

## **MATERIALES Y METODOS**

En la realización del presente trabajo se utilizó aceite de soya, el cual fue procesado a nivel industrial. El aceite fue extraído de semilla de soya, el aceite crudo obtenido fue sometido a la etapa de desgomado y posteriormente a la etapa de neutralización. El aceite neutralizado de soya fue enviado al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, en un recipiente de 25 lts, el cual fue tomado como materia prima para el blanqueo a nivel laboratorio.

### **Obtención del Aceite Neutralizado**

Se utilizó aceite de soya neutralizado producido en la planta aceitera GAMESA, S.A. de C.V. de Ciudad Obregón Sonora. Este aceite se obtuvo a partir de semilla de soya producida en E.U.A. Una vez que el aceite se encontraba en el laboratorio se almacenó en recipientes de 1 L. Las muestras fueron almacenadas bajo atmósferas de nitrógeno y congeladas a una temperatura de  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , se descongelaba únicamente aquella que era sometida al proceso de blanqueo.

### **Caracterización del Aceite de Soya Neutralizado (ASN)**

Al ASN se le realizaron las siguientes determinaciones en base a las técnicas oficiales del AOCS, 1997. Contenido de tocoferoles, color, ácidos grasos libres, valor de peróxidos, valor de *p*-anisidina, elementos traza (calcio, magnesio, hierro, cobre), fósforo, dienos conjugados y perfil de ácidos grasos (incluyendo los isómeros trans). Esto con la finalidad de establecer una caracterización físico química completa del aceite que se utilizó como materia prima al inicio del experimento. Cabe mencionar que después de obtener las condiciones óptimas de blanqueo, el aceite blanqueado fue caracterizado de la

misma manera que un aceite neutralizado para poder tener los patrones de comparación de antes y después de ser sometido al proceso de blanqueo.

### **Color**

El color fue determinado por dos métodos oficiales: Lovibond (método Cc 13e-92) y color espectrofotométrico (método Cc 13c-50, AOCS,1997). Esta determinación indica la reducción del color debido a los diferentes pigmentos coloridos como son: clorofila, carotenos y xantofilas. El colorímetro Lovibond utilizado fue un Lovibond Automatic Tintometer HF Scientific, Inc. Fort, Myers, Florida. Utilizando la celda de 51/4 de pulgada. Esta medición consiste en la comparación del color de los aceites con una serie de vidrios coloridos graduados (amarillo, rojo y verde). Además de la medición del color del aceite se cuantifico el contenido de clorofila A y B en las muestras de aceite de soya blanqueado. La medición del color espectrofotométrico se realizó midiendo la absorbancia del aceite a diferentes longitudes de onda (460, 520, 550 y 670) utilizando un espectrofotómetro (marca Perkin Elmer, Lambda 2S).

### **Acidos Grasos Libres**

Este indica el grado de descomposición de los triacilgliceridos que se encuentran presentes en el aceite. Esta se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar la acidez libre de un gramo de aceite, utilizando fenolftaleína como indicador (método Ca 5a-40, AOCS,1997).

### **Valor de Peróxidos**

Este análisis tiene la finalidad de indicar la calidad de los aceites en cada una de las etapas unitarias del procesamiento de los aceites y a su vez durante su almacenamiento (nos cuantifica los productos primarios de la oxidación). Para esta determinación se utilizan cinco gramos de la muestra y se disuelven en ácido acético-cloroformo (3:2 v/v), se agregan 0.5 ml. de KI con agitación

ocasional, la reacción es terminada añadiendo agua destilada y se titula con tiosulfato de sodio 0.1 N, usando almidón como indicador (método Cd 8-53, AOCS,1997).

#### **Valor de *p*-anisidina**

Esta determinación tiene como finalidad la cuantificación de los productos secundarios de la reacción de oxidación de las diferentes grasas y aceites, los cuales son los responsables de proporcionar los malos olores y sabores en los aceites. Un gramo de muestra se disuelven en hexano y se mide la absorbancia a 350 nm ( $As_1$ ) usando el solvente como blanco. Después, a 5 ml de esta solución de grasa se le agrega 1 ml del reactivo *p*-anisidina. Después de 10 minutos de reacción se midió la absorbancia a 350 nm ( $As$ ). Donde el valor de *p*-anisidina =  $25 \times (1.2 As_1 - As)$ /peso del aceite en gramos (método Cd 18-90, AOCS,1997).

#### **Jabón**

Esta determinación tiene como finalidad la cuantificación del jabón proveniente de la etapa de neutralización. Es un indicador de la eficiencia del proceso de neutralización. Es importante la ausencia del jabón ya que este inactiva la acción de las tierras de blanqueo en la siguiente etapa (blanqueo). La cuantificación de Jabón consiste en la medición de la alcalinidad del aceite, 10 gramos de muestra se disuelven en acetona al 98%, se agita ocasionalmente y se titula con HCl 0.01N usando como indicador azul de bromofenol (método Cc 17-79, AOCS,1997).

## Fósforo

La cuantificación del fósforo es importante ya que este se encuentra formando parte de las gomas hidratables, conocidas comúnmente como "lecitinas". La cuantificación de este elemento consiste en una digestión ácida del aceite en presencia de óxido de zinc, para posteriormente ponerse en contacto con molibdato de sodio y formar así el complejo fosfomolibdato de amonio que al ponerse en contacto con el sulfato de hidrazina forma un compuesto colorido que se lee a 650 nm (método Ca 12-55, AOCS,1997).

## Dienos Conjugados

Estos son el resultados de una modificación estructural de los ácidos grasos poliinsaturados durante la autooxidación o durante la hidrogenación parcial de los aceites vegetales, por lo cual resulta de suma importancia conocer cuando se ha iniciado la reacción de oxidación. Para esta determinación se utilizan 0.01 g de muestra, se disuelven en 25 ml. de hexano y se mide la absorbancia a 232 nm (método Ti 1a-64, AOCS,1997).

El porcentaje de ácidos dienoicos conjugado se obtiene mediante la siguiente formula:

$$\%ADC = 0.84 (\text{absorb/ long. de celda} \times \text{conc. (g/l) de muestra}) - K_0 \quad (7)$$

Donde:  $K_0$  es una constante para ésteres,  $K_0 = 0.07$

## Elementos Traza

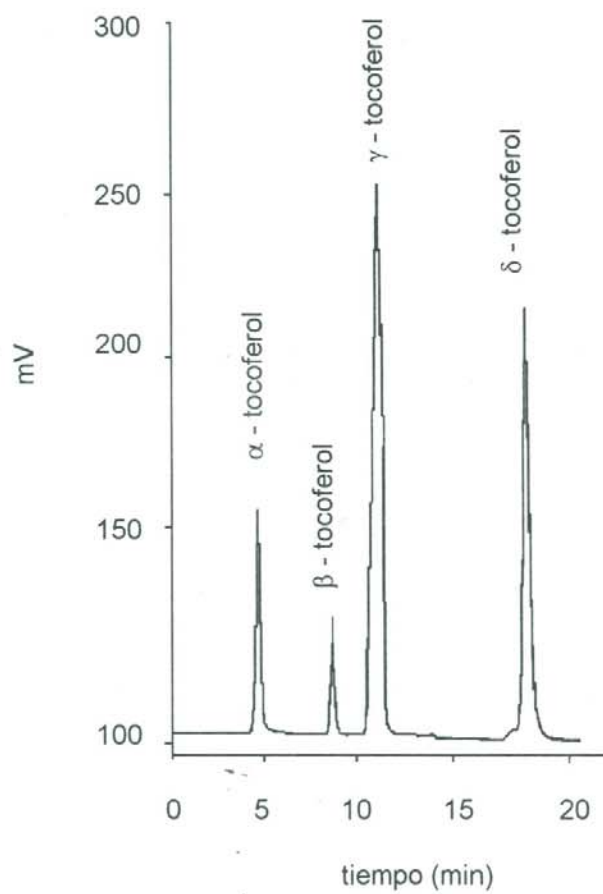
La determinación de cobre, calcio, magnesio y fierro se llevo a cabo mediante Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado por Inducción (ICP), Modelo OPTIMA 3100 XL (Secuencial/Simultaneo) con antorcha axial (horizontal). Este equipo no se encuentra en DICTUS, por lo que las muestras

fueron procesadas en la Compañía Química Sumex, Puebla, Puebla. La cuantificación de estos metales es de gran importancia debido a que están considerados como agentes prooxidantes, es decir tienen como finalidad acelerar la reacción de oxidación de los aceites. La cuantificación de estos elementos consiste en diluir la muestra en queroseno y posteriormente es leída en el equipo, en la misma medición se cuantifican todos los elementos requeridos.

### **Cuantificación de Tocoferoles**

La técnica que se utilizó para la cuantificación de tocoferoles fue cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para lo cual se utilizó un cromatografo (marca Varian 9050) equipado con un detector de luz ultravioleta (modelo Varian 3400) y una columna Lichrosorb Si60 (25 cm x 4mm 5 $\mu$ . Supelco). La fase móvil fue una mezcla de hexano:isopropanol (99.5:0.5), con un flujo de 1.6 mL/min. Antes de ser utilizada la fase móvil fue filtrada a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m. La cuantificación se llevo acabo a 292 nm.

Dos gramos de muestra fueron diluidos en 25 mL de h $\acute{e}$ xano y filtrados a través del filtro de 0.45  $\mu$ m, con vacío, 20 mm de Hg. Las muestras fueron inyectadas (10  $\mu$ l) directamente al HPLC por triplicado, tal como lo recomiendan Chase y col. (1994) y Warner y Mounts (1990). Los picos de las muestras, fueron identificados y cuantificados por la comparación de los tiempos de retención y las áreas de los estándares del  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol (Sigma Chemical Co., St. Luis MO) (**Figura 7**). La pureza de los estándares fue definida utilizando los coeficientes de extinción ( $\epsilon$  1%), según lo recomienda Yao y Col. (1992), y el método oficial AOCS Ce 8-89 (1997). Esta técnica fue validada utilizando un estándar certificado de coco (NBS 1563-2, NIST, Gaithersburg, MD, USA).



**Figura 7.** Cromatograma Típico de Tocoferoles para un Aceite de Soya.

### **Cuantificación de Ácidos Grasos y *trans* Isómeros**

Las muestras fueron sometidas a la reacción de saponificación y esterificación de acuerdo al método oficial AOCS Ce 2-66 (AOCS 1997), como lo recomienda Ackman (1998), para posteriormente ser analizados en un cromatógrafo (Varian 3400), el cual cuenta con un detector de ionización de flama (FID), un integrador (Perkin Elmer-1020) y una columna capilar con una fase estacionaria de 100% de polisiloxano biscianopropil SP 2560 (100 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA 16823-0048 USA). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 20 cm/s., con el siguiente programa de temperatura para la columna: 140 - 210°C (4 °C/min), 210-215 °C (1 °C/min), 215-220 °C (0.5 °C/min). La temperatura del inyector y detector fue de 250 °C.

La identificación de los picos se realizó por comparación con los tiempos de retención de los picos de las muestras con los picos de sus respectivos estándares (Sigma Chemical Co., St. Luis MO). Una vez identificados los picos, se realizó la cuantificación utilizando el C<sub>17:0</sub> como estándar interno, tomando en cuenta el contenido natural de C<sub>17:0</sub> del aceite de soya desodorizado. Los resultados están dados como porcentaje en peso y son la medida de dos repeticiones. El límite de detectabilidad fue de 0.01%. Con el fin de lograr una mayor estabilidad de las muestras y estándares, estos se conservaron a temperaturas de congelación y en viales de cristal con tapas de septa de teflón y atmósfera de nitrógeno. La cuantificación de los ácidos grasos y el contenido de tocoferoles proporcionan una información completa de la composición del aceite, así como de la verdadera fuente del aceite, por lo cual es importante su análisis.

### **Proceso de Blanqueo**

La operación de blanqueo se realizó por lotes en un matraz de vidrio con una capacidad de 1 litro, esta operación consistió en colocar 250 ml de aceite de soya neutralizado y la cantidad respectiva de tierra de blanqueo (Tonsil Optimum

320 FF, proporcionada por Química Sumex) esta mezcla fue calentada con una chaqueta, con agitación magnética (250 rpm) para una distribución homogénea de la mezcla y la temperatura. La temperatura fue monitoreada con un termómetro que se encontraba en el interior del aceite. Al matraz se le suministro vacío para la eliminación del oxígeno y evitar la posible oxidación del aceite (**Figura 8**). Las muestras obtenidas del proceso de blanqueo se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en viales de teflón y bajo atmósferas de nitrógeno.

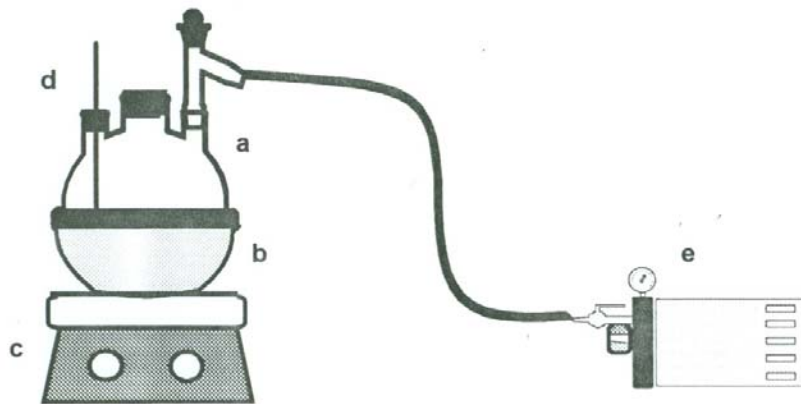
A las muestras de aceite de soya blanqueadas (20 corridas en ausencia de oxígeno y 20 con presencia de oxígeno) se les determinó el contenido de tocoferoles, valor de peróxidos, color Iovibond y color espectrofotométrico, además de clorofila A y clorofila B, según la metodología mencionada en la caracterización del aceite neutralizado.

### Diseño de Experimentos

Se utilizó un diseño de experimentos de composición central (DCC) tipo Box-Wilson (Myers y Montgomery, 1995). Las variables independientes fueron: temperatura (X1), tiempo de contacto (X2) y cantidad de tierra (X3); mientras que las variables dependientes fueron, color (Y1), valor de peróxidos (Y2) y retención de tocoferoles (Y3) en el aceite (RTOCOLES), durante el proceso de blanqueo. Las variables independientes y los niveles seleccionados para el presente diseño, se presentan en la **Tabla 7**, los cuales fueron seleccionados en base a las condiciones utilizadas en el proceso de blanqueo en la industria. En total para cada experimento se realizaron 20 corridas experimentales de las cuales 8 corresponden a un diseño factorial  $2^3$ , 6 puntos axiales y 6 repeticiones al centro.

Cada experimento se realizó en forma aleatoria con el fin de reducir la variabilidad debida a factores externos. En la **Tabla 8**, se muestra el arreglo del diseño de composición central para un modelo de segundo orden. Cabe mencionar que en el presente estudio se evaluó el efecto del vacío sobre la





**Figura 8.** Equipo Utilizado en la Operación de Blanqueo a Nivel Laboratorio  
a) Matraz de 3 bocas de 1000 ml. b) Chaqueta de Calentamiento.  
c) Placa de Agitación Magnética. d) Termómetro. e) Suministro de Vacío.

**Tabla 7.** Variables Independientes y Niveles Seleccionadas para el Diseño de Composición Central.

Variables	Unidades	Niveles		
		-1	0	1
Temperatura	°C	90	110	130
Cantidad de tierras	% <sup>1</sup>	0.5	1.0	1.5
Tiempo de contacto	min	20	40	60
Presión	mm de Hg	Sin vacío y 60 mm de Hg		

<sup>1</sup> Es el porcentaje de tierras en base al peso del aceite.

**Tabla 8.** Arreglo General para el Diseño de Composición Central Rotable

Experimento Número	Temperatura	Contenido de Tierras	Tiempo de Contacto
	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

retención de tocoferoles durante el blanqueo (sin presencia de oxígeno = 65 mm de Hg y con presencia de oxígeno), esto debido a que en algunas industrias del país se lleva cabo el proceso de blanqueo sin el cuidado necesario en el vacío. En este caso el vacío se tomó como una variable cualitativa. El DCC se utilizó para modelar y optimizar el proceso de blanqueo (metodología de superficie de respuesta). Esta metodología ha sido utilizada para optimizar otros procesos en la industria de alimentos (Draper, 1988; Krishna, 1999; Jaswir, 1999; Wanasundara, 1998), estos trabajos muestran como principal ventaja de esta metodología, que se requiere de un número reducido de experimentos para generar información suficiente y resultados estadísticamente aceptables. Se utilizó un modelo de segundo orden para la predicción de las variables individuales dependientes ( $Y_i$ ) (color, valor de peróxidos y retención de tocoferoles (RTOCOLS)), donde  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$ , son respectivamente el efecto combinado, efecto lineal, efecto cuadrático y la interacción en la regresión. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para conocer el efecto de los tratamientos; una regresión polinomial para el establecimiento del modelo matemático; y el análisis de superficie respuesta utilizando el paquete estadístico JMP IN ver. 3.2.1 (Statistical Graphic Corp.), para la obtención de las condiciones adecuadas para tener un aceite con la mayor cantidad de retención de tocoferoles.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (8)$$