo, Yamada, describe un proceso donde 100 partes de aceite de palma (450 ppm de carotenos), se obtienen 4.8 partes de residuo con 0.9% de carotenos (Yamada y colaboradores, 1977).

El mismo autor ha realizado una extracción con hexano sobre los residuos del blanqueo. El hexano se destila del extracto y se obtiene 2.39 partes con 17.1% de carotenos, partiendo de 100 partes del residuo (Yamada y colaboradores, 1977). Este extracto se puede utilizar como agente colorante en alimentos.

#### d) Análisis Químico de Carotenoides.

En cualquier análisis de carotenoides, se pueden delimitar cuatro fases:

1. Extracción de los carotenoides del material analizado.
2. Aislamiento de un carotenoide y/o separación de distintos carotenoides.
3. Caracterización de un carotenoides.
4. Cuantificación de uno o varios carotenoides.

En cada una de las etapas de análisis, deben tenerse precauciones en el manejo de los carotenoides debido a la poca estabilidad de estos a la luz, a las temperaturas elevadas y al oxígeno. Por esas razones, se ha sugerido trabajar en atmósfera de  $N_2$ , en oscuridad y aún adicionar antioxidantes en el solvente como el BHT (Butil hidroxil Tolueno.) (Kimura y colaboradores, 1972). Esto no se hace en todas las etapas del análisis sino en aquellas en las cuales se considera crítica la acción de la luz, temperatura y oxígeno. Un ejemplo de la importancia de lo anterior puede verse en el licopeno, el cual puede disminuir hasta en 60% de su valor inicial cuando está expuesto al aire (Kimura y colaboradores, 1972).

## 1. Extracción de Carotenoides

Los carotenoides pueden extraerse con solventes inmiscibles al agua o miscibles, según el material esté deshidratado o hidratado. En el caso de material deshidratado, éste debe obtenerse por algún método que no sea secado al aire pues esto ocasiona la destrucción de los carotenoides. Generalmente, las extracciones se realizan en muestras húmedas con solventes miscibles con agua como mezclas de acetona-agua o etanol-agua (Liassen-Jensen, 1971). En algunas oportunidades es indispensable adicionar antioxidantes como quinol o agentes neutralizantes, como carbonato de calcio, piridina o dimetilamina (Liassen-Jensen, 1971). También se han informado métodos de extracción utilizando celulosa para mejorar la extracción de los pigmentos atrapados en tejidos verdes (Mattoshek, 1974).

Después de obtener el extracto, se le elimina el agua, lo cual se puede lograr por la adición de una solución salina, por extracción de los carotenoides con un solvente orgánico o por destilación azeotrópica con benceno a presión reducida.

## 2. Aislamiento de Carotenoides

En la fase de aislamiento de carotenoides, se incluyen las etapas de saponificación, partición y la técnica de cromatografía. Estas etapas no son exclusivas en su realización, depende de la naturaleza de la mezcla de los carotenoides y sus impurezas, así como la finalidad del análisis.

### a) Saponificación

Esta etapa permite la eliminación de lípidos no deseables y la clorofila. Además, nos permite separar los carotenoides ácidos de los neutros, debido a que los primeros quedan en forma de sales en la hipofase, la fase acuosa. Los carotenoides neutros se pueden quedar en la fase etérea junto con los lípidos no saponificables como los

esteroles, los cuales pueden eliminarse por una cristalización fraccionada en éter de petróleo o acetona a bajas temperaturas. Los carotenoides ácidos, como los diosfenoles, y carboxílicos, pueden ser extraídos de la fase acuosa por la acidulación del medio y una posterior extracción etérea (Liassen-Jensen, 1971).

#### b) Partición

La partición consiste en la distribución de carotenoides entre dos fases inmiscibles entre sí. Cuando se tiene carotenoides que difieren grandemente en su polaridad, se pueden aprovechar sus propiedades de polaridad para obtener una distribución heterogénea de estos carotenoides entre las dos fases. El sistema utilizado generalmente es éter de petróleo-metanol de 85-95%. Los carotenoides apolares se encontrarán en la epifase (éter de petróleo); los carotenoides polares como los dihidroxicarotenoides se encontrarán en la hipofase (fase metanólica) y los medianamente polares, como los monohidroxicarotenoides se encontrarán distribuidos entre las dos fases. De esta forma, puede obtenerse una separación burda de los carotenoides en dos grupos (Petracek, 1956).

#### c) Cromatografía

La cromatografía permite una separación más refinada de los carotenoides, en comparación a la partición. Las modalidades que han sido utilizadas dependen del trabajo específico que se esté realizando y de los recursos que se tengan. Entre las distintas formas de cromatografía se encuentran: cromatografía en columna (CC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía en papel (PC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Las técnicas cromatográficas se basan en la adsorción de los compuestos, la cual depende de la naturaleza del esqueleto de carbonos y del número o tipo de sustituyentes oxigenados (Davies, 1976). Los compuestos más polares se quedan más cerca del origen en el desarrollo del cromatograma porque son adsorbidos más fuertemente. Por ejemplo, los epóxidos son menos adsorbidos que las xantofilas (Coscia, 1975). Sin embargo, existe la técnica de cromatografía de fase reversa, donde los compuestos más polares quedan más alejados del origen.

#### Cromatografía en Columna

Esta técnica se utiliza para la separación de carotenoides en escala preparativa. Algunos adsorbentes utilizados pueden verse en Cuadro 7.

Entre los solventes utilizados para cromatografía en columna de carotenoides están éter de petróleo, éter, metanol, isopropanol, n-propanol, acetona (Coscia, 1975).

Para cromatografía en columna existen tres técnicas que han sido utilizadas en el campo de los carotenoides:

- (i) Cromatografía de Zona. En ésta, las zonas coloreadas de los distintos carotenoides son cortadas y eluidas posteriormente. Se aplica principalmente a las columnas de carbonato de calcio (Strain, 1975).
- (ii) Elusión por Etapas. Utilizando un eluyente compuesto de un solvente apolar y un polar, cuyas proporciones se alteran en forma de etapas; el eluyente se va enriqueciendo en el solvente polar. Con esta técnica se logra la elusión secuencial de los componentes menos adsorbidos y por último los adsorbidos.

CUADRO 7. ADSORBENTES UTILIZADOS PARA SEPARAR CAROTENOIDES EN CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

Adsorbente	Utilidad
Polvo de Celulosa Silicato de Magnesio Sacarosa	Utiles en separación de carotenoides polares
Alúmina Desactivada Carbonato de Zinc* Carbonato de Calcio Oxido de Magnesio Oxido de Magnesio-Supercell*	Utiles en separación de carotenoides de polaridad intermedia
Hidróxido de Calcio Alúmina Activada	Utiles en separación de carotenoides en general

(Datos tomados de Liassen-Jensen, 1971, "Isolation, Reactions". Carotenoids (O. Isler. Ed) Birkhäuser, Basle. pp 61-188); (Datos con asterisco tomados de Coscia, C. 1975, "Chromatography of Terpenoids" in.: A Laboratory Handbook for Chromatographic and Electrophoretic. (E. Heftmann, Ed) Third Ed. New York, van Nostrand Reinhold Co. pp 588-590).

(iii) Elusión en Gradiente. Consiste en un cambio gradual en la composición del solvente como en el caso de la elusión por etapas.

También se han hecho análisis de cromatografía en columna en fase reversa. En este caso, el orden de elusión es inverso: primero eluyen los compuestos más polares y de último los menos polares. Para esta técnica se han utilizado columnas de polietileno.

#### Cromatografía de Capa Fina

Esta técnica se utiliza para caracterizar o como un paso previo a la cuantificación de un carotenoide.

En el caso de una caracterización, además que permite la separación de distintos carotenoides, permite identificar a cada uno de ellos con un valor de  $R_f$  (razón de distancia recorrida por el pigmento sobre la distancia recorrida por el solvente), el cual es muy útil para el caso en que se tenga el dato en la literatura y bajo exactamente las mismas condiciones. El valor de  $R_f$  va a depender de las condiciones específicas del análisis: fase fija, solvente, grosor de la capa de adsorbente, temperatura, etc..

El uso de esta técnica se ha generalizado por la rapidez de separación y la eficiencia. Se ha logrado separar isómeros cis-trans por esta técnica (Liassen-Jensen, 1971). Entre las desventajas que presenta, están las precauciones excesivas para evitar pérdidas de carotenoides por luz, oxígeno y temperaturas; además las cantidades que se logran separar, generalmente sólo alcanzan para obtener espectros ultravioleta visible y un análisis en un espectrómetro de masas.

Al igual que la cromatografía en columna, su poder de separación se basa en la adsorción diferencial de los carotenoides presentes. Entre los sistemas de adsorción utilizados se encuentran: la Silica gel, Kieselguhr, Alúmina, Hidróxido de Calcio-Sílica Gel, Hidróxido de Magnesio y Almidón-Manitol. Entre los solventes más comunes están: el éter de petróleo-benceno, éter de petróleo - tetracloruro de carbono, cloruro de metileno, acetato de etilo - cloruro de metileno.

También se ha aplicado modalidad de fase reversa a la cromatografía de capa fina. Se han utilizado capas de celulosa o tierras activadas "Kieselguhr", impregnadas con parafina o triglicéridos por inmersión en solución de estas grasas en éter de petróleo. La fase móvil ha estado constituida por mezclas de acetona-metanol-agua. En este caso, los carotenoides polares, son los que se desplazan una mayor distancia del origen. Esta técnica ha sido aplicada con muchas ventajas (Daley, 1973). En el estudio de Daley, no se notó variación de  $R_f$  debido al tipo de tierra activada utilizada, al procedimiento de aplicación, al grosor de la capa adsorbente, a la concentración del aceite y a la saturación del tanque. En esta técnica, se pueden cromatografiar directamente extractos acuosos y no se observa el fenómeno de doble cola observado en cromatografía de capa fina por adsorción. La única etapa donde hay susceptibilidad de oxidación es durante la siembra de la placa. Se puede almacenar la placa desarrollada hasta por tres semanas a 20°C sin observar degradación. Sin embargo, presenta la desventaja que no puede utilizarse en cromatografía preparativa porque al intentar recromatografiar, el aceite residual interfiere.

En la cromatografía de capa fina de fase reversa pueden separarse las bandas de carotenoides por raspado y disolverse en un solvente apropiado para hacer una cuantificación espectrofotométrica.

#### Cromatografía en papel

Las técnicas utilizadas incluyen cromatografía de papel por adsorción en una o dos dimensiones, circular, sobre papel impregnado o sin impregnar y las técnicas correspondientes a la modificación de fase reversa.

Los mejores resultados cuantitativos se han obtenido con papeles impregnados en cromatografía circular (se ha recuperado de 97 a 100% de los carotenoides en análisis cuantitativos posteriores). Los Rf obtenidos han sido bastante reproducibles bajo condiciones de análisis estandarizadas (Liassen-Jensen, 1971). Los papeles han sido impregnados con tierras activadas "Kieselguhr", alúmina, carbonato de calcio, sílica gel, hidróxido de aluminio.

Las aplicaciones de cromatografía en papel de fase reversa en general, no han dado resultados (Davies, 1976). Sin embargo, se han logrado separar beta-apocarotenales utilizando papel impregnado con vaselina al 3% y usando como solvente metanol al 9% (Singh y colaboradores, 1973).

#### Cromatografía de gases

Esta técnica es poco apropiada para el análisis de carotenoides en general. Esto se debe a la termolabilidad de los carotenoides. En intentos de cuantificación utilizando esta técnica se ha observado destrucción total de fitol, retinol, beta-apo-8'-carotenol, beta-caroteno y cantaxantina (Taylor, 1975). Sin embargo, se han logrado analizar derivados de carotenoides hidrogenados,

como perhidroescualeno, perhidrofitoeno, perhidrolicopeno, perhidro-gama-caroteno y perhidro-beta-caroteno y sus respectivos ésteres metilados. Esta técnica puede ser útil para determinar el número de carbonos de un carotenoide o analizar los productos de hidrogenación de carotenoides (Davies, 1976).

#### Cromatografía de Gas-líquido de alta presión

En esta técnica se utiliza un solvente a alta presión que pasa a través de un soporte recubierto de adsorbentes. Este método es utilizado para separar carotenoides de cíclicos (Davies, 1976). El adsorbente que ha sido utilizado es óxido de magnesio o carbonato de zinc, el solvente utilizado puede ser una mezcla de n-hexano y tert-amil-alcohol con 1% de butil hidroxitolueno (BHT), como antioxidante. En esta técnica se puede realizar una cuantificación espectrofotométrica a 440 nm, sin pérdida o destrucción de muestra. En otro estudio se ha utilizado una fase fija C-18 sobre sílica-gel (Partisil S-OXD, Whatman Inc.) y una mezcla diluyente de cloroformo-acetonitrilo al 5% (Zakaria et. al., 1979). Con esta composición se han separado B-caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\delta$ -caroteno y licopeno.

### 3. Caracterización de Carotenoides

#### a) Pureza

Uno de los primeros pasos para caracterizar un carotenoide, después de su separación, es su purificación, que puede lograrse por técnicas cromatográficas, seguida por la cristalización del carotenoide. El número de cristalizaciones máximo es tres y depende de la cantidad y grado de impurezas.

A continuación, se mencionan algunos criterios de pureza de un carotenoide aislado y purificado.

- i. Debe ser cromatográficamente homogéneo en dos sistemas cromatográficos independientes, de papel o capa fina.
- ii. No deben haber impurezas en los cromatogramas, reveladas con ácido sulfúrico.
- iii. No deben haber zonas de los isómeros cis.
- iv. Deben poseer una estructura cristalina definida debajo del microscopio.
- v. Su punto de fusión en un capilar evacuado debe ser fino y no presentar depresiones como en el caso de muestras mezclas eutécticas.

b) Coeficiente de Partición

El coeficiente de partición también puede usarse como un criterio de caracterización. Existen cuadros de distintos coeficientes de partición en distintos sistemas de solventes (Petracek, 1956). El coeficiente de partición también nos da información de la polaridad de un carotenoide. Otro criterio utilizado para tener una medida de polaridad de un carotenoide es el  $M_{50}$  (que se refiere al porcentaje de metanol necesario para obtener un coeficiente de partición 1:1). Se les ha asignado un valor de polaridad a cada grupo y se obtiene un valor de polaridad relativa al sumar la polaridad de cada grupo. Esta polaridad relativa puede relacionarse directamente con el valor de  $M_{50}$ . Este tipo de análisis es mejor cuando el carotenoide tiene un 40 a 60% en una de las fases (Davies, 1976).

c) Propiedades Espectroscópicas

Las propiedades espectroscópicas también se pueden utilizar para dilucidar estructuras moleculares. Las propiedades espectroscópicas utilizadas en el campo de los carotenoides son: absorción ultravioleta-visible, infrarojo, resonancia, magnética nuclear y espectroscopía de masas.

i. Espectrometría Ultravioleta-visible

Esta técnica es útil tanto en la caracterización como en cuantificación. La forma del espectro depende de los grupos cromóforos presentes, del tipo de solvente y de la temperatura.

Los grupos cromofóricos más importantes lo constituyen los dobles enlaces conjugados. Conforme aumenta el número de dobles enlaces conjugados se observan efectos batocrómicos (desplazamiento de la longitud de máxima absorción a longitudes de onda mayores) y un aumento en absorptividad.

Los espectros sufren modificaciones debido a la presencia de grupos cíclicos, anillos epsilon (véase Apéndice 1), anillos aromáticos que ocasionan efectos hipsocrómicos; los grupos carbonilos ocasionan desplazamiento batocrómico y pérdida de resolución (Davies, 1976).

Los solventes más utilizados son: éter de petróleo, hexano, etanol, acetona, cloroformo, benceno, disulfuro de carbono y en menor grado, éter, metanol, piridina. En los solventes apolares, las longitudes de onda máxima son menores en relación a los polares. Valores de longitudes de onda máxima pueden encontrarse en Davies, 1976.

ii. Resonancia Magnética Nuclear

Esta técnica es útil para determinar el número de grupos metilo y sus alrededores. Se puede determinar también la naturaleza de los grupos OH en las xantofilas. Se han utilizado frecuencias de 60 a 100 MHz.

iii. Infrarojo

Esta técnica es más limitada pues sólo nos da una idea de los grupos funciones que posee. Permite distinguir

grupos hidroxilo primarios, secundarios y terciarios, grupos carbonilos, grupos aleno y acetilenos y grupos fenólicos (Davies, 1976). Entre las técnicas utilizadas están las pastillas de KBr, emulsiones con nujol y soluciones en cloroformo.

#### iv. Espectroscopía de Masas

Esta técnica nos da una idea de la composición molecular y el patrón de fragmentación da información de la estructura. El campo eléctrico aplicado es de 13 a 70 eV y a una temperatura de 180 a 250°C.

#### d) Preparación de Derivados

Se pueden realizar transformaciones en las estructuras de los carotenoides utilizando métodos químicos. Los productos resultantes pueden identificarse por alguna de las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente por algún método químico, confirmando la identidad sugerida del carotenoide.

Algunas reacciones de importancia son las siguientes (Liassen-Jensen, 1971).

1. Reacciones de adición a dobles enlaces: hidrogenación.
2. Degradaciones oxidativas: ozonólisis.
3. Oxidación con ácido crómico y permanganato.
4. Rearreglo cis-trans y de ciclación.
5. Reacciones de grupos hidroxilo: eliminación de metano, esterificación, silación, metilación, oxidación y deshidratación.

6. Reacciones de grupos carbonilos: reducciones, oxidaciones, condensaciones, adiciones, reacciones de titulación de carboxilos, oxidación de alfa-cetoles.
7. Reacciones de alcóxidos.
8. Reacciones de epóxidos: pruebas coloridas, rearrreglo a furanoides, ruptura hidrogenolítica, de-epoxidación.

#### 4. Cuantificación de Carotenoides

Para cuantificar un carotenoide presente en algún material se puede utilizar su absorción en la región ultravioleta-visible. El carotenoide se disuelve en un solvente apropiado como hexano o éter de petróleo o un solvente más polar si se trata de un carotenoide muy polar. Se requiere en general, que la absorbancia sea de 0.5 a 0.8 y que cumpla la ley de Beer-Lambert. El carotenoide analizado debe ser cromatográficamente puro.

En el caso de mezclas de carotenoides, o cuando no se dispone del coeficiente de absorptividad pueden utilizarse los valores del Cuadro 8.

En el caso de tener dos carotenoides no resueltos cromatográficamente, pero de identidad conocida y diferente absorptividad, puede utilizarse un análisis de curvas visuales o algún método computarizado para determinar las contribuciones de cada carotenoide (Davies, 1976).

Muchas veces, las absorptividades molares son idénticos para dos carotenoides: en este caso, es posible llegar a utilizar uno como standard en la elaboración de una curva de calibración y cuantificar el otro; como ejemplo: beta-caroteno y algún derivado hidroxilado (Davies, 1976).

CUADRO 8. ABSORTIVIDAD PROMEDIO DE CAROTENOIDES EN LA  
LONGITUD DE ONDA DE ABSORCION MAXIMA.

---

E%	SOLVENTE
1 cm	
2500	éter de petróleo, hexano, éter dietílico, etanol
2400	cloroformo
2300	benceno
2000	disulfuro de carbono

---

(Tomado de Davies, B. 1976. "Carotenoids" in "Chemistry and Biochemistry of plant pigments". Vol. II (T. Goodwin. Ed.) Academic Press, London, pp 38-165).

Otra técnica para cuantificar carotenoides lo constituye cromatografía líquida de alta presión (Zakaria, 1979). En este caso, es necesario preparar soluciones de carotenoides estándar.

### III. OBJETIVOS

- A. Establecer una metodología apropiada para extraer, caracterizar y cuantificar carotenoides, tomando en cuenta el equipo y los materiales de laboratorio disponibles en el país.
- B. Caracterizar y cuantificar los carotenoides del aceite de palma local.
- C. Analizar el contenido de carotenoides en los desechos de refinación alcalina y del proceso de blanqueo del aceite.
- D. Establecer un procedimiento de refinamiento alcalino y uno de blanqueo por tierras activadas que sea adecuado para lograr un aceite de buena calidad.

#### IV. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION

El aceite de palma africana es extraído de la pulpa del fruto de la planta Elaneis guineensis o sea, la palma africana o palma de aceite. Este aceite después de un procesamiento adecuado, pues de convertirse en un aceite para consumo humano.

La extracción del aceite de palma es un proceso atractivo puesto que esta planta es la que produce la mayor cantidad de aceite por área cultivada, (Banco de Guatemala 1981). En la producción mundial de aceite para consumo humano, el de palma es el tercero en importancia, después del de soya o girasol (4038, 11060 y 4364 miles de toneladas métricas anuales, respectivamente), (Banco de Guatemala, 1981).

En Guatemala, el aceite de palma no se utiliza para consumo humano, sino es utilizado en su estado crudo para incluirlo en las formulaciones de concentrados para animales y en fábricas de jabones. Se puede considerar que el aceite de palma puede venir a aliviar el déficit de aceites que existe en el país (véase cuadro 1). Por esta razón es de importancia el establecimiento de plantas procesadoras de este aceite. En este trabajo se evalúan distintas condiciones en las etapas principales del refinamiento del aceite, el blanqueo y el refinamiento alcalino. Basándose en estas condiciones puede implementarse un procesamiento adecuado de refinamiento del aceite de palma.

La implementación del refinamiento de aceite de palma, trae como consecuencia la producción de desechos, los cuales vuelven más atractivo el procesamiento del aceite cuando estos son aprovechados. Uno de los desechos de este procesamiento lo constituyen los jabones, producidos en el refinamiento alcalino.

En estos desechos, quedan relativamente grandes cantidades de carotenoides (véase Apéndice A), que se encontraban originalmente en el aceite de palma. En otra etapa, el proceso de refinamiento, el blanqueo, se eliminan los carotenoides aún presentes en el aceite de palma por adsorción en carbón activado o tierras activadas. Los dos materiales resultantes en los procesos anteriores, los jabones y las tierras activadas, constituyen una fuente potencial de carotenoides, los cuales son de importancia industrial y alimenticia como agentes colorantes (véase Antecedentes). Por ejemplo, una aplicación de estos pigmentos es su uso en la industria avícola para proporcionar un color agradable a la yema de los huevos y a la piel de las aves. En este trabajo, se estudia el nivel de carotenoides en los desechos de aceite de palma, para poder establecer la calidad de los mismos como fuentes de pigmento.

En nuestro medio, no se cuenta con métodos adecuados para el análisis de carotenoides, por falta de equipo, métodos muy largos o no optimizados. Por las razones anteriores es importante la implementación de técnicas analíticas para el análisis de carotenoides. En este trabajo, se presenta un procedimiento para extracción, separación y cuantificación de carotenoides.

## V. MATERIALES Y METODOS

En esta sección, se describen los pasos seguidos durante el desarrollo experimental. Se hace referencia a los métodos utilizados en cada etapa. Para una descripción completa de los métodos utilizados, véase Apéndice B.

Las etapas experimentales son: establecimiento de un proceso de refinamiento del aceite; y análisis y cuantificación de los carotenoides en los materiales de cada una de las etapas del proceso de refinamiento.

### A. Establecimiento del Proceso de Refinamiento.

En esta etapa, se investigó sobre lo siguiente:

1. Selección de las condiciones y procedimientos de refinamiento alcalino.
  2. Selección de las condiciones y procedimiento de blanqueo de aceite.
  3. Establecimiento de otras etapas auxiliares en el proceso de refinamiento del aceite.
  4. Ordenamiento de las etapas del proceso de refinamiento del aceite.
1. Selección de las Condiciones y Procedimiento del Refinamiento Alcalino.

El procedimiento que se tomó como punto de partida consiste en una neutralización de los ácidos grasos libres con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 10% (Cocks y Redde, 1966. Véase Apéndice B).

2. Selección de Condiciones y Procedimiento del Blanqueo del Aceite.

El procedimiento que se seleccionó como punto de partida, consiste en un blanqueo por adsorción química, utilizando tierras blanqueadoras o carbón activado a temperaturas del orden de 100°C (Cocks y Redde, 1966).

3. Establecimiento de Otras Etapas Auxiliares en el Proceso del Refinamiento del Aceite.

Estas etapas constituyen el desgomado del aceite y el lavado del aceite (véase Apéndice B).

4. Estructuración de las Etapas del Refinamiento del Aceite.

Después de establecidas las mejores condiciones para las etapas de blanqueo y refinamiento alcalino, se procedió a evaluar el orden de las etapas y la repetición de las mismas.

B. Análisis y Cuantificación de los Carotenoides en los Materiales de cada una de las Etapas del Proceso de Refinamiento.

En esta etapa se investigó lo siguiente:

1. Establecimiento del procedimiento de extracción de carotenoides del aceite de palma, jabones y tierras activadas.
2. Cuantificación de carotenoides totales.
3. Cuantificación y balance de carotenoides que se encuentran en los materiales en las distintas etapas del proceso.
4. Caracterización de los carotenoides contenidos en el aceite de palma por cromatografía de capa fina y espectrofotometría visible.

## 1. Establecimiento del Procedimiento de Extracción de Carotenoides del Aceite de Palma, Jabones y Tierras Activadas.

### a) Aceites y Jabones.

El proceso de extracción de carotenoides que se tomó como punto de partida es una saponificación con KOH, seguido por una extracción del material con éter etílico (Davies, 1976). La saponificación sucede en baño maría de 5 a 10 minutos en la oscuridad y con un flujo de nitrógeno. El extracto etéreo es lavado y secado previo a su uso como solución de carotenoides.

### b) Tierras Activadas.

En este caso, se eliminan aceites y otros compuestos, lavando con hexano las tierras activadas que han sido utilizadas en el blanqueo. Los carotenoides se extraen con éter dietílico analítico y esta solución es analizada directamente.

## 2. Cuantificación de Carotenoides Totales.

Se cuantifican espectrofotométricamente utilizando como estándar una solución de beta-caroteno. Este estándar en solución etérea se utilizó para construir una curva de calibración a 450 nm,

## 3. Cuantificación y Balance de Carotenoides que se encuentran en los Materiales en las Distintas Etapas del Proceso.

Los materiales en los cuales se efectuó el análisis de carotenoides totales, incluyen los siguientes: en el aceite crudo, después del refinamiento alcalino, en el aceite blanqueado, en los jabones, en las tierras activadas.

4. Caracterización de los Carotenoides Contenidos en el Aceite de Palma, por Cromatografía de Capa Fina de Fase Reversa.

Esta técnica permite la separación de los carotenoides que se encuentran en el extracto etéreo del aceite de palma. En este caso, la fase fija es sílica Gel G, recubierta de parafina y la fase móvil es una mezcla de metanol, acetona, benceno, isopropanol, agua. Después de desarrollado el cromatograma, se raspa la región de sílica con carotenoides adsorbidos; esta sílica es eluída a través de un limpiador micro. El extracto se utiliza para caracterizar y cuantificar espectrofotométricamente el carotenoide de la mancha.

#### C. Materiales.

1. Aceite de palma africana. Origen: Finca Bella Vista, San Sebastián, Retalhuleu. Almacenado en refrigeración a 2°C.
2. Tierras Activadas: Decalite, Tierras de Fuller, Tonsil Optima, Carbón Activado (fuente desconocida).
3. Reactivos grado analítico (Merck): sulfato de sodio anhidro, hidróxido de sodio, sílica gel G, hidróxido de potasio, fenolftaleína, ftalato ácido de potasio, parafina Paraplast (Sherwood).
4. Estándar de beta-caroteno, SIGMA y MCB.
5. Solventes: metanol, acetona, éter de petróleo, 30-55 C, benceno, cloroformo, éter dietílico (Merck). Alcohol 95° (ILG).
6. Acidos: sulfúrico y fosfórico (Merck).
7. Balanzas: analítical meter H80; Ohaus Triple Beam Balance.

8. Horno: Blue M, Modelo OV-18A; Horno al vacío GCA, Modelo 19, presión 22" Hg. Estufas y agitadores Corning. Camisas de calentamiento, Glas-Col Apparatus Co. Cintas de Calentamiento. Transformador. Baño de temperatura controlada, Fisher Versa-Bath. Refrigeradora Frigidaire, General Motors.
9. Cámara para sembrar placas de cromatografía. Cámaras para el desarrollo de placas cromatográficas. Placas de vidrio de 20 x 20 cm. Desecador con sulfato de calcio.
10. Kit de síntesis orgánicas, Corning. Rotaevaporador (Büchi Laboratoriums-Technick AG). Aparato de extracción, Soxhlet.
11. Papel filtro grueso. Tela de gabardina.
12. Nitrógeno (Fabrigas). Regulador de cilindro de hidrógeno, Matheson.
13. Espectrofotómetro Lambda 5, Perkin Elmer. Espectrofotómetro Spectronic 21, Bausch & Lomb.

## VI. RESULTADOS

### A. Establecimiento del Proceso de Refinamiento.

el aceite de palma que se utilizó fue obtenido de la planta extractora de la Finca Buena Vista, San Sebastián, Retalhuleu. El aceite utilizado en los refinamientos 1 a 5, se conservó en el refrigerador hasta 8 meses después de obtenido. Otra muestra de aceite utilizado en los refinamientos 6 a 9, se conservó en el refrigerado hasta 4 meses después de obtenido.

#### 1. Selección del Procedimiento y de las Condiciones de Refinamiento Alcalino.

Se efectuaron 9 pruebas de refinamiento alcalino (véase Cuadro 9). En todas las pruebas se logró obtener un número ácido menor o igual que uno. El número ácido promedio del aceite, después de refinado es  $0.9 \pm 0.2$  mg KOH/g de aceite (incertidumbre estimada según el intervalo de confianza al 5%). El número ácido promedio del aceite crudo utilizado en las pruebas de refinamiento alcalino 1 al 5 fue de  $15.9 \pm 0.9$  mg KOH/g de aceite el aceite crudo utilizado en las pruebas de refinamiento 6 al 9 tenía un número ácido promedio del  $9.7 \pm 1.4$  mg KOH/g de aceite (incertidumbre estimada según el intervalo de confianza al 5%). Ambas muestras de aceite crudo fueron obtenidas en diferente época.

En las pruebas de refinamiento 1, 2, 6, 7, 8 y 9, el sistema de separación del aceite fue decantación directa del aceite (véase Cuadro 9); en este caso el aceite era decantado aprovechando que se encontraba formando una capa en la parte superior de los jabones. En las pruebas de refinamiento 3, 4 y 5, el sistema de separación del aceite fue rebalse (véase Cuadro 9); en este

caso, se introducía agua en la masa jabonosa de manera que el volumen de la fase de los jabones aumentara, logrando elevar el nivel de la capa de aceite hasta que ésta podía ser rebalsada y separada de los jabones. No se encontró que este factor incidiera de manera importante en el rendimiento del refinamiento alcalino.

El tiempo que estaba en contacto el aceite con los jabones afectó el rendimiento del refinamiento (véase Cuadro 9). Cuando este período fue una noche (doce horas), el rendimiento promedio fue  $64 \pm 4\%$  (incertidumbre estimada con el intervalo de confianza al 5%, cuatro muestras). Cuando el período de contacto fue 4 horas, el rendimiento promedio fue  $82 \pm 9\%$  (incertidumbre estimada con el intervalo de confianza al 5%, 5 muestras). Era conveniente separar el aceite después del período de 4 horas de contacto del aceite con los jabones, en vez de separarlo hasta el día siguiente.

Los jabones resultantes eran una masa de jabones, aceite y agua. Al eliminar el agua por calentamiento en horno, se encontró que el porcentaje promedio en peso de los jabones (base seca), en relación al aceite refinado es  $24 \pm 6\%$  (incertidumbre estimada según intervalo de confianza al 5%, 7 muestras. Véase Cuadro 9). No se pudo determinar la influencia del número del aceite crudo, del período de contacto jabón-aceite y de la forma de separación del aceite, sobre el porcentaje obtenidos en el refinamiento.

## 2. Selección del Procedimiento y Condiciones de Blanqueo de Aceite.

Los agentes blanqueadores evaluados son Decalite, tierras de fuller, Tonsil Optima y Carbón Activado (véase Cuadro 10). El agente blanqueador se utilizó en el es-

CUADRO 9. RENDIMIENTO DE LOS PROCESOS DE REFINAMIENTO ALCALINO.

REFINAMIENTO	NUMERO ACIDO DEL ACEITE CRUDO (mgKOH/g)	NUMERO ACIDO DEL ACEITE REFINADO (mgKOH/g)	NUMERO ACIDO DEL ACEITE REFINADO (mgKOH/g)	PORCENTAJE DE JABONES SECA (%)	PERIODO DE CONTACTO JABON-ACEITE	FORMA DE SEPARACION DE ACEITE	RENDIMIENTO
1	15.1 ± 0.4	0.8 ± 0.1	29 ± 3	12 horas	Decantación	68.2 ± 0.7	
2	15.3 ± 0.4	0.9 ± 0.1	-	12 horas	Decantación	63.4 ± 0.6	
4	16.4 ± 0.4	-	22 ± 2	12 horas	Revalse	63.6 ± 0.6	
8	9.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	16 ± 2	12 horas	Decantación	61.7 ± 0.6	
PROMEDIO	64 ± 4 <sup>b</sup>						
3	16.4 ± 0.4	-	14 ± 1	4	Revalse	83.2 ± 0.8	
5	16.4 ± 0.4	-	20 ± 2	4	Revalse	84.0 ± 0.8	
6	10.4 ± 0.2	-	12 ± 1	4	Decantación	79.0 ± 0.8	
7	8.5 ± 0.2	-	37 ± 4	4	Decantación	86.0 ± 0.8	
9	10.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	22 ± 2	4	Decantación	78.2 ± 1.0	
PROMEDIO	82 ± 9 <sup>b</sup>						

- a. Incertidumbres estimadas por propagación de error. Las incertidumbres de rendimiento de aceite se les puso un factor de ponderación de 5. Las incertidumbres de los jabones se estimaron en un 10% del valor del porcentaje de jabones.
- b. Las incertidumbres de los promedios de rendimiento son intervalos de confianza a un nivel de 5%.
- c. No se cuenta con los valores correspondientes a las casillas con guión.

CUADRO 10. ENSAYO DE BLANQUEO DE ACEITE DE PALMA.

AGENTE BLANQUEADOR	REFINAMIENTO <sup>b</sup>	PORCENTAJE DE AGENTE <sup>a</sup> (%)	TEMPERATURA ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )	CoF <sup>a,e</sup>	C S <sup>f</sup>
DECALITE SIN ACTIVAR	3	2.0 $\pm$ 0.1	200	6.0 $\pm$ 0.6	+
	2	6.0 $\pm$ 0.2	100	0.9 $\pm$ 0.1	+
	1	2.0 $\pm$ 0.1	110	1.0 $\pm$ 0.1	+
DECALITE ACTIVADO	3	2.0 $\pm$ 0.1	160	5.8 $\pm$ 0.5	-
FULLER SIN ACTIVAR	3	2.0 $\pm$ 0.1	145	0.23 $\pm$ 0.02	+
	2	2.0 $\pm$ 0.1	110	0.61 $\pm$ 0.02	+
FULLER ACTIVADO	3	2.0 $\pm$ 0.1	175	0.8 $\pm$ 0.1	-
	4	2.0 $\pm$ 0.1	120	0.8 $\pm$ 0.1	+
TONSIL OPTIMA ACTIVADA	6	2.0 $\pm$ 0.1	120	-	-
CARBON <sup>c</sup> ACTIVADO	6	2.0 $\pm$ 0.1	115	-	-
FULLER ACTIVADO <sup>d</sup>	5	2.0 $\pm$ 0.1	120	-	+

- a. Incertidumbre estimada por propagación de error.
- b. El aceite utilizado en el ensayo de blanqueo, fue obtenido del refinamiento indicado en esta columna.
- c. Carbón activado elaborado a partir de la cáscara de la semilla de *Hevea brasiliensis*.
- d. Prueba efectuada en atmósfera de  $\text{N}_2$ .
- e. Co F: Color Fotométrico.
- f. C S: Color en relación al aceite de soya. (-) significa aceite más claro que el aceite de soya refinado. (+) significa aceite más oscuro que el aceite de soya refinado.

tado que se obtuvo (sin activar) y activado (calentado a  $100^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos antes del blanqueo). Los agentes blanqueadores se consideraron efectivos si disminuían el color del aceite de palma en un grado mayor que el color del aceite de soya refinado. El color fotométrico (Co F), no resultó ser un parámetro efectivo para determinar el blanqueo de un aceite (véase Cuadro 10).

Los agentes blanqueadores efectivos fueron Tonsil Optima y el Carbón Activado. Los otros agentes blanqueadores funcionaban si la temperatura se elevaba arriba de los  $160^{\circ}\text{C}$  y si habían sido previamente activados (véase Cuadro 10).

La prueba de blanqueo en atmósfera de nitrógeno, utilizando Fuller Activado, también resultó negativa.

El color fotométrico, Co F, como parámetro de blanqueo no resultó efectivo porque los valores obtenidos para determinado aceite no coincidían con el color percibido visualmente. Por ejemplo, para Decalite, se obtienen valores altos de Co F ( $5.8 \pm 0.5$ ), cuando se somete el aceite a altas temperaturas ( $160^{\circ}\text{C}$ ), aunque el aceite aparentemente está blanqueado. En las tierras activadas de Fuller, el color fotométrico fue bajo ( $0.8 \pm 0.1$ ;  $120^{\circ}\text{C}$ ), aunque el aceite no haya sido blanqueado.

3. Establecimiento de otras Etapas Auxiliares en el Proceso de Refinamiento del Aceite.
  - a) Desgomado del Aceite.

En los refinamientos 7 y 8, antes de la neutralización con álcali, se desgomó el aceite con ácido fosfórico. Precipitaron gomas de apariencia negra. La recuperación de aceite en esta etapa fue:  $99.3 \pm 0.5\%$  (incertidum-

bre calculada por propagación de error). En el refinamiento alcalino y en el blanqueado que se hicieron posteriormente no se percibieron diferencias (véase Cuadros 9 y 10).

b) Lavados de aceite.

El aceite del refinamiento 3 fue lavado con agua a  $90^{\circ}\text{C}$ , después del refinamiento alcalino. Esta etapa aumentó el contenido de humedad de  $0.40 \pm 0.05\%$  a  $0.92 \pm 0.05\%$ .

4. Ordenamiento de las Etapas del Proceso de Refinamiento.

En base a los resultados de la selección de condiciones para el proceso de refinamiento alcalino y de blanqueo del aceite, se evaluaron dos secuencias para el refinamiento del aceite, estas secuencias pueden verse en las figuras 3 y 4. Los resultados de estas secuencias pueden verse en los Cuadros 11 y 12.

La secuencia # 1 corresponde al refinamiento 8. Primero se realiza un refinamiento alcalino, seguido de dos blanqueos con Tonsil Optima, la eficiencia de la secuencia completa es de  $57 \pm 1\%$ .

El número ácido aumentó con el primer blanqueo en un  $23 \pm 13\%$ . En el segundo blanqueo no se percibió aumento en el número ácido. La secuencia # 2 corresponde al refinamiento 9. Primero se realizó un blanqueo, luego un refinamiento alcalino y se finalizó con un blanqueo. La eficiencia de la secuencia completa es de  $71 \pm 1\%$  y el número ácido aumentó durante el primer blanqueo en un  $15 \pm 6\%$ . En el segundo blanqueo no se percibió aumento en el número ácido.

CUADRO 11. RESULTADOS DE LA SECUENCIA # 1.  
(REFINAMIENTO 8)

ETAPA	MATERIAL	% ACEITE	No. Acido <sup>a</sup> (mg KOH/g)	EFICIENCIA DE LA ETAPA (%)
REFINAMIENTO ALCALINO	Aceite crudo	60 ± 6 <sup>b</sup>	9.4 ± 0.4	62 ± 0.6
	Jabones <sup>d</sup>			
	Aceite Refinado		1.1 ± 0.1	
PRIMER BLANQUEO	Tonsil Optima Utilizado	29 ± 0.2		95 ± 0.9
	Aceite Semiblan- queado		1.4 ± 0.1	
SEGUNDO BLANQUEO	Tonsil Optima Utilizado	29 ± 0.2 <sup>c</sup>		96 ± 1.0
	Aceite Final		1.4 ± 0.1	

- a. Incertidumbres calculadas por propagación de error. La incertidumbre de la eficiencia de la etapa se ponderó por un factor de 5.
- b. La incertidumbre se estimó en un 10%.
- c. Este dato es estimado a partir del % de aceite del primer blanqueo de esta secuencia.
- d. Otros datos de refinamiento 8, pueden verse en el Cuadro 9.

CUADRO 12. RESULTADOS DE LA SECUENCIA # 2.  
(REFINAMIENTO 9)

ETAPA	MATERIAL	% ACEITE	No. Acido <sup>a</sup> (mg KOH/g)	EFICIENCIA DE LA ETAPA (%)
PRIMER BLANQUEO	Aceite Crudo		9.1 ± 0.4	
	Tonsil Optima Utilizado	27.2 ± 0.5 <sup>a</sup>		
	Aceite Semiblan- queado		10.5 ± 0.4	95.9 ± 1.0
REFINAMIE- NTO ALCALINO	Jabones <sup>c</sup>	73.5 ± 7 <sup>b</sup>		
	Aceite Refinado		0.9 ± 0.1	78.2 ± 0.8
SEGUNDO BLANQUEO	Tonsil Optima Utilizado	38.2 ± 0.3 <sup>a</sup>		
	Aceite Final		0.9 ± 0.1	95.0 ± 1.0

- a. Incertidumbre calculada por propagación de error. La incertidumbre de la eficiencia de la etapa se ponderó por un factor de 5.
- b. La incertidumbre se estimó en un 10%.
- c. Otros datos de refinamiento 9, pueden verse en el Cuadro 9.

FIGURA 3. SECUENCIA DE REFINAMIENTO DE ACEITE # 1.  
(REFINAMIENTO 9)

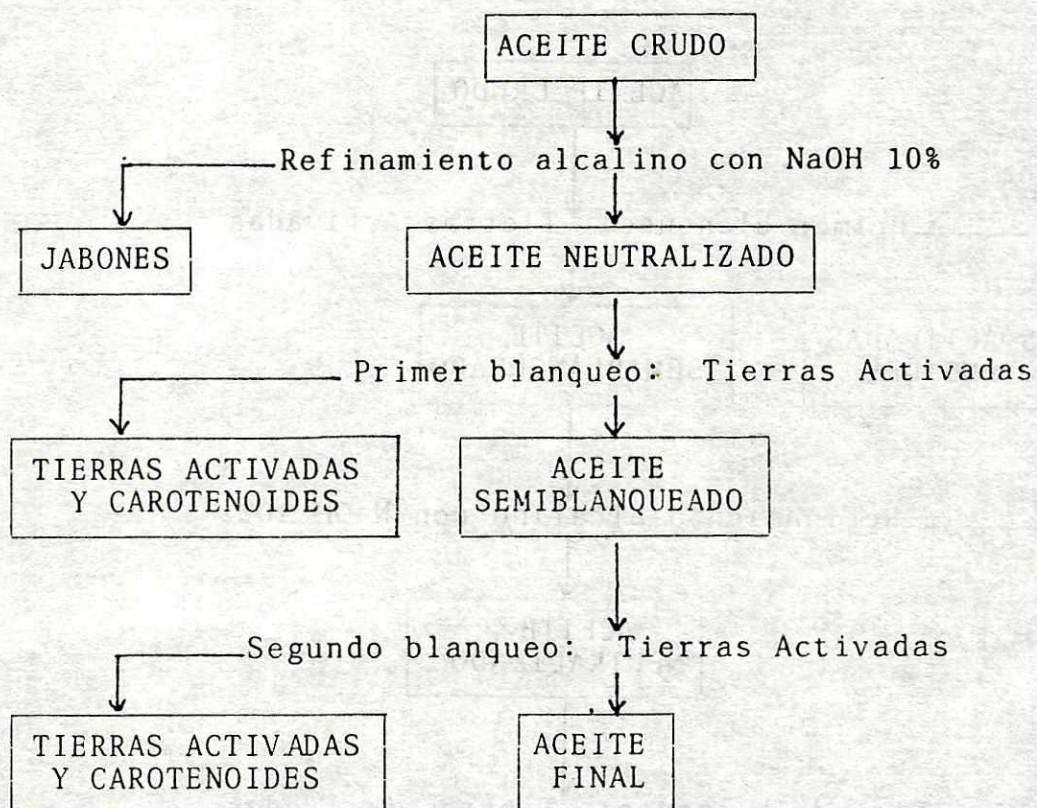
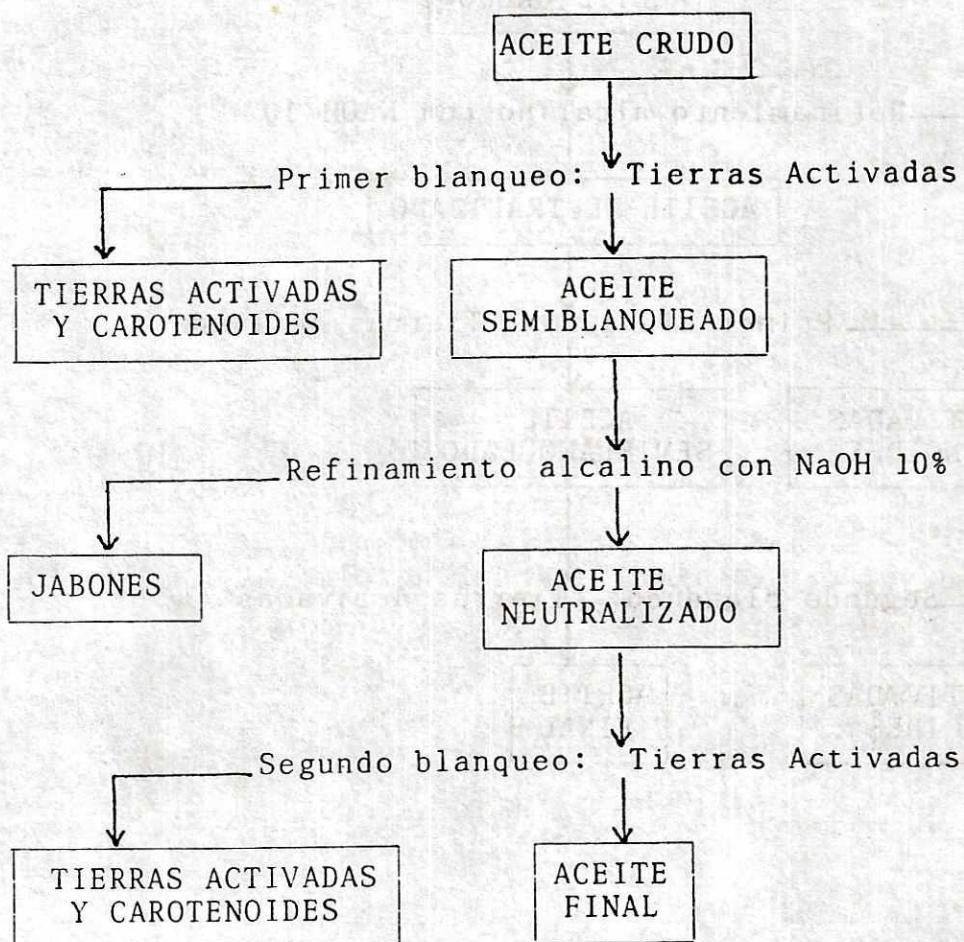


FIGURA 4. SECUENCIA DE REFINAMIENTO DE ACEITE # 2.  
(REFINAMIENTO 9)



B. Análisis y Cuantificación de Carotenoides en los Materiales de Cada una de las Etapas del Proceso de Refinamiento.

El aceite utilizado en este estudio, provino todo de la planta extractora de la Finca Buena Vista, San Sebastián, Retalhuleu. El aceite utilizado estuvo almacenado en refrigerador por cuatro meses antes de usarse. Para la caracterización por cromatografía de capa fina, se utilizó aceite almacenado durante dos meses, antes de usarse.

1. Establecimiento del Procedimiento de Extracción de Carotenoides de Aceite de Palma, Jabones y Tierras Activadas.

El procedimiento que permitió la obtención de un extracto etéreo homogéneo, libre de aceite, de una fase residual sin carotenoides y un tiempo corto para realizarlo puede verse en el Apéndice B.

2. Cuantificación de Carotenoides Totales.

Se preparó una solución de Beta-caroteno cristalino trans de  $(9.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$  g/100 ml. en éter dietílico, la cual se utilizó para construir una curva de calibración y calcular el coeficiente de absortividad (véase Apéndice C). El coeficiente de absortividad calculado es  $E = 2323 \pm 100 \text{ cm}^{-1} (\text{g}/100 \text{ ml})^{-1}$  a una longitud de onda de  $451 \pm 2 \text{ nm}$ . Se ha reportado  $E = 2450 - 2590 \text{ cm}^{-1} (\text{g}/100 \text{ ml})^{-1}$  para Beta-caroteno (Davies, 1976). En base a la curva de calibración, el contenido de carotenoides totales en el aceite de palma crudo es  $540 \pm 55$  (incertidumbre determinada por el intervalo de confianza con un nivel de probabilidad de 5% y seis muestras analizadas).

3. Cuantificación y Balance de Carotenoides que se Encuentran con los Materiales en las Distintas Etapas de Proceso de Refinamiento del Aceite.

En los Cuadros 13 y 14 pueden verse los niveles de carotenoides en los materiales que se encuentran en los procesos de refinamiento de aceite. Para estimarlos, se utilizó la curva de calibración descrita en el Apéndice C. El aceite crudo presentó  $537 \pm 10\%$  ppm (tres muestras analizadas). El aceite final presentó  $1.7 \pm 12\%$  y  $3.8 \pm 2\%$  ppm para las secuencias de refinamiento # 1 y # 2, respectivamente.

El contenido de carotenoides en las tierras activadas fue más elevado en el segundo blanqueo de la secuencia # 1 que en los dos blanqueos de la secuencia # 2 ( $57.7 \pm 12\%$  ppm. secuencia # 1, segundo blanqueo;  $4.8 \pm 7\%$  ppm. secuencia # 2, primer blanqueo y  $8.1 \pm 5\%$  ppm. secuencia # 2, segundo blanqueo).

En los jabones, el contenido de carotenoides fueron  $235 \pm 8\%$  ppm. en la secuencia # 1 y  $393 \pm 32\%$  ppm. en la secuencia # 2.

Las etapas de blanqueo ocasionaban una mayor pérdida de carotenoides en el aceite que la etapa de refinamiento alcalino. En la secuencia # 1, se nota, para los blanqueos (véase Cuadro 13), una pérdida de carotenoides de 93% y 79%, contra 79% para el refinamiento alcalino. En la secuencia # 2, se nota, para los blanqueos (véase Cuadro 14), una pérdida de carotenoides de 77% y 95% contra 41%. También se nota una mayor pérdida de carotenoides en el blanqueo, cuando las tierras activadas se adicionan a temperaturas elevadas. En la secuencia # 1, se adicionan las tierras activadas a  $110 \pm 5^{\circ}\text{C}$  obteniéndose una pérdida de carotenoides de 93%; de igual manera en la secuencia # 2, segundo blanqueo, se adicionan las tierras activadas  $90 \pm 5$ , obteniéndose una pérdida de caro-

CUADRO 13. CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES EN LA SECUENCIA # 1. (REFINAMIENTO 8)

ETAPA.	MATERIAL	NIVELES DE <sup>a</sup> CAROTENOI- DES (PPM)	% DE PERDI- DA DE <sup>b</sup> CA- ROTENOIDES EN ACEITE	TEMPERATURA <sup>c</sup> -MAXIMA ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) -ADICION ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )
	Aceite Crudo	537 $\pm$ 10%		
REFINAMIENTO ALCALINO	Aceite Refinado	113 $\pm$ 13%	79%	
	Jabones (Base Seca)	235 $\pm$ 8%		
PRIMER BLANQUEO	Aceite Semiblan- queado	8.2 $\pm$ 52%	93%	120
	Tierras	57.7 $\pm$ 12% <sup>d</sup>		110
SEGUNDO BLANQUEO	Aceite Final	1.7 $\pm$ 12%	79%	115
	Tierras	57.7 $\pm$ 12%		75
JABONES	Muestra de Industria (Honduras)	19.4 $\pm$ 5%		

- a. Incertidumbres utilizadas son la desviación estándar relativa (se analizaron 3 muestras de aceite).
- b. La pérdida de carotenoides en el aceite se calculó así:
- $$100\% \times \frac{(\text{ppm}) \text{ carotenoides antes de etapa} - (\text{ppm}) \text{ después de etapa}}{(\text{ppm}) \text{ carotenoides antes de etapa}}$$
- c. Las temperaturas máximas y de adición se refieren a la temperatura mayor alcanzada en la etapa y a la temperatura en que se le adicionaron las tierras activadas, respectivamente.
- d. Datos estimados a partir de segundo blanqueo.

CUADRO 14. CUANTIFICACION DE CAROTENOIDES EN LA SECUENCIA # 2. (REFINAMIENTO 9)

ETAPA	MATERIA	NIVEL DE <sup>a</sup> CAROTENOIDES (ppm)	% DE PERDIDA DE <sup>b</sup> CAROTENOIDES EN ACEITE	TEMPERATURA -MAXIMA(±5 °C) -ADICION(±5 °C)
	Aceite Crudo	537 ± 10%		
PRIMER BLANQUEO	Aceite Semiblanqueado	123 ± 7%	77%	115
	Tierras	4.8 ± 7%		70
REFINAMIENTO ALCALINO	Aceite Refinado	72 ± 5%	41%	
	Jabones (Base Seca)	393 ± 32%		
SEGUNDO BLANQUEO	Aceite Final	3.8 ± 2%	95%	110
	Tierras	8.1 ± 5%		98

- a. Incertidumbres utilizadas son la desviación estándar relativa (se analizaron 3 muestras de aceite).  
 b. La pérdida de carotenoides en el aceite se calculó así:

$$100\% \times \frac{(\text{ppm}) \text{ de carotenoides antes etapa} - (\text{ppm}) \text{ de carotenoides después etapa}}{(\text{ppm}) \text{ de carotenoides antes de etapa}}$$

- c. Las temperaturas máxima y de adición se refieren a la mayor temperatura alcanzada en la etapa y a la temperatura que se adicionaron las tierras activadas, respectivamente.

tenoides de 95%. En el resto del blanqueo la temperatura de adición de las tierras activadas fue abajo de  $75^{\circ}\text{C}$  obteniéndose pérdidas de carotenoides de 77% y 79%.

4. Caracterización de los carotenoides contenidos en el aceite de palma por cromatografía de capa fina y espectrofotometría visible.

a. Espectros en el rango visible.

Se obtuvo un espectro de un extracto etéreo de aceite de palma crudo y un espectro del extracto etéreo del aceite procesado en la secuencia de refinamiento de aceite # 2. Estos espectros pueden verse en las Gráficas 1 y 2, respectivamente. Para el aceite de palma crudo (Gráfica 1), se notan máximos en longitudes onda  $445 \pm 1$  nm para el extracto concentrado. El espectro del extracto diluido se aproxima al espectro del componente del estándar  $R_f = 0.0$ , desarrollado en el sistema cromatográfico metanol:acetona (5:1, véase Gráfica 5).

En el aceite de palma procesado el espectro pierde la forma característica del espectro de absorción de los carotenoides (Gráfica 2). El espectro visible del extracto etéreo de los jabones (secuencia de refinamiento # 2), puede verse en la Gráfica 3. Se nota que la longitud máxima de absorción sigue siendo la característica del Beta-caroteno  $441 \pm 1$  nm; sin embargo, el espectro ha perdido la forma característica.

El espectro visible del extracto etéreo de las tierras activadas utilizadas en el blanqueo, puede verse en la Gráfica 4. Se nota que cuando se ha extraído la tierra activada previamente con hexano, no se nota un máximo de región ultravioleta. Cuando no se ha extraído previamen-

te con hexano se nota una absorción máxima de  $443 \pm 1$  nm. El espectro observado no coincide con el del Beta-caroteno o del extracto del aceite crudo.

b. Separaciones Cromatográficas de los Extractos Etéreos.

Los resultados de los diferentes sistemas cromatográficos evaluados pueden verse en el Cuadro 15. Se nota que en todos los sistemas, a excepción del sistema metanol: acetona (1:5), fueron efectivos para separar las manchas A y B. La mejor separación se logró con el sistema metanol:acetona (15:1),  $33 \pm 4\%$  para el extracto etéreo y  $27 \pm 4\%$  para el estándar de Beta-Caroteno.

La mancha C sólo se notó en los sistemas cromatográficos metanol:acetona (7:1) y (5:1). En estos sistemas, los extractos utilizados tenían siete días de preparación.

En las gráficas 5 y 6 pueden verse espectros de cada una de las manchas de Beta-caroteno y del extracto etéreo del aceite de palma, separadas en el sistema metanol: acetona (5:1). Se nota que en ambos casos, la mancha A carece de un máximo en la región 350 - 550 nm y que aumenta en absorbancia en la región ultravioleta del espectro. Las manchas B y C si presentaron un máximo.

CUADRO 15. SEPARACION DE CAROTENOIDES DEL EXTRACTO ETereo DEL ACEITE DE PALMA  
CRUDO POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA.

SISTEMA	Rf x 100% Promedio de las manchas de (EXTRACTO ETereo DE ACEITE)		Porcentaje de Separación de Manchas A y B (+4)	Porcentaje de Separación de Manchas B y C (+4)	Rf x 100% Promedio Estándar Beta-caroteno		Porcentaje de Separación de Manchas A y B
	A (+3)	B (+3)			A (+3)	B (+3)	
i	91	77	14		92	84	8
ii	84	73	11	20	75	62	13
iii	84	68	16	14	78	63	15
iv	--	--	--	--	--	--	--
v	82	54	16		79	62	16
vi	83	50	33		79	52	27

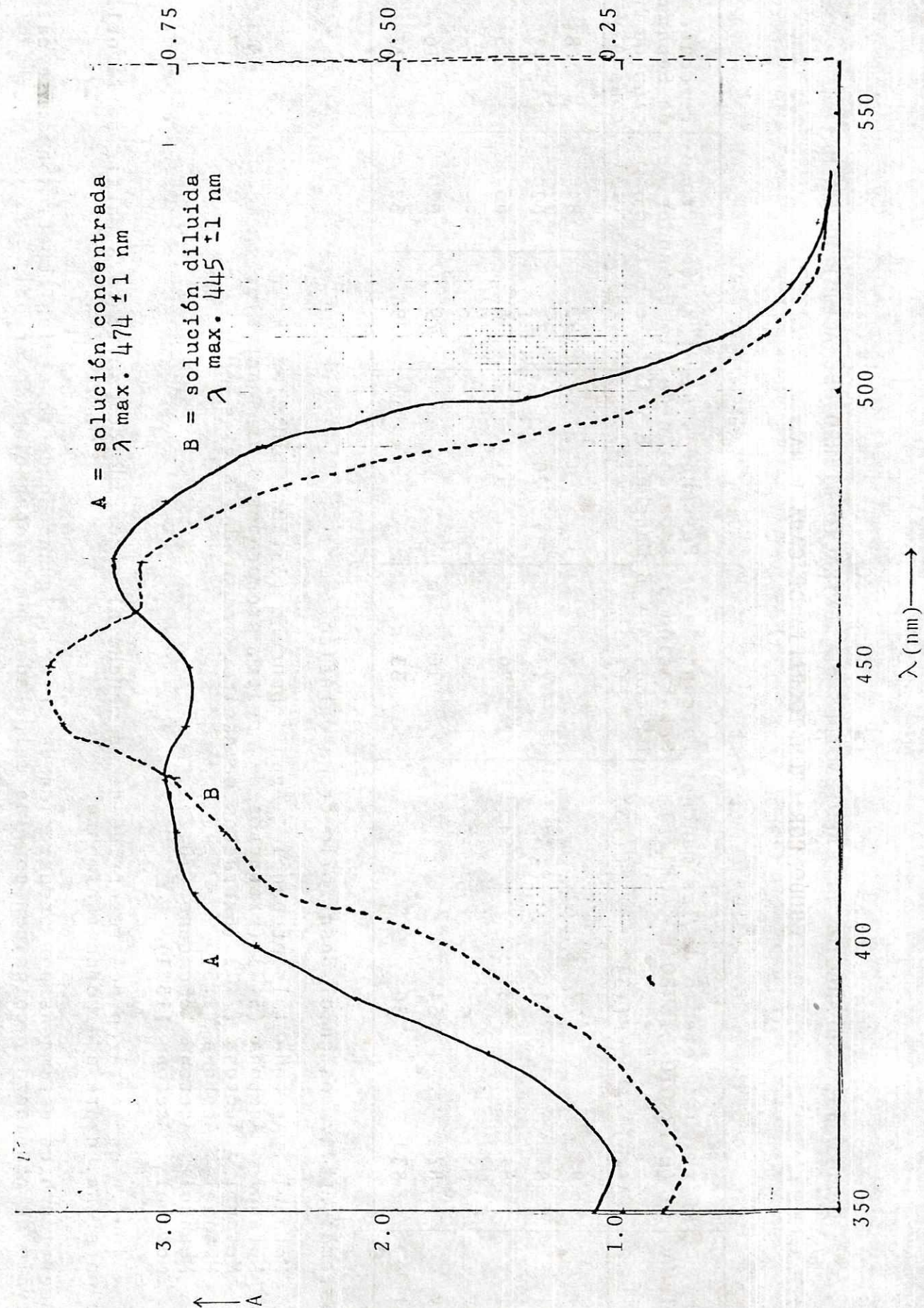
a. Sistemas utilizados en el desarrollo cromatográfico:

- i. Metanol : Acetona : Isopropanol : Agua : Benceno (35:50:10:10:2)
- ii. Metanol : Acetona (5:1) (Extractos de Aceite, preparados 8 días antes).
- iii. Metanol : Acetona (7:1) (Extractos de Aceite, preparados 8 días antes).
- iv. Metanol : Acetona (1:5)
- v. Metanol : Acetona : Benceno (10:2:1)
- vi. Metanol : Acetona (15:1)

b. Rf x 100%: es la razón del recorrido de la mancha al recorrido del solvente a partir de la orilla de parafina, expresada porcentualmente.

c. Incertidumbres estimadas por propagación de error (algunas donde se tenían repeticiones, se calculó intervalo de confianza y coinciden con las calculadas por propagación de error).

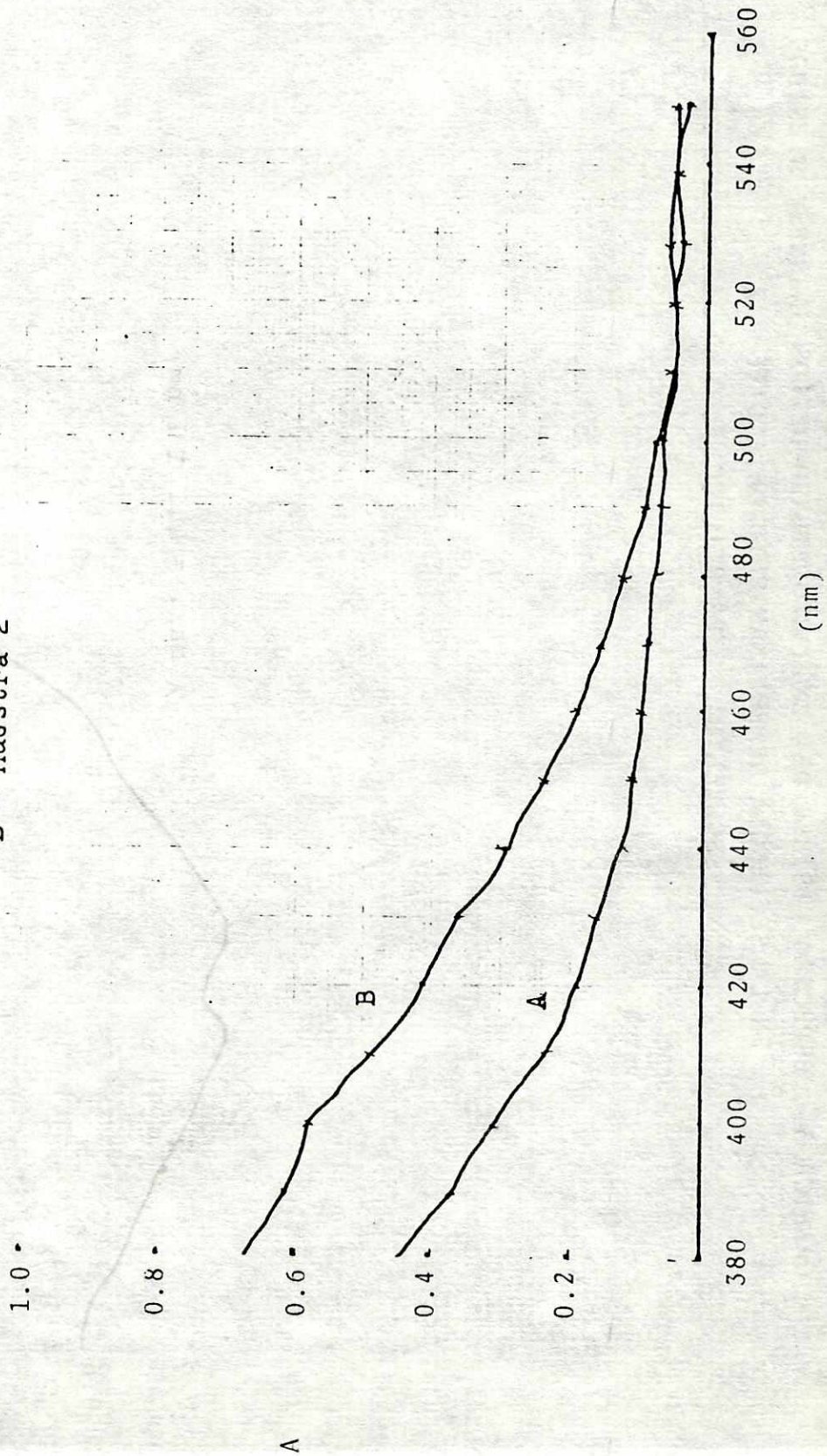
GRAFICA 1. ESPECTRO VISIBLE DEL EXTRACTO ETereo DEL ACEITE CRUDO DE PALMA.  
SOLVENTE: ETER ETILICO



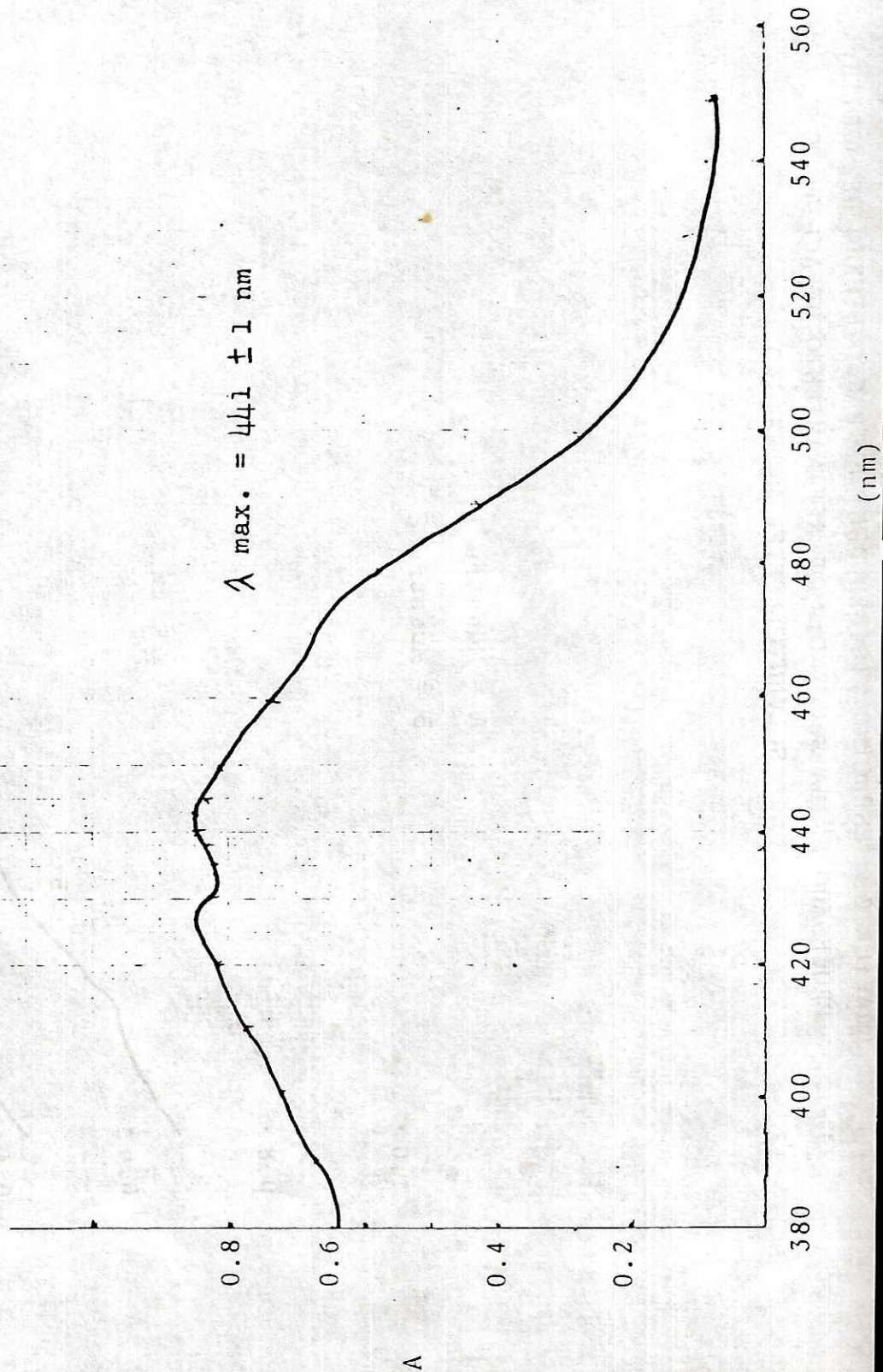
GRAFICA 2. ESPECTRO VISIBLE DEL EXTRACTO ETereo DE ACEITE PROCESADO EN LA SECUENCIA DE REFINAMIENTO DE ACEITE # 2.

SOLVENTE: ETER DIETILICO

A = Muestra 1  
B = Muestra 2

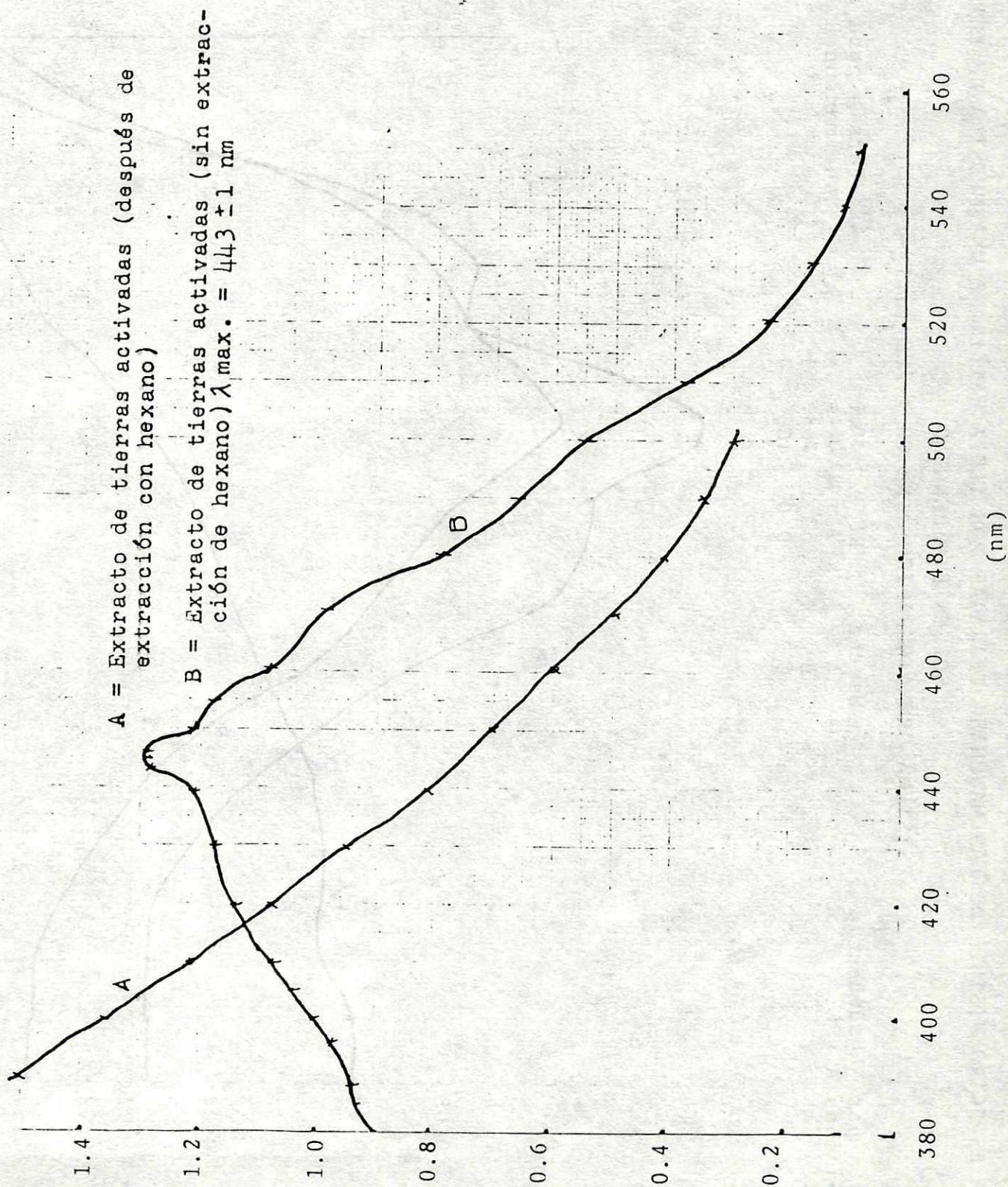


GRAFICA 3. ESPECTRO VISIBLE DEL EXTRACTO ETereo DE LOS JABONES OBTENIDOS  
EN LA SECUENCIA DE REFINAMIENTO DE ACEITE # 2.  
SOLVENTE: ETER ETILICO



CONSIDERACIONES OPTIMAS UTILIZADAS EN LA SECUENCIA DE REFINAMIENTO DE ACEITE # 1.

SOLVENTE: ETHER ETILICO



AFICA 5. ESPECTRO VISIBLE DE LAS MANCHAS SEPARADAS POR TLC A PARTIR DE UNA MUESTRA DE BETA-CAROTENO (MC

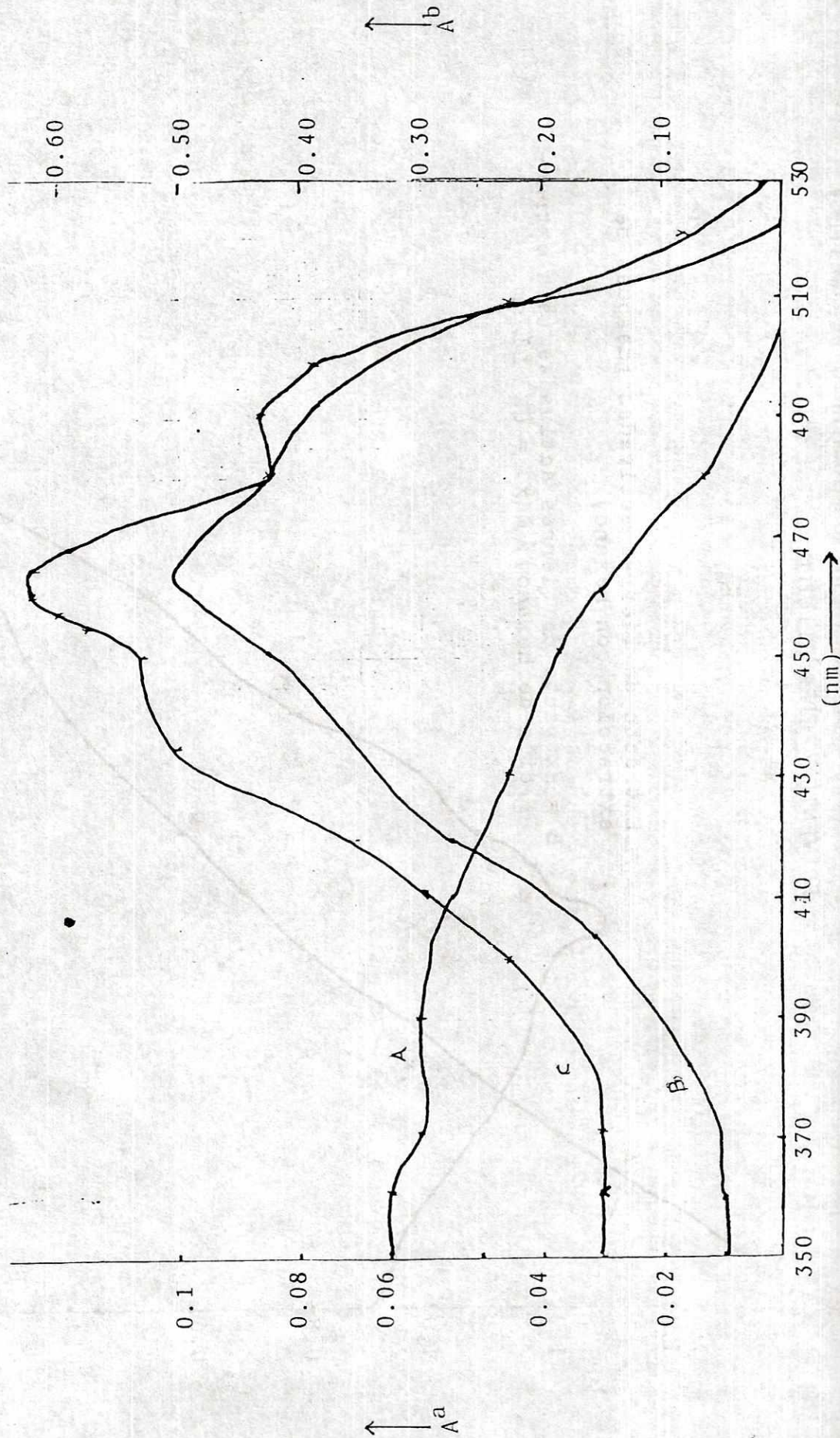
SOLVENTE: BENCENO

SISTEMA CROMATOGRAFICO : Me OH : ACE (5:1)

A<sup>b</sup>: Escala para absorbancia de mancha B.

A<sup>a</sup>: Escala para absorbancia de manchas A y C.

Mancha	Rf	Max
A	75	---
B	62	464 ± 1
C	0.0	463 ± 1



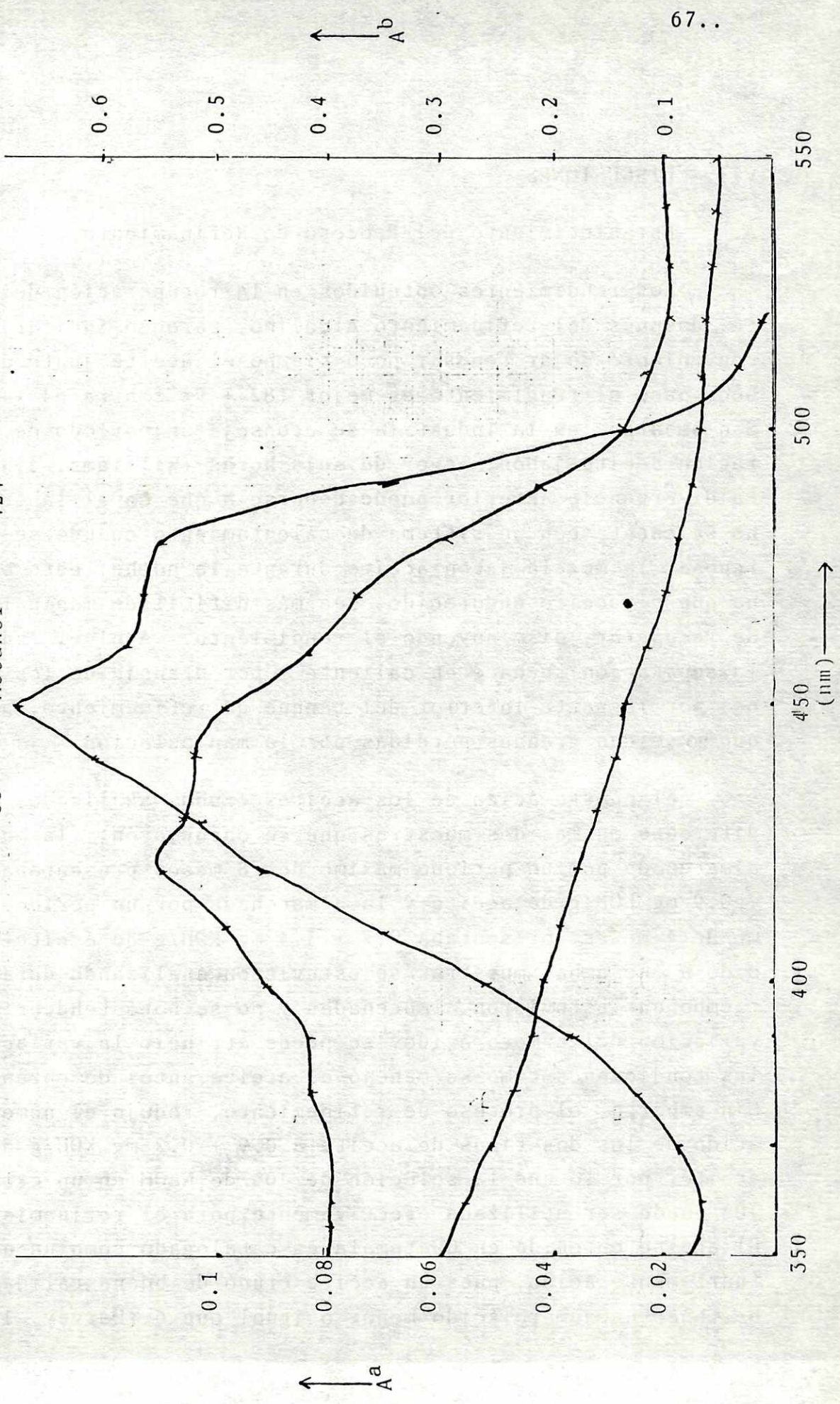
GRAFICA 6. ESPECTRO VISIBLE DEL EXTRACTO ETereo DEL ACEITE CRUDO DE PALMA, SEPARADO CROMATOGRAFICAMENTE

A<sup>a</sup>: Escala para absorban-  
cancia manchas A y C

SISTEMA CROMATOGRAFICO : MeOH : Ace (5:1)

Mancha	Rf	Solvente	Max(nm)
A	84	Hexano	-
B	73	Hexano	448
C	53	Metanol	424

A<sup>b</sup>: Escala para absorban-  
cia de mancha B



## VII. DISCUSIONES

### A. Establecimiento del Proceso de Refinamiento.

Los rendimientos obtenidos en la recuperación del aceite, después del refinamiento alcalino, parecen indicar que es conveniente dejar reposar poco tiempo el aceite junto al jabón, pues el rendimiento es mejor ( $82 \pm 9\%$  contra  $64 \pm 4\%$ ). Sin embargo, en la industria se aconseja un período de separación aceite-jabón, mayor de seis horas (Williams, 1950). La divergencia anterior puede deberse a que en el laboratorio no se cuenta con un sistema de calentamiento cuando se deja reposar la mezcla jabón-aceite durante la noche; esto ocasiona que el aceite endurecido, sea más difícil de manipular y de recuperar, disminuyendo el rendimiento. A nivel industrial, la separación se hace en caliente y por drenaje de los jabones por la parte inferior del tanque de refinamiento, por lo que no se dan grandes pérdidas por la manipulación.

El número ácido de los aceites crudos analizados fue diferente en las dos muestras que se obtuvieron: la muestra almacenada por un período máximo de 8 meses presentaba  $15.9 \pm 0.9$  mg KOH/g de aceite y la almacenada por un período máximo de 4 meses, presentaba  $9.7 \pm 1.4$  mg KOH/g de aceite. Debido a que ambas muestras se estuvieron analizando durante el tiempo que estuvieron almacenadas y no se notó tendencia a la variación del número ácido, se puede atribuir la variación a las condiciones como se manejó el aceite antes de obtenerlo. Sin embargo, el proceso de refinamiento, redujo el número ácido de los dos tipos de aceite a  $0.9 \pm 0.2$  mg KOH/g de aceite, por lo que la solución de 10% de NaOH en un exceso de 10% puede ser utilizada efectivamente para el refinamiento. El aceite obtenido en Guatemala es catalogado como un aceite fuertemente ácido, pues un aceite crudo de buena calidad debe tener un número ácido menor o igual que 6 (Harvey, 1983).

Los jabones obtenidos fueron en  $24 \pm 64\%$  en base seca, basándose en el peso del aceite refinado. El contenido de humedad en jabones dependió de la manera como se había separado el aceite de los jabones, por lo que se consideró como mejor parámetro tomar los jabones en base seca. Un aspecto importante hubiera sido hacer una corrección por el contenido de aceite a los jabones, sin embargo, este valor no se midió.

## 2. Blanqueo

En relación al proceso de blanqueo se encontró que sólo Tonsil Optima y Carbón Activado mostraron un blanqueo efectivo del aceite (véase Cuadro 10). El resto de las tierras activadas no tenían capacidad de blanquear el aceite de palma. Para que una arcilla (tierra activada), tenga la capacidad blanqueadora, debe haber tenido una activación ácida previa, debe tener una estructura porosa adecuada y una partícula de tamaño adecuado (Morgan, et. a., 1985). Estos estudios no fueron realizados en este trabajo sobre las tierras utilizadas; sin embargo, si se ha reportado que Tonsil Optima es una bentonita que tiene las características requeridas para poder blanquear el aceite (Khoo, 1979). Otras arcillas, como micas y caolinitas, no tienen una estructura cristalina adecuada para adsorber las moléculas de carotenoides por lo que no se puede utilizar como blanqueadores. En relación al Carbón Activado, presenta buena capacidad blanqueadora; sin embargo, presenta la desventaja de adsorber casi un 100% de aceite en peso. Otra desventaja del Carbón Activado es que las partículas son demasiado pequeñas, por lo que se necesita más cuidado para separarlo del aceite.

También se puede notar, como alternativa, el uso de una temperatura alta para blanquear el aceite. Sin embargo, esta técnica no es adecuada cuando se desea obtener un desecho rico en carotenoides adsorbidos o cuando el costo de la energía es elevado.

El color fotométrico, Co F, como parámetro de coloración no pudo utilizarse adecuadamente. Para calcularlo se utiliza una suma ponderada de distintas absorbancias (véase Apéndice B), donde las longitudes de onda 550 y 620 se tienen las mayores contribuciones para el cálculo del Co F. Al blanquear un aceite y disminuir el nivel de carotenoides disminuye la absorbancia en el rango 440-480 nm, por lo que no coincide con las longitudes de onda de más importancia en el cálculo de Co F. Entonces, el Co F viene a ser una medida no adecuada para determinar el blanqueo en el aceite de palma.

### 3. Otras Etapas de Procesamiento.

El desgomado del aceite es un proceso que se acostumbra como primer paso en el procesamiento del aceite crudo. Esto reduce la formación de emulsiones jabón-aceite o elimina problemas en el refinamiento físico (Cornelius, 1983). Sin embargo, no se tuvieron en este trabajo, los recursos para evaluar el efecto de las gomas en la formación de emulsiones, por lo que dicho procedimiento se excluyó en las secuencias de procesamiento del aceite que se establecieron. En relación al lavado del aceite, la introducción de esta etapa incluye la necesidad de secarlo para mantener el nivel de humedad bajo. El grado de humedad aceptable es de 0.1%, según la norma de exportaciones de Malasia. Debido a que el contenido de humedad aceptado puede variar según las exigencias del mercado, esta etapa tampoco se incluyó en la secuencia seleccionada para el procesamiento del aceite.

### 4. Secuencias del Procesamiento de Aceite.

Las secuencias de procesamiento no difieren aparentemente entre sí. El rendimiento fue diferente, pero esto es atribuible a que en la secuencia # 1 se tuvo una eficiencia de refinamiento alcalino baja, debido a que se dejó la mezcla

aceite-jabones para que separaran durante la noche. La selección de una u otra secuencia estaría basada en las facilidades relativas de refinamiento alcalino y blanqueo. Por ejemplo, si el refinamiento alcalino es un proceso costoso, no es conveniente utilizar la secuencia # 1, puesto que la realización de dos procesos de blanqueo sucesivos ocasiona la elevación del número ácido en un  $27 \pm 3\%$ . Esto ocasionará la necesidad de incluir un nuevo refinamiento para disminuir el número ácido.

También es importante aclarar que esta secuencia sólo forma parte de un procesamiento de aceite, determinado por el uso que se le dará posteriormente; el proceso se puede seguir con un deodorizado, un fraccionamiento, una transesterificación, una hidrogenación (Cornelius, 1983).

## B. Análisis y Cuantificación de Carotenoides.

### 1. Procedimiento de Extracción.

El procedimiento establecido para extraer los carotenoides se hizo considerando los siguientes factores:

- a) Debía evitarse la radiación solar; por lo que se trabajó con lámparas de tungsteno.
- b) La saponificación tenía que ser completa, por lo que se utilizó un exceso de base (una solución de KOH 60% p/v). Esto aseguraba que las separaciones cromatográficas fueran reproducibles y no mostraran falta de movilidad.
- c) Las temperaturas altas destruyen los carotenoides. Sin embargo, la temperatura de saponificación fue alta. Esta deficiencia lo compensaba el corto período que duraba una saponificación (10 minutos). Una saponificación en frío hubiera durado una noche, lo que hubiera ocasionado un método más largo y con riesgos de saponi-

ficación incompleta y un gasto excesivo de nitrógeno.

d) Se utilizó atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los carotenoides antes y durante la saponificación.

e) Las extracciones con éter dietílico fueron eficientes pues eliminaban completamente el color amarillo de la fase acuosa. Las emulsiones no constituyeron problemas pues éstas se desestabilizaban rápidamente con etanol.

## 2. Cuantificación de Carotenoides Totales.

Para Beta-carotenos estándar, el coeficiente de absorptividad calculado es  $2323 \pm 100 \text{ cm}^{-1} (\text{g}/100\text{ml})^{-1}$ . Y el reportado es  $2450 - 2590 \text{ cm}^{-1} (\text{g}/100 \text{ ml})^{-1}$ , (Davies, 1976). Esto sugiere que el estándar de Beta-caroteno ya estaba degradado. Este efecto se nota como una sobreestimación del nivel de carotenoides en las muestras analizadas. En este caso, el sobreestimado sería de un 10% (estimado a partir de las razones de los coeficientes de absorptividad). Sin embargo, los niveles de carotenoides no se corrigieron por este factor porque habían otros factores que afectaban el nivel de carotenoides y no eran conocidos. Entre estos factores se pueden mencionar la efectividad de la atmósfera de nitrógeno para reducir la oxidación de los carotenoides y la temperatura a que se somete el aceite en la saponificación para hacer el extracto.

En relación al contenido de carotenoides encontrados en el aceite crudo,  $540 \pm 55 \text{ ppm}$ , coinciden con los reportados en la literatura para otros países (véase Cuadro 6). Es importante especificar que este valor es para aceite de palma extraído del híbrido Ténera, que es el que se cultiva en Guatemala.

### 3. Cuantificación de Carotenoides en las Etapas del Refinamiento del Aceite.

Se pudo comprobar que el proceso de blanqueo es el que reduce el nivel de carotenoides en el aceite en mayor escala (véase Cuadros 13 y 14). Estos carotenoides son adsorbidos en las tierras activadas o son destruidos por altas temperaturas. Sin embargo, el refinamiento alcalino también disminuye el nivel de carotenoides en el aceite, porque algunos carotenoides son destruidos por la temperatura y otros son atrapados por los jabones.

Los desechos, jabones y tierras activadas son fuentes potenciales de pigmento para las raciones de las aves y otros animales. Sin embargo, el contenido de carotenoides en tierras activadas es muy bajo ( $58 \pm 12\%$  ppm, secuencia de refinamiento # 1), para extraerlos. Esto implicaría el uso de una gran cantidad de tierras activadas aún para lograr bajas concentraciones de carotenoides.

En el caso de los jabones, el nivel de carotenoides es más elevado ( $393 \pm 32\%$  ppm, secuencia # 2), por lo que es potencialmente una buena fuente. Si se considera que el jabón puede acidularse e incorporarse al concentrado del ave como fuente de carotenoides y fuente de material graso, se encuentra que el nivel de grasa máximo en la dieta del ave es de 6% (Miller, 1974). Lo que equivale a 6.5% de jabones en base seca). Esta limitación nos permite incorporar  $25 \pm 32\%$  ppm de carotenoides en un kilogramo de alimento, por lo que los jabones pueden utilizarse como suplemento. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que el tipo de carotenoides sea el adecuado para pigmentar el huevo del ave. No se conoce el tipo de carotenoide que se encuentra en los jabones, pero su espectro de absorción es cualitativamente diferente al Beta-caroteno (no es útil como pigmento del huevo, véase Gráfica # 3), por lo que no se descarta el uso de jabones como fuente de pigmento.

#### 4. Caracterización de los Carotenoides Contenidos en el Aceite de Palma.

Al obtener espectros del aceite crudo, aceite blanqueado, jabones y tierras activadas, se obtuvieron espectros diferentes (véase Gráficas 1-4). El extracto del aceite crudo presenta un espectro con la forma característica de un carotenoide; se puede comparar el espectro con el de la mancha B de la Gráfica 5.

La importancia de tener una solución diluida para la caracterización del espectro también se nota en la Gráfica 1, donde ocurre un desplazamiento batocrómico y pérdida de resolución cuando la solución se concentra.

El espectro del aceite blanqueado (Gráfica 2), manifestó que los carotenoides han desaparecido del aceite, puesto que no manifiesta un máximo de absorción en el intervalo que absorben los carotenoides.

El espectro de jabones (Gráfica 3), manifiesta presencia de carotenoides,  $\lambda_{\max} = 441 \pm 1$  nm, pero existen otros componentes o los carotenoides han sufrido alguna transformación pues la forma del espectro se ha alterado.

El espectro de tierras activadas presentó dos formas (Gráfica 4). La forma B, donde no se ha extraído con hexano, indica la presencia de carotenoides no adsorbidos en la tierra activada, sino que están en el aceite atrapado en la tierra. La forma A indica que el producto ha sido oxidado y que no manifiesta absorción máxima en el visible, aunque el color del extracto sea naranja.

En las separaciones cromatográficas sólo se lograron separar dos manchas (véase Gráfica 6), pues la mancha C se forma como un producto de degradación. Esta mancha apareció tanto en el estándar de Beta-caroteno, como en el extracto

etéreo del aceite crudo que tenía varios días de preparado. La mancha A corresponde a un producto de transformación de Beta-caroteno (posiblemente un producto formado durante la siembra del extracto en la placa), pues aparece tanto en el estándar como en la cromatografía del extracto. Además no presenta un máximo de absorción en la región donde absorben los carotenoides. No puede ser Alfa-caroteno porque el orden de elución no coincide con el de un sistema cromatográfico de fase reversa. En esta posición debería eluir el Gama-caroteno (que existe en cantidades menores en el aceite), y el Alfa-caroteno debería quedar más cerca del origen.

El valor de  $\lambda_{\text{max}}$  para Beta-caroteno en hexano es 448 nm (Davies, 1976), que coincide con el valor medido para la mancha B. Se puede concluir que los sistemas cromatográficos utilizados permiten localizar al Beta-caroteno como la mancha B (véase Cuadro 16).

Los sistemas utilizados aparentemente no separan los carotenoides (alfa y beta-caroteno), por no ser apropiado el sistema o por estar los carotenoides en pequeñas cantidades (gama-caroteno, xantofilas y licopeno). Sería conveniente utilizar una fase fija más selectiva para separar los carotenoides. Por similitud con la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la fase fija adecuada debe estar compuesta de moléculas lineales y largas. Por ejemplo, los suplidores de columnas para separar carotenoides por cromatografía líquida de alta presión, utilizan en su fase fija, moléculas de dieciocho carbonos. Una fase fija para cromatografía de capa fina podría ser sílica gel recubierta de Trioleína, en vez de parafina, que fue la utilizada en este estudio.

Otra alternativa para analizar carotenoides es la técnica HPLC (Zakaria, et. al., 1979). Esta técnica permite separar y cuantificar carotenoides cuando se utiliza la columna

adecuada y una mezcla isocrática adecuada. La pérdida por oxidación no es importante en este caso y el tiempo de análisis es relativamente corto.

Esta técnica permite cuantificar carotenoides de una manera sencilla en relación a la técnica de cromatografía de capa fina. La fracción separada es inmediatamente analizada espectrofotométricamente, mientras que en capa fina la cuantificación se complica, pues hay pérdidas en la etapa de recuperación para analizar espectrofotométricamente. Esta técnica presenta la desventaja de ser necesario un equipo relativamente costoso.

etéreo del aceite crudo que tenía varios días de preparado. La mancha A corresponde a un producto de transformación de Beta-caroteno (posiblemente un producto formado durante la siembra del extracto en la placa), pues aparece tanto en el estándar como en la cromatografía del extracto. Además no presenta un máximo de absorción en la región donde absorben los carotenoides. No puede ser Alfa-caroteno porque el orden de elución no coincide con el de un sistema cromatográfico de fase reversa. En esta posición debería eluir el Gama-caroteno (que existe en cantidades menores en el aceite), y el Alfa-caroteno debería quedar más cerca del origen.

El valor de  $\lambda_{\text{max}}$  para Beta-caroteno en hexano es 448 nm (Davies, 1976), que coincide con el valor medido para la mancha B. Se puede concluir que los sistemas cromatográficos utilizados permiten localizar al Beta-caroteno como la mancha B (véase Cuadro 16).

Los sistemas utilizados aparentemente no separan los carotenoides (alfa y beta-caroteno), por no ser apropiado el sistema o por estar los carotenoides en pequeñas cantidades (gama-caroteno, xantofilas y licopeno). Sería conveniente utilizar una fase fija más selectiva para separar los carotenoides. Por similitud con la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la fase fija adecuada debe estar compuesta de moléculas lineales y largas. Por ejemplo, los suplidores de columnas para separar carotenoides por cromatografía líquida de alta presión, utilizan en su fase fija, moléculas de dieciocho carbonos. Una fase fija para cromatografía de capa fina podría ser sílica gel recubierta de Trioleína, en vez de parafina, que fue la utilizada en este estudio.

Otra alternativa para analizar carotenoides es la técnica HPLC (Zakaria, et. al., 1979). Esta técnica permite separar y cuantificar carotenoides cuando se utiliza la columna

adecuada y una mezcla isocrática adecuada. La pérdida por oxidación no es importante en este caso y el tiempo de análisis es relativamente corto.

Esta técnica permite cuantificar carotenoides de una manera sencilla en relación a la técnica de cromatografía de capa fina. La fracción separada es inmediatamente analizada espectrofotométricamente, mientras que en capa fina la cuantificación se complica, pues hay pérdidas en la etapa de recuperación para analizar espectrofotométricamente. Esta técnica presenta la desventaja de ser necesario un equipo relativamente costoso.

### VIII. CONCLUSIONES

Un proceso adecuado para el refinamiento del aceite de palma utiliza NaOH al 10% con 10% de exceso, separando el aceite de los jabones aún cuando el aceite está caliente (antes de cuatro horas de haberse realizado la neutralización).

Los agentes blanqueadores del aceite de palma utilizados son el Tonsil Optima y el Carbón Activado, ambos en un dos por ciento; el tiempo de contacto con el aceite con el agente blanqueador es media hora a  $115 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Se puede obtener un aceite de número ácido aceptable y bajo color con un refinamiento alcalino y dos blanqueos.

El contenido de carotenoides totales en el aceite de palma es  $540 \pm 55$  ppm. El aceite refinado y blanqueado presenta menos de 4 ppm. de carotenoides. En tierras activadas el contenido de carotenoides es de  $58 \pm 1\%$  ppm. (el valor más alto obtenido). En los jabones se encontraron  $393 \pm 32\%$  ppm. de carotenoides.

Los espectros del aceite crudo indican la presencia de carotenoides. Los espectros de los jabones aún poseen absorción máxima a 441 nm, pero contienen otros componentes u otros carotenoides. Las tierras activadas lavadas con hexano presentan un espectro sin máximo en la región visible correspondiente a productos de oxidación de los carotenoides.

El desarrollo de los sistemas de cromatografía de capa fina permitieron la separación de manchas que pueden ser productos de degradación del Beta-caroteno.

Las tierras activadas no pueden utilizarse como fuente de pigmento en la dieta de las aves. Sin embargo, los jabones si tienen un nivel de carotenoides que permite que se utilicen como suplemento dietético.

## IX. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS FUTUROS.

Se sugiere investigar los siguientes aspectos.

- A. Evaluación biológica de los jabones acidulados, resultantes del refinamiento del aceite de palma. Su función como fuente de pigmentos y de vitamina A en las dietas de las aves.
- B. Estudio de factibilidad económica para el procesamiento de aceite de palma y aprovechamiento de sus desechos.
- C. Obtención de tierras activadas para el blanqueo de aceite a partir de la preparación y activación de montmorillonitas.
- D. Tratamiento de las tierras activadas con distintos antioxidantes, para optimizar la recuperación de carotenoides de éstas.
- E. Evaluación de sistemas cromatográficos de fase reversa para separar carotenoides, tanto por cromatografía de capa fina, como por cromatografía líquida de alta presión.
- F. Estudios de degradación de carotenoides durante su manipulación.
- G. Establecimiento de métodos para extracción y purificación de carotenoides en escala preparativa.

## X. BIBLIOGRAFIA

- Bauernfeind, J. C. y colaboradores. "Use of Carotenoids" in:  
1971 Carotenoids. (O. Isler Ed.). Birkhäuser, Basle.  
746-761.
- Bauernfeind, J. C. Carotenoids as Colorants and Vitamin A  
1981 Precursors. (Copyright). U.S.A., Academic Press  
Inc. pp 1-45.
- Bauernfeind, J. C.; Rubin, S. H.; Surmatis J. D. "Carotenoids  
1970 and Fat-soluble Vitamins: Contribution to Food,  
Feed and Pharmaceutical". International Journal  
for Vitamin Research. 40(3). pp 392-416.
- Bauernfeind, J. C. y colaboradores. "Use of Carotenoids" in:  
1971 Carotenoids (O. Isler, Ed.) Basle, Birkhäuser.  
pp 746-761.
- Beeson, W. M. "Relative potencies of Vitamin A and Carotene  
1965 for Animals". Federation Proceedings. 24(4).  
part I pp 924-26.
- Banco de Guatemala. Estudio sobre el cultivo e industriali-  
1981 zación de la palma africana. Informe Económico.  
Guatemala, Banco de Guatemala. Enero-marzo 1981.  
pp 1-74.
- 1983 Boletín estadístico. Julio-septiembre,  
Guatemala, Banco de Guatemala.
- Berger, Kurt. "Palm Oil". Handbook of Tropical Foods. (H.  
1983 Chan. Ed.). U.S.A. pp 433-468.
- Cocks, L. V. y Redde C. Laboratory Handbook for Oil and Fat  
1966 Analysts. London, Academic Press, 419 pp.
- Cornelius, J. A. "Processing of palm fruit and its products".  
1983 London, Tropical Products Institute.
- Coscia, Carmine. "Chromatography of Terpenoids" in: Chroma-  
1975 tography: a Laboratory Handbook for Chromatography  
and Electrophoretic Methods. (E. Heftmann, Ed.).  
Third Edition. New York, Van Nostrand Reinhold Co.  
pp 588-590.
- CRC. Handbook of Food Aditives. 2nd. Ed. (T. Furia Ed.)  
1975 U.S.A., CPC press.
- Daley, R.; Gray, G.; Brown, S. "Reverse-phase Thin Layer  
1973 chromatography of chlorophyll derivatives". Journal  
of Chromatography. 76(1) pp 175-83.

- Davies, B. "Carotenoids". Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Vol II. (T. Goodwin, Ed.) Academic Press, 1976 London, pp 38-165.
- Defrancesco, F. y Seppi, A. "Relations between differential areas and concentrations in derivative absorption spectrophotometry". Chemical Abstracts 91: 203880p. 1979
- Dimitrovski, C. y colaboradores. "Determination of various forms of vitamin A by TLC". Chemical Abstracts 82: 203395 u. 1975
- Fletcher, D. y Halloran, H. "An evaluation of a commercially available marigold concentrate and paprika oleoresin on egg yolk pigmentation". Poultry Science 60(8). 1981
- Fraser, M. y Frankl, G. "Colored components of processed palm oil". Journal of American Oil Chemical Society. 58(10) pp 926-31. 1981
- Frie, F. y Haspel-Horvatovic, E. "Preparative Trennung von Plastidenpigmenten auf Polyamidsäulen". Journal of Chromatography. 68(1) pp 264-6. 1972
- Fry, J. Harms, R. "Influence of a xanthophyll-free pullet grower diet on subsequent egg yolk pigmentation". Poultry Science. 53(1). 1974
- Harvey, T. Handbook of Tropical Foods. U. S. Department of Agriculture, Hawaii. 1983
- Heuser, G. La alimentación en avicultura. México, Unión Tipográfica Editorial Hispanoamericana. 667 pp. 1963
- Hock, A. y colaboradores. "An improved method for the extraction of carotens from palm oil". Chemical Abstracts. P 90: 3012 g. 1980
- Hunter, R. F. y Krakenberger, R. M. "Palm oil Carotenoids". Biochemical Journal. 40 pp 492-493. 1946
- Ikan, Raphael. Natural Products. U.S.A., Academic press. 1976 301 pp.
- Jacobsberg, B. "Characteristics of Malaysian palm oil". II. Crude palm oil characteristics and refining abilities". Oleagineux. 30(7), pp 319-24. 1975
- Keefer, L. y Hohnson D. "Magnesium hydroxide as a thin-layer chromatographic adsorbent. III. Application to separations of vitamin A and related carotenoids". Journal of Chromatography 69(1). pp 215-18. 1972

- Khoo, L. y colaboradores. "The adsorption of beta carotene I  
1979 by bleaching earth". Journal of American Oil Chemical Society. 56 pp 672-75.
- Kimura, S. y colaboradores. "Color of tomato. VI. Protection  
1974 of carotenoid oxidation during the procedure of TLC".  
Chemical Abstracts. 81: 169874 u.
- Knaut, J. y H. J. Richter. JAOCs 62(2) 317-326.  
1985
- Liassen-Jensen. "Isolation, Reactions" in Carotenoids (O.  
1971 Isler, Ed.). Basle, Birkhäuser pp 61-188.
- Lin, K. L. y colaboradores. "A laboratory study of the recovery  
1977 of carotenoids from the spent adsorbents used in  
decolorizing palm oil". Chemical Abstracts 86:  
104609 x.
- Lipstein, B; Bernstein, S.; Budoski, P. "Byproducts of the  
1967 refining Soybean oil as pigment sources for poultry  
I. Broiler pigmentation". Poultry Science. 40(2)  
pp 626-637.
- 1976 "Byproducts of the  
refining of soybean oil as pigment sources for poultry.  
II. Egg yolk pigmentation". Poultry Science  
49(2). pp 449-58.
- Loncin, Marcel. "Separation of carotenoid pigment in palm oil".  
1975 Oleagineux. 30(2). pp 77-80.
- Loncin, Marcel. "Uber das Palmitol". JAOCs, 49 pp 104-112.  
1972
- Marusich, W. L. y Bauernfeind, J. C. "Oxycarotenoids in poultry  
1970 pigmentation. I. Yolk studies. Poultry Science.  
49(6). pp 1555-66.
- Matooshek, Ralph. "Xanthophyllic pigment extraction". Chemical Abstracts. 81: P23186 b.  
1974
- MacCready, S. y colaboradores. "Colorimetric characterization  
1973 of egg yolk and egg yolk products". Journal of Food Science.  
38(1). pp 176-86.
- MacLellan, M. Palm Oil. Journal of American Oil Chemical Society.  
1983 60(2). pp 320A-325A.
- Meanra, M. L. y Weir, G. S. D. "The effect of beta-carotene  
1976 on content of Nigerian palm oil". Chemical Abstracts.  
85: 190985 a.

- Miller, D. Et. al. Soybean Meal Diet Supplemented with Sulfate Methionine and Fishery Products. Poultry Science. 53: 226-224.
- Mondal B. K.; Rahman, M. A.; Rhan, N. A. "Survey of oil seeds. 1976 V. Some studies on African Palm oil". Food Science and Technology Abstracts. 11: 6N 282.
- Morgan, J. et al. JOACS 62(2)  
1985
- Mudambi, S. y Rajagopal, M. "Effect of heat on the beta-carotene content of Nigerian palm oil". 1977 Journal of Food Science. 42(5). pp 1414-1415.
- Muller-Mullot, W. Analysis of Carotenes in crude palm oil. 1975 Revue Francaise Corps Grass. 22(3) 131-6.
- Nisshin Oil Mills. "Carotenoid recovery from clay by-product of palm oil purification by contacting with inorganic solvent and extracting with organic solvent". 1974 04.12.74-JA 138474 (05.06.76) 009b-61. (Chemical Abstracts). (Patente Alemana).
- Poust, J. y colaboradores. "Canthaxanthin". 1977 Chemical Abstracts. 86: 155834 z.
- Petracek, F. y Zechmeister, L. "Determination of Partition Coefficient of Carotenoids as a tool in Pigment Analysis". 1956 Analytical Chemistry. 29(9). pp 1484-1485.
- Pfander, H. y colaboradores. "Separation of carotenoid mixtures by countercurrent extraction. II". 1972 Chemical Abstracts. 78: 159930 k.
- Pinto, Gabriela. "Carotene composition of palm oil". 1959 Chemical Abstracts. 56: 711 d.
- Quackenbush, Forrest. "Extraction and analysis of carotenoids in fresh plant material". Journal of American Oil Chemical Society. 57(3) pp 511-512.
- Strain, H. y Svec, W. "Chromatography of chlorophylls and related Porphyrins" in Chromatography: a laboratory Handbook for Chromatographic and Electrophoretic Methods. (E. Heftman, Ed.) Third Edition. New York, Van Nostrand Reinhold Co.

- Singh, H.; John, J.; Cama, H. "Separation of beta apocarotenals and related compounds by reversed-phase paper and thin-layer chromatography". Journal of Chromatography. 75 pp 146-150.  
1973
- Suárez, D. "Incorporation of lycopene in egg yolk". Poultry Science. 48(2). pp 433-35.  
1969
- Taylor, R. y Ikawa, M. "Gas chromatography of carotenoids". Analytical Biochemistry. 44(2) pp 623-27.  
1971
- Vuilleumier, J. P. "The Roche Yolk Color Fan'-an instrument for measuring yolk color". Poultry Science 48(3) pp 767-69.
- Williams, K. A. Oil, Fats, and fatty Foods. Third ed. U.S.A. 1950 The Blakiston Company. 500 pp.
- Yamada, C. y colaboradores. "Carotene Food Color". Chemical Abstracts. 86: 22568 f.  
1978
- Yamada, C. "Production of carotene concentrate". Chemical Abstracts. 87: 138309 q.  
1977
- Yoshioza, H. y colaboradores. "Extracting carotenoids from silent white clay from palm oil refining". Chemical Abstracts. 87: 172362 g.  
1977
- Zakaria, M. et. al. Journal of Chromatography. 176 109-114  
1979

## APENDICE

### A. Estructura y Formulación de Carotenoides.

Los carotenoides son tetraterpenos naturales, de alta coloración, sintetizados en organismos fotosintéticos y hongos. Consisten de ocho residuos isoprenoides agrupados en 2 unidades.

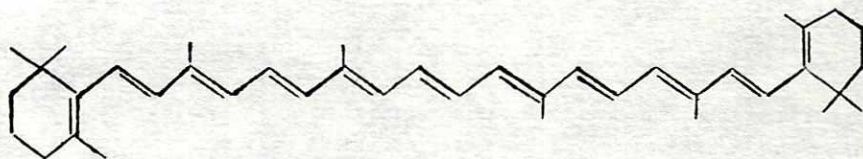
Cada unidad está formada de cuatro residuos isoprenoides unidos cabeza con cola.

Los carotenoides pueden subdividirse en dos grupos:

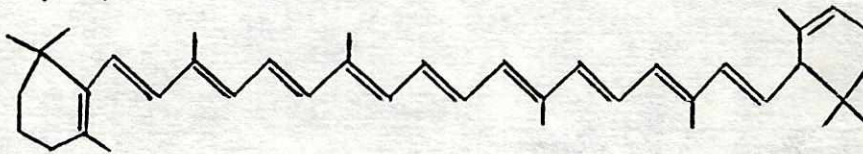
1. Carotenos que no presentan oxígeno en su estructura.
2. Xantofilas que presentan funciones oxigenadas en su estructura.

A continuación se presentan las estructuras de algunos carotenoides importantes para el desarrollo de este proyecto.

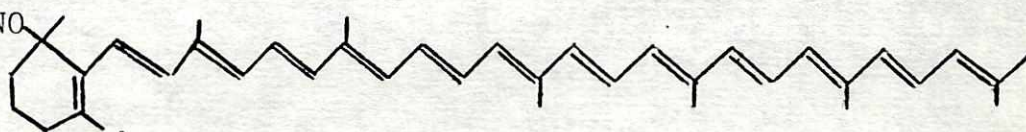
BETA-CAROTENO

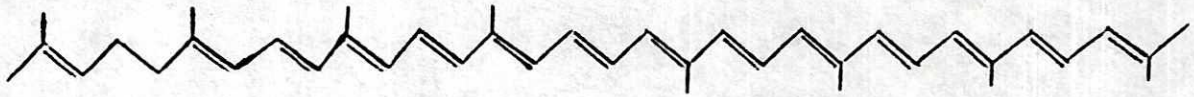


ALFA-CAROTENO

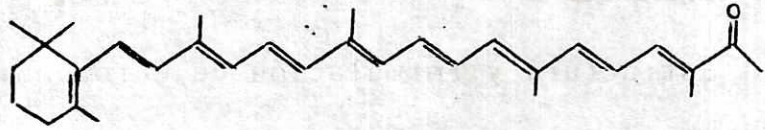


GAMA-CAROTENO

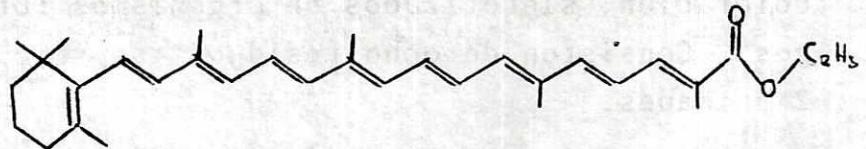
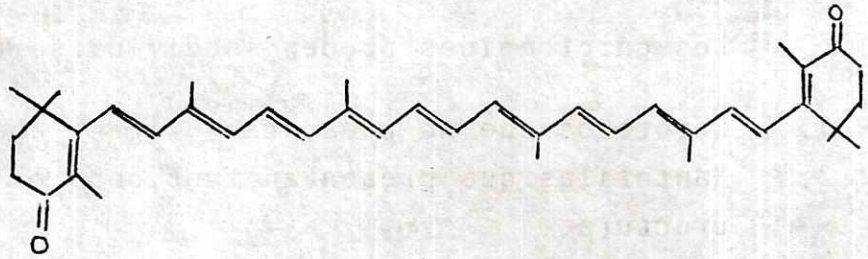




LICOPENO



BETA-APO-8'-CAROTENAL

ESTER ETILICO DEL ACIDO  
BETA-APO-8'-CAROTENOICO

CANTAXANTINA

B. Procedimientos Utilizados en Etapa Experimental.

1. Extracción de Carotenoides de Aceite de Palma (adaptación de Davies, 1976).
  - a. Se pesa, en triplicado, aproximadamente 1 gramo de aceite derretido en baño maría. Se disuelve en 25 ml. de éter dietílico destilado. En el caso de los jabones, se pesan 5 gramos y se disuelven en 50 ml. de agua destilada.
  - b. Se burbujea nitrógeno 10 minutos, en oscuridad.
  - c. Se adicionan 8 ml. de KOH al 60% peso/peso. Se continúa burbujeando nitrógeno.
  - d. Se calienta en baño maría de agua hirviendo por 10 minutos. Se continúa burbujeando nitrógeno.
  - e. Se adicionan 75 ml. de agua destilada y se continúa burbujeando 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 (destilado). Se debe de 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 sobre sulfato de sodio anhidro (Fisher).
  - i. Se filtra el extracto en papel filtro ordinario (filtrado rápido) y se rotoevapora hasta 25 ó 10 ml., según el nivel de carotenoides).
  - j. Se afora con éter dietílico destilado.

2. Extracción de Carotenoides en Tierras Activadas (adaptación de Nishin Oil Mills, 1974).
  - a. Se pesa, en triplicado, 1-2 gramos de tierras activadas que ya han sido utilizadas para blanqueo de aceite (erlenmeyer de 50 ml.).
  - b. Se adicionan 25 ml. de hexano (Merck), se agitan magnéticamente 5 minutos. Se separa el hexano y se descarta (esto contiene todo compuesto que se encontraba en las tierras activadas y que no están absorbidos).
  - c. Se atraen las tierras con éter dietílico analítico (Merck), 25 ml. por minutos y se separa de las tierras por filtro y por gravedad.
  - d. Se vuelve a repetir la extracción con éter dietílico analítico.
  - e. Se rotoevapora, si el volumen de aforo es pequeño, se afora directo.
  
3. Análisis de Cromatografía de Capa Fina (adaptado de Daley, 1973).
  - a. Se preparan las placas cromatográficas (20 x 20 cm.) con una mezcla de Sílica Gel G H F 3.5:10. (peso/volumen), en agua destilada utilizando un aplicador con un grosor de 500  $\mu$ m. se dejan secar al aire por 24 horas.
  - b. Las placas anteriores se sumergen en una solución de parafina ("Paraplast" de Sherwood), en éter de petróleo (35-38 C), al 4%, hasta una profundidad de 16 cm. Se dejan 12 horas al ambiente, antes de usarse.

- c. Se siembra la placa en una atmósfera de  $N_2$  (proporcionado por una caja de plexiglas), por medio de una pipeta automática de 100  $\mu$ l. La siembra se efectúa a 2 cms. de borde con parafina, en la franja que no tiene parafina. Debe haber una iluminación artificial (luz de tungsteno) en el momento de la siembra).
  - d. El desarrollo de la placa se hace en oscuridad por un período de 3 a 4 horas. Para calcular el Rf, se miden las distancias a partir de extremo con parafina y se calcula la razón de la distancia recorrida por la mancha a la distancia por el solvente.
  - e. Las manchas de la placa desarrollada se raspan con un bisturí (iluminación artificial).
  - f. Luego se recoge el Sílica Gel suelta con un recogedor de muestras al vacío.
  - g. Se eluye el pigmento de la Sílica Gel, utilizando el solvente que fue utilizado para la determinación espectrofotométrica, hasta obtener un volumen adecuado.
  - h. Se obtiene el espectro en la región visible.
4. Refinamiento Alcalino (Cocks y Redde, 1966).
- a. En base del número ácido del aceite, se calcula el volumen de solución de NaOH 10% para neutralizar el peso de aceite a refinar y que esté en un 10% de exceso del requerido.

El cálculo se hace así:

Peso solución 10% = No.A x 40 g NaOH x 1.1 x 10 x peso aceite

56110 mg KOH

- b. Se calienta el aceite de 60 a 70°C sobre la estufa, y con agitación, se les adiciona la solución de NaOH 10%. Luego se agita lentamente.
  - c. Se pasa el material a un baño de temperatura controlada de entre 60 y 70°C y se mantiene la temperatura por una hora.
  - d. Se decanta el aceite a un embudo con papel filtro y calentado con una cinta de calentamiento. Se pesa el aceite y todos los jabones.
  - e. Se mide el número ácido del aceite final del proceso y se observa que sea menor que uno.
5. Blanqueo de Aceite (Cocks y Redde, 1966).
- a. Se activan tierras activadas (Tonsil Optima F 99) en 100°C por 15 minutos y se espera que se enfríen.
  - b. Se calienta el aceite a una temperatura mayor que 70°C y se agita magnéticamente.
  - c. Se adiciona un 2% de tierras activadas frías y se eleva rápidamente la temperatura a 110°C (usando estufa de plancha).
  - d. Se conserva la temperatura a lo largo de 30 minutos.
  - e. Se deja enfriar el aceite y se filtra a 90°C, usando embudo bucher con tela gabardina.
  - f. Se compara el color del aceite con el aceite de soya refinado.
6. Determinación de Extracto Etéreo (Williams, 1950).
- a. Se coloca un dedal en el Soxhlet y se le ponen 2 gramos de material adentro.

- b. Se extrae en aparato Soxhlet con éter dietílico por 24 horas.
  - c. Se seca el dedal al aire por una hora y se determina el peso perdido. El % de peso perdido se toma como el % de aceite.
7. Determinación del Número Acido (Williams, 1950).
- a. Se pesa un gramo de aceite. Se disuelve en 25 ml. de Bencenoetanol 95% (1:1).
  - b. Se adicionan 3 gotas de fenolftaleína.
  - c. Se titula con una solución de KOH etanólico estándar de concentración 1.0 mg KOH/ml. estandarizado previamente con ftalato ácido de potasio. El punto final es el viraje con la fenolftaleína.
  - d. El volumen gastado es el número ácido del aceite.
8. Desgomado del Aceite (Cornelius, 1983).
- a. Se calienta el aceite a 90<sup>o</sup>C con una estufa.
  - b. Se adiciona el aceite crudo 0.5% de ácido ortofosfórico 85%.
  - c. Se mantiene la temperatura a 90<sup>o</sup>C por 20 minutos.
  - d. Se decanta el aceite y se dejan como residuo las gomas precipitadas.
9. Determinación de Humedad en Aceite y Jabones (Williams, 1950).
- a. Se pesan 10 g. de aceite en una balanza analítica.
  - b. Se coloca la muestra en un horno de vacío y se calienta a 50<sup>o</sup>C y 22 pulgadas de Hg de vacío por 12 horas.

- c. Se determina el peso perdido y se calcula el % de pérdida.
  - d. En el caso de jabones se hace en un horno de ventilación forzada a 100°C por un día.
10. Determinación del Color Fotométrico (Co F) (Williams, 1950).

El Co F es calculado por la fórmula:

$$1.29 A_{469} + 69.7 A_{550} + 41.2 A_{620} - 56.4 A_{670}$$

Utilizando una solución de 1 ml. de aceite, 175 ml. de acetona, grado industrial.

C. Curva de Calibración para Cuantificación de Carotenoides a Partir de un Estándar de Beta-Caroteno.

El estándar utilizado es B-caroteno cristalino Trans (Sigma), en una concentración de  $(9.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$  g/100 ml. en éter dietílico. Después de hacer las diluciones adecuadas, se leyeron las soluciones en el aparato Spectronic 21 (B & L), a  $451 \pm 2$  nm (longitud de onda máxima).

(Concentración g/100 ml) $\times 10^{-4}$	4.9	0.98	0.49
$A_{451 \text{ nm}}$	0.907	0.182	0.106

$$A = E C + A'$$

donde C: concentración en g/100 ml  
 A; absorbancia  
 E: Coeficiente absorptividad molar experimental

$$A = 2323 C - 0.025$$

$$\sigma_E = 100 \text{ (desviación estándar de la pendiente)}$$

$$\sigma_{A'} = 0.02 \text{ (desviación estándar del intercepto)}$$

$$\sigma_{\text{REG}} = 7 \times 10^{-4} \text{ (desviación estándar de la regresión)}$$

$$R^2 = 0.998 \text{ (coeficiente de correlación).}$$

