



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA
QUÍMICA**

TESIS

**DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y
COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES EN LAS
SEMILLAS DE DOS MORFOTIPOS DE MACAMBO *Theobroma
bicolor* (Humb. & Bompl)**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTADO POR:

MIGUEL JAZED LÓPEZ VELÁSQUEZ

ASESORES:

ING. JORGE MANASÉS RÍOS RÍOS. MSc.

ING. GABRIEL EMILIO VARGAS ARANA. Dr.

IQUITOS, PERÚ

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
Facultad de Ingeniería Química



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 006-CGT-FIQ-UNAP

En Iquitos, en el auditorio de la Facultad de Ingeniería Química a los diez y ocho días del mes de noviembre del dos mil veinte, a horas diez y diez, se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES EN LAS SEMILLAS DE DOS MORFOTIPOS DE MACAMBO *Theobroma bicolor* (Humb. & Bompf)", aprobado con Resolución Decanal N° 279-2018-FIQ-UNAP, presentado por el Bachiller: MIGUEL JAZED LÓPEZ VELÁSQUEZ, para optar el título profesional de **Ingeniero Químico**, que otorga la Universidad de acuerdo Ley y Estatuto.


El jurado calificador y dictaminador designado mediante R. D. N° 102-2020-FIQ-UNAP está integrado por:

Ing. JORGE ARMANDO VÁSQUEZ PINEDO, Dr.	Presidente
Ing. DUMA LUZ RENGIFO PINEDO, Dra.	Miembro
Ing. DANIEL DIOMEDES CARRASCO MONTAÑEZ, MSc.	Miembro

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: satisfactoriamente

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:


La sustentación pública y la tesis han sido: aprobadas con la calificación muy buena (17) Estando el bachiller apto para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Químico** siendo las once y cuarenta se dio por terminado el acto de sustentación


Ing. JORGE ARMANDO VÁSQUEZ PINEDO, Dr.
Presidente

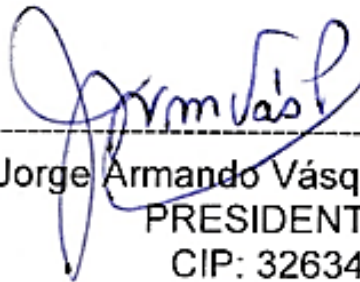

Ing. DUMA LUZ RENGIFO PINEDO, Dra.
Miembro


Ing. DANIEL DIOMEDES CARRASCO MONTAÑEZ, MSc.
Miembro

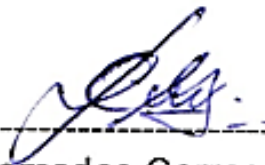

Ing. JORGE MANASES RÍOS RÍOS, MSc.
Asesor


Ing. GABRIEL EMILIO VARGAS ARANA, Dr.
Asesor

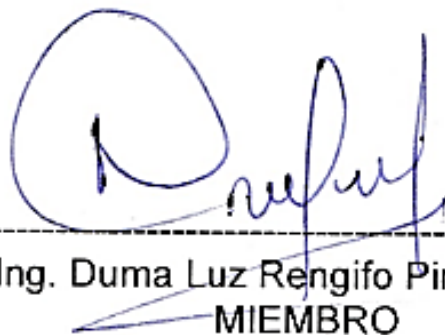
JURADO



Ing. Jorge Armando Vásquez Pinedo Dr.
PRESIDENTE
CIP: 32634

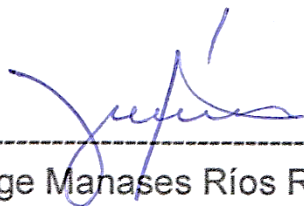


Ing. Daniel Diomedes Carrasco Montañez MSc.
MIEMBRO
CIP: 96801



Ing. Duma Luz Rengifo Pinedo, Dra.
MIEMBRO
CIP: 26294

ASESORES



Ing. Jorge Manases Ríos Ríos. MSc.
ASESOR
CIP: 32015



Ing. Gabriel Emilio Vargas Arana Dr.
ASESOR
CIP: 147224

A mis padres **Jazmín** y **Edwar** que son pilares fundamentales en mi formación como profesional, a mis hermanos Frank y Milady por siempre estar conmigo en todo momento y de manera especial a Samanta Ramírez, mi compañera de toda la vida.

Miguel Jazed

AGRADECIMIENTO:

A Dios, por permitirme concluir con bien este trabajo de investigación.

Al Msc. Jorge Manases Ríos Ríos por su apoyo y dedicación a pesar de tener su tiempo limitado, por las sugerencias, y enseñanzas brindadas en la culminación este trabajo de investigación.

Al Dr. Gabriel Vargas Arana, por la oportunidad brindada para realizar este trabajo de Investigación, por ser un referente en la labor de investigador amazónico

A las personas encargadas de Laboratorio de Química de Productos Naturales (LQPN) del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) por facilitarme la realización de esta investigación y permitir utilizar sus instalaciones, así como sus materiales, equipos y reactivos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Química de Productos naturales, en especial de Ing. Claudia Merino y Dr. Billy Cabanillas, por todas las experiencias vividas y las enseñanzas compartidas.

Miguel Jazed

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
JURADO	iii
ASESORES	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas	4
1.2.1. Especie en Estudio	4
1.2.1.1. Aspectos Botánicos	5
1.2.1.2. Descripción Botánica	5
1.2.1.3. Usos Comunes	6
1.2.1.4. Distribución, Clima y Suelos	6
1.2.1.5. Otros Nombres	7
1.2.1.6. Fruto del <i>Theobroma bicolor</i> (macambo)	7
1.2.1.7. Composición nutricional de la pulpa y semilla del macambo	7
1.3. Definición de Términos Básicos	8
CAPÍTULO II	13
HIPÓTESIS Y VARIABLES	13
2.1. Formulación de la Hipótesis	13
2.1.1. Hipótesis General	13
2.1.2. Hipótesis Específico	13

2.2. Variables y su Operacionalización	13
2.2.1. Variable de Estudio	13
CAPÍTULO III	15
METODOLOGÍA	15
3.1. Tipo y Diseño	15
3.2. Diseño Muestral	15
3.3. Procedimiento de Recolección de Datos	16
3.3.1. Materiales, Equipos y Reactivos	16
3.3.1.1. Materiales	16
3.3.1.2. Equipos	17
3.3.1.3. Reactivos	17
3.3.2. Lugar de ejecución	18
3.3.3. Colecta del material vegetal	18
3.3.4. Selección y clasificación de morfotipos	18
3.3.5. Extracción de semillas	19
3.3.6. Secado de semillas	19
3.3.7. Molienda de semillas secas	19
3.3.8. Extracción de aceite.	19
3.3.9. Separación del solvente.	19
3.3.10. Obtención de aceite para los análisis.	20
3.3.11. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del aceite de las semillas.	21
3.3.11.1. Determinación del índice de acidez	21
3.3.11.2. Determinación del índice de saponificación	22
3.3.11.3. Determinación del índice de peróxido	24
3.3.11.4. Determinación del índice de yodo	26
3.3.11.5. Determinación del material insaponificable	28
3.3.12. Determinación de la composición de ácidos grasos del aceite por Cromatografía gaseosa	30
3.3.12.1. Características del método para la determinación de la composición de ácidos por cromatografía gaseosa.	30
3.4. Procesamiento y Análisis de los Datos	33
3.5. Aspectos Éticos	33
CAPÍTULO IV:	34
RESULTADOS	34
4.1. Porcentaje del rendimiento del aceite de los dos morfotipos de macambo " <i>Theobroma bicolor</i> (Humb. & Bompl)"	34

4.1.1. Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 1:	34
4.1.2. Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 2:	34
4.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del <i>Theobroma bicolor</i> (morfotipo 1)	35
4.2.1. Resultado del índice de acidez del aceite:	35
4.2.2. Resultado del índice saponificación del aceite.	35
4.2.3. Resultado del índice de peróxidos del aceite.	36
4.2.4. Resultado del índice de yodo del aceite.	36
4.2.5. Resultado del material insaponificable del aceite:	37
4.3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del aceite <i>Theobroma bicolor</i> (morfotipo 2)	37
4.3.1. Resultado del índice de acidez del aceite:	37
4.3.2. Resultado del índice saponificación del aceite	38
4.3.3. Resultado del índice de peróxidos del aceite.	38
4.3.4. Determinación del índice de yodo del aceite:	39
4.3.5. Resultado del material insaponificable del aceite:	39
4.4. Comparación de los resultados de las propiedades fisicoquímicas del aceite del <i>Theobroma bicolor</i> (morfotipo 1 y morfotipo 2).	40
4.5. Composición porcentual de ácidos grasos del aceite del <i>Theobroma bicolor</i> (morfotipo 1).	41
4.5.1. Composición porcentual de los ácidos grasos saturados:	41
4.5.1.1. Resultados porcentuales del ácido palmítico:	41
4.5.1.2. Resultados porcentuales del ácido esteárico:	41
4.5.2. Composición porcentual de ácidos grasos insaturados.	42
4.5.2.1. Resultados porcentuales del ácido palmitoleico:	42
4.5.2.2. Resultados porcentuales del ácido oleico:	42
4.5.2.3. Resultados porcentuales del ácido linoleico:	43
4.5.2.4. Resultados porcentuales del ácido linolénico:	43
4.6. Composición porcentual de ácidos grasos del aceite del <i>Theobroma bicolor</i> (morfotipo 2).	44
4.6.1. Composición porcentual de los ácidos grasos saturados:	44
4.6.1.1. Resultado porcentual del ácido palmítico:	44
4.6.1.2. Resultado porcentual del ácido esteárico:	44
4.6.2. Composición porcentual de ácidos grasos insaturados.	45
4.6.2.1. Resultado porcentual del ácido palmitoleico:	45
4.6.2.2. Resultado porcentual del ácido oleico:	45
4.6.2.3. Resultado porcentual del ácido linoleico:	46

4.6.2.4.Resultado porcentual del ácido linolénico:	46
4.7. Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos saturados del <i>Theobroma bicolor</i> (morfortipo 1 y morfortipo 2)	47
4.8. Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos insaturados del <i>Theobroma bicolor</i> (morfortipo 1 y morfortipo 2)	47
CAPÍTULO V	49
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:	49
CAPÍTULO VI	51
CONCLUSIONES.	51
CAPÍTULO VII	53
RECOMENDACIONES	53
CAPÍTULO VII	53
FUENTES DE INFORMACIÓN	54
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: <i>Theobroma bicolor</i> (Macambo)	4
Figura N° 2: Fruto de <i>Theobroma bicolor</i> (macambo)	6
Figura N° 3: Árbol de <i>Theobroma bicolor</i> (macambo)	6
Figura N° 4: Ácido Oleico	10
Figura N° 5: Ácido linoleico	11
Figura N° 6: Ácido linolenico	11
Figura N° 7: Ácido Palmitoleico	11
Figura N° 8: Ácido palmítico	12
Figura N° 9: Ácido esteárico	12
Figura N° 10: <i>Theobroma bicolor</i> (INIA)	15
Figura N° 11: Laboratorio de Química de Productos Naturales - IIAP	18
Figura N° 12: Morfotipo 1 <i>Theobroma bicolor</i> (pequeño rugoso)	18
Figura N° 13: Morfotipo 2 <i>Theobroma bicolor</i> (liso suave)	19
Figura N° 14: Diagrama de flujo de la extracción de aceite de los dos morfotipos.	20
Figura N° 15: Diagrama de flujo de la determinación del grado de acidez	21
Figura N° 16: Diagrama de flujo de la determinación de índice de saponificación	23
Figura N° 17: Diagrama de flujo de la determinación del índice de peróxido	25
Figura N° 18: Diagrama de flujo de la determinación del índice de yodo	27
Figura N° 19: Diagrama de flujo en la determinación del material Insaponificable	29
Figura N° 20: Equipo de cromatografía de gases	31
Figura N° 21: Diagrama de flujo de ácidos grasos por cromatografía de gases	32

ÍNDICE DE TABLAS	Páginas
Tabla N° 1: Composición nutricional de pulpa y semilla de macambo	8
Tabla N° 2: Cuadro de Operacionalización de variables	14
Tabla N° 3: Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 1	34
Tabla N° 4: Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 2	34
Tabla N° 5: Resultado de índice de acidez del aceite	35
Tabla N° 6: Resultado de índice de saponificación del aceite	35
Tabla N° 7: Resultado del índice de peróxidos del aceite	36
Tabla N° 8: Resultado del Índice de Yodo del aceite	36
Tabla N° 9: Resultado del porcentaje de material insaponificable.	37
Tabla N° 10: Resultado del índice de acidez del aceite	37
Tabla N° 11: Resultado del índice saponificación del aceite	38
Tabla N° 12: Resultado del índice de peróxido del aceite	38
Tabla N° 13: Determinación del índice de yodo del aceite	39
Tabla N° 14: Resultado del material insaponificable del aceite	39
Tabla N° 15: Comparación de los resultados de las propiedades fisicoquímicas del aceite del <i>Theobroma bicolor</i> (morfotipo 1 y morfotipo 2).	40
Tabla N° 16: Resultados porcentuales del ácido palmítico	41
Tabla N° 17: Resultados porcentuales del ácido esteárico	41
Tabla N° 18: Resultados porcentuales del ácido palmitoleico	42
Tabla N° 19: Resultados porcentuales del ácido oleico	42
Tabla N° 20: Resultados porcentuales del ácido linoleico	43
Tabla N° 21: Resultados porcentuales del ácido linolénico	43
Tabla N° 22: Resultados porcentuales del ácido palmítico	44
Tabla N° 23: Resultados porcentuales del ácido esteárico	44
Tabla N° 24: Resultados porcentuales del ácido palmitoleico	45

Tabla N° 25: Resultados porcentuales del ácido oleico	45
Tabla N° 26: Resultados porcentuales del ácido linoleico	46
Tabla N° 27: Resultados porcentuales del ácido linolénico	46
Tabla N° 28: Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos saturados del <i>Theobroma bicolor</i> (morfortipo 1 y morfortipo 2)	47
Tabla N° 29: Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos insaturados <i>Theobroma bicolor</i> (morfortipo 1 y morfortipo 2)	47

ÍNDICE DE ANEXOS	Páginas
Anexo N° 1: Lista De Abreviaturas	59
Anexo N° 2: Fotos de las variedades del <i>Theobroma bicolor</i>	61
Anexo N° 3: Imágenes del procedimiento para la extracción del aceite de <i>Theobroma bicolor</i>	62
Anexo N° 4: Imágenes para determinar el índice de acidez <i>Theobroma bicolor</i>	63
Anexo N° 5: Imágenes para determinar el Índice de Peróxido <i>Theobroma bicolor</i> .	64
Anexo N° 6: Determinación del Índice de Saponificación	65
Anexo N° 7: Determinación del Índice de Yodo	66
Anexo N° 8: Determinación del Material Insaponificable	67
Anexo N° 9: Imágenes de la determinación de la composición de ácidos grasos	68
Anexo N° 10: Cálculo del rendimiento porcentual del aceite de los dos morfotipos	69
Anexo N° 11: Cálculo del Índice de acidez de los morfotipos	70
Anexo N° 12: Cálculo del Índice de saponificación de los morfotipos	71
Anexo N° 13: Cálculo del índice de peróxido de los morfotipos	72
Anexo N° 14: Cálculo del índice de yodo de dos morfotipos	73
Anexo N° 15: Cálculo del porcentaje de materia insaponificable de los morfotipos	74
Anexo N° 16: Cromatograma de ácidos grasos de macambo " <i>Theobroma bicolor</i> (Humb. & Bompl)" morfotipo 1	75
Anexo N° 17: Cromatograma de ácidos grasos de macambo " <i>Theobroma bicolor</i> (Humb. & Bompl)" morfotipo 2	76
Anexo N° 18: Protocolo de Determinación de Índice de Acidez	77
Anexo N° 19: Protocolo de Determinación de Índice de Saponificable	79
Anexo N° 20: Protocolo de Determinación de Índice de Peróxido	81
Anexo N° 21: Protocolo en la determinación del índice yodo	84
Anexo N° 22: Protocolo en la determinación de material insaponificable	86

RESUMEN

El presente estudio de investigación tuvo como finalidad determinar las propiedades fisicoquímicas y la composición de ácidos grasos de los aceites de las semillas de dos morfotipos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)". El tipo de estudio fue descriptivo con diseño analítico. Las muestras de los morfotipos "macambo pequeño rugoso, designado (morfotipo 1) y macambo liso suave designado como (morfotipo 2), fueron extraídos aleatoriamente de los campos experimentales del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) ubicado en el Km 25 de la carretera Iquitos-Nauta. Los resultados obtenidos del porcentaje de aceite del morfotipo 1 es 25,31 % y del morfotipo 2 es 42,67 %.

La comparación de los resultados fisicoquímicos de los aceites de las semillas del morfotipo 1 y morfotipo 2 "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)", son: semejantes, como se puede notar: el índice de acidez es 0,69 y 0,96 mgKOH/g; índice de saponificación 170,99 y 163,99 mgKOH/g; índice de peróxidos 9,43 y 12,47 meqO₂/Kg; índice de yodo 24,3 y 34,73 gl₂/100g y el material Insaponificable 0,63 y 0,47 %. Se determinó la composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa, encontrándose principalmente el ácido esteárico 50,88 % del total de ácidos grasos presentes en el morfotipo 1 y 51,68 % en el morfotipo 2, también se determinó la presencia de ácido oleico con 37,56 % para el morfotipo 1 y 36,48 % para el morfotipo 2, además de otros ácidos grasos insaturados como el ácido palmitoleico, ácido linoleico y el ácido linolénico.

Se concluye que el rendimiento, las características fisicoquímicas y la composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de los dos morfotipos del "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" presentan características propias en cada morfotipo.

PALABRAS CLAVES: Morfotipo, *Theobroma bicolor*, liso suave, pequeño rugoso

ABSTRACT

The present research study had the aim of determining the physicochemical properties and the fatty acid composition of the oils from the seeds of two morphotypes of macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)". The type of study was descriptive with analytical design. The samples of the morphotypes "small rough macambo, designated (morphotype 1) and smooth smooth macambo designated as (morphotype 2), were randomly extracted from the experimental fields of the National Institute of Agricultural Research (INIA) located at Km 25 of the Iquitos-Nauta highway. The results obtained from the percentage of oil of morphotype 1 is 25.31 % and of morphotype 2 is 42.67 %.

The comparison of the physicochemical results of the oils from the seeds of the morphotype 1 and morphotype 2 "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)", are: similar, as it can be noticed: acid index is 0.69 and 0.96 mgKOH/g; saponification index 170.99 and 163.99 mgKOH/g; peroxide index 9.43 and 12.47 meqO₂/Kg; iodine index 24.3 and 34.73 gI₂/100g and unsaponifiable material 0.63 and 0.47 %. It was determined the composition of fatty acids by gas chromatography, being mainly the stearic acid 50.88% of the total fatty acids present in morphotype 1 and 51.68% in morphotype 2, it was also determined the presence of oleic acid with 37.56% for morphotype 1 and 36.48% for morphotype 2, besides other unsaturated fatty acids such as palmitoleic acid, linoleic acid and linolenic acid. It is concluded that the yield, physicochemical characteristics and fatty acid composition of the oil from the seeds of the two morphotypes of the "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" have their own characteristics in each morphotype.

KEY WORDS: Morphotype, *Theobroma bicolor*. Smooth soft, small rough

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un crecimiento importante de investigaciones relacionados al estudio de la composición química de compuestos de productos naturales, principalmente de aquellos que se utilizan para la elaboración de productos dirigidos a la industria alimentaria, así como también los residuos que quedan en el proceso de fabricación de estos productos.

Las semillas de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" en los últimos años vienen siendo popularizado gracias a sus múltiples beneficios para el ser humano, tiene altas concentraciones de fibra y ácidos grasos insaturados, que ayudan a la disminución del colesterol, y al control de los niveles de azúcar en la sangre. (1)

La especie *Theobroma bicolor*, se encuentra dispersa en forma silvestre y cultivada a lo largo de la Amazonía peruana, es por ello, que este fruto y en especial la semilla se presenta como una alternativa atractiva en el poblador amazónico para la integración de su dieta habitual y para la transformación industrial. (1)

Por otra parte, para una comprensión de las utilidades que se le podrían aplicar a los aceites de las semillas de los morfotipos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" en el presente estudio, es necesario conocer las propiedades fisicoquímicas y la composición de ácidos grasos, para compararlas con otros productos que sean menos accesibles o más costosos en la región Loreto, para una posible sustitución total o parcial.

Las preocupaciones de la población en relación a la obesidad y a las cardiopatías coronarias han aumentado el interés general por minimizar el consumo de grasas saturadas y grasas trans. Estas preocupaciones han sido el principal motor de la industria de lípidos a la hora de desarrollar grasas e ingredientes ricos en grasas con mejores propiedades nutritivas. (2)

Debido al gran potencial de los ácidos grasos oleico y esteárico de la especie en estudio, es un aporte importante para la industria alimentaria y también dar a conocer a la comunidad loreтана, que artesanalmente se puede obtener los aceites los cuales contribuirán al descenso de enfermedades cardiovasculares.

El trabajo de investigación realizado se basa en la determinación de las propiedades fisicoquímicas y la caracterización de los ácidos grasos, del aceite de las semillas de dos morfotipos, en la cual se han obtenido resultados interesantes sobre las bondades de los aceites obtenidos

Es necesario continuar con los trabajos de investigación con las otras especies de este género por sus bondades en la alimentación y en la salud de la población amazónica.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Es importante mencionar que se ha realizado una revisión bibliográfica de antecedentes a nivel general, que ayudaran a discutir los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

En el año 2017, se realizó una investigación descriptiva y diseño analítico, teniendo como población El jardín de frutales nativos de la Reserva Nacional Alpahuayo-Mishana en Iquitos, Perú. Se evaluó las características fisicoquímicas de dos morfotipos de macambo (*Theobroma bicolor*), los cuales poseen como característica morfológica una cáscara rugosa y dura, al que le denominó morfotipo 1; el segundo tipo posee una cáscara rugosa y blanda al que denominó morfotipo 2. Como resultado de los ensayos realizados fueron de las semillas, donde se obtuvo los siguientes resultados: el porcentaje de aceite extraído de las semillas de los morfotipos 1 y 2, fueron 22,15 y 25,71 % (3).

En el año 2010, se realizó una investigación de aportación a la investigación científica, dando origen a la elaboración del Manual de Cultivo de Macambo en el Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana – IIAP. Publicación en la que se describe las principales características de los ácidos grasos del aceite de las semillas del macambo (*Theobroma bicolor*) en los que se encuentra una mayor concentración de ácidos grasos saturados 57,94 %, en el que destaca el ácido esteárico, mientras que los ácidos grasos insaturados representan el 42,06 %, en el que se determinó que el ácido oleico representa 39,9 %, ácido linoleico 2,2 % y ácido linolénico 0,2 %. (4)

En el 2010 en Ginebra, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) publica el estudio “*Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos*”. Libro que realiza un análisis profundo a los principales ácidos grasos saturados que se encuentran en los aceites y grasas de origen animal, vegetal y su relación con la obesidad y enfermedades cardiovasculares. La investigación

presenta evidencias entra la similitud que existe entre el ácido esteárico (C18:0) y el ácido oleico (C18:1) en relación a los cambios favorables que producen para la salud y mejoran sus valores de lípidos séricos: el ácido esteárico disminuye el colesterol total en - 0,010 mmol/L y ácido oleico - 0,006 mmol/L; así como en el colesterol LDL el ácido esteárico disminuye -0,004 mmol/L y ácido oleico es - 0,009 mmol/L; en colesterol HDL el ácido esteárico aumenta las concentraciones en +0,002 mmol/L y ácido oleico en +0,008 mmol/L. Presentándose como alternativas para la integración de una dieta saludable. (2)

En el 2007, en Guatemala se realizó la investigación de la composición química de distintas mezclas de semillas de las especies *Theobroma bicolor* y *Theobroma cacao*. Los datos obtenidos del *Theobroma bicolor*, en el contenido de ácidos grasos presentes son: ácido esteárico 44,92 %, ácido oleico 46,85 %, ácido palmítico 6,37 % y ácido linoleico 1,88 %. (5)

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Especie en Estudio

La especie en del presente trabajo es *Theobroma bicolor*, conocida en la región Amazónica como “macambo”. (6)



Figura N° 1: *Theobroma bicolor* (Macambo)

1.2.1.1. Aspectos Botánicos

La especie vegetal *Theobroma bicolor* fue descrita por Humb & Bompl.

Descripción de la especie:

- Nombre Común : “Macambo”.
- Nombre Científico : *Theobroma bicolor*
- Familia : Sterculiaceae
- Género : *Theobroma*
- Especie : *bicolor*
- Reino : Plantae
- Subreino : Tracheobinta
- División : Magnoliophyta
- Clase : Magnoliopsida
- Subclase : Caryophyllidae
- Orden : Malvales
- Determinadores : Humboldt & Bonpland (7).

1.2.1.2. Descripción Botánica

Es un árbol que al estado natural en el bosque puede alcanzar hasta 25 a 30 m de altura y 20 a 30 cm de diámetro. Cultivado puede tener menores dimensiones, copa oblonga e irregular, conformada por escasos verticilos de tres ramas pendulares que pueden llegar a tocar el suelo. Corteza externa agrietada color beige gris. (8) (9).

Son Hojas simples, alternas, con estipulas nerviación palmeada con 5 a 7 nervios conspicuos en el envés; haz blanquecino. Láminas dimorfas en el tronco, ampliamente ovado cordadas, de 12 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de ancho, en las ramas laterales de forma oblonga a elíptico-ovadas (1).

El fruto es una cápsula voluminosa de diversos tamaños, su peso fluctúa entre 300 y 400 g y las formas varían desde redondeadas hasta ovaladas. La corteza puede ser reticulada o lisa

de color amarillo cuando madura. Las numerosas semillas están rodeadas por una pulpa blancuzca o amarillenta de olor fuerte y sabor agridulce que es de carácter comestible. Los frutos maduros se recogen cuando han caído al suelo. (10)



Figura N° 2: Fruto de *Theobroma bicolor* (macambo)



Figura N° 3: Árbol de *Theobroma bicolor* (macambo)

1.2.1.3. Usos Comunes

La parte utilizada del fruto es la pulpa y las semillas para producir jugos, chocolate y otros derivados aptos para la agroindustria; también se utiliza como recurso genético para el mejoramiento del cultivo de cacao ya que pertenecen a la misma familia y género (11).

1.2.1.4. Distribución, Clima y Suelos

El género *Theobroma* es una especie nativa de América tropical, probablemente originaria de la Amazonía occidental. Es una planta silvestre que crece desde México hasta Brasil (12).

En la cuenca amazónica de América del sur, se distribuye en los países de Bolivia, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela, Surinam y Guyana. (9)

En el Perú, el *Theobroma bicolor* se cultiva principalmente en los departamentos de Loreto, Ucayali, San Martín y Junín. (12)

Las Especies se adapta a temperatura media anual de 25-28 °C, precipitación anual de 900-3000 mm, altitud variable desde el nivel del mar hasta 1000 msnm. (9) y (13).

1.2.1.5. Otros Nombres

En el Perú es conocido con el nombre regional de “macambo”; cacao do Perú (Brasil); bacau (Colombia); patashte (Estados Unidos) (9).

1.2.1.6. Fruto del *Theobroma bicolor* (macambo)

Es una capsula voluminosa, con una longitud que va desde 15 cm a 35 cm y un ancho de 15 cm, con pesos que oscilan entre 300 g y 4000 g aproximadamente (8) (9). Sus formas varían desde ovaladas hasta redondeadas, tiene una cascara leñosa y compacta de 12 mm de espesor con muchas fisuras de color amarillo cuando están maduras y verdes cuando aún no están maduras. La producción de frutos se inicia a partir del tercer año de cultivo y produce alrededor de 15 a 40 frutos por cosecha. El mes de mayo es la etapa donde florece y la cosecha generalmente se realizan entre los meses de febrero a marzo y de setiembre a octubre, y si hay abundancia de agua los árboles producen frutos todo el año. Cuando caen las hojas que rodean al fruto maduro indica que es tiempo que debe ser cosechado, aunque actualmente los frutos maduros se recogen anualmente. (14)

1.2.1.7. Composición nutricional de la pulpa y semilla del macambo

Nutricionalmente tiene un alto contenido en proteínas y carbohidratos, según estudios la pulpa y semilla reportan 177 kcal de energía y son ricas en vitaminas hidrosolubles: retinol, tiamina, riboflavina, niacina y vitamina C; y minerales como: calcio, fósforo y hierro. Sin embargo, no existen estudios, sobre la composición de aminoácidos del fruto de macambo (15). A continuación, se muestra la tabla sobre la composición Nutricional de la Pulpa y semilla de Macambo.

Tabla N° 1: Composición nutricional de pulpa y semilla de macambo

NUTRIENTES %	Semilla de Macambo	Pulpa de Macambo
	Furlán y Bressani, 1999	Sinchi-Uniamazonia, 2000
Humedad	5,57	87,90
Proteínas	24,42	1,66
Carbohidratos	15,10	7,44
Grasas	25,48	0,48
Cenizas	4,14	1,08
Fibras	30,86	1,44

Fuente: Natividad Chirinos (15)

1.3. Definición de Términos Básicos

Morfotipo:

Son todas las características de las plantas (formas, colores, órganos y estructuras), se pueden diferenciar a simple vista y haciendo uso de herramientas sencillas, a veces ciertas plantas muestran el mismo fenotipo, sin embargo, no significa que son de la misma constitución genética. (16)

Lípidos:

“Los lípidos es un conjunto de biomoléculas cuya característica distintiva es la insolubilidad en agua y la solubilidad en solventes orgánicos como benceno, cloroformo, hexano, entre otros”. (17)

Otras referencias también lo definen como grasas en su estado sólido y aceites cuando se encuentran líquidos a temperatura ambiente; sin embargo, con frecuencia, el término grasas se utiliza para referirse en general a los lípidos. (18).

Propiedades fisicoquímicas:

“Es parte de la química que estudia los fenómenos químicos o de interés para la química desde un punto de vista metodológico físico con la finalidad de determinar componentes analíticos (19)

Índice de acidez:

Es la cantidad en miligramos de Hidróxido de sodio NaOH ó Hidróxido de potasio KOH necesarios para neutralizar 1 gramo de muestra. (20).

Índice de Saponificación:

Es la cantidad de hidróxido de potasio (KOH) expresada en miligramos, necesarios para realizar el proceso de saponificación de 1 gramo de grasa. Cabe indicar que las grasas que contienen ácidos grasos de cadena corta consumen más KOH en su saponificación y mientras que los ácidos grasos de cadena larga consumen menos de este álcali exhibiendo valores menores del índice de saponificación. (21)

Índice de Peróxidos

Es la cantidad de miliequivalentes de oxígeno activo presentes en 1000 g de aceite o grasa, y nos proporciona información sobre el grado de oxidación de un aceite. La reacción de oxidación de lípidos es quizá el proceso más importante que se lleva a cabo en los alimentos, y ha sido objeto de un amplio número de investigaciones. (22)

Índice de Yodo:

Es la medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa, será mayor cuanto más sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, este método se utiliza para comprobar la pureza y la identidad de grasas (23).

Materia Insaponificable:

Son sustancias presentes con frecuencia disueltas en grasas y aceites que no pudieron ser saponificadas por el tratamiento cáustico normal, pero que a la vez son solubles en solventes de aceites y grasas. Incluso en el grupo de compuestos de los alcoholes alifáticos de cadena larga, esteroides, pigmentos e hidrocarburos. (24)

Ácidos Grasos:

Químicamente los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas de longitud variable, con un grupo carboxilo en su extremo son saturados como insaturados, también son constituyentes tanto de los triglicéridos, lípidos complejos o pueden hallarse en forma libre, además pueden esterificar el colesterol. Este tipo lípidos es una importante fuente de energía para las células. (25)

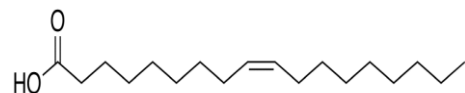
Ácidos grasos insaturados

Son ácidos orgánicos que se caracterizan porque en la cadena hidrocarbonada aparece una doble unión C = C y pueden ser insaturados con una o más insaturaciones, lo cual fuera de introducir una rigidez en la molécula, automáticamente complica la química de los ácidos grasos al presentarse dos tipos de isomerismos: uno de posición y otro geométrico de tipo cis-trans que le confiere propiedades diferentes a los ácidos grasos (28). Cuando un ácido graso presenta un único doble enlace se le denomina “monoinsaturado” o “monoénico”. Si contiene más de uno se le llama “poliinsaturado” o “poliénico”. La presencia de dobles enlaces en la estructura de un ácido graso cambia notablemente sus propiedades químicas y físicas. Por ejemplo, mientras un ácido graso saturado puede ser un sólido a temperatura ambiente, el ácido graso mono o poliinsaturado de igual número de carbono será generalmente un líquido (27).

Ácido oleico.

Es un ácido graso monoinsaturado de la serie del omega 9, su fórmula química es $C_{18}H_{34}O_2$, es utilizado por el ser humano para prevenir el desarrollo de padecimientos cardiovasculares, ayuda a disminuir el colesterol malo y también los triglicéridos en la sangre. (32)

Figura N°4: Ácido Oleico

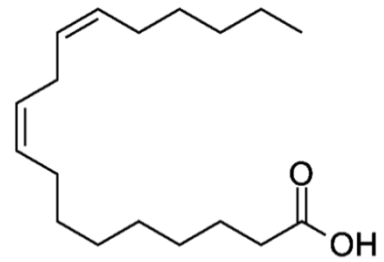


Fuente: UNIIQUIM (28)

Ácido linoleico

Es un ácido graso poliinsaturado de la serie del omega 6, su fórmula química es $C_{18}H_{32}O_2$, que generalmente es encontrada en los vegetales: como el aceite de soya, girasol, maíz, trigo, etc, se caracterizan por tener dobles enlaces en posición conjugada o contigua, tiene efectos beneficiosos para el hueso. (30) (31)

Figura N°5: Ácido linoleico

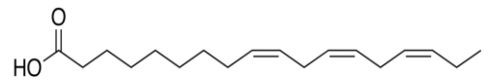


Fuente: UNIIQUIM (28)

Ácido linolénico

Es un ácido poliinsaturado de la serie del omega 3, su fórmula química es $C_{18}H_{30}O_2$, se caracteriza por tener tres dobles enlaces, los cuales le generan la características de ser fácilmente oxidados. (33)

Figura N°6: Ácido linolénico

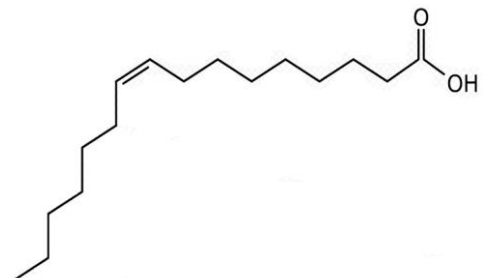


Fuente: UNIIQUIM (28)

Ácido palmitoleico

Es un ácido graso monoinsaturado de la serie del omega 7, su fórmula química es $C_{16}H_{30}O_2$, que se encuentra en todos los tejidos de los seres vivos. (34)

Figura N°7: Ácido Palmitoleico



Fuente: UNIIQUIM (28)

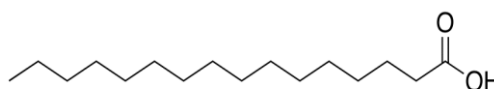
Ácidos Grasos Saturados

Son ácidos orgánicos que se encuentran en las grasas, se caracterizan por no tener dobles enlaces y punto de fusión medianamente elevado por la abundantes fuerzas de van der Waals entre cadenas que favorecen la inmovilidad y el empaquetamiento entre moléculas, propios del estado sólido dando origen a las grasas sólidas (cebos y mantecas), debe ser consumida con mucha moderación porque se le relaciona con el colesterol. (29)

Ácido palmítico

Es un ácido graso saturado de cadena larga, su fórmula química es $C_{16}H_{32}O_2$, es el menos saludable porque aumenta los niveles de colesterol en la sangre, lo cual hace que sea más c (relación entre colesterol total y colesterol HDL), (34).

Figura N°8: Ácido palmítico

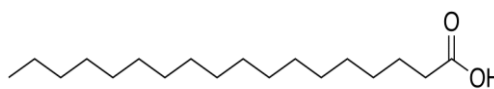


Fuente: UNIIQUIM (28)

Ácido esteárico.

Es un ácido graso saturado de cadena larga, su fórmula química es $C_{18}H_{36}O_2$, que se encuentran en los aceites y grasas de animales y vegetales, es utilizado para la fabricación de jabones, también en elaboración de velas y el campo cosmético. (34).

Figura N°9: Ácido esteárico



Fuente: UNIIQUIM (28)

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la Hipótesis

2.1.1. Hipótesis General

Existen diferencias en las características fisicoquímicas y composición de ácidos grasos del aceite en las semillas de los dos morfotipos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)".

2.1.2. Hipótesis Específico

- Los aceites de las semillas de dos morfotipos de macambo, (*Theobroma bicolor*) presentan diferencias significativas en propiedades fisicoquímicas.
- Los aceites de las semillas de los dos morfotipos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" presentan diferencias en la composición de los ácidos grasos.

2.2. Variables y su Operacionalización

2.2.1. Variables de estudio.

- Aceite de las semillas de los frutos de dos morfotipos de macambo (*Theobroma bicolor*).
- Propiedades fisicoquímicas.
- Composición de ácidos grasos.

Tabla N° 2: Cuadro de Operacionalización de variables

Variables de Estudio	Indicadores	Índices
Aceite de las semillas de dos morfotipos de macambo (<i>Theobroma bicolor</i>).	Rendimiento de aceite	%
Propiedades fisicoquímicas.	Índice de acidez Índice de saponificación Índice de Peróxidos Índice de yodo Materia Insaponificable	mgKOH/g mgKOH/g meqO ₂ /Kg gl ₂ /100g %
Composición de ácidos grasos.	Ácidos grasos saturados - Ácido Palmítico - Ácido Esteárico	% %
	Ácidos Grasos insaturados - Ácidos Oleico - Ácidos Linoleico - Ácido Linolénico - Ácido Palmitoleico	% % % %

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Tipo y Diseño

La investigación es de tipo descriptivo; porque se busca especificar resultados de las características fisicoquímicas y el contenido de ácidos grasos de las muestras de acuerdo a las diferentes metodologías propuestas.

De diseño comparativo: porque compara los valores obtenidos en los análisis de rendimiento de aceites, las propiedades fisicoquímicas y la composición de ácidos grasos en ambos morfotipos.

3.2. Diseño Muestral

Para el presente estudio se realizó el diseño muestral aleatorio simple, teniendo en cuenta una población de varios árboles con frutos maduros, en buen estado y fresco. Los frutos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" fueron colectados en el centro de Investigación del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

La población estuvo constituida por ocho frutos; de los que se seleccionaron dos tipos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" donde uno de ellos tiene como característica morfológica de forma pequeño rugoso que se denominó Morfotipo 1 y la segunda posee cascara liso suave al cual se denominó Morfotipo 2.

Figura N° 10: *Theobroma bicolor* (INIA)



3.3. Procedimiento de Recolección de Datos

3.3.1. Materiales, Equipos y Reactivos

3.3.1.1. Materiales

- Balones de fondo plano de 250 mL y 500mL.
- Bureta de titulación de 25 mL.
- Cápsula de porcelana.
- Crisol.
- Condensador.
- Cuchillo grande y pequeño
- Desecador de vidrio.
- Embudo pequeño y mediano.
- Fiola de vidrio
- Frascos de vidrio.
- Gradilla.
- Guantes de látex.
- Probetas.
- Matraz Erlenmeyer 100mL, 250mL y 500mL.
- Micropipetas 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 2000 μL .
- Papel filtro.
- Tiras reactivas de pH
- Pinzas de metal (mediana y grande).
- Pipetas Pasteur.
- Placas Petri.
- Soporte universal.
- Tijera.
- Vasos de precipitado 10mL, 50mL, 100mL, 250mL y 500mL
- Varilla de vidrio.
- Vernier.
- Termómetro

3.3.1.2. Equipos

- Agitador magnético.
- Balanza analítica
- Balanza Digital
- Equipo de Soxhlet
- Estufa
- Centrífuga.
- Homogeneizador (vortex).
- Rotavapor
- Cromatógrafo de Gases.
- Molino triturador.

3.3.1.3. Reactivos

- Metanol grado (CG, Merck)
- Ácido sulfúrico (grado PA, Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico (grado PA, Merck)
- Agua destilada
- Agua ultra pura (MQ)
- Etanol (grado comercial)
- Éter de petróleo (grado PA, Merck)
- Fenoltaleína (grado PA, Merck)
- Folin-Ciocalteu (grado PA, Merck)
- Fosfato disodio (grado PA, Merck)
- Hidróxido de sodio (grado PA, Merck)
- Hidróxido de potasio (grado PA, Scharlau)
- Tiosulfato de sodio (grado PA, Merck)
- Sulfato de potasio (grado PA, Merck)
- Sulfato de cobre anhidro (grado PA, Merck)
- Sílica gel
- Lauril sulfato de sodio. (grado PA, Sigma-Aldrich)

3.3.2. Lugar de ejecución

La presente investigación se inició con la recolección de los frutos de *Theobroma bicolor* en las instalaciones del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y el tratamiento de la muestra colectada y sus análisis fisicoquímicos y determinación de ácidos grasos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Química de Productos Naturales (LQPN), del Instituto de investigación de la Amazonía Peruana (IIAP), que se encuentra ubicado en la carretera Iquitos - Nauta, distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

Figura N° 11: Laboratorio de Química de Productos Naturales – IIAP



3.3.3. Colecta del material vegetal

Los frutos de los dos morfotipos de macambo “*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)” empleados en el presente trabajo de investigación fueron colectados en el centro de Investigación del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en la carretera Iquitos-Nauta Km. 25, se colectaron ocho frutos de macambo *Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)”, que corresponden a los morfotipos 1 y 2, que se analizaron en la presente investigación.

3.3.4. Selección y Clasificación de los Morfotipos

En total se seleccionaron ocho frutos de macambos (*Theobroma bicolor*) entre los dos morfotipos estudiados: cuatro frutos del morfotipo 1 (macambo rugoso pequeño)



Figura N°12: Morfotipo 1 *Theobroma bicolor* (pequeño rugoso)

Y cuatro frutos del morfotipo 2 (macambo rugoso pequeño). Que posteriormente fueron llevados al Laboratorio de química de productos naturales para sus análisis respectivos.



Figura N°13: Morfotipo 2
Theobroma bicolor (liso suave)

3.3.5. Extracción de semillas

Las semillas se obtuvieron a partir de los frutos recién cosechados, para ello se cortaron cada uno de los frutos con un instrumento cortante, y se consiguieron de 39 a 42 semillas por fruto, haciendo un total de 160 semillas del morfotipo 1 y 162 semillas del morfotipo 2; que posteriormente fueron depositados en varias placas petri de 6 pulgadas, para su posterior secado

3.3.6. Secado de semillas

El secado de las 160 semillas del Morfotipo 1 y las 162 semillas del Morfotipo 2, se realizó en una estufa a temperatura de 35 °C por espacio de cinco días en el laboratorio de Química de Productos Naturales (LQPN – IIAP).

3.3.7. Molienda de semillas secas

Las semillas secas del morfotipo 1 y morfotipo 2 fueron trituradas por separados en un molino triturador manual y posteriormente fueron almacenadas en diferentes recipientes según su morfotipo.

3.3.8. Extracción de aceite.

Se colocaron las semillas molidas del morfotipo 1 y morfotipo 2 en un cartucho de papel filtro y se colocó dentro de un equipo de extracción Soxhlet. Se agregó el éter de petróleo como solvente orgánico. Luego, se extrajo bajo reflujo durante 3 horas y se obtuvo el aceite de las respectivas semillas.

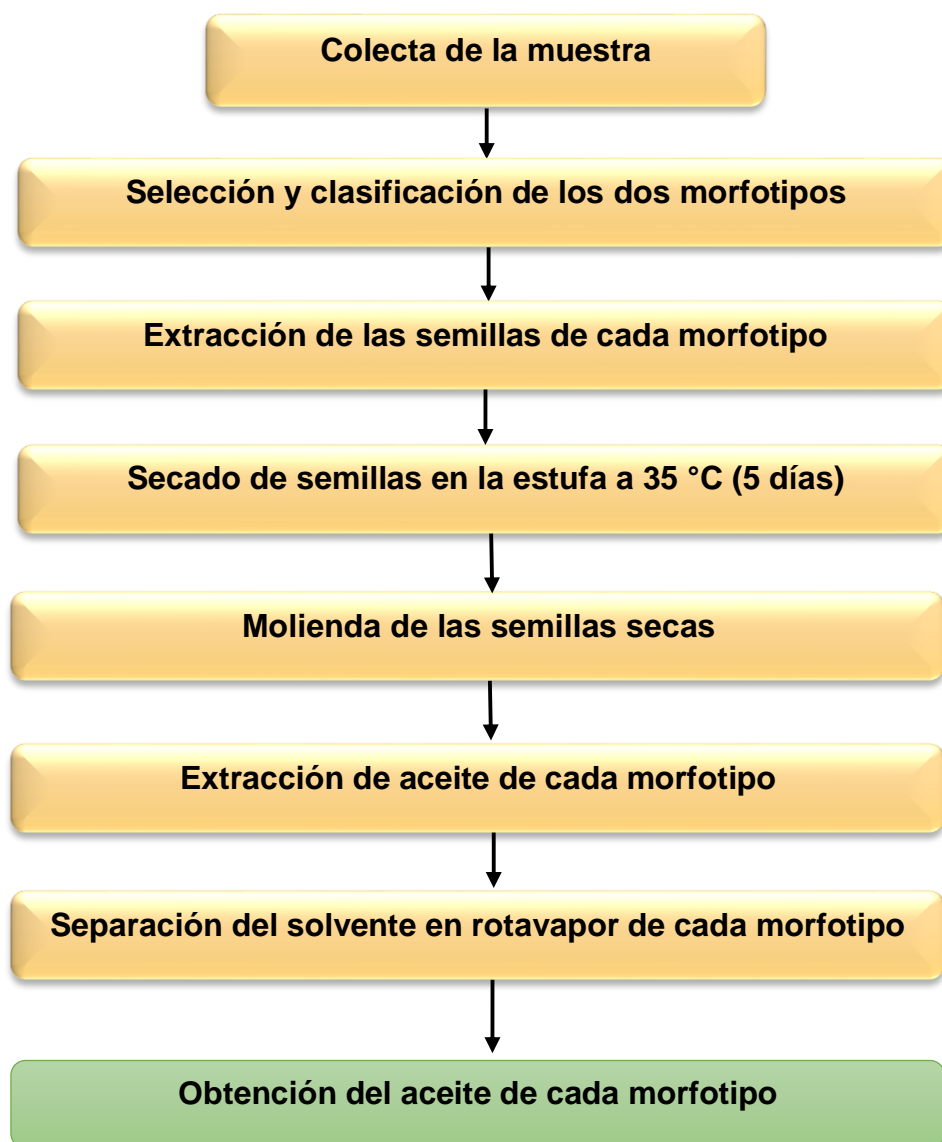
3.3.9. Separación del solvente.

Para la separación del solvente de cada uno de los morfotipos, se utilizó el rotavapor a presión reducida, con la finalidad de separar el solvente del aceite.

3.3.10. Obtención de aceite para los análisis.

Obtenido el aceite, se llevó a un recipiente con cierre hermético, para su posterior análisis fisicoquímicos y cromatográfico.

Figura N° 14: Diagrama de flujo de la extracción de aceite de los dos morfotipos.



Elaboración propia

3.3.11. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del aceite de las semillas.

Métodos utilizados en la determinación de las propiedades fisicoquímicas:

3.3.11.1. Determinación del índice de acidez

Procedimiento: AOCS-Cd-3d-63

1. Se pesaron en tres matraces Erlenmeyer 7 gramos de aceite.
2. Se añadió 50 mL de alcohol etílico neutralizado. se mezclaron la muestra y se calentó hasta 78 °C.
3. Se agregó 2 mL de indicador de fenolftaleína 1,0 % en 95,0 % de etanol.
4. Se tituló con hidróxido de potasio (KOH) estándar, agitando vigorosamente hasta la aparición del color rosa suave.

Cálculos

- El índice de acidez de determino con la siguiente fórmula:

$$\bullet \text{ Índice de acidez} = \frac{(mL \text{ de KOH} * N * 56.1)}{\text{masa g de muestra}}$$

Unidad: mgKOH/g

Donde:

- N: Normalidad de la solución de hidróxido de potasio gastado.

Figura N° 15: Diagrama de flujo de la determinación del grado de acidez



Elaboración propia

3.3.11.2. Determinación del índice de saponificación

Procedimiento: AOCS-CD-3-25

1. Se pesó 5 g de aceite en tres balones de 250 mL y se utilizó adicionalmente un balón sin muestra de aceite (blanco).
2. Se procedió a pipetear 50 mL de hidróxido de potasio alcohólico al 0.7 N y añadir 10 mL de agua destilada, en el frasco con la solución se agregó astillas de vidrio.
3. Se adjuntaron el balón al condensador y se hizo reflujo por 2 horas a 100 °C.
4. Al término del reflujo, se añadieron al balón 20 mL de agua destilada (lavando al condensador).
5. Al balón destinado como blanco se le agregó 20 mL de agua destilada y 50 mL de hidróxido de potasio alcohólico.
6. Se añadió 1 mL de indicador y se tituló con ácido sulfúrico estándar 1 N hasta que el color viró de violeta a blanco.

Cálculos:

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{(\text{mL blanco} - \text{mL muestra}) \times N(\text{H}_2\text{SO}_4) \times 56.1}{\text{peso de muestra en g}}$$

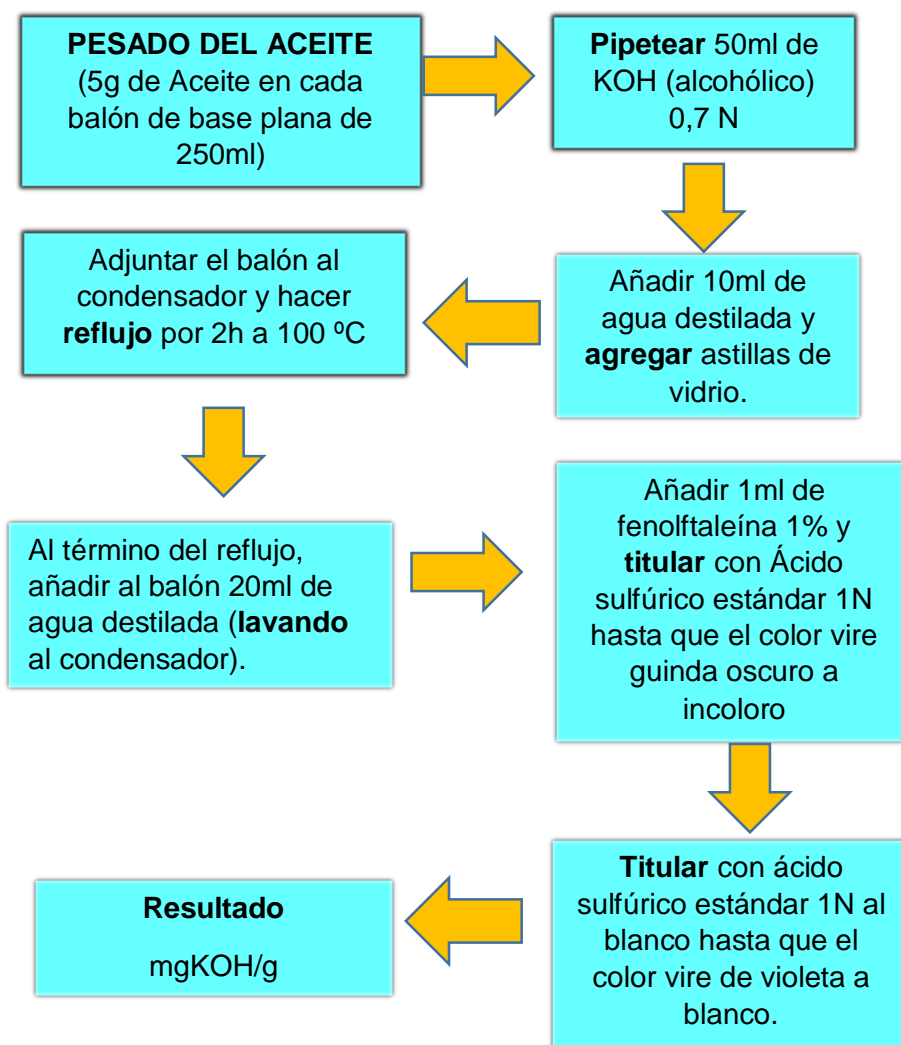
Unidad : mgKOH/g

mL blanco : Volumen de H₂SO₄ gastado en la titulación del blanco

mL muestra : Volumen de H₂SO₄ gastado en la titulación de la muestra.

N : Normalidad del H₂SO₄ estandarizado.

Figura N° 16: Diagrama de flujo de la determinación de índice de saponificación



Elaboración propia

3.3.11.3. Determinación del índice de peróxido

Procedimiento: AOCS-CD-8b-90

1. Se pesaron 5 gramos de aceite en tres matraces de 250 mL.
2. Se añadió 50 mL de la solución ácido acético glacial – isooctano (3:2), moviendo hasta disolver la muestra.
3. Se usó una pipeta volumétrica añadiendo 0,5 ml de la solución KI saturada.
4. Se dejó en reposo la solución 1 minuto (agitando por lo menos 3 veces) y se añadieron inmediatamente 30 mL de agua destilada.
5. Se tituló con tiosulfato de sodio 0,1 N añadiendo gradualmente y agitando constante y vigorosamente, se continuó la titulación hasta que el color amarillo del ioduro casi desaparezca.
6. Se añadieron 0,5 mL de lauril sulfato de sodio (LSS) al 10 % y adicionamos 0,5 mL de indicador de almidón.
7. Se continuó con la titulación en agitación constante hasta que el color azul desaparezca.

Cálculo

- Índice de peróxido =
$$\frac{(S-B)*N*1000}{masa\ de\ muestra\ (g)}$$

Unidad: meqO₂/Kg de muestra

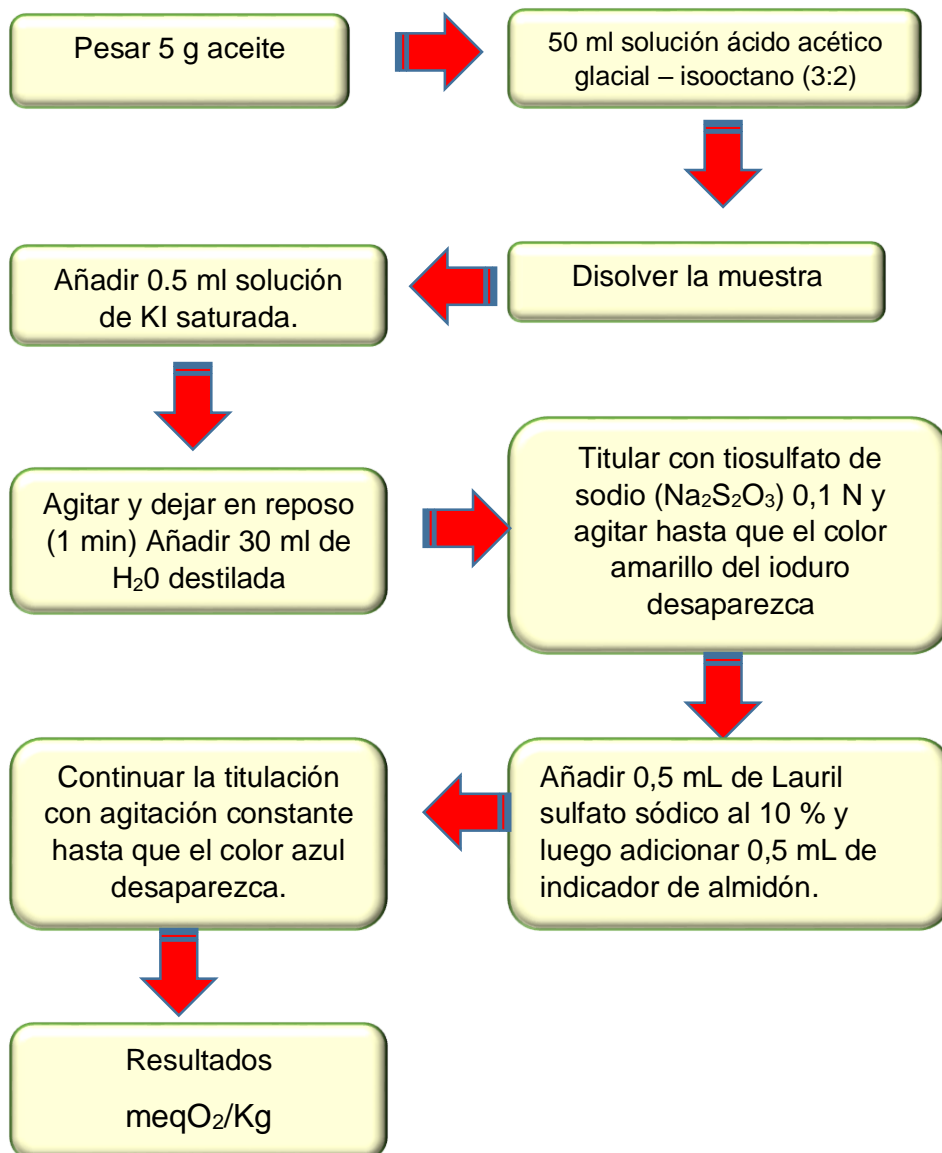
Donde:

B: Volumen de tiosulfato gastado en la titulación del blanco.

S: Volumen de tiosulfato gastado en la titulación de la muestra.

N: Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio gastado.

Figura N° 17: Diagrama de flujo de la determinación del índice de peróxido



Elaboración propia

3.3.11.4. Determinación del índice de yodo

Procedimiento: AOAC-920-158

1. Se pesaron 0,15 g de aceite en tres matraces Erlenmeyer con tapa esmerilado de 500 mL.
2. Se disolvió con 10 mL de CHCl_3 (cloroformo).
3. Con una pipeta volumétrica se adicionaron 25 mL de reactivo Hanus (solución 0,2 N equimolecular de yodo y bromo en ácido acético glacial).
4. Luego se dejó reposar 30 minutos en un lugar sin iluminación y agitando ocasionalmente.
5. Posteriormente se adicionó 10 mL de solución KI (yoduro de potasio) 15 %, agitando vigorosamente.
6. Luego, se agregaron 100 mL de agua destilada lavando la tapa de vidrio con restos de Yodo.
7. Se tituló el I_2 con solución estándar de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N añadiendo gradualmente y agitando vigorosamente.
8. Se continuó la titulación hasta que el color amarillo del iodo se torne incoloro.
9. Luego se adicionó 2 mL de indicador de almidón, continuando la titulación hasta que el color azul desapareció por completo.
10. Al finalizar la titulación, se taparon el matraz Erlenmeyer y se agitaron para comprobar si todo el I_2 reaccionó.
11. Se Realizó un blanco utilizando el mismo procedimiento sin presencia de la muestra.

$$\text{Cálculos: Índice de Iodo} = \frac{(B-M) \times N \times 12.69}{g \text{ de muestra}}$$

$$\text{Unidad: } \frac{g \text{ I}_2}{100g \text{ de muestra}}$$

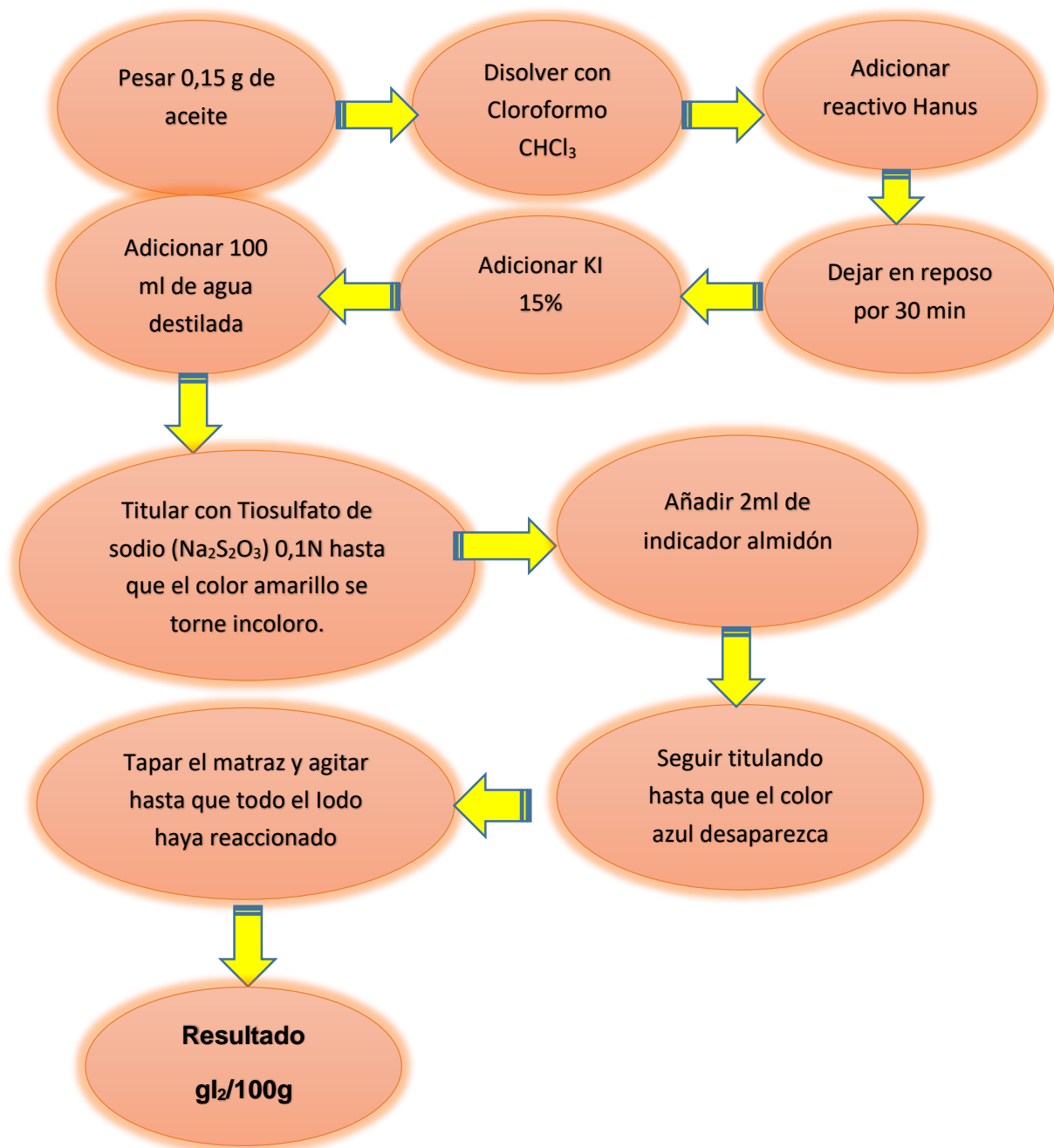
Variables:

B: volumen del titulante para el blanco.

M: volumen del titulante para la muestra.

N: normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

Figura N° 18: Diagrama de flujo de la determinación del índice de yodo



Elaboración propia

3.3.11.5. Determinación del material insaponificable

Procedimiento: AOCS-CA-6a-40

1. Se pesaron en tres matraces Erlenmeyer 5 g de aceite, luego se añadió 30 mL de alcohol etílico al 95 % y 5 mL de solución de NaOH - hidróxido de sodio 5 %. Adaptando el matraz a un condensador se puso a reflujo y calentándolo durante 1 hora a 100 °C hasta completar la saponificación.
2. Se transfirió a una pera de decantación (al que llamaremos cilindro "A") y se lavó con alcohol etílico al 95% hasta la marca de 40 ml. Se continuó añadiendo agua caliente y después fría, hasta completar un volumen de 80 ml. Al matraz donde se saponificó la muestra se agregó 5 ml del éter de petróleo y se transvasó su contenido al cilindro "A", posteriormente se añadió 50 mL de éter de petróleo.
3. Se tapó el cilindro de extracción "A" y se agitó vigorosamente durante 1 minuto; se dejó reposar hasta que las capas estuvieron completamente definidas. Se usó el sifón de vidrio para retirar la capa superior (etérea), asegurándose de no incluir la solución de la fase inferior (hidroalcohólica).
4. La capa superior (etérea) se colocó en otro cilindro de extracción "B", que contenía 5 mL de alcohol etílico 10% con el objetivo de evitar la posible pérdida del éter de petróleo.
5. Se repitieron la extracción capa superior (etérea), por un espacio de 6 veces más, usando porciones de 50 mL del éter de petróleo y agitando vigorosamente en cada extracción y juntando todas las soluciones etéreas en el cilindro de extracción "B".
6. Se lavaron los extractos combinados en el cilindro "B" con 25 mL de alcohol etílico al 10% y se desecha la fase hidroalcohólica después de cada lavado. El lavado se suspendió hasta que la solución no reaccione virando a violeta después de agregar fenolftaleína al 1%.
7. Se pasó el extracto etéreo a un balón de fondo plano previamente pesado y se evaporaron a sequedad en un rotavapor a 40 °C. Se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron.

8. Una vez pesado el residuo se disolvió con 50 ml de alcohol etílico al 95 % con ph 7 a 50 °C adicionando 1 mL de solución de fenolftaleína al 1% y se titularon con solución de NaOH 0,02 N.

Cálculos:

$$\% \text{ Materia Insaponificable} = \frac{G_1 - (G_2 + G_b)}{G} \times 100$$

Donde:

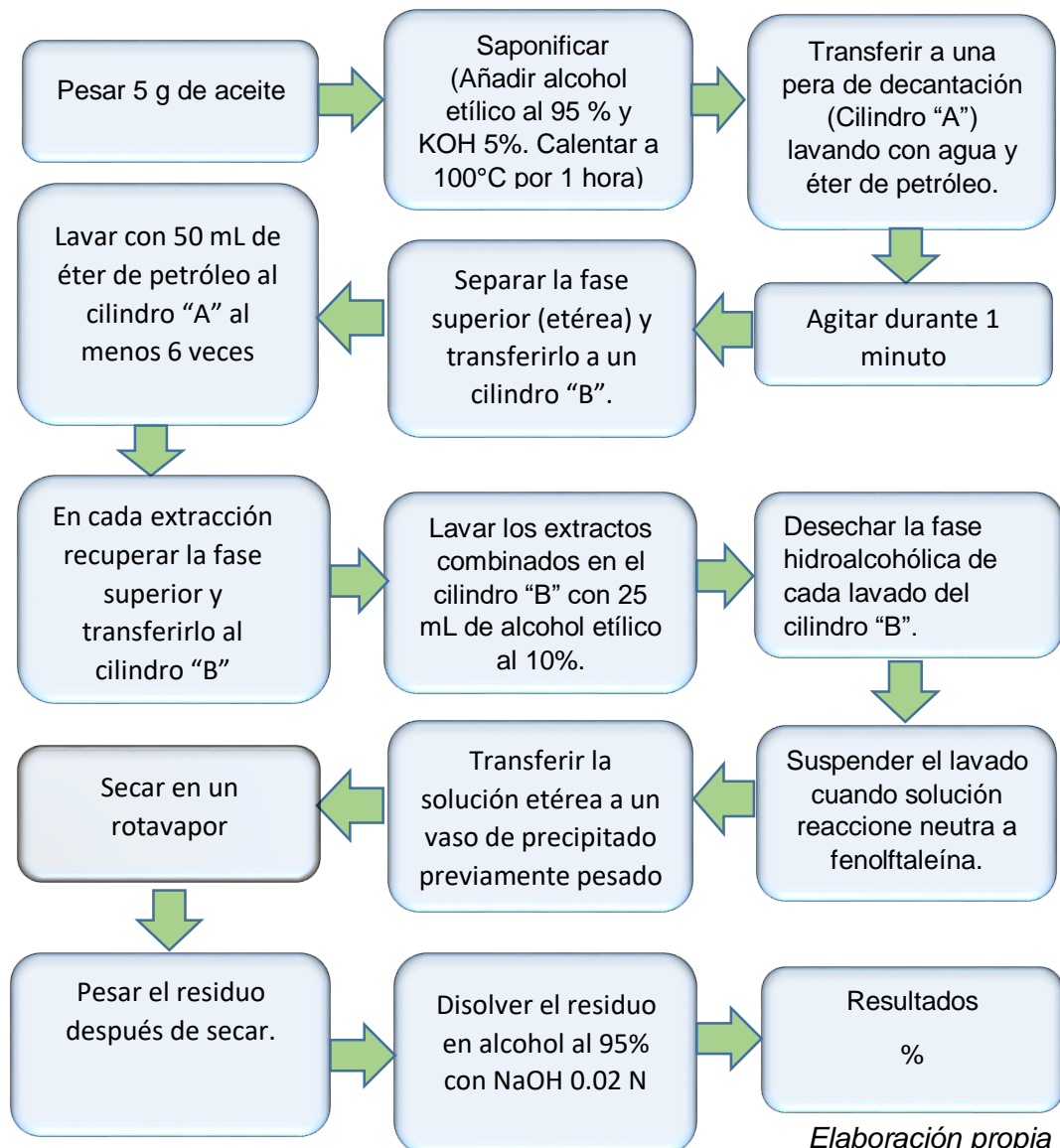
G_1 = Peso del residuo, en gramos.

G_2 = Gramos de ácidos grasos en el extracto. (1ml de NaOH al 0.02 N \leftrightarrow a 0.0056 gramos de ácido oleico.

G_b = Peso del residuo en el blanco.

G = Peso de la muestra empleada, en gramos.

Figura N° 19: Diagrama de flujo en la determinación del material Insaponificable



3.3.12. Determinación de la composición de ácidos grasos del aceite por Cromatografía gaseosa

Procedimiento: Método AOCS Ce-1-62

1. Se pesó 0,4g de aceite en tres balones de 250mL.
2. Se adicionó 6mL de Hidróxido de sodio NaOH 0,5N en metanol grado GC.
3. Se llevó a reflujo por 5-10 min hasta saponificar completamente (las agrupaciones de grasa deben disolverse en la solución).
4. Se añadió 7mL de reactivo Trifloruro de Boro (BF_3) diluido en metanol grado GC a través del condensador, se dejó hervir por un minuto.
5. Se retiraron el balón de la superficie caliente, se removió del condensador e inmediatamente añadir 15mL de Cloruro de Sodio NaCl saturado, se agitó durante 30 segundos.
6. Se transfirió la mezcla a una pera de decantación. Se lavó dos veces con 50mL de éter de petróleo (se notará las fases hidroalcohólica y etérea).
7. Se descartó la fase hidroalcohólica y lavó la fase etérea varias veces (aprox. 6 veces) con 100 mL agua ultra pura, hasta que la fase hidroalcohólica se torne alcalina con el indicador rojo de metilo.
8. Se transfirió la fase etérea a un vaso de precipitado de 100 ml que contiene 2g de Sulfato de Sodio anhidro Na_2SO_4 .
9. Se filtró y evaporó el solvente a baño maría a 40°C (evaporar hasta que quede un poco de residuo).
10. Inmediatamente se adicionó 1,5 mL de Heptano o Diclorometano grado GC a la muestra resultante.
11. Almacenar la muestra diluida a -5°C , posteriormente programar el equipo de cromatografía gaseosa para la lectura de la muestra.

3.3.12.1. Características del método para la determinación de la composición de ácidos por cromatografía gaseosa.

Nombre del método	:	Theobromabicolor.2.9.19.METH
Tipo de columna	:	De pared recubierta (WCOT)
Dimensiones de la columna	:	30m x 0.25mm x 0.25mm
Volumen / modo de inyección	:	1 μL / En columna
T. de inyector	:	250 $^\circ\text{C}$
T. inicial del horno	:	180 $^\circ\text{C}$

Gradiente de temperatura	:	1.0 °C
T. final del horno	:	220 °C
Flujo	:	1.0 mL/min
Tiempo de corrida	:	42 min.
Temperatura del detector	:	270 °C
Flujos de gases en el detector :		Flujo de aire 300 mL/min. Flujo de gas hidrogeno 30 mL/min Flujo de gas helio 30 mL/min

Contenido de muestras de ácidos grasos en el patrón de esteres metílicos:

Se identificaron los ácidos grasos a través de la comparación de los tiempos de retención de las muestras analizadas con los de un patrón comercial de esteres metílicos de ácidos grasos F.A.M.E. Mix C8-C24, 100 mg. Que contiene los siguientes ácidos grasos: ácido caprílico; ácido cáprico; ácido láurico; ácido mirístico; ácido palmítico; ácido palmitoleico; ácido esteárico; ácido oleico; ácido linoleico; ácido araquidónico; ac. linolénico; ácido behénico; ácido erúxico; ácido lignocérico.

Figura N°20: Equipo de cromatografía de gases

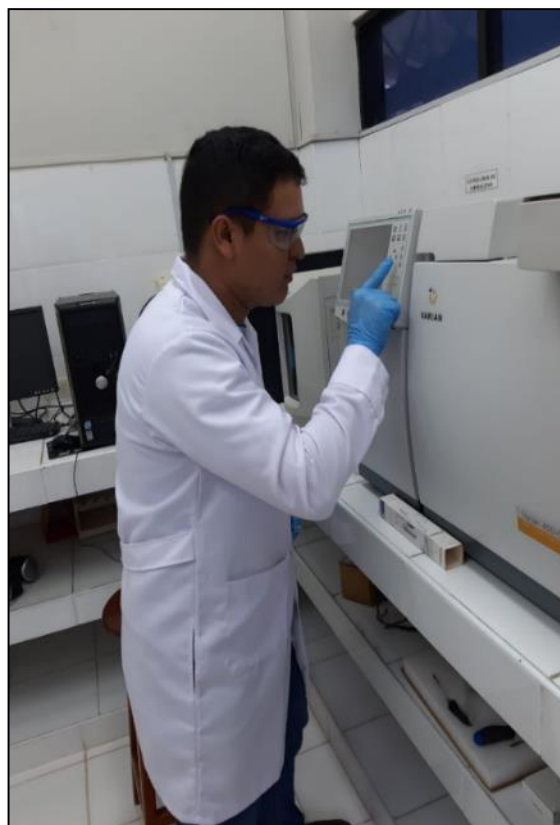
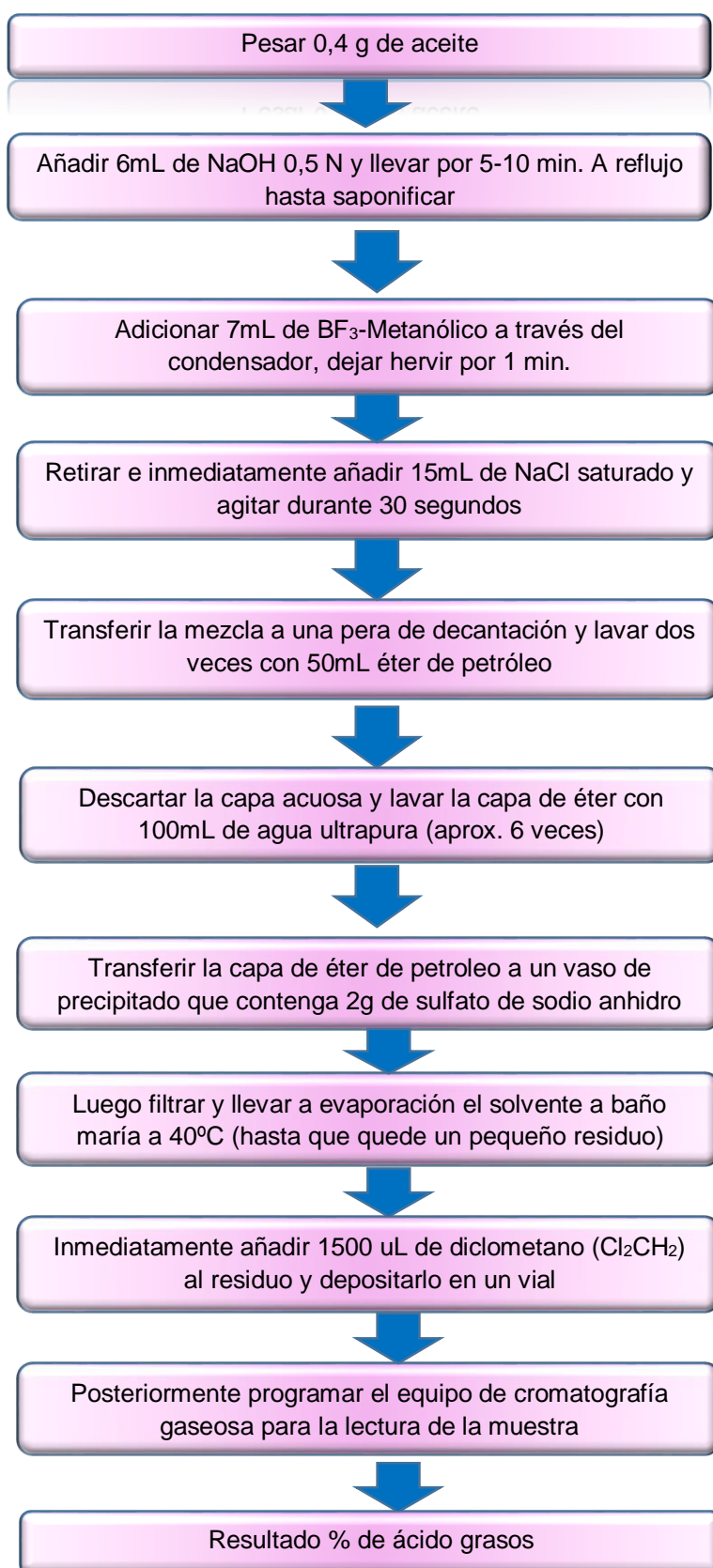


Figura N°21: Diagrama de flujo de ácidos grasos por cromatografía de gases



Elaboración propia

3.4. Procesamiento y Análisis de los Datos

Todos los procedimientos y los análisis para determinar las propiedades fisicoquímicas y composición de ácidos grasos de los aceites de las semillas de dos morfotipos de macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)". Se realizó la media aritmética y la desviación estándar en cada uno de los resultados obtenidos, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 22.

3.5. Aspectos Éticos

La investigación se realizó cuidando la biodiversidad ecológica, la recolección de los frutos no afectarán el futuro desarrollo sostenible en el Instituto nacional de innovación agraria (INIA) de las plantaciones "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)".

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS

4.1. Porcentaje del rendimiento del aceite de los dos morfotipos de macambo “*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)”

4.1.1. Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 1:

Tabla N° 3: Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 1

Muestra seca de semilla (g)	Masa de aceite (g)	Rendimiento del aceite (%)	Promedio del Rendimiento de aceite (%)	Desviación Estándar
5,0000	1,3103	26,20	25,31	± 0,78
	1,2432	24,86		
	1,2431	24,86		

Elaboración propia

La tabla N° 3, se muestra el porcentaje de rendimiento del aceite en el morfotipo 1 cuyo promedio es 25,31 %.

4.1.2. Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 2:

Tabla N° 4: Rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 2

Muestra seca de semilla (g)	Masa de aceite (g)	Rendimiento del aceite (%)	Promedio del Rendimiento de aceite (%)	Desviación Estándar
5,0000	2,1572	43,14	42,67	± 0,41
	2,1195	42,39		
	2,1240	42,48		

Elaboración propia

La tabla N° 4, se muestra el porcentaje de rendimiento del aceite en el morfotipo 2 cuyo promedio es 42,67 %.

4.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1)

4.2.1. Resultado del índice de acidez del aceite:

Tabla N° 5: Resultado de índice de acidez del aceite

Muestra de aceite (g)	Índice de acidez de aceite (mgKOH/g)	Promedio del Índice de acidez (mgKOH/g)	Desviación Estándar
7,0000	0,70	0,69	± 0,02
	0,67		
	0,70		

Elaboración propia

La tabla N° 5, muestra el promedio del índice de acidez en el aceite del morfotipo 1, siendo de 0,69 mgKOH/g.

4.2.2. Resultado del índice saponificación del aceite.

Tabla N° 6: Resultado del índice de saponificación del aceite.

Muestra de aceite (g)	Índice de Saponificación (mgKOH/g)	Promedio del Índice de saponificación (mgKOH/g)	Desviación Estándar
5,0000	170,99	170,99	± 0,01
	170,98		
	170,99		

Elaboración propia

La tabla N° 6, muestra el promedio del índice de saponificación en el aceite del morfotipo 1, siendo de 170,99 mgKOH/g.

4.2.3. Resultado del índice de peróxidos del aceite.

Tabla N° 7: Resultado del índice de peróxidos del aceite.

Muestra de aceite (g)	Índice de peróxidos (meqO ₂ /Kg)	Promedio del Índice de peroxidos (meqO ₂ /Kg)	Desviación Estándar
5,0000	10,11	9,43	± 0,58
	9,10		
	9,10		

Elaboración propia

La tabla N° 7, muestra el promedio del índice de peróxidos en el aceite del morfotipo 1, siendo de 9,43 meqO₂/Kg.

4.2.4. Resultado del índice de yodo del aceite.

Tabla N° 8: Resultado del índice de Yodo del aceite.

Muestra de aceite (g)	Índice de Yodo (gl ₂ /100g)	Promedio del Índice de Yodo (gl ₂ /100g)	Desviación Estándar
0,1500	24,77	24,30	± 0,47
	23,84		
	24,30		

Elaboración propia

La tabla N° 8, muestra el promedio del índice de yodo en el aceite del morfotipo 1, siendo 24,30 gl₂/100g.

4.2.5. Resultado del material insaponificable del aceite:

Tabla N° 9: Resultado del porcentaje de material insaponificable

Muestra de aceite (g)	Material insaponificable (%)	Promedio del material insaponificable (%)	Desviación Estándar
5,0000	0,59	0,63	± 0,03
	0,64		
	0,66		

Elaboración propia

La tabla N° 9, muestra el promedio porcentual del material insaponificable del aceite del morfotipo 1, siendo de 0,63%.

4.3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del aceite *Theobroma bicolor* (morfotipo 2)

4.3.1. Resultado del índice de acidez del aceite:

Tabla N° 10: Resultado del índice de acidez del aceite

Muestra de aceite (g)	Índice de acidez de aceite (mgKOH/g)	Promedio del Índice de acidez (mgKOH/g)	Desviación Estándar
7,0000	0,94	0,96	± 0,05
	1,02		
	0,94		

Elaboración propia

La tabla N° 10, muestra el promedio del índice de acidez en el aceite del morfotipo 2, siendo de 0,96 mgKOH/g.

4.3.2. Resultado del índice saponificación del aceite

Tabla N° 11: Resultado del índice saponificación del aceite

Muestra de aceite (g)	Índice de Saponificación (mgKOH/g)	Promedio del Índice de saponificación (mgKOH/g)	Desviación Estándar
5,0000	163,46	163,99	± 0,53
	164,52		
	163,99		

Elaboración propia

La tabla N° 11, muestra el promedio del índice de saponificación en el aceite del morfotipo 2, siendo de 163,99 mgKOH/g

4.3.3. Resultado del índice de peróxidos del aceite.

Tabla N° 12: Resultado del índice de peróxido del aceite.

Muestra de aceite (g)	Índice de peróxidos (meqO ₂ /Kg)	Promedio del Índice de peroxidos (meqO ₂ /Kg)	Desviación Estándar
5,0000	12,13	12,47	± 0,58
	12,13		
	13,14		

Elaboración propia

La tabla N° 12, muestra el promedio del índice de peróxidos en el aceite del morfotipo 2, siendo 12,47 meqO₂/Kg.

4.3.4. Determinación del índice de yodo del aceite:

Tabla N° 13: Determinación del índice de yodo del aceite.

Muestra de aceite (g)	Índice de Yodo (gl ₂ /100g)	Promedio del Índice de Yodo (gl ₂ /100g)	Desviación Estándar
0,1500	34,97	34,73	± 0,43
	35,00		
	34,23		

Elaboración propia

La tabla N° 13, muestra el promedio del índice de yodo en el aceite del morfotipo 2, que representa el 34,73 gl₂/100g.

4.3.5. Resultado del material insaponificable del aceite:

Tabla N° 14: Resultado del material insaponificable del aceite.

Muestra de aceite (g)	Material insaponificable (%)	Promedio del material insaponificable (%)	Desviación Estándar
5,0000	0,50	0,43	± 0,05
	0,49		
	0,40		

Elaboración propia

La tabla N° 14, muestra el promedio porcentual del material insaponificable del aceite del morfotipo 2, que representa 0,43%.

4.4. Comparación de los resultados de las propiedades fisicoquímicas del aceite del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1 y morfotipo 2).

Tabla N° 15: Comparación de los resultados de las propiedades fisicoquímicas del aceite del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1 y morfotipo 2).

Análisis fisicoquímicos del aceite	<i>Theobroma bicolor</i> Morfotipo 1		<i>Theobroma bicolor</i> Morfotipo 2	
	Promedio	Desviación Estándar	Promedio	Desviación Estándar
1. Índice de acidez (mgKOH/g)	0,69	± 0,02	0,96	± 0,05
2. Índice de saponificación (mgKOH/g)	170,99	± 0,62	163,99	± 0,53
3. Índice de peróxidos (meqO ₂ /Kg)	9,43	± 0,58	12,47	± 0,54
4. Índice de yodo (gI ₂ /100g)	24,3	± 0,47	34,73	± 0,43
5. Materia Insaponificable (%)	0,63	± 0,03	0,47	±0,05

Elaboración propia

En la Tabla N° 15, se ha determinado la comparación de las propiedades fisicoquímicas de los aceites de los dos morfo tipos estudiados.

Entre ellos podemos indicar que el índice de acidez del aceite extraído del morfotipo 1, es menor en 0,69 mgKOH/g, en comparación con el morfo tipo 2, que tiene como promedio 0,96mgKOH/g.

El índice de saponificación del morfotipo 1 es mayor en 170,99 mg KOH/g de aceite, en comparación con el morfotipo 2 que es de 163,99 mg KOH/g.

El índice de peróxidos en los resultados obtenidos fueron que el morfotipo 1 de "*Theobroma bicolor*" es 9,43 meqO₂/Kg de aceite y el morfotipo 2 "*Theobroma bicolor* es 12,47 meqO₂/Kg.

Los resultados para el índice de yodo en "*Theobroma bicolor* (morfotipo 1) y "*Theobroma bicolor* (morfotipo 2), fueron de 24,3 g I₂/100g de aceite y 34,73 g I₂/100g respectivamente.

Los resultados obtenidos con respecto al material insaponificable en los morfotipos de macambo "*Theobroma bicolor*" fueron los siguientes para el morfotipo 1 es 0,63 % y el morfotipo 2 es 0,47 %.

4.5. Composición porcentual de ácidos grasos del aceite del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1).

4.5.1. Composición porcentual de los ácidos grasos saturados:

4.5.1.1. Resultados porcentuales del ácido palmítico:

Tabla N° 16: Resultados porcentuales del ácido palmítico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido palmítico (%)	Promedio del porcentaje de ácido palmítico (%)	Desviación Estándar
5,0000	6,40	6,36	± 0,10
	6,44		
	6,25		

Elaboración propia

En la tabla N° 16, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 6,36%.

4.5.1.2. Resultados porcentuales del ácido esteárico:

Tabla N° 17: Resultados porcentuales del ácido palmítico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido esteárico (%)	Promedio del porcentaje de ácido esteárico (%)	Desviación Estándar
5,0000	50,56	50,88	± 0,49
	50,69		
	51,44		

Elaboración propia

En la tabla N° 17, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 50,88%.

4.5.2. Composición porcentual de ácidos grasos insaturados.

4.5.2.1. Resultados porcentuales del ácido palmitoleico:

Tabla N° 18: Resultados porcentuales del ácido palmitoleico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido palmitoleico (%)	Promedio del porcentaje de ácido palmitoleico (%)	Desviación Estándar
5,0000	0,23	0,22	± 0,01
	0,23		
	0,21		

Elaboración propia

En la tabla N° 18, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 0,22 %.

4.5.2.2. Resultados porcentuales del ácido oleico:

Tabla 19: Resultados porcentuales del ácido oleico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido oleico (%)	Promedio del porcentaje de ácido oleico (%)	Desviación Estándar
5,0000	37,81	37,53	± 0,37
	37,67		
	37,11		

Elaboración propia

En la tabla N° 19, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 37,53 %.

4.5.2.3. Resultados porcentuales del ácido linoleico:

Tabla N° 20: Resultados porcentuales del ácido linoleico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido linoleico (%)	Promedio del porcentaje de ácido linoleico (%)	Desviación Estándar
5,0000	2,54	2,52	± 0,06
	2,57		
	2,46		

Elaboración propia

En la tabla N° 20, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 2,52 %.

4.5.2.4. Resultados porcentuales del ácido linolénico:

Tabla N° 21: Resultados porcentuales del ácido linolénico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido linolénico (%)	Promedio del porcentaje de ácido linolénico (%)	Desviación Estándar
5,0000	2,46	2,46	± 0,07
	2,40		
	2,53		

Elaboración propia

En la tabla N° 21, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 2,46 %.

4.6. Composición porcentual de ácidos grasos del aceite del *Theobroma bicolor* (morfotipo 2).

4.6.1. Composición porcentual de los ácidos grasos saturados:

4.6.1.1. Resultado porcentual del ácido palmítico:

Tabla N° 22: Resultados porcentuales del ácido palmítico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido palmítico (%)	Promedio del porcentaje de ácido palmítico (%)	Desviación Estándar
5,0000	6,64	6,63	± 0,01
	6,64		
	6,62		

Elaboración propia

En la tabla N° 23, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 6,63%.

4.6.1.2. Resultado porcentual del ácido esteárico:

Tabla N° 23: Resultados porcentuales del ácido esteárico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido esteárico (%)	Promedio del porcentaje de ácido esteárico (%)	Desviación Estándar
5,0000	51,75	51,68	± 0,07
	51,66		
	51,62		

Elaboración propia

En la tabla N° 23, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 51,68 %.

4.6.2. Composición porcentual de ácidos grasos insaturados.

4.6.2.1. Resultado porcentual del ácido palmitoleico:

Tabla N° 24: Resultados porcentuales del ácido palmitoleico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido palmitoleico (%)	Promedio del porcentaje de ácido palmitoleico (%)	Desviación Estándar
5,0000	0,18	0,18	± 0,01
	0,18		
	0,18		

Elaboración propia

En la tabla N° 24, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 0,18%.

4.6.2.2. Resultado porcentual del ácido oleico:

Tabla N° 25: Resultados porcentuales del ácido oleico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido oleico (%)	Promedio del porcentaje de ácido oleico (%)	Desviación Estándar
5,0000	36,49	36,48	± 0,03
	36,45		
	36,51		

Elaboración propia

En la tabla N° 18, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 37,53 %.

4.6.2.3. Resultado porcentual del ácido linoleico:

Tabla N° 26: Resultados porcentuales del ácido linoleico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido linoleico (%)	Promedio del porcentaje de ácido linoleico (%)	Desviación Estándar
5,0000	2,52	2,55	± 0,02
	2,56		
	2,56		

Elaboración propia

En la tabla N° 26, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 2,55 %.

4.6.2.4. Resultado porcentual del ácido linolénico:

Tabla N° 27: Resultados porcentuales del ácido linolénico

Muestra de aceite (g)	Porcentaje de ácido linolénico (%)	Promedio del porcentaje de ácido linolénico (%)	Desviación Estándar
5,0000	2,42	2,48	± 0,06
	2,52		
	2,51		

Elaboración propia

En la tabla N° 27, se demuestra que los resultados del promedio porcentual de este ácido graso es 2,48 %.

4.7. Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos saturados del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1 y morfotipo 2)

Tabla N° 28: Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos saturados del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1 y morfotipo 2)

Ácidos grasos saturados	<i>Theobroma bicolor</i> Morfotipo 1		<i>Theobroma bicolor</i> Morfotipo 2	
	Promedio (%)	Desviación Estándar	Promedio (%)	Desviación Estándar
Ácido palmítico (C16:0)	6,36	± 0,10	6,63	± 0,10
Ácido esteárico (C18:0)	50,88	± 0,49	51,68	± 0,07
Total	57,24	-	58,31	-

Elaboración propia

En la tabla N° 28, comparamos el total de los ácidos grasos saturados presentes existentes en el *Theobroma bicolor* en el morfotipo 1, que contiene 57,24 % y el morfotipo 2, contiene 58,31 %.

4.8. Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos insaturados del *Theobroma bicolor* (morfotipo 1 y morfotipo 2)

Tabla N° 29: Comparación de los resultados porcentuales de los ácidos grasos insaturados *Theobroma bicolor* (morfotipo 1 y morfotipo 2)

Ácidos grasos insaturados	<i>Theobroma bicolor</i> Morfotipo 1		<i>Theobroma bicolor</i> Morfotipo 2	
	Promedio (%)	Desviación Estándar	Promedio (%)	Desviación Estándar
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,22	± 0,01	0,18	± 0,01
Ácido oleico (C18:1)	37,56	± 0,37	36,48	± 0,03
Ácido linoleico (C18:2)	2,52	± 0,06	2,55	± 0,02
Ácido linolénico (C18:3)	2,46	± 0,07	2,48	± 0,06
Total	42,76	-	41,69	-

Elaboración propia

En la tabla N° 29, comparamos el total de los ácidos grasos insaturados presentes existentes en el *Theobroma bicolor* en el morfotipo 1, que contiene 42,76 % y el morfotipo 2, contiene 41,69 %.

La relación porcentual de ácidos grasos saturados con los insaturados en el macambo "*Theobroma bicolor* (Humb. & Bompl)" morfotipo 1 es de 57,24 % de ácidos grasos saturados y 42,76 % ácidos grasos insaturados y en el morfotipo 2 es de 58,31 % de ácidos grasos saturados y 41,69 % de ácidos grasos insaturado.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:

Estudios realizados por Sifuentes M. (3) sobre la evaluación fisicoquímica de la semilla de dos morfotipos del fruto de macambo "*Theobroma bicolor* (humb. & bompl.)", 2015, reporta que el rendimiento porcentual del aceite del morfotipo 1 (pequeño rugoso) es de 22,15 %, es muy similar con los datos obtenidos en el estudio de investigación del morfotipo 1 que es de 25,31 %. Por otro lado, el rendimiento porcentual en la investigación de Sifuentes (3) el aceite del morfotipo 2 (liso suave) reporta 25,71 %, el cual no coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación que es de 42,67 %. La diferencia del porcentaje de rendimiento del aceite podría deberse a factores de fertilidad de suelos, edad de los árboles, entre otros.

Estudios de investigación realizados por Gonzales & Torres (1), mencionan que los resultados porcentuales del aceite de las semillas del *Theobroma bicolor*, contienen 57,94 % de ácidos grasos saturados, el cual se aproximan con los resultados del ácidos grasos obtenidos en el trabajo de investigación del morfotipo 1 es de 57,24 % y en el morfotipo 2 es 58,31 % de ácidos grasos saturados.

En presente estudio de investigación realizado, se obtuvo el porcentaje de ácidos grasos insaturados en el morfotipo 1 (pequeño rugoso), se obtuvo el 42,76 % de ácidos grasos insaturados y en el morfotipo 2 (liso suave), se obtuvo el 41,69 % de ácidos grasos insaturados, los cuales se asemejan a los resultados obtenidos, por Gonzales & Torres (1) que fue de 42,03 %.

Estudios de investigación en Guatemala por Arriaga C (5) sobre el porcentaje de ácidos grasos saturados, del ácido palmítico (6,37 %), coinciden con el resultado obtenido de este ácido en el morfotipo 1, que es de 6,36 %. Con respecto al ácido esteárico (44,92 %), encontrado por (5), se aproximan a los datos obtenidos en el presente estudio que tiene por resultado el 50,88 %.

En este mismo trabajo de investigación por Arriaga C (5), determinó que el porcentaje de ácidos grasos insaturados del ácido oleico fue de 46,85 % y el ácido linoleico 1,88 %, los cuales difieren en cantidades pequeñas con los resultados obtenidos por el presente trabajo en el morfotipo 1, los cuales son: el ácido oleico 37,56 % y el ácido linoleico 2,52 %, estas pequeñas diferencias de

los resultados, puede deberse a factores climáticas como la altitud, latitud, temperatura ,entre otros.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES.

1. Se concluye que el rendimiento porcentual del aceite de las semillas del morfotipo 2 (42,67 %) es mayor al morfotipo 1 (25,31 %),
2. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas, siguiendo el protocolo AOCS, en la cual se obtuvo del morfotipo 1, los siguientes resultados: Índice de acidez (0,69 mgKOH/g); índice de saponificación (170,99 mgKOH/g); índice de peróxidos (9,43 meqO₂/Kg); índice de yodo (24,3 gl₂/100g) e índice de material Insaponificable (0,63 %.)
3. Se determinó las propiedades fisicoquímicas del aceite del morfotipo 2, y los resultados son los siguientes: índice de acidez (0,96 mgKOH/g); índice de saponificación (163,99 mgKOH/g); índice de peróxidos (12,47 meqO₂/Kg); índice de yodo (34,73 gl₂/100g) y el índice de material Insaponificable es (0,47 %.)
4. Se comparó que el morfotipo 1, hay mayor presencia de: índice de saponificación y material insaponificable que en el morfotipo 2.
5. Asimismo, el morfotipo 2, hay mayor presencia de: índice de acidez, índice peróxidos e índice de yodo, con respecto al morfotipo 1.
6. Se determinó la presencia de ácidos grasos saturados, ácido palmítico (C₁₆ H₃₂O₂) (6,36% en el morfotipo1) y (6,63% en el morfotipo 2), ácido esteárico(C₁₈H₃₆O₂) (50,88%) en el morfotipo 1 y en el morfotipo 2 (51,68%).
7. Se determinó la composición de los ácidos grasos insaturados en el aceite de la semilla de dos morfotipos, con presencia del ácido palmitoleico (C₁₆ H₃₀O₂) (0,22% en el morfotipo1 y 0,18% en el morfotipo 2); ácido oleico (C₁₈H₃₄O₂) (37,56% en el morfotipo1 y 36,48% en el morfotipo2 ácido linoleico(C₁₈H₃₂O₂) (2,52% en el morfotipo 1 y 2,55% en el morfotipo 2 y en el ácido linolénico (C₁₈ H₃₀O₂) (2,46% en el morfotipo 1) y (2,48% en el morfotipo2).
8. La cantidad total de ácidos grasos saturados encontrados en el presente trabajo de investigación en el morfotipo 1, es de 57,24% y en el morfotipo 2 es 58,31%

9. La cantidad total de ácidos grasos insaturados encontrados en el presente trabajo de investigación en el morfotipo 1, es de 42,66% y en el morfotipo 2 es de 41,69%

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

1. Continuar con otro tipo de análisis en la investigación del *Theobroma bicolor*, en sus diferentes variedades, con la finalidad de identificar vitaminas, aminoácidos, minerales, antioxidantes y análisis de toxicidad, con el fin de complementar los resultados de la presente investigación.
2. Los aceites encontrados en este trabajo de investigación podrían ser útiles para la industria farmacéutica, en la elaboración de cremas, jabones, desinfectantes y otros.
3. Se recomienda realizar el perfil de ácidos grasos y las características fisicoquímicas de las variedades rugoso suave grande y rugoso duro grande, que se encuentran en la amazonia peruana, y que aún no han sido estudiadas.
4. Seguir investigando otras especies del género ***Theobroma*** como por ejemplo el *T. grandiflorum*, *T. angustifolium*, que se encuentran en Centro América, América del Sur y principalmente en la amazonia peruana, los cuales presentan, alto contenido nutricional en aceites, proteína y fibras que las vuelven potenciales materias primas para diferentes aplicaciones en las industrias de alimentos y otras aplicaciones favorables a la salud del poblador amazónico.
5. La alta concentración del ácido oleico, que contiene en ambos, morfotipos, constituyen una gran oportunidad, para incluir en la dieta alimenticia del poblador.
6. De los ácidos grasos obtenidos del aceite de las semillas del *Theobroma bicolor* (morfotipos 1 y 2) como es el ácido oleico, el ácido palmitoleico, el ácido linoleico y ácido linolénico, los que tienen efectos saludables en las lipoproteínas séricas, disminuyendo el colesterol total, colesterol LDL y aumentando el colesterol HDL.

CAPÍTULO VIII

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Gonzales A, Torres G. Manual Cultivo de Macambo. Diseño. Saul Pinedo Flor.
2. FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos Ginebra; 2010.
3. Sifuentes M. “Evaluación Físico-Química de la Pulpa y Semilla de dos Morfotipos del fruto de Macambo “*Theobroma bicolor* (Humb. & Bonpl.)” de la Región Loreto, 2015 Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2017.
4. Manual. Cultivo de Macambo *Theobroma bicolor* (Humb. & Bonpl.). Iquitos: Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana; 2010.
5. Arriaga C. Contenido de Ácidos Grasos de la manteca proveniente de mezclas, endistintas fracciones, de semillas de *Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor* y su uso en la manufactura de chocolate. Farmacia FdCQy, editor. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2007.
6. Kufer J, Cameron L. The Jaguar Tree (*Theobroma bicolor* Bonpl), in Chocolate in Mesoamérica. Gainesville , editor. Florida: University Press of Florida; 2011.
7. Sinchi I. Herbario Virtual. [Online]; 2019. Acceso 10 de Setiembre de 2019. Disponible en: <https://www.sinchi.org.co/coah/consulta-de-especimenes-coah>.
8. Ruiz J. Alimentos del bosque amazónico: Una alternativa para la protección de los bosques tropicales Montevideo , editor. Lima: UNESCO/ORCYT; 1993.
9. Flores P. Cultivo de flores nativos amazónicos. Amazonía , editor. Lima: Tratado de cooperación.; 1997.

10. Melgarejo L, Hernández M, Barrera J&CM(. Oferta y potencialidades de un banco de germoplasma del género *Theobroma* en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región amazónica. Instituto Amazónico de Ltda SS, editor. Colombia: Instituto Amazónico del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas; 2006.
11. INIA. Macambo. Hoja Divulgativa. 2008; 2(N° 8).
12. Gonzales A. Frutales Nativos Amazónicos Patrimonio Alimenticio de la Humanidad Iquitos: Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana; 2007.
13. Rixe D, Vela C. Licor a partir de la semilla de *Theobroma bicolor* (Macambo) y su valor Nutricional (Tesis para Titulación) Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2017.
14. Furlán A, Bressanni R. Recursos vegetales con potencial de explotación agroindustrial de Guatemala. Caracterización química de la pulpa y la semilla de Guatemala: Arch. Lat. Amer.; 1999.
15. Chirinos N. Efecto de dietas extruidas en base a torta de castaña (*Bertholletia excelsa*) y fruto de macambo (*Theobroma bicolor*), sobre los índices de crecimiento y zootécnicos en el cultivo de pacos juveniles (*Piractus brachypomus*), provincia de Tambopata, Departamen Puerto Maldonado: UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS; 2015.
16. Sevilla R. Definiciones conceptuales básicas. En Medina Hinostroza T, Roldán Chávez A, Estrada Jimenez RI, editores. Manual para caracterización in situ de cultivos Nativos. Conceptos y Procedimientos. Lima: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN AGRARIA - INIEA; 2006. p. 168.
17. Battaner arias E. Biomoléculas: una introducción estructural a la bioquímica Salamanca: Universidad de Salamanca; 2013.

18. Alimentarius C. Norma del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. 191981st ed.: Organización Mundial de la Salud; 2013.
19. CEDE Pd. Propiedades físicoquímicas que miden o identifican la materia. Instrumentos, aparatos y equipos de laboratorio. Técnicas y métodos aplicados para su medida en el laboratorio. En OPOSICIONES CDDEY. Análisis y Química Industrial. Madrid: Centro Documentación de Estudios y Oposiciones p. 39.
20. Calvo M. Bioquímica de los Alimentos. Ácidos grasos. [Online].; 2004. Acceso 29 de setiembre de 2019. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/lipidos/acidograssos.html>.
21. Rodríguez J, Hernández M, Estrada E, Santoyo M. ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN DE MAYONESAS. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2016; 1(2).
22. Badui S. Diccionario de la Tecnología de los Alimentos México D.F.; 1988.
23. Solomons. Química orgánica Mexico: Limusa Wiley; 1999.
24. Aguilar M. Alimentos- Aceites y grasas vegetales o animales- determinación de materia insaponificable- Método de prueba. Norma Mexicana. Mexico: ASOCIACIÓN NACIONAL DE INDUSTRIALES DE ACEITES Y MANTECAS, CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE ACEITES, GRASAS, JABONES, CARGILL DE MÉXICO, S.A. DE C.V. SECRETARÍA DE SALUD, Mexico.NMX-K-306-SCFI-2006.
25. Hoyos M, Rosales V. Lípidos: Características principales y su metabolismo. Revista Bolivianas. Rev. Act. Clin. Med La Paz mar. 2014; v.41(41).
26. Masson L, Mella M. Materia grasa de consumo habitual y potencial en Chile: Composición de los ácidos grasos Santiago, Chile.; 1985.
27. Valenzuela A, Manzini J, Toussaint G, Uauy R y P. J. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga México; 1999.

28. Unidad de informática del instituto de química. [Online]; 2016. Disponible en: uniquim.iquimica.unam.mx.
29. Amasufuen K. Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp, *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. sometidas a diferentes concentraciones de Nitrato. Ingeniería FdCe, editor. Iquitos-Perú: UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ; 2017.
30. Martín E. efectos de la intervención nutricional con un preparado lácteo enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 ácido oleico y vitamina sobre marcadores relacionados con el riesgo cardiovascular y con el metabolismo óseo en pacientes deslipémicos. Te Granada: Universidad de Granada; 2006.
31. Fernández A, Rodríguez V, Portillo. Ácido linoleico conjugado y grasa corporal. *Revista Española de Obesidad*. 2004; 2.
32. Paucar L, Salvador R, Guillen J, Capa J, Moreno C. *Sciencia Agropecuaria*. 2015; 6(4).
33. Medina J. Determinación de contenido de ácido oléico, linoléico, linolénico y trans-elaídico en margarinas, aceites y mayonesas por cromatografía de gases. (Tesis de Grado) Química Fdl, editor. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2014.
34. Amasifuen K. Perfil de Ácidos Grasos de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. Sometidas a Diferentes Concentraciones de Nitrato. (Tesis de Título). Ingeniería FdCe, editor. Iquitos-Perú: Universidad Científica del Perú; 2017.

ANEXOS

Anexo N° 1: Lista De Abreviaturas

LS	: Liso Suave
PQ	: Pequeño rugoso
IA	: Índice de Acidez
µg	: Microgramo
µl	: Microlítro
A₀	: Absorbancia
A₁	: Absorbancia de la solución del extracto
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: segundos
T	: temperatura
GC	: Cromatografía de gases
v/v	: Volumen/volumen
Ác.	: Ácido
%A.	: Porcentaje de aceite
cm	: Centímetro
cm³	: Centímetro cúbico
g	: Gramo
h	: Hora
Kg	: kilogramo
L	: Litro
M	: Molaridad
meq	: Mili equivalentes
mg	: Miligramo
min	: Minutos
mL	: Mililitro
mm	: Milímetro
ms	: Muestra seca
mf	: Muestra fresca

N	: Normalidad
n	: Número de repeticiones
nm	: Nanómetro
m/m	: masa/masa
m/v	: masa/volumen
PM	: Peso molecular
ppm	: Partes por millón
HDL	: Lipoproteína de alta densidad
LDL	: Lipoproteína de baja densidad
\bar{X}	: Promedio aritmético.
σ	: Desviación estándar.
INIA	: Instituto Nacional de Innovación Agraria.
IIAP	: Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana
LQPN	: Laboratorio de Química de Productos Naturales
AOCS	: Sociedad Americana de Químicos de Aceite.
FAME	: Ésteres metílicos de ácidos grasos

Anexo N° 2: Fotos de las variedades del *Theobroma bicolor*.



Anexo N° 3: Imágenes del procedimiento para la extracción del aceite de *Theobroma bicolor*



1 Recolección de la muestra



2 Selección de la muestra



3. Clasificación por código



4. separación de semillas



5. Secado a 35°C (6 días)



6. Molienda de semillas



7. Extracción por Soxhlet



8. obtención del aceite

Anexo N° 4: Imágenes para determinar el índice de acidez *Theobroma bicolor*



1. pesado de aceite



2. Disolución del aceite con etanol



3. Agregando fenolftaleína

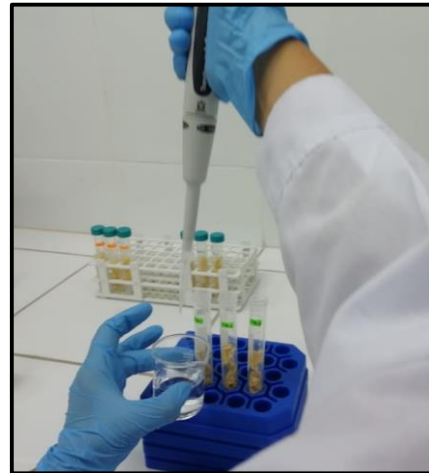


4. Titulación

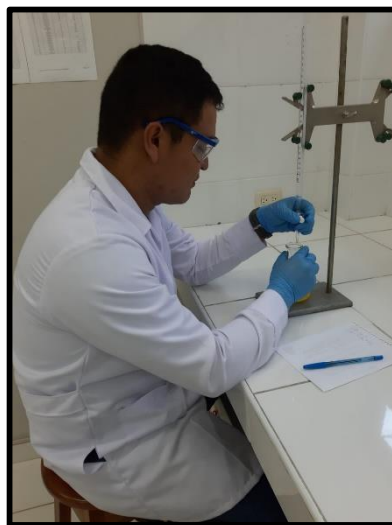
Anexo N° 5: *Imágenes para determinar el Índice de Peróxido Theobroma bicolor.*



1. Pesado de aceite



2. Disolución

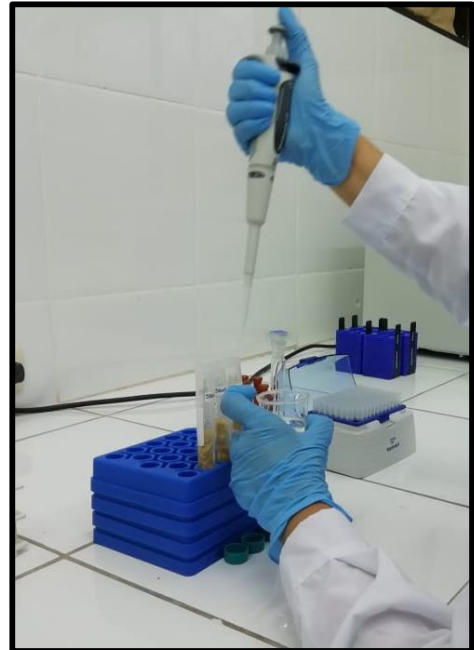


3. Titulación

Anexo N° 6: Determinación del Índice de Saponificación



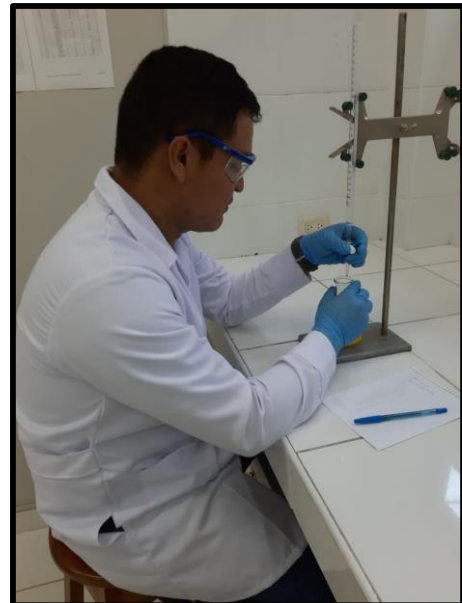
1. Pesado del aceite



2. Agregar con KOH

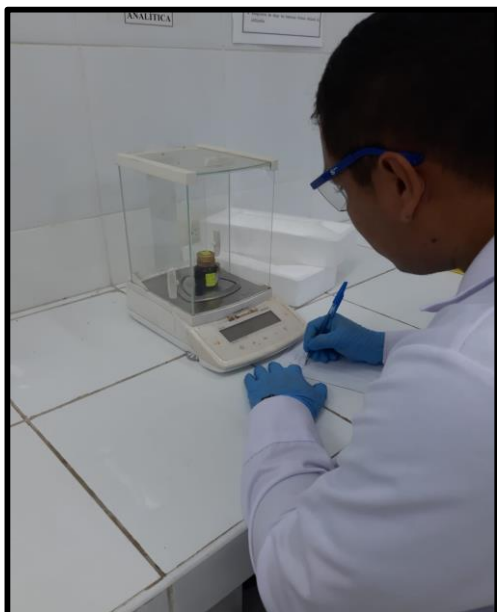


3. Reflujo en el condensador



4. Titulación

Anexo N° 7: Determinación del Índice de Yodo



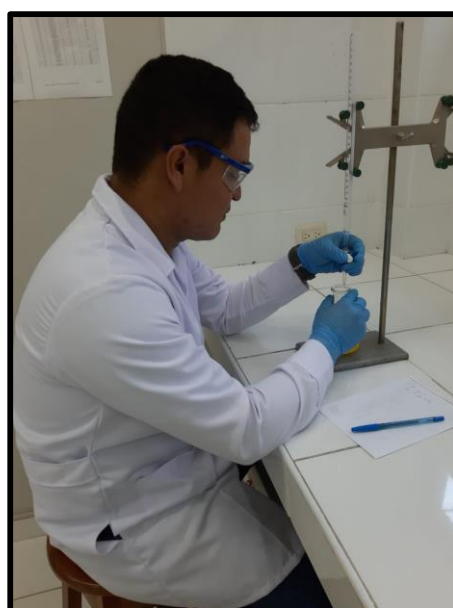
1. Pesado



2. Adicionamos reactivo Hanus

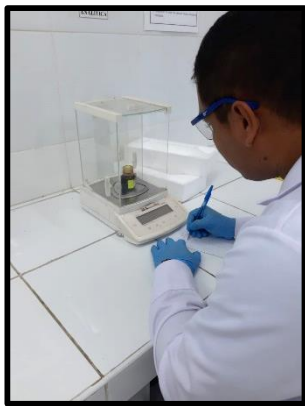


3. Adición de KI



4. Titular

Anexo N° 8: Determinación del Material Insaponificable



1. Pesado



2. calentar a 100 °C



3. Decantación



4. Separación fase



5. Secar rotavapor



6. Titular

Anexo N° 9: Imágenes de la determinación de la Composición de ácidos grasos

1. Pesado



2. Saponificando



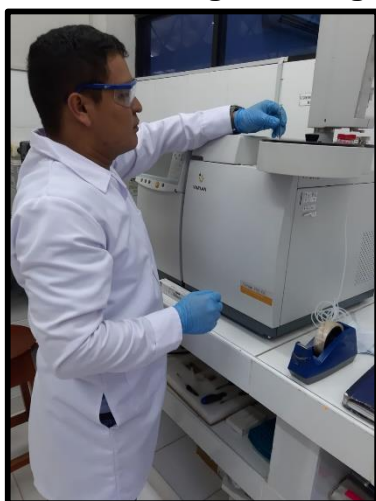
3. Decantación



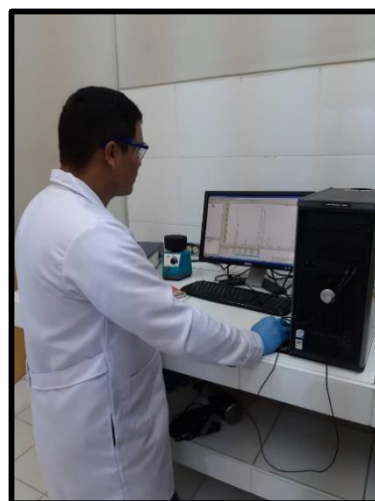
4. Filtración



1. Cromatografía de gases



6. Resultados



Anexo N° 10: Cálculo del rendimiento porcentual del aceite de los dos morfotipos

	Morfotipo 1			Morfotipo 2		
Repeticiones	1	2	3	1	2	3
Peso de balón (g)	100.5670	102.3463	103.2950	106.6627	101.6512	102.1330
Peso de muestra (g)	5.0006	5.0008	5.0002	5.0005	5.0001	5.0002
Peso de balón + Peso de aceite (g)	101.8773	103.5895	104.5381	108.8199	103.7707	104.2570
Peso de aceite (g)	1.3103	1.2432	1.2431	2.1572	2.1195	2.1240
% aceite	26.2029	24.8600	24.8610	43.1397	42.3892	42.4783
Promedio (muestra freca)	25.3079			42.6690		
Desviación estándar	0.7750			0,4100		

Para Morfotipo pequeño rugoso

Calculo del promedio:

$$1. \%A = \frac{1.3103}{5,0006} \times 100 = 26.20 \%$$

$$2. \%A = \frac{1.2432}{5,0008} \times 100 = 24.86 \%$$

$$3. \%A = \frac{1.2431}{5,0002} \times 100 = 24.86 \%$$

$$\text{Promedio} = \frac{26.2029+24.8600+24.8610}{3} = 25.3079 \rightarrow 25.31 \%$$

Calculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(26.2029-25.3079)^2+(24.8600-25.3079)^2+(24.8610-25.3079)^2}{3-1}} = \pm 0,7750 \% \rightarrow \pm 0.78 \%$$

Para Morfotipo liso suave:

Calculo del promedio:

$$1. \%A = \frac{2.1572}{5,0005} \times 100 = 43.1397 \%$$

$$2. \%A = \frac{2.1195}{5,0001} \times 100 = 42.3892 \%$$

$$3. \%A = \frac{2.1240}{5,0002} \times 100 = 42.4783 \%$$

$$\text{Promedio} = \frac{43.1397+42.3892+42.4783}{3} = 42.6690 \rightarrow 42.67 \%$$

Calculo de la desviación estándar:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(43.1397-42.6690)^2+(42.3892-42.6690)^2+(42.4783-42.6690)^2}{3-1}} = \pm 0.4100\% \rightarrow \pm 0.41 \%$$

Anexo N° 11. Cálculo del Índice de acidez de los morfotipos

	Morfotipo 1			Morfotipo 2		
Repeticiones	1	2	3	1	2	3
P. muestra (g)	5,0001	5,0000	5,0003	5,0004	5,0002	5,0002
Vol. NaOH (mL)	1,20	1,30	1,20	0,90	0,85	0,90
Concentración de NaOH (m)	0,0976	0,0976	0,0976	0,0976	0,0976	0,0976
Índice de A.G.L mgKOH/100g	0,9388	1,0172	0,9388	0,7041	0,6651	0,7041
Promedio	0,9649			0,6911		
Desviación estándar	0,05			0,02		

Para Morfotipo 1:

$$1. IA = \frac{1,2 \times 0,0976 \times 56,1}{5,0001} = 0,9388$$

$$2. IA = \frac{1,3 \times 0,0976 \times 56,1}{5,0000} = 1,0172$$

$$3. IA = \frac{1,2 \times 0,0976 \times 56,1}{5,0003} = 0,9388$$

$$\text{Promedio} = \frac{0,9388+1,0172+0,9388}{3} = 0,9649\% \rightarrow 0,96\%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0,9388-0,9649)^2+(1,0172-0,9649)^2+(0,9388-0,9649)^2}{3-1}} = \pm 0,05$$

Para Morfotipo 2:

$$1. IA = \frac{0,90 \times 0,0976 \times 56,1}{5,0004} = 0,7041$$

$$2. IA = \frac{0,85 \times 0,0976 \times 56,1}{5,0002} = 0,6651$$

$$3. IA = \frac{0,90 \times 0,0976 \times 56,1}{5,0002} = 0,7041$$

$$\text{Promedio} = \frac{0,7041+0,6651+0,7041}{3} = 0,6911\% \rightarrow 0,69\%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0,7041-0,6911)^2+(0,6651-0,6911)^2+(0,7041-0,6911)^2}{3-1}} = \pm 0,02$$

Anexo N° 12: Cálculo del Índice de saponificación de los morfotipos

Repeticiones	Morfotipo 1			Morfotipo 2			Blanco
	1	2	3	1	2	3	1
P. muestra (g)	5,0002	5,0008	5,0005	5,0000	5,0003	5,0002	-
Vol. H ₂ SO ₄ (mL)	15,2	15,1	15,15	14,5	14,5	14,5	30,4
Índice de saponificación mgKOH/100g	163,46	164,52	163,99	170,99	170,98	170,99	
Promedio	163,99			170,99			
Desviación estándar	0,53			0,01			

Para el Morfotipo 1:

$$1. IS = \frac{(30,4-15,2) \times 0,96 \times 56,1}{5,0002} = 163,46$$

$$2. IS = \frac{(30,4-15,1) \times 0,96 \times 56,1}{5,0008} = 164,46$$

$$3. IS = \frac{(30,4-15,15) \times 0,96 \times 56,1}{5,0005} = 163,99$$

$$\text{Promedio} = \frac{163,46+164,46+163,99}{3} = 163,99$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0163,46-163,99)^2+(164,46-163,99)^2+(163,99-163,99)^2}{3-1}} = \pm 0,53$$

Para el morfotipo 2

$$1. IS = \frac{(30,4-14,5) \times 0,96 \times 56,1}{5,0002} = 170,99$$

$$2. IS = \frac{(30,4-14,5) \times 0,96 \times 56,1}{5,0008} = 170,98$$

$$3. IS = \frac{(30,4-14,5) \times 0,96 \times 56,1}{5,0005} = 170,99$$

$$\text{Promedio} = \frac{170,99+170,98+170,99}{3} = 170,99$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(170,99-170,99)^2+(170,98-170,99)^2+(170,99-170,99)^2}{3-1}} = \pm 0,01$$

Anexo N° 13: Cálculo del índice de peróxido de los morfotipos

	<i>Morfotipo 1</i>			<i>Morfotipo 2</i>			<i>Blanco</i>
Repeticiones	1	2	3	1	2	3	1
P. muestra (g)	5,0006	5,00066	5,0005	5,0008	5,0007	5,0000	0
Vol. Tiosulfato (mL)	0,7	0,7	0,75	0,6	0,55	0,55	0,1
Índice de peróxido meqO ₂ /100g	12,13	12,13	13,14	10,11	9,10	9,60	
Promedio	12,47			9,60			
Desviación estándar	0,58			0,71			

Para el morfotipo 1:

$$1. \text{ IP} = \frac{(0,70-0,1) \times 0,1011 \times 1000}{5,0006} = 12,13$$

$$2. \text{ IP} = \frac{(0,70-0,1) \times 0,1011 \times 1000}{5,0006} = 12,13$$

$$3. \text{ IP} = \frac{(0,75-0,1) \times 0,1011 \times 1000}{5,0005} = 13,14$$

$$\text{Promedio} = \frac{13,14+12,13+12,13}{3} = 12,47 \%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(12,13-12,47)^2+(12,13-12,47)^2+(13,14-12,47)^2}{3-1}} = 0,58$$

Para el morfotipo 2:

$$1. \text{ IP} = \frac{(0,60-0,1) \times 0,1011 \times 1000}{5,0006} = 10,11$$

$$2. \text{ IP} = \frac{(0,55-0,1) \times 0,1011 \times 1000}{5,0006} = 9,10$$

$$3. \text{ IP} = \frac{(0,55-0,1) \times 0,1011 \times 1000}{5,0005} = 9,60$$

$$\text{Promedio} = \frac{10,11+9,10+9,60}{3} = 9,60 \%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(12,13-12,47)^2+(12,13-12,47)^2+(13,14-12,47)^2}{3-1}} = \pm 0,58$$

Anexo N° 14: Cálculo del índice de yodo de dos morfotipos

Repeticiones	Morfotipo 1			Morfotipo 2			Blanco
	1	2	3	1	2	3	1
P. muestra (g)	0,1507	0,1506	0,1502	0,1502	0,1507	0,1505	-
Vol. Tiosulfato (MI)	38,8	38,8	38,9	39,9	40,00	39,95	42,8
Índice de yodo g l/100g	34,97	35,00	34,23	24,77	23,84	24,3	
Promedio	34,73			24,3			
Desviación estándar	0,43			0,47			

Para Morfotipo 1:

$$1. \text{ IY} = \frac{(42,8-38,8) \times 0,1013 \times 12,69}{0,1507} = 34,97$$

$$2. \text{ IY} = \frac{(42,8-38,8) \times 0,1013 \times 12,69}{0,1506} = 35,00$$

$$3. \text{ IY} = \frac{(42,8-38,8) \times 0,1013 \times 12,69}{0,1502} = 34,23$$

$$\text{Promedio} = \frac{34,97+35,00+34,23}{3} = 34,73 \%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(34,97-34,73)^2+(35,00-34,73)^2+(34,23-34,73)^2}{3-1}} = \pm 0,43$$

Para Morfotipo 2:

$$1. \text{ IY} = \frac{(42,8-39,9) \times 0,1013 \times 12,69}{0,1502} = 24,77$$

$$2. \text{ IY} = \frac{(42,8-40,0) \times 0,1013 \times 12,69}{0,1507} = 23,84$$

$$3. \text{ IY} = \frac{(42,8-39,95) \times 0,1013 \times 12,69}{0,1505} = 24,30$$

$$\text{Promedio} = \frac{24,77+23,84+24,3}{3} = 24,3$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(24,30-24,3)^2+(23,84-24,3)^2+(24,77-24,3)^2}{3-1}} = \pm 0,47$$

Anexo N° 15: Cálculo del porcentaje de materia insaponificable de los morfotipos

	Morfotipo 1			Morfotipo 2		
Repeticiones	1	2	3	1	2	3
P. muestra (g)	5,0008	5,0005	5,0004	5,0001	5,0006	5,0004
P. residuo	0,0344	0,0349	0,0284	0,0436	0,0460	0,0472
[] NaOH	0,0196			0,0196		
Gasto (mL)	1,60	1,60	1,30	1,80	1,85	1,80
Corrección del peso	0,0090	0,0090	0,0073	0,0101	0,0101	0,0104
%M. insaponificable	0,50	0,49	0,40	0,59	0,64	0,66
Promedio	0,47			0,63		
Desviación estándar	0,05			0,03		

Para Morfotipo 1

1. $\%MI = \frac{0,0344 - (0,0090 + 0,0009)}{5,0008} \times 100 = 0,50 \%$
2. $\%MI = \frac{0,0349 - (0,0090 + 0,0009)}{5,0005} \times 100 = 0,49 \%$
3. $\%MI = \frac{0,0284 - (0,0073 + 0,0009)}{5,0004} \times 100 = 0,40 \%$

$$\text{Promedio} = \frac{0,50 + 0,49 + 0,40}{3} = 0,47 \%$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0,50 - 0,47)^2 + (0,49 - 0,47)^2 + (0,40 - 0,47)^2}{3 - 1}} = \pm 0,05$$

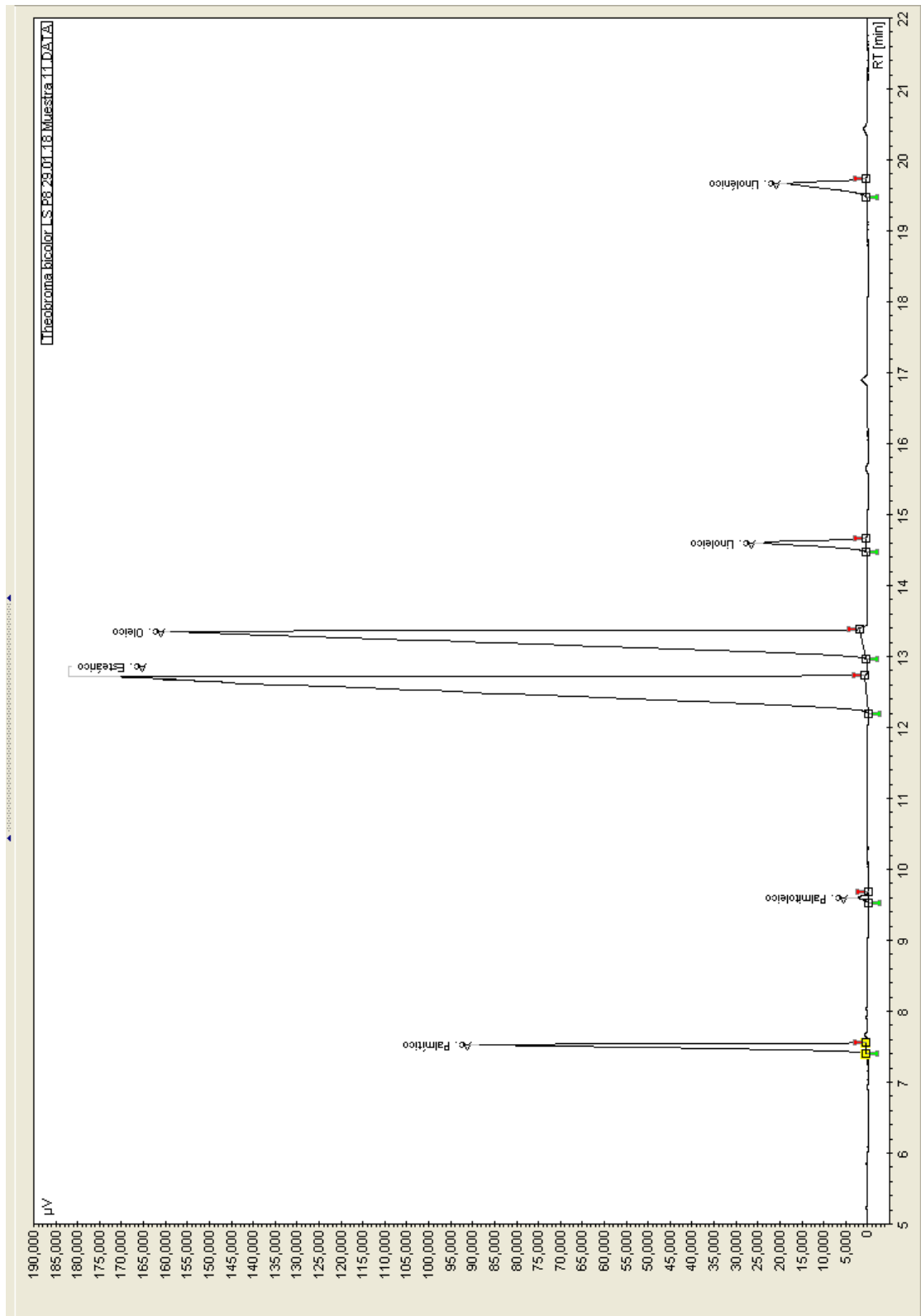
Para Morfotipo 2

1. $\%MI = \frac{0,0436 - (0,0104 + 0,0009)}{5,0008} \times 100 = 0,59 \%$
2. $\%MI = \frac{0,0460 - (0,0101 + 0,0009)}{5,0005} \times 100 = 0,64 \%$
3. $\%MI = \frac{0,0472 - (0,0101 + 0,0009)}{5,0004} \times 100 = 0,66 \%$

$$\text{Promedio} = \frac{0,59 + 0,64 + 0,66}{3} = 0,63 \%$$

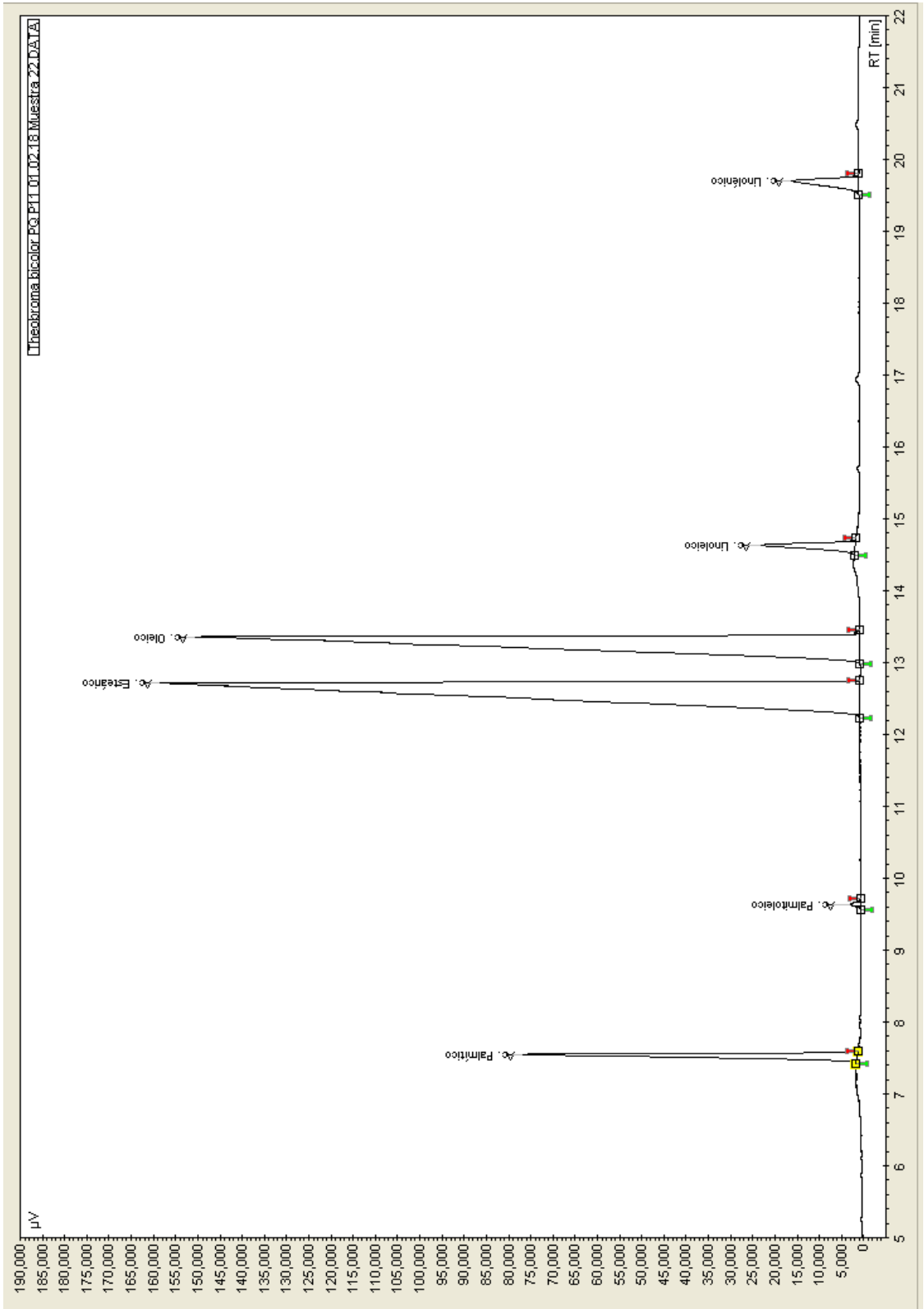
$$\sigma = \sqrt{\frac{(0,59 - 0,63)^2 + (0,64 - 0,63)^2 + (0,66 - 0,63)^2}{3 - 1}} = \pm 0,03$$

Anexo N° 16: Cromatograma de ácidos grasos de macambo "Theobroma bicolor (Humb. & Bompl)" morfotipo 1



Anexo N° 17: Cromatograma de ácidos grasos de macambo

“Theobroma bicolor (Humb. & Bopl)” morfotipo 2



Anexo N° 18: Protocolo de Determinación de Índice de Acidez

SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS



AOCS Official Method Cd 3d-63
Revised 2009

Acid Value

DEFINITION

The acid value is the number of milligrams of potassium hydroxide necessary to neutralize the free acids in 1 gram of test sample. With test samples that contain virtually no free acids other than fatty acids, the acid value may be directly converted by means of a suitable factor to percent free fatty acids.

SCOPE

Applicable to crude and refined animal, vegetable, and marine fats and oils, and various products derived from them. Formerly Cd 3a-63.

APPARATUS

1. Erlenmeyer flasks—250 or 300 mL.
2. Magnetic stirring device.
3. Burette—10 mL, graduated in 0.05 mL divisions with a tip drawn to a fine opening and extending at least 10 cm below the stopcock.
4. Analytical balance—accurate to 0.0001 g.

REAGENTS

1. Potassium hydroxide (KOH), 0.1 M—Reagent grade KOH having a carbonate specification of 0.5% max. or 0.1 M KOH with NIST traceable standardization to ± 1 part in 1000 in water, methanol, or ethanol.
2. Solvent mixture consisting of equal parts by volume of isopropyl alcohol (AOCS Specification H 18-58) and toluene (AOCS Specification H 19-58). See Notes, *Caution*. The mixture must give a distinct and sharp end point with phenolphthalein in the titration as noted in Procedure, 5.
3. Phenolphthalein indicator solution—1.0% in isopropyl alcohol.

PROCEDURE

1. Add indicator solution to the required amount of solvent in ratio of 2 mL to 125 mL and neutralize with alkali to a faint but permanent pink color.
2. Determine the test portion size from the following table:

Acid value	Mass, g of test portion ($\pm 10\%$), g	Weighing accuracy, mg
0-1	20	0.05
1-4	10	0.02
4-15	2.5	0.01
15-75	0.5	0.001
75 and over	0.1	0.0002

3. Weigh the specified amount of a well-mixed liquid test portion into an Erlenmeyer flask.
4. Add 125 mL of the neutralized solvent mixture. Be sure that the test portion is completely dissolved before titrating. Warming may be necessary in some cases.
5. Shake the test portions vigorously while titrating with standard alkali to the first permanent pink color of the same intensity as that of the neutralized solvent before the latter was added to the test portion. The color must persist for 30 s.
6. Perform a blank titration using 125 mL of the neutralized solvent mixture.

CALCULATIONS

1. Acid value, mg KOH/g of test portion = $\frac{(A - B) \times M \times 56.1}{W}$

where—

- A = volume, mL of standard alkali used in the titration
- B = volume, mL of standard alkali used in titrating the blank
- M = molarity of standard alkali
- W = mass, grams of test portion

To express in terms of free fatty acids as percent lauric, oleic, or palmitic, divide the acid value by 2.81, 1.99, or 2.19, respectively.

PRECISION

1. Single determinations performed in two different laboratories should not differ by more than 0.22 for values less than 4 nor by more than 0.36 for values in the range 4–20.

ALTERNATE PROCEDURE FOR HIGHLY COLORED TEST SAMPLES

APPARATUS

1. Glass electrode—calomel electrode pH meter for electrometric titration. A sleeve-type calomel electrode should be used (see Numbered Notes, 2).
2. Variable-speed mechanical stirrer—with glass stirring paddle.
3. Burette—10 mL, graduated in 0.05 mL divisions with a tip drawn to a fine opening and extending at least 10 cm below the stopcock.
4. Beakers—250 mL.
5. Stand and mountings for electrodes, stirrer, and burette.
6. Magnetic stirring device.

REAGENTS

1. Same as for the phenolphthalein titrimetric procedure, except that the standard alkali should be standardized by electrometric titration of pure potassium acid phthalate and no indicator solution is necessary.

PROCEDURE

1. Determine the test portion size from Procedure, 2 and weigh the test portion into a 250 mL beaker.
2. Add 125 mL of solvent mixture.
3. Mount the beaker in the titration assembly so that the electrodes are half immersed. Start the stirrer and operate at speeds that will give vigorous agitation without splashing. Immerse the tip of the burette to 1 cm below the surface of the test portion.
4. Titrate with suitable increments of alkali. After each addition of alkali, wait until the meter reading is essentially constant (usually within 2 min), then record burette and meter readings graphically. Limit increments of alkali so that changes in meter readings are 0.5 pH units (0.03 volts) or less; when inflections in titration curve occur, add alkali in 0.05 mL portions.
5. Remove titrated solution, rinse electrodes with isopropyl alcohol, and immerse in distilled water.
6. Perform a blank titration, using 125 mL of solvent mixture.

CALCULATIONS

$$1. \text{ Acid value, mg KOH/g of test portion} = \frac{(A - B) \times M \times 56.1}{W}$$

where—

A = volume, mL of standard alkali used in titrating to middle of inflection in titration curve of test portion

B = volume, mL of standard alkali used in titrating to same pH meter reading for the blank

M = molarity of standard alkali

W = mass, grams of test portion

To express in terms of free fatty acids as percent oleic, lauric, oleic or palmitic, divide the acid value by 2.81, 1.99, or 2.19, respectively.

PRECISION

Table 1 shows the precision data from interlaboratory studies evaluated according to ISO 5725:1994.


NOTES

Caution

Isopropyl alcohol is flammable and a dangerous fire risk. The explosive limits in air are 2–12%. It is toxic by ingestion and inhalation. The TLV in air is 400 ppm.

Toluene is flammable and a dangerous fire risk. Explosive limits in air are 1.27–7%. It is toxic by ingestion, inhalation, and skin absorption. The TLV is 100 ppm air. A fume hood should be used at all times when using toluene.

Anexo N° 19: Protocolo de Determinación de Índice de Saponificable

	AOCS Official Method Cd 3-25 Revised 2013
<h1>Saponification Value</h1>	
DEFINITION The saponification value is the amount of alkali necessary to saponify a definite quantity of the test sample. It is expressed as the number of milligrams of potassium hydroxide (KOH) required to saponify 1 gram of the test sample.	
SCOPE Applicable to all normal fats and oils (see Notes, 1).	

APPARATUS

1. Erlenmeyer flasks—alkali resistant, 250 or 300 mL, T24/40 ground-glass joint.
2. Condensers—with T24/40 ground-glass joint to fit Erlenmeyer flasks.
3. Water bath, or a hot plate with variable heat control.

REAGENTS

1. Hydrochloric acid, 0.5 M—accurately standardized. See AOCS Specification H 14-52.
2. Alcoholic potassium hydroxide (KOH)—may be purchased or prepared by placing 5–10 g of reagent-grade KOH (see Notes, *Caution*) pellets in a 2-L flask, adding 1–1.5 L of 95% ethyl alcohol (see Notes, *Caution*) and boiling in a water bath under reflux for 30–60 min. Distill and collect alcohol in a clean, glass-stoppered receiver. Dissolve 40 g of potassium hydroxide, low in carbonate, in 1 L of the distilled alcohol (see Notes, *Caution*) with cooling to keep the temperature at or below 15°C. This solution should remain clear (see Notes, 2–3).
3. Phenolphthalein indicator solution—1.0% in 95% ethyl alcohol (see Notes, 4).

PROCEDURE

1. Melt the test sample (see Notes, 5) if it is not already liquid and filter through dry filter paper to remove any impurities and moisture. The test sample must be completely dry.
2. Weigh a test portion of such size that the back titration is 45–55% of the blank. This usually requires a test portion of 1.0–2.2 g if 25 mL of 0.5 M HCl are used (Table 1) or 4–5 g if 50 mL of 0.5 M HCl are used. Add the alcoholic KOH with a pipet and allow the pipet to drain for approximately 10 s (see Notes, 6).
3. Prepare and conduct blank determinations concurrently with the test portion omitting the fat or oil.
4. Connect the condenser and boil gently, but steadily, until the test portion is completely saponified. This usually requires at least 30 min for normal test portions (see Notes, 7). Make certain that the vapor ring in the condenser does not rise to the top of the condenser, or loss may occur.
5. After the flask and condenser have cooled somewhat, but not sufficiently to form a gel, wash the inside of the condenser with a small quantity of distilled water. Disconnect the condenser, add about 1 mL of phenolphthalein indicator and titrate with 0.5 M HCl until the pink color just disappears. Record the volume of 0.5 M HCl required for the titration.

CALCULATIONS

$$1. \text{ Saponification value} = \frac{(B - S) \times (M) \times 56.1}{W}$$

Where—

- B = volume of 0.5 M HCl required to titrate blank, mL
- S = volume of 0.5 M HCl required to titrate test portion, mL
- M = molarity of HCl solution
- W = mass of test portion in grams

PRECISION

Repeatability and reproducibility values from an international collaborative study are given in Table 2.

NOTES

Caution

Potassium hydroxide, like all alkalis, can burn skin, eyes, and respiratory tract severely. Wear heavy rubber gloves and face shield to protect against concentrated alkali liquids. Use effective flame-removal device or gas mask to protect respiratory tract against alkali dusts or vapors. When working with extremely caustic materials such as potassium hydroxide, always add pellets to water.

and not the reverse. Alkalies are extremely exothermic when mixed with water. Take precautions to contain the caustic solution in the event that the mixing container breaks from the extreme heat generated.

Ethyl alcohol (ethanol) is flammable. Use a fume hood when heating or evaporating this solvent.

Hydrochloric acid is a strong acid and will cause severe burns. Protective clothing should be worn when working with this acid. It is toxic by ingestion and inhalation and a strong irritant to eyes and skin. The use of a properly operating fume hood is recommended. When diluting the acid, always add the acid to the water, never the reverse.

NUMBERED NOTES

1. When the saponification value is required on the fatty acids, the preparation and separation are performed as directed in AOCS Official Method T1 14-64.
2. Ethanol may be stabilized by the addition of 5 g aluminum pellets to the reflux flask prior to refluxing and distillation. Decant the clear supernatant from the precipitated potassium carbonate formed after dissolving the potassium hydroxide.
3. An alternative method to stabilize alcoholic KOH is the addition of 4 g aluminum *tert*-butylate and allowing it to stand for several days. Decant the clear supernatant from the precipitated potassium carbonate formed after dissolving the potassium hydroxide.
4. If the starting solution is strongly colored, 0.5–1 mL of alkali blue 6B solution can be used in place of phenolphthalein as the indicator. Note that alkali blue 6B has a pKa range that differs from phenolphthalein and the resulting pKa of the titrated test portion could vary similarly.
5. Test samples must be well mixed and entirely liquid before weighing; however do not heat the sample more than 10°C over the melting point.
6. For consistent results, a 25 or 50 mL class A volumetric pipet calibrated "to deliver" should be used. The pipet should be allowed to drain for about 10 s. And the same pipet should be used for all analyses.
7. Some test portions, particularly those difficult to saponify, may require 1–6 hr refluxing. This can only be determined by trial. Clarity and homogeneity of the test solution are partial indicators of complete saponification, but they are not necessarily absolute criteria.

Table 1
Mass of test portion.

Expected saponification value	Mass of test portion
150 to 200	2.2 g–1.8 g
200 to 250	1.7 g–1.4 g
250 to 300	1.3 g–1.2 g
> 300	1.1 g–1.0 g

Table 2
Results of a 2000 collaborative study conducted by DIN on the determination of saponification value.

Test Sample	Rapeseed oil	Palm oil	Coconut oil	60% Coconut oil + 40% MCT oil	MCT oil
Total number of laboratories accepted	19	17	20	18	16
Mean of the laboratory values (mg/g)	190.20	199.50	256.80	287.50	334.10
Repeatability					
Standard deviation, s_r	0.71	0.55	0.72	0.71	1.41
Relative standard deviation, RSD _r , %	0.4	0.3	0.3	0.2	0.4
Repeatability value, $2.8 \times s_r$	2.01	1.56	2.02	1.99	3.95
Reproducibility					
Standard deviation, s_R	1.77	2.04	4.17	2.36	2.86
Relative standard deviation, RSD _R , %	0.9	1.0	1.6	0.8	0.9
Reproducibility value, $2.8 \times s_R$	4.97	5.72	11.67	6.61	8.00

Anexo N° 20: Protocolo de Determinación de Índice de Peróxido

SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS



AOCS Official Method Cd 8b-90

Revised 2009

Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method

DEFINITION

This method determines all substances, in terms of milliequivalents of peroxide per 1000 grams of test sample, that oxidize potassium iodide under the conditions of the test. The substances are generally assumed to be peroxides or other similar products of fat oxidation.

SCOPE

Applicable to all normal fats and oils, including margarines. This method is highly empirical, and any variation in the test procedure may result in erratic results. Because this method gives erratic results at peroxide values ≥ 70 , this method should not be used with the AOM test, AOCS Official Method Cd 12-57, with which peroxide values ≥ 70 may be encountered.

APPARATUS

1. Pipet—0.5 mL, or other suitable volumetric apparatus capable of dispensing 0.5 mL of saturated potassium iodide (KI) solution.
2. Erlenmeyer flask—with glass stopper, 250 mL.
3. Burette—25 mL or 50 mL, class A, graduated in 0.1 mL divisions.
4. Titrat.
5. Balance—top loading, 500 g capacity with ± 0.01 gram sensitivity.

REAGENTS

1. Acetic acid-isoctane solution—3:2, v/v, prepared by mixing 3 volumes of reagent-grade glacial acetic acid (see Notes, Caution) with 2 volumes of reagent-grade isoctane (see Notes, Caution).
2. Potassium iodide (KI) solution—saturated, prepared fresh each day analysis is performed by dissolving an excess of KI in recently boiled distilled water. Make certain the solution remains saturated during use, as indicated by the presence of undissolved KI crystals. Store in the dark when not in use. Test the saturated KI solution by adding 2 drops of starch solution to 0.5 mL of the KI solution in 30 mL of the acetic acid-isoctane solution. If a blue color is formed that requires more than 1 drop of 0.1 M sodium thiosulfate solution to discharge, discard the KI solution and prepare a fresh solution.
3. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) solution—0.1 M, accurately standardized vs. potassium dichromate primary standard as follows:
 - (a) Sodium thiosulfate solution 0.1 M, prepared by dissolving 24.9 g of sodium thiosulfate in distilled water and diluting to 1 L.
 - (b) The potassium dichromate (see Notes, Caution) primary standard should be finely ground, dried at 105°C for 2 hr and cooled in a desiccator. Weigh 0.16–0.22 g of potassium dichromate into a 500 mL flask or bottle by difference from a weighing bottle. Dissolve in 25 mL of water, add 5 mL of concentrated hydrochloric acid (35–37%), 20 mL of potassium iodide solution (15% solution, 15 g KI in 100 mL water), and rotate to mix. Allow to stand for 5 min and then add 100 mL of distilled water. Titrate with sodium thiosulfate solution, shaking continuously until yellow color has almost disappeared. Add 1–2 mL of starch indicator and continue the titration, adding the thiosulfate solution slowly until the blue color just disappears. The strength of the sodium thiosulfate solution is expressed in terms of its molarity:

$$\text{Molarity of Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ solution} = \frac{20.394 \times \text{mass of K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7, \text{ g}}{\text{mL of sodium thiosulfate}}$$

4. Sodium thiosulfate solution—0.01 M, accurately standardized. This solution may be prepared by accurately pipetting 100 mL of 0.1 M sodium thiosulfate into a 1000 mL volumetric flask and accurately diluting to volume with recently boiled distilled water.
5. Starch indicator solution—scented for sensitivity, prepared by making a paste with 1 g of starch (see Notes, 1) and a small amount of cold distilled water. Add, while stirring, to 200 mL of boiling water and boil for a few seconds. Immediately remove from heat and cool. Salicylic acid (1.25 g/L) may be added to preserve the indicator. If long storage is required, the solution must be kept in a refrigerator at 4–10°C. Fresh indicator must be prepared when the end point of the titration from blue to colorless fails to be sharp. If stored under refrigeration, the starch solution should be stable for about 2–3 weeks.

Test for sensitivity—Place 5 mL of starch solution in 100 mL of water and add 0.05 mL of freshly prepared 0.1 M KI solution and one drop of a 50 ppm chlorine solution made by diluting 1 mL of a commercial 5% sodium hypochlorite (NaOCl) solution to 100 mL. The deep blue color produced may be discharged by 0.05 mL of 0.1 M sodium thiosulfate.
6. Sodium lauryl sulfate (SDS)— $\geq 99\%$ (Aldrich Chemical (W. Milwaukee, WI, USA) or Mallinckrodt (Paris, KY, USA)). Prepare 10% solution by dissolving 10 g SDS in 100 mL water.

PROCEDURE FOR FATS AND OILS

1. Weigh the test portion (Table 1) into a 250 mL Erlenmeyer flask with glass stopper and add 30 mL of the 3:2 acetic acid-isooctane solution. Swirl to dissolve the test portion. Add 0.5 mL of saturated KI solution using a suitable volumetric pipet.
2. Allow the solution to stand for exactly 1 min, thoroughly shaking the solution at least three times during the 1 min, and then immediately add 30 mL of distilled water.
3. Titrate with 0.1 M sodium thiosulfate, adding it gradually and with constant and vigorous agitation (see Notes, 2). Continue the titration until the yellow iodine color has almost disappeared. Add 0.5 mL of 10% SDS (Reagents, 6), and then add about 0.5 mL of starch indicator solution. Continue the titration with constant agitation, especially near the end point, to liberate all of the iodine from the solvent layer. Add the thiosulfate solution dropwise until the blue color just disappears (see Notes, 3 and 4).
4. Conduct a blank determination of the reagents daily. The blank titration must not exceed 0.1 mL of the 0.1 M sodium thiosulfate solution.

PROCEDURE FOR MARGARINE

1. Melt the test portion by heating with constant stirring on a hot plate set at low heat, or by heating in an air oven at 60–70°C. Avoid excess heating and particularly prolonged exposure of the oil to temperatures above 40°C.
2. When completely melted, remove the test portion from the hot plate or oven and allow to settle in a warm place until the aqueous portion and most of the milk solids have settled to the bottom.
3. Decant the oil into a clean beaker and filter through a Whatman no. 4 paper (or equivalent) into another clean beaker. Do not strain for filtration unless absolutely necessary. The test portion must be clear and brilliant.
4. Proceed as directed in Procedure for Fats and Oils, paragraphs 1–4.

CALCULATIONS

1. Peroxide value (milliequivalents peroxide/1000 g test portion) = $\frac{(S - B) \times M \times 1000}{\text{mass of test portion, g}}$

Where—

- B = volume of titrant, mL, of blank
- S = volume of titrant, mL, of test portion
- M = Molarity of sodium thiosulfate solution

PRECISION

The details of interlaboratory tests are given in Tables 2–4. The values presented may not be applicable to matrices other than those presented and may not be representative for other concentrations.

1. **Repeatability**—The difference between two test results on the same material, in the same laboratory under the same conditions, should not exceed the repeatability value, r.
2. **Reproducibility**—The difference between two test results on the same material, under the same conditions in different laboratories, should not exceed the reproducibility value, R.

NOTES

Cancer

Isooctane is flammable and a fire risk. Explosive limits in air are 1.1–6.0%. It is toxic by ingestion and inhalation. A properly operating fume hood should be used when working with this solvent.

Acetic acid in the pure state is moderately toxic by ingestion and inhalation. It is a strong irritant to skin and tissue. The TLV in air is 10 ppm.

Potassium dichromate is toxic by ingestion and inhalation. There is sufficient evidence in humans for the carcinogenicity of chromium (+6), in particular, lung cancer. It is a strong oxidizing agent and a dangerous fire risk when in contact with organic chemicals.

NUMBERED NOTES

1. "Potato Starch for Iodometry" is recommended, because this starch produces a deep blue color in the presence of the iodonium ion. "Soluble Starch" is not recommended because a consistent deep blue color may not be developed when some soluble starches interact with the iodonium ion. The following are suitable starches: Soluble Starch for Iodometry, Fisher S516-100; Soluble Potato Starch, Sigma S-2630; Soluble Potato Starch for Iodometry, J.T. Baker 4006-04.
2. There is a 15–30 sec delay in neutralizing the starch indicator for peroxide values 70 meq/kg and higher. This delay is due to the tendency of isooctane to float on the surface of an aqueous medium, and the time necessary to adequately mix the solvent in large volumes of aqueous titrant, thereby liberating the last traces of iodine. Based on collaborative study results (References, 1,2), the recommendation is to use 0.1 M titrant for peroxide value ranges (10–150 meq/kg). Erratic results reported for this method, especially at higher peroxide values, appear to be related to the isooctane floating on the surface of the aqueous layer (Reference, 3). Rapid mechanical stirring (e.g., with magnetic stirrer) and/or use of a surfactant, such as sodium lauryl sulfate (Reagents, 6), is highly recommended.

3. If the titration is less than 0.5 mL using 0.1 M sodium thiosulfate, repeat the determination using 0.01 M sodium thiosulfate, using vigorous agitation and/or surfactant for the reason stated in Notes. 2. Analysts may use 0.001 M sodium thiosulfate if full validation protocols are followed.
4. The test should be carried out in diffuse daylight or in artificial light shielded from a direct light source (References, 6).

REFERENCES

1. Bosola, D.D., and D.L. Berner, Isooctane as an Alternative Solvent for Peroxide Value Determination. Study 1, poster presentation at AOCS Annual Meeting, Baltimore, MD, April 23, 1990.
2. Collaborative study results published in *AOCSOM* 1-884 (1990).
3. Bosola, D.D., S.K. Brophy, B. Hayden, and G.R. Cross, Alternative Solvents for Peroxide Value Determination, poster presentation at AOCS Annual Meeting, Cincinnati, OH, May 10, 1989.
4. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75:507 (1992).
5. The International Standards Organization (ISO) successfully completed an international collaborative study of this method in 1996. The results are presented in ISO 3960.

Table 1
Mass of test portion and accuracy of weighing.

Expected peroxide value (meq/kg)	Mass of test portion (g)	Weighing accuracy (g)
0 to 12	5.0 to 2.0	± 0.01
12 to 20	2.0 to 1.2	± 0.01
20 to 30	1.2 to 0.8	± 0.01
30 to 50	0.8 to 0.5	± 0.001
50 to 90	0.5 to 0.3	± 0.001

Table 2
The results of international collaborative tests held between 1993 and 1999 (see References, 5).

	Cocconut oil	Linseed oil	Lard	Tallow	Beef fat	Olive oil	Palm stearin
<i>n</i>	14	15	15	11	11	16	16
Mean	1.94	5.11	3.89	14.0	12.2	24.18	9.27
Repeatability							
<i>s_r</i>	0.07	0.16	0.18	0.79	0.36	0.98	0.73
RSR _r	5.38	5.14	6.34	5.61	2.93	4.08	7.86
<i>r</i>	0.20	0.45	0.51	2.20	1.00	2.75	2.04
Reproducibility							
<i>s_R</i>	0.25	0.79	0.31	4.07	4.14	3.92	2.48
RSR _R	26.04	31.76	10.65	29.08	33.94	16.26	26.18
<i>R</i>	0.99	2.77	0.86	11.40	11.60	10.98	6.80

Table 3
Test on olive oil.

	Refined olive oil	Olive oil	Virgin olive oil
Mean value, meq/kg	10.11	7.68	12.27
Relative repeatability standard deviation, %	11.53	6.05	6.90
Repeatability limit, <i>s_r</i> , meq/kg	4.25	1.30	2.23
Relative reproducibility standard deviation, %	12.88	13.24	13.32
	4.58	2.84	4.45

Table 4
Test on lard, tallow, and beef fat.

	Lard	Tallow	Beef fat
Number of laboratories	11	11	11
Number of acceptable results	11	11	11
Mean value, meq/kg	4.9	6.7	5.4
Repeatability limit, <i>s_r</i> , meq/kg	0.4	1.1	0.5
Reproducibility limit, <i>R</i> , meq/kg	2.4	5.7	3.8

Anexo N° 21: Protocolo en la determinación del índice yodo

41.1.12

AOAC Official Method 965.32 Hydroxyl Value of Oils and Fats

Acetylation Method
First Action 1985
Final Action 1999

AOCS-AOAC Method

(Hydroxyl value is number of mg KOH equivalent to hydroxyl content of 1 g oil or fat. Applicable to fatty oils and derivatives such as fatty alcohols, mono- and diglycerides, and hydroxystearic acid.)

A. Reagents

- Pyridine.—Reagent grade, redistilled at 114°–115°C.
- Acetic anhydride.—ACS, fresh.
- Pyridine-acetic anhydride reagent.—Mix 3 volumes reagent (a) with 1 volume (b) just before use.
- n*-Butyl alcohol.—Reagent grade. Neutralize with 0.5M KOH to faint pink phenolphthalein end point.
- Alcoholic potassium hydroxide standard solution.—0.5M. (Should be $\geq 0.5M$ so that blank titers do not require refilling of 50 mL buret.)

B. Determination

(Caution: See Appendix B, safety notes on pipets and acetic anhydride.)

According to expected hydroxyl value, weigh amounts from Table 965.32 of test sample into 250 mL standard taper glass-stoppered Erlenmeyers to nearest mg for acetylation.

Weigh 9.0–11.0 g test portion into another flask for acidity determination. (For fatty acids such as hydroxystearic acid, take 0.9–1.1 g.)

Pipet 5.0 mL reagent (c) into flask containing acetylation test sample. For test samples with 0–20 hydroxyl value, add additional 5 mL pyridine. Mix thoroughly by gentle swirling. Pipet 5 mL reagent (c) (and 5 mL pyridine, if used in acetylation) into another flask for reagent blank. Place flasks on steam bath under standard taper reflux condenser and heat 1 h. (Do not use hot plate or mantle.) Add 10 mL H₂O through condenser and heat additional 10 min. Let flasks cool with condenser attached. Add 25 mL *n*-butyl alcohol, ca half through condenser, remove condenser, and use rest to wash down sides of flask. Add 1 mL phenolphthalein and titrate to faint pink end point with 0.5M alcoholic KOH.

Add 10 mL pyridine, neutralized to phenolphthalein, to test portion for acidity determination. Swirl gently to mix, add 1 mL phenolphthalein, and titrate to faint pink end point with 0.5M alcoholic KOH.

$$\text{Hydroxyl value} = [B + (F \times FVC) - S] \times \text{molarity} \times 56.1/F$$

Table 965.32. Weights of test sample for acetylation according to expected hydroxyl value

Hydroxyl value	Weight, g
0–20	10 ± 0.1
20–50	5
50–100	3
100–200	2

where F = mL KOH for acidity titration, B = mL KOH for reagent blank, C = g test portion for acidity titration, S = mL KOH for acetylated test sample, F = g test portion used for acetylation.

References: *Rev.* 34, 3354(1901).

J. Biol. Chem. 104, 627(1934).

Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 394(1945).

AOCS Method C8 13–69 (Revised 1993).

AOAC 48, 131, 175(1965).

41.1.13

AOAC Official Method 820.158 Iodine Absorption Number of Oils and Fats

Hanus Method
First Action 1920
Final Action

(All reports should specify method used.)

A. Reagent

Hanus iodine solution.—Dissolve 13.2 g pure I₂ in 1 L CH₃COOH that shows no reduction with dichromate and H₂SO₄. Add enough Br₂ to double halogen content as determined by titration (ca 3 mL). The I₂ may be dissolved by heating, but solution should be cold when Br₂ is added. Hanus I₂ solution may also be prepared as follows: Measure 825 mL CH₃COOH and dissolve 13.615 g I₂ in it with aid of heat. Cool, and titrate 25 mL with 0.1M Na₂S₂O₃, 943.27 (see Appendix A). Measure another portion of 200 mL CH₃COOH and add 3 mL Br₂. To 5 mL of this solution add 10 mL 15% KI solution, and titrate with the 0.1M Na₂S₂O₃. Calculate volume Br₂ solution required to double halogen content of remaining 800 mL I₂ solution as follows:

$$X = B/C$$

where X = mL Br₂ solution required; B = 800 = thiosulfate equivalent of 1 mL I₂ solution; and C = thiosulfate equivalent of 1 mL Br₂ solution. If necessary, reduce mixed solution to proper concentration by dilution with CH₃COOH.

B. Determination

Weigh ca 0.5000 g fat, or 0.2500 g oil (0.1000–0.2000 g of oils that have high absorbent power), into 500 mL glass-stoppered flask or bottle and dissolve in 10 mL CHCl₃. With pipet, add 25 mL Hanus I₂ solution, draining pipet definite time, and let stand 30 min in dark, shaking occasionally. (For accurate results use exact time. Excess I₂ should be $\geq 60\%$ of amount added.)

Add 10 mL 15% KI solution, shake thoroughly, and add 100 mL freshly boiled and cooled H₂O, washing down any free I₂ on stopper. Titrate I₂ with standard 0.1M Na₂S₂O₃, adding it gradually, with constant shaking, until yellow solution turns almost colorless. Add few drops starch indicator, (mix ca 1 g soluble starch with enough cold water to make thin paste, add 100 mL boiling water, and boil ca 1 min while stirring) and continue titration until blue entirely disappears. Toward end of titration, stopper bottle and shake vigorously, so that any I₂ remaining in solution in CHCl₃ may be taken up by KI solution.

Conduct 2 blank determinations along with determination on sample. Number of mL 0.1M Na₂S₂O₃ required by blank (B) minus mL used in determination (S) gives Na₂S₂O₃ equivalent of I₂ absorbed by the fat or oil. Calculate % by weight of I₂ absorbed (I , number, Hanus method).

$$I_2 \text{ number} = \frac{(B - S) \times M \times 12.69}{\text{g test portion}}$$

where M is molarity of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution.

Revised: March 1998

41.1.14

AOAC Official Method 920.159 Iodine Absorption Number of Oils and Fats

Wijs Method
First Action 1929
Final Action

A. Reagents

Wijs iodine solution.—(1) Dissolve 13 g resublimed I_2 in 1 L CH_3COOH , and pass in dried (through H_2SO_4) Cl_2 until original $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ titration of solution is not quite doubled. (Characteristic color change at end point indicates proper amount of Cl_2 . Convenient method is to reserve some of original I_2 solution, add slight excess of Cl_2 to bulk of solution, and bring to desired titer by readjustments of reserved portion.) Or: (2) Dissolve 16.5 g ICI in 1 L CH_3COOH .

Store in amber bottle sealed with paraffin until ready for use. Wijs solutions are sensitive to temperature, moisture, and light. Store in dark at $<30^\circ\text{C}$. Determine I/Cl ratio as follows:

Iodine content.—Pipet 5 mL Wijs solution into 500 mL Erlenmeyer containing 150 mL saturated $\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ and some glass beads. Shake, heat to bp, and boil briskly 10 min. Cool, add 30 mL H_2SO_4 (1 + 89) and 15 mL 15% KI solution, and titrate immediately with 0.1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Total halogen content.—Pipet 20 mL Wijs solution into 500 mL Erlenmeyer containing 150 mL recently boiled and cooled H_2O and 15 mL 15% KI solution. Titrate immediately with 0.1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

$$\text{I/Cl} = \frac{2X}{3B - 2X}$$

where X = mL 0.1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ required for I_2 content and B = mL required for total halogen content. I/Cl ratio must be 1.10 ± 0.1 .

B. Determination

Use test portion weight calculated as 26/expected iodine value, or from Table 920.159.

Weigh melted and filtered test portion into clean, dry, 500 mL glass-stoppered flask containing 20 mL CCl_4 . With pipet, add 25 mL I_2 solution, draining pipet definite time. Excess of I_2 should be 50–60% of amount added, that is, 100–150% of amount absorbed. Swirl, and let bottle stand in dark 30 min at $25^\circ \pm 5^\circ\text{C}$. Let oils with I_2 values >150 (linseed and perilla) stand 1 h.

Add 20 mL 15% KI solution and 100 mL recently boiled and cooled H_2O . Titrate the I_2 with 0.1M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 942.27 (see A.1.1.1), added gradually, shaking constantly until yellow solution turns almost colorless. (Vigorous magnetic stirring is convenient.) Add few drops starch indicator, (mix ca 1 g soluble starch with enough cold water to make thin paste, add 100 mL boiling water, and boil ca 1 min while stirring) and continue titration until blue entirely

Table 920.159. Test sample weights

Iodine value	g Test portion ^a	Accuracy, mg
3	10.58–8.46	± 0.5
10	3.17–2.54	0.2
20	1.59–1.27	0.2
40	0.79–0.63	0.2
80	0.40–0.32	0.2
120	0.28–0.21	0.1
160	0.20–0.16	0.1
200	0.16–0.13	0.1

^a For 100 and 150% excess, respectively.

disappears. Toward end of reaction, stopper bottle and shake vigorously so that any I_2 remaining in solution in CCl_4 may be taken up by KI solution.

Conduct 2 determinations on blanks in same manner as test portion, but without fat. Slight variations in temperature appreciably affect titer of I_2 solution, as CH_3COOH has high coefficient of expansion. It is essential, therefore, that blanks and determinations on test portion be made at same time. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ equivalent of I_2 absorbed by test portion taken = mL standard $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution required by blank (B) – mL used in determination (S). Calculate % by weight of I_2 absorbed as in 920.158B (see 41.1.13) and report as I_2 number, Wijs method.

Reference: *JAOAC* 48, 127(1965).

41.1.15

AOAC Official Method 993.23 Iodine Value of Fats and Oils

Wijs (Cyclohexane–Acetic Acid Solvent) Method
First Action 1993
Final Action 1996

IUPAC–AOCS–AOAC Method

(Applicable to determination of iodine value for fats and oils which do not contain conjugated double bonds.)

Caution: Wijs solution causes severe burns; vapors can cause lung and eye damage. Use of fume hood is recommended. See Appendix B, Laboratory Safety, for procedures on safe handling of acids and organic solvents (cyclohexane).


See Table 993.20A for the results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle

Fat or oil is mixed with iodine monochloride solution to halogenate double bonds in fat or oil. Excess iodine monochloride is reduced to free iodine in presence of potassium iodide, and free iodine is measured by titration with sodium thiosulfate using starch as indicator.

Iodine value (IV), calculated as mg iodine absorbed per g of sample (% iodine absorbed), is a measure of unsaturation of fats and oils.

Anexo N° 22: Protocolo en la determinación de material insaponificable

	AOCS Official Method Ca 6a-40 Revised 2011
<h1>Unsaponifiable Matter</h1>	
DEFINITION Unsaponifiable matter includes those substances frequently found dissolved in fats and oils, which cannot be saponified by the usual caustic treatment, but are soluble in ordinary fat and oil solvents. Included in this group of compounds are higher aliphatic alcohols, sterols, pigments, and hydrocarbons.	
SCOPE Applicable to normal animal and vegetable fats and oils. This method is not suitable for fats and oils containing an excessive amount of unsaponifiable matter, such as marine oils. This method does not apply to feed-grade fats.	

APPARATUS

1. Extraction cylinder—graduated, with glass stopper, capacity about 200 mL (see Notes, 1).
2. Erlenmeyer flasks or Soxhlet flasks—100 to 200 mL capacity.
3. Separatory funnels—500 mL.
4. Glass siphon—See Procedure, 3 and Notes, 1.

REAGENTS

1. Ethyl alcohol 95%—USSD formulas 30 and 3A are permitted (see Notes, Caution).
2. Aqueous potassium hydroxide (KOH)—50% by weight, prepared by dissolving 60 g of reagent-grade KOH in 40 mL of distilled water with cooling (see Notes, Caution).
3. Petroleum ether—see AOCS Specification H 2-41 (see Notes, Caution).
4. Sodium hydroxide (NaOH) solution, 0.02 M—accurately standardized. See AOCS Specification H 12-52.
5. Phenolphthalein indicator solution—1.0% in 95% ethyl alcohol.

PROCEDURE

1. Accurately weigh about 5 g ± 0.1 mg of well-mixed test sample into an Erlenmeyer flask or Soxhlet flask. Add 30 mL of 95% ethyl alcohol and 5 mL of 50% KOH solution. Boil gently, but steadily, under reflux for 1 hr, or until completely saponified. Complete saponification is essential.
2. Transfer to the extraction cylinder (see Notes, 1) and wash to the 40 mL mark with 95% ethyl alcohol. Complete the transfer with warm and then cold distilled water until the total volume is 80 mL. Wash out the flask with a small volume (5 mL) of petroleum ether and add to the cylinder. Cool the contents of the cylinder to room temperature (20–25°C) and then add 50 mL of petroleum ether.
3. Insert the stopper, shake vigorously for at least 1 min, and allow to settle until both layers are clear. Use a glass siphon to remove the upper layer as completely as possible without including any of the lower portion (see Notes, 1).
4. The petroleum ether fractions are combined in a 500 mL separatory funnel.
5. Repeat the extraction at least six times, using 50 mL portions of petroleum ether each time and shaking vigorously with each extraction (see Notes, 2).
6. Wash the combined extracts in the separatory funnel three times, using 25 mL portions of 10% ethyl alcohol in distilled water, shaking vigorously and drawing off the aqueous alcohol layer after each extraction. Avoid removing any of the petroleum ether layer.
Continue to wash with the 10% ethyl alcohol solution until the wash solution no longer gives a pink color after the addition of one drop of phenolphthalein solution (Reagents, 5) (see Notes, 3).
7. Transfer the petroleum ether extract to a tared beaker and evaporate to dryness on a water bath, using a gentle stream of clean, dry nitrogen. After all of the solvent has evaporated, complete the drying to constant weight in a vacuum oven at 75–80°C and an internal pressure of not more than 200 mm of mercury. Cool in a desiccator and weigh. The result becomes "A" in the calculation.
8. After weighing, take up the residue in 50 mL of warm (50°C) 95% alcohol, containing phenolphthalein indicator previously neutralized to the phenolphthalein end point. Titrate with 0.02 M NaOH to the same final color. Correct the weight of the residue (see Notes, 3) for free fatty acid content, using the following relationships:
1 mL of 0.02 M NaOH is equivalent to 0.0056 g of oleic acid.
The grams of fatty acid determined by this titration become "B" in the calculation for determining percent unsaponifiable matter (see Notes, 3). A reagent blank correction should also be determined.
9. Correct for any reagent blank by conducting the unsaponifiable matter procedure without any fat or oil present. The blank determined by this procedure becomes "C" in the calculations.

CALCULATIONS

1. Unsaponifiable matter, % = $\frac{A - (B + C)}{\text{mass of test portion, g}} \times 100$

Where—

- A = mass of residue, g
- B = mass of fatty acids, g
- C = mass of blank, g

PRECISION

1. There are no statistics from a collaborative study of AOCS Official Method Ca 6a-40. The following values for reproducibility standard deviation (S_R), percent relative standard deviation (RSD%), and reproducibility (R) were obtained from 1985-1986 Smalley Check Sample Program results for unsaponifiable values using AOCS Official Method Ca 6a-40.

Sample	No. of analyses	Outlier %	Mean, unsp.	S_R	RSD%	R
1	49	2	0.37	0.128	34.25	0.36
2	51	5	0.56	0.097	27.25	0.28
3	47	0	0.38	0.108	28.13	0.31
4	47	2	0.40	0.088	22.06	0.25
5	47	2	0.39	0.075	19.48	0.21

NOTES

Caution

Ethyl alcohol (ethanol) is flammable. Use a fume hood when heating or evaporating this solvent.

Potassium hydroxide, like all alkalis, can burn skin, eyes, and respiratory tract severely. Wear heavy rubber gloves and face shield to protect against concentrated alkali liquids. Use effective fume-removal device or gas mask to protect respiratory tract against alkali dusts or vapors. When working with extremely caustic materials, such as potassium hydroxide, always add pellets to water and not the reverse. Alkalis are extremely exothermic when mixed with water. Take precautions to contain the caustic solution in the event that the mixing container breaks from the extreme heat generated.

Petroleum ether is extremely flammable. Avoid static electricity. The explosive limits in air are 1-6%. A fume hood should be used at all times when using petroleum ether.

NUMBERED NOTES

1. Alternately, a 500 mL separatory funnel may be substituted for the extraction cylinder, eliminating the need for the siphon. If a separatory funnel is substituted, draw off the lower aqueous layer into another separatory funnel, retaining the petroleum ether extract in the first funnel. Repeat the petroleum ether extraction of the aqueous phase as noted in Procedure, 5, combining all of the petroleum ether extracts in the first funnel.
2. There are some cases in which seven extractions may not be sufficient. This is best judged by making another extraction and separately evaporating this extract as noted in Procedure, 7. There should be no unsaponifiable matter in this extract. If there is, dissolve in a small volume of petroleum ether and add back to the combined extracts. Continue with the extractions until no unsaponifiable matter remains in the extract.
3. The titration correction for extractable free fatty acids and other extractable unsaponifiable impurities (both reported as oleic acid) will tend to increase as the crude nature of the sample increases. For example, highenergy fats (used in animal feeds), feed fats, tall oil, and foats, would be expected to give a higher free fatty acid titration than relatively pure refined, bleached, and deodorized (RBD) oil.

Historically, in the AOCS method, the correction for extractable free fatty acids has been determined by titration of the unsaponifiable residue. There is an indication that the quantity of free fatty acids determined in this manner may be lower than the actual quantity present, due to the fact that some of the free fatty acids may have been converted to soaps and therefore would not be titrated. This can be verified by determining the total free fatty acids in the unsaponifiable residue by GLC such as AOCS Recommended Practice Cd 5d-01. If soaps are present, they may be eliminated by repeated washing of the combined extracts (Procedure, 6) with water until neutral washings are obtained.