



## **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

### **REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

### **INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Caracterización del agua residual obtenido del tratamiento enzimático de la semilla de cacaté (*Oecopetalum mexicanum*) y de piñón (*Jatropha curcas*)

**PRESENTA:**  
**GUILLÉN PINTO YAJAIRA WENDALY**

**ASESOR INTERNO:**  
**DRA. SANDY LUZ OVANDO CHACÓN**

**REVISORES:**  
**DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO**  
**M.C. JOSÉ HUMBERTO CASTAÑÓN GONZÁLEZ**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS A 06 DE JULIO DEL 2012**



# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	v
<b>CAPITULO I.- INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPITULO II.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	2
<b>CAPITULO III.- OBJETIVO</b> .....	3
<b>CAPITULO IV.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLA EL PROYECTO</b> .....	4
<b>CAPITULO V.- PROBLEMAS A RESOLVER</b> .....	7
<b>CAPITULO VI.- ALCANCES Y LIMITACIONES</b> .....	8
<b>CAPITULO VII.- FUNDAMENTO TEÓRICO</b> .....	9
VII.1.- Agua residual .....	9
VII.1.1.- Parámetros de calidad del agua residual.....	10
VII.1.1.1.- Temperatura .....	10
VII.1.1.2.- pH .....	10
VII.1.1.3.- Azúcares reductores .....	10
VII.1.1.4.- Fenoles .....	11
VII.1.1.5.- Antocianinas .....	12
VII.1.1.5.1.- Efecto del pH sobre el color de las antocianinas .....	13
VII.2.1.- Descripción botánica de las semillas estudiadas .....	14
VII.2.1.1- <i>Jatropha curcas</i> L. ....	14
VII.2.1.2.- <i>Oecopetalum mexicanum</i> .....	16
<b>CAPITULO VIII.- METODOLOGÍA</b> .....	17
VIII.1.- Materia prima .....	17
VIII.2.- Determinaciones fisicoquímicas .....	17
VIII.2.1.- Determinación de pH (AOAC,1990, 981.12) .....	17
VIII.2.2.- Determinación de acidez titulable (AOAC, 1990, 973.42).....	17
VIII.2.3.- Determinación de °Brix (AOAC, 1990, 969.38B) .....	18
VIII.2.4.-Determinación de sólidos solubles totales (NMX-F-103-1982).....	18
VIII.3.- Determinación de azúcares totales método fenol sulfúrico.....	18
VIII.4.- Determinación de azúcares reductores método de DNS.....	19
VIII.4.1.- Curva de calibración de glucosa .....	19
VIII.5.-Determinación de fenoles totales.....	20
VIII.6.-Determinación de antocianinas.....	21
<b>CAPITULO IX.- RESULTADO Y DISCUSIONES</b> .....	23
IX.1.- Características fisicoquímicas del residuo acuoso .....	23
IX.1.1.- pH .....	23



IX.1.2.- °Brix y sólidos solubles totales.....	24
IX.1.3.- Acidez titulable.....	25
IX.2.- Azúcares reductores.....	26
IX.3.- Azúcares totales.....	27
IX.4.- Fenoles totales.....	28
IX.5.- Antocianinas.....	29
<b>CAPITULO X.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPITULO XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPITULO XII.- ANEXOS.....</b>	<b>36</b>
XII.1.- Soluciones .....	35
XII.2.- Curvas de calibración .....	36
XII.3.- Antocianinas.....	41



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
FIGURA IV.1.- Mapa de localización del ITTG.....	6
FIGURAVII.1.- Semilla de <i>Jatropha</i> .....	12
FIGURA VII.2.- Estructura del fenol.....	14
FIGURA VII.3.- Estructura básica de los flavonoides.....	14
FIGURA.VII.4.- Reacciones de la transformación estructural malvidia-3-glicosido en el intervalo de pH de 1 a 7.....	16
FIGURA IX.1.- Comparación del pH del residuo de cacaté y piñón.....	24
FIGURA IX.2.- Comparaciones °Brix del residuo de cacaté y piñón.....	25
FIGURA IX.3.- Grafica comparativa del % de ácido cítrico del residuo acuoso de cacaté y piñón.....	26
FIGURA IX.4.- Concentración de azúcares reductores del piñón y cacaté.....	27
FIGURA IX.5.- Concentración de azúcares totales del piñón y cacaté.....	28
FIGURA IX.6.- Concentración de fenoles totales del piñón y cacaté.....	29
FIGURA IX.7.- Concentración de antocianinas del residuo de cacaté y piñón..	31
FIGURA XII.1.- Curva de calibración para azúcares reductores.....	40
FIGURA XII.2.- Curva de calibración para azúcares totales.....	42
FIGURA XII.3.- Curva de calibración para fenoles totales.....	44
FIGURA XII.4.- Antocianinas que presentan algunos frutos.....	45



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
TABLA VIII.1.- Concentración de glucosa a partir de una solución de 1mg/mL para la curva patrón de glucosa.....	20
TABLA VIII.2.- Concentración de ácido gálico a partir de una solución de 1.2 mg/mL para la curva patrón de fenoles.....	21
TABLA VIII.3.- Procedimiento para la determinación de fenoles totales.....	22
TABLA VIII.4.- Medición en espectrofotometría.....	23
TABLA XII.1.- Concentración de glucosa y densidad óptica correspondiente.....	39
TABLA XII.2.- Concentración de sacarosa y densidad óptica correspondiente.....	41
TABLA XII.3.- Concentración de ácido gálico y densidad óptica correspondiente.....	43
TABLA XII.4.- Concentración de antocianinas en el residuo acuoso de cacaté y piñón.....	46



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

México es un país con una gran variedad de especies vegetales y aunque muchas veces las investigaciones se han enfocado en la caracterización de especies comestibles, haciendo a un lado plantas que aunque pueden ser tóxicas para el consumo humano nos ofrecen otros beneficios, por lo que es importante investigar otras especies vegetales que aunque no tienen un beneficio primario, pueden ser buenos recursos renovables.

El agua es el recurso natural más empleado en el ámbito de la industria, durante este proceso el agua se contamina o carga con factores contaminantes de tipo orgánico e inorgánico. En consecuencia las características naturales del agua cambian los valores físicoquímicos y su composición biológica se altera. Cuando el agua es contaminada de esta manera toma el nombre de agua residual y genera procesos de contaminación cuando es descargada en los ecosistemas.

La calidad del agua es un término usado para describir las características químicas, físicas y biológicas del agua, por lo general en lo que respecta a su idoneidad para un propósito en particular. Cuando una persona media pregunta sobre la calidad del agua, es probable que quiera saber si el agua es lo suficientemente bueno para usar o si la calidad del agua es adecuada para los ecosistemas acuáticos, plantas y animales.

Hoy en día la exhaustiva búsqueda de información para aprovechar nuevos recursos naturales para la producción de aceite, ya sea para el uso comestible o bien para producción de biocombustible nos ha llevado a conocer nuevas fuentes de semillas como es el caso del piñón y el cacaté. Por lo que el presente proyecto es un preámbulo de proyectos anteriores enfocados al estudio de extracción del cual fue un elemento de partida para la obtención de las muestras residuales acuosas de cacaté (*Oecopetalum mexicanum*).

Después de realizar la hidrólisis enzimática e inactivación de enzima, así mismo la centrifugación de los tratamientos para luego obtener el residuo, los diferentes tratamientos se mantuvo en refrigeración hasta realizar las determinaciones físico-químicas (pH, acidez titulable, °Brix, sólidos solubles, sólidos sedimentables, azúcares reductores, azúcares totales, fenoles totales y antocianinas).



## **CAPÍTULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

Las semillas oleaginosas son una fuente muy importante de aceites, lo cual implica que muchas industrias se ven en la necesidad de investigar sus características físicas y químicas, enfocándose únicamente en la producción primaria del aceite y haciendo a un lado el residuo que podría ser una fuente abundante y segura de otros insumos de interés.

Actualmente en México los residuos acuosos están siendo subutilizados en la mayoría de los casos, causando serios problemas de contaminación ambiental, de manera que antes de convertirse en un obstáculo, deberá convertirse en un instrumento más, para ser utilizados como materia prima en otras industrias.

Los residuos obtenidos de la hidrólisis enzimática aplicada a las semillas de cacaté y piñón para la obtención de aceite, genera principalmente residuos líquidos, siendo estos de gran impacto ambiental ya que los residuos líquidos sin tratamiento, puede provocar una importante contaminación de las aguas receptoras. Dado que el material orgánico constituye el principal componente contaminante, los problemas de contaminación de aguas se relacionarán principalmente con la descomposición de dicho material orgánico, lo que puede traducirse en una disminución del oxígeno, muerte de peces, producción y emisión de biogás y formación de una capa de material flotante.

De esta manera es necesario tener más información acerca de los residuos acuosos, investigar la composición fisicoquímica y determinar si es agua capaz de reutilizarse o simplemente es muy contaminante y es necesario aplicar un tratamiento para no contaminar el medio ambiente.

En otro aspecto es importante no considerar el agua residual como un problema si no que debido a la composición presente en los frutos de cacaté y piñón se podría intuir la composición del residuo acuoso, lo que permitiría poder sugerir un uso para su aprovechamiento, pudiendo considerarlo como fuente de azúcares fermentables y fuente de antioxidantes, los cuales son de importancia industrial. Ello resulta de interés, sobre todo si se piensa en la posibilidad de destinarlo en la industria alimenticia o sustancias fermentadas.



## **CAPÍTULO III**

### **OBJETIVO**

Determinar la composición fisicoquímica que presenta el agua residual obtenida del tratamiento enzimático de la semilla de cacaté y de piñón.

#### **III.1.- OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Determinar parámetros fisicoquímicos específicos del agua residual, como son; pH, acidez titulable (en % de ácido cítrico), °Brix, sólidos solubles y sólidos sedimentables.



## CAPÍTULO IV

### CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

Las determinaciones se realizaron en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

#### **Historia del tecnológico.**

En la década de los 70's, se incorpora el estado de Chiapas al movimiento educativo nacional extensión educativa, por intervención del Gobierno del Estado de Chiapas ante la federación. Esta gestión dio origen a la creación del Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG) hoy Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG).

El 23 de Agosto de 1971 el Gobernador del Estado, Dr. Manuel Velasco Suárez, colocó la primera piedra de lo que muy pronto sería el Centro Educativo de nivel medio superior más importante de la entidad.

El 22 de Octubre de 1972, con una infraestructura de 2 edificios con 8 aulas, 2 laboratorios y un edificio para talleres abre sus puertas el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez con las carreras de Técnico en Máquinas de Combustión Interna, Electricidad, Laboratorista Químico y Máquinas y Herramientas.

En 1974 dio inicio la modalidad en el nivel superior, ofreciendo la carrera de Ingeniería Industrial en Producción y Bioquímica en Productos Naturales. En 1980 se amplió la oferta educativa al incorporarse las carreras de Ingeniería Industrial Eléctrica e Ingeniería Industrial Química.

En 1987 se abre la carrera de Ingeniería en Electrónica y se liquidan en 1989 las carreras del sistema abierto del nivel medio superior y en el nivel superior se reorientó la oferta en la carrera de Ingeniería Industrial Eléctrica y se inicia también Ingeniería Mecánica. En 1991 surge la licenciatura en Ingeniería en Sistemas Computacionales.



Desde 1997 el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ofrece la Especialización en Ingeniería Ambiental como primer programa de postgrado.

En 1998 se estableció el programa interinstitucional de postgrado con la Universidad Autónoma de Chiapas para impartir en el Instituto Tecnológico la Maestría en Biotecnología.

**Misión:**

Formar de manera integral profesionales competentes, en el campo de la ciencia y la tecnología, con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores. Institucionales.

**Visión:**

Ser una Institución de excelencia en la educación superior tecnológica, comprometida con el desarrollo socioeconómico, sostenido y sustentable de la región.

**Valores:**

- El ser humano
- El espíritu de servicio
- El liderazgo
- El trabajo en equipo
- La calidad
- El alto desempeño

**Objetivo general de la carrera**

Formar profesionales, con sentido crítico, que aplique los principios y métodos de la Ingeniería Bioquímica para el aprovechamiento racional e integral de los recursos bióticos, en la producción de bienes y servicios que contribuyen a elevar el nivel de vida de la sociedad.

### Localización:

Todas las determinaciones fueron realizadas en el laboratorio de biotecnología e investigación que se encuentran dentro del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ubicado en la carretera Panamericana Km. 1080 (figura IV.1).

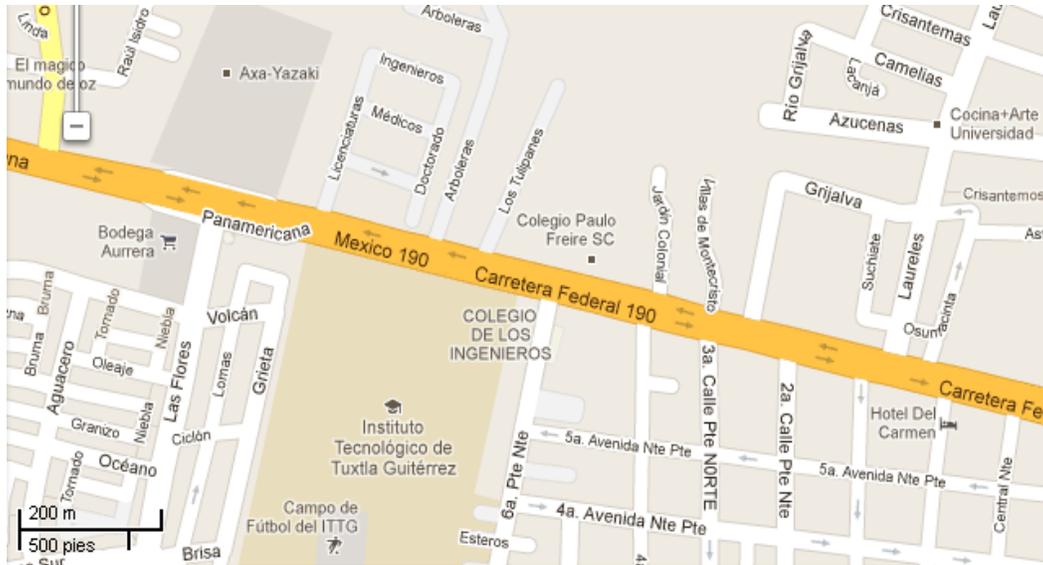


Figura IV.1.- Mapa de localización del Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas



## **CAPÍTULO V**

### **PROBLEMAS A RESOLVER**

Generar información fisicoquímica sobre el agua residual de la semilla de cacaté y piñón a partir de una hidrólisis enzimática.



## **CAPÍTULO VI**

### **ALCANCES Y LIMITACIONES**

#### **VI.1.- Alcances.**

Se analizaron algunas variables para verificar la calidad de agua que se desecha en una hidrólisis enzimática para la obtención de aceite.

Logrando obtener:

Resultados que dentro de otras fuentes bibliográficas el agua residual acuosa del cacaté y piñón son fuentes importantes de azúcares totales, y que la concentración de antocianinas presentes en este residuo no es de gran significancia.

#### **VI.2.- Limitaciones.**

El presente proyecto presenta únicamente la caracterización del agua residual de una previa hidrólisis enzimática para la extracción de aceite del cacaté y piñón, señalando que el proyecto puede ser extendido en relación a la reutilización del agua residual en una nueva tecnología, utilizando los resultados obtenidos en este trabajo, así también puede extenderse más la investigación del agua residual que se obtuvo de la hidrólisis enzimática del cacaté y piñón, para lograr tener mayor amplitud en este tema como por ejemplo determinar los parámetros normalizados para aguas residuales y así hacer una comparación con los límites permisibles que presentan estos.



## CAPÍTULO VII

### FUNDAMENTO TEÓRICO

#### VII.1.- Agua residual

El agua es fundamental para todas las formas de vida, lo que la convierte en uno de los recursos esenciales de la naturaleza, es origen y base de la vida, se ha consolidado como medio indispensable para cualquier alternativa de futuro. No existe actividad humana: económica, industrial, social que pueda prescindir de este vital recurso.

La contaminación del agua es uno de los peores problemas ambientales que la naturaleza sufre hoy en día. Día a día el hombre contamina el agua sin darse cuenta que este es un recurso indispensable del planeta.

La principal fuente de contaminación de ríos, bahías, lagunas y acuíferos es el vertido incontrolado de residuales, los cuales proceden en su mayoría del sector industrial. La industria alimentaria es un sector socioeconómico con alta incidencia en la contaminación de las aguas a nivel nacional; siendo las industrias láctea, cárnica y productora de aceites vegetales, las de mayor influencia debido al excesivo volumen de aguas residuales que generan. Por otra parte, el contenido oleoso de las aguas residuales de la industria alimentaria acentúan el deterioro de los ecosistemas donde impactan (Orozco C. *et al.*, 2004).

El problema del uso del agua en la industria tiene tres vertientes: 1) Los altos consumos; 2) Las descargas contaminantes al drenaje o a través de canales permeables al suelo; y 3) Las descargas directas a cuerpos de agua. De ahí se derivan efectos variados que tienen que ver principalmente con su origen pero también con su manejo posterior. La industria tienen en general un gran impacto en el agua. En promedio, la agricultura usa un 65%, la industria y servicios un 25% y uso domestico un 10% del agua del mundo (Santiago, 1998).

Los residuos industriales se originan porque los procesos de fabricación no poseen un rendimiento de producción del 100 % con respecto a las materias primas y energía que utilizan. Por ello, junto a productos con valor comercial, se generan paralelamente residuos que a simple vista no tienen un valor económico (Alcántara, 2007).

Los residuos industriales líquidos, son los mayoritarios en las industrias



alimentarias, y se caracterizan por tener una alta carga de contaminantes tales como, sustancias disueltas o suspendidas, y dependiendo de la industria pueden contener altos índices de grasas, metales pesados, restos de fertilizantes, nitrógeno amoniacal, sulfuros, fosfatos, etc.

El impacto ambiental que estos contaminantes causan en los cursos receptores de aguas se evalúa mediante una serie de parámetros de calidad de las aguas residuales. Es importante conocer las características de estos parámetros para saber en que medida van a producir daño en el receptor, sobretodo si es de origen natural, ya sea un río, laguna o mar.

### **VII.1.1.- Parámetros de calidad de las aguas residuales.**

#### **VII.1.1.1.- Temperatura.**

Predice intercambios térmicos entre el residuo industrial líquido y el receptor. La temperatura puede afectar negativamente a la vida acuática, la que se desarrolla en un rango estrecho de variación térmica. La recomendación es que la temperatura del curso receptor después de mezclarse con el residuo industrial líquido, no varíe más de 3°C. La temperatura influye en otros parámetros tales como la conductividad, solubilidad de gases, (en especial de oxígeno), pH y densidad.

#### **VII.1.1.2.- pH.**

Es una medida indirecta de las sustancias químicas que están presentes, si éstos son de carácter ácidos o básicos. La vida acuática se desarrolla entre rangos de pH: 5,5 a 9,0. Los organismos acuáticos son extremadamente sensibles a valores de pH fuera de este rango. En consecuencia, el control de pH es esencial para la adecuada preservación de la flora y fauna acuática.

#### **VII.1.1.3.- Azúcares reductores.**

El monitoreo y determinación de la glucosa a lo largo de una corriente superficial afectada por descargas de residuo industriales y domésticos permite el cálculo de los pesos relativos en términos de contaminación orgánica biodegradable que producen ambos tipos de vertimientos (Gutiérrez, 1997).

#### **VII.1.1.4.- Fenoles.**



Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Sus principales fuentes se encuentran en las frutas y verduras, cereales y las legumbres. La naturaleza y las propiedades de los fenoles varían mucho entre un alimento y otro. Encontramos estas sustancias especialmente en los frutos, legumbres, cereales y granos (Festy, 2007). Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Kähkönen *et al*, 2001; Robbins, 2003).

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Figura VII.5).

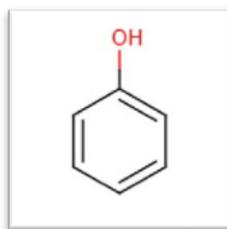


Figura VII.5.- Fenol

Los antocianinas representan un factor importante en la industria alimenticia debió a las restricciones sanitarias hacia el uso de colorante sintéticos. En el mercado existen algunas patentes que permiten extraer y estabilizar las estructuras naturales de antocianinas para ser usadas en la fabricación de colorantes alimentarios y por ello se patrocinan varios estudios dedicados a la búsqueda de nuevas fuentes vegetales ricas en antocianinas (Marcano y Hasegawa, 2002).



Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos dos subunidades fenólicas; los compuestos que tienen tres o más subunidades fenólicas se denominan taninos (Figura VII.6) (Robbins, 2003).

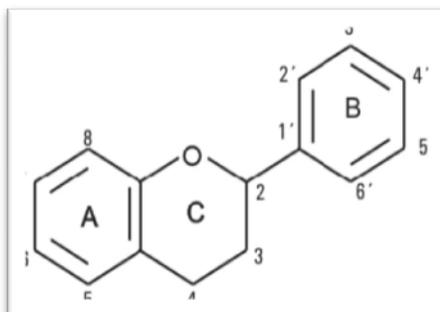


Figura VII.6.- Estructura básica de los flavonoides; consta de un anillo aromático (A), unido a un anillo heterocíclico(C) que contiene oxígeno, el cual está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático (B)

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres (Vinson *et al*, 1995).

#### VII.1.1.5.- Antocianinas.

Las antocianinas representan un factor importante en la industria alimentaria debido a las restricciones sanitarias hacia el uso de colorante sintéticos. En el mercado existen algunas patentes que permiten extraer y estabilizar las estructuras naturales de antocianinas para ser usadas en la fabricación de colorantes alimentarios y por ello se patrocinan varios estudios dedicados a la búsqueda de nuevas fuentes vegetales ricas en antocianinas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Fennema, 1993). Químicamente



las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas (Wong, 1995), es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio (Badui, 1999), también llamado 2-fenil-benzopirilio (Wong, 1995) que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión (Badui, 1999).

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación de los rojos (Badui, 1999).

Los tratamientos térmicos influyen significativamente en la destrucción de las antocianinas; es así como se ha visto que en las fresas se presenta una relación logarítmica entre la pérdida de color y la temperatura (Badui, 1999).

Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables (Badui, 1999).

Dada su alta hidrosolubilidad, estos pigmentos se pueden perder fácilmente por lixiviación en el agua que se utiliza en los diferentes tratamientos; a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de la fruta, ya que se favorece tanto la extracción que incluso se puede llegar a obtener productos prácticamente incoloros.

Las antocianinas también cambian de color cuando forman complejos con otros compuestos fenólicos (proantocianidinas, catequinas, taninos y flavonoides) o con algunos polisacáridos, ya que se favorece un desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayores (Badui, 1999).

#### **VII.1.1.5.1.- Efecto del pH sobre el color de las antocianinas.**

Las antocianinas son muy sensibles a los cambios de pH (Wong, 1995). Debido a una deficiencia del núcleo del flavilio, estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH; es decir, su color depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran: a pH ácido adquiere una estructura estable del catión flavilio rojo, representado por la fórmula  $(AH^+)$ ,



(Figura VII.3) cuando se incrementa el pH, la distribución electrónica se modifica hasta llegar a la forma quinoidea azul (A) o base anhidra; tanto la sal del flavilio como la base anhidra pueden convertirse a la base de carbinol (B) incolora, que predomina en el intervalo de pH de 4 a 5 (Badui, 1999), que después se tautomeriza a una calcona (C) (Figura VII.8) (Wong, 1995).

El procedimiento cuantitativo para determinar el contenido de antocianinas que se describirá se basa en el principio que a pH 1.0 las antocianinas existen en la forma oxonio, muy coloreadas, mientras que con un pH 4.5 son predominantes en la forma carbinol, completamente incoloras (Wrolstad, 1976).

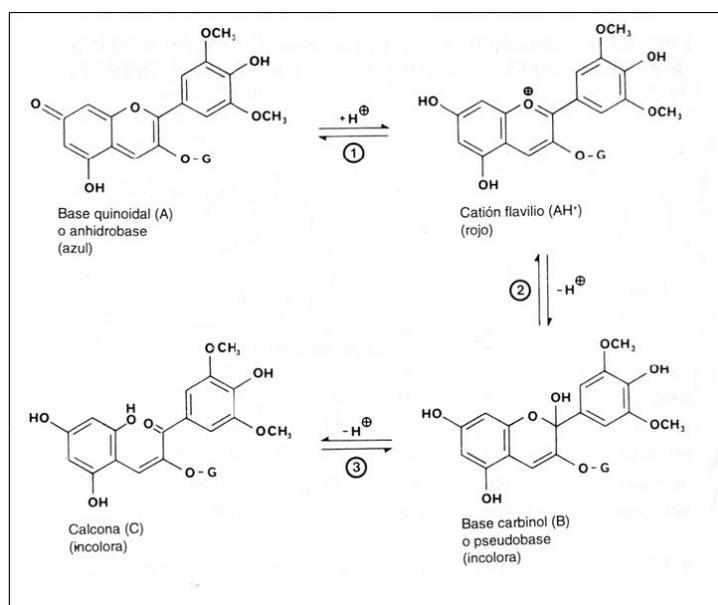


Figura VII.8.- Reacciones de la transformación estructural de malvidina-3-glicósido en el intervalo de pH de 1 a 7.

## VII.2.- Descripción botánica de las semillas estudiadas.

### VII.2.1.- *Jatropha curcas* L.

La *Jatropha curcas*, por definición, es un árbol pequeño o arbusto grande que puede alcanzar una altura de hasta 5 m. La planta muestra un crecimiento articulado. Tiene una corteza lisa, ramas robustas y gruesas hojas apergaminaadas. Las ramas contienen látex. La planta es monoica y las flores



son unisexuales; en ocasiones se producen flores hermafroditas (Pabón, 2009). El fruto es de forma elipsoidal trilocular. El exocarpo carnoso permanece hasta que las semillas están maduras. Las semillas son de color negro, de 2 cm de largo y 1 cm de espesor (figura VII.1) (Héller 1996).



Figura VII.1.- Semilla de *Jatropha*

La clasificación taxonómica según Cronquist, (1981) es; **Reino:** Plantae; **División:** Magnoliophyta; **Clase:** Magnoliopsida; **Orden:** Euphorbiales; **Familia:** Euphorbiaceae; **Género:** *Jatropha* L.; **Especie:** *Jatropha curcas* L.

Nombres Comunes: Español: Jatrofa, piñón. En otros países se le conoce como: Nuez purgante, piñón, piñoncillo (México), Tempate (Costa Rica y Nicaragua), Habel meluk (Portugal), Piñón manzo (Brasil), Piñón de leche o piñón de botija (Cuba), Piñón (Argentina) (Pabón, 2009).

La *Jatropha* o piñón (*Jatropha curcas* L.) es una planta oleaginosa que ha adquirido importancia en México por su alta producción y calidad de aceite para biocombustibles, despertando el interés en la investigación de su fisiología y desempeño productivo, la semilla de piñón aporta alrededor de un 50 a 52% de aceite cuando se usan solventes y entre el 28 y 35% con extracción mecánica y se puede obtener 12 Kg de semilla por planta (Pedraza *et al.*, 2010).

La *Jatropha* es conocida por los agricultores como una planta medicinal han empleado para el establecimiento de cercas vivas. Algunos agricultores encuentran que las cercas de *Jatropha* son mejores para la protección de



cultivos contra animales salvajes que aquellas hechas con otras plantas (Flemming y Jan, 2009).

El piñón representa una alternativa de reconversión para el productor mexicano por la demanda creciente, nacional y mundial, y las ventajas ecológicas del biodiesel para reducir las emisiones gaseosas que contaminan el ambiente (Zamarripa y Díaz, 2008).

La *Jatropha curcas* es una especie resistente a la sequía. Muchas partes de las plantas se utilizan en la medicina tradicional. Las semillas, sin embargo, son tóxicas para los humanos y muchos animales.

#### VII.2.2.- *Oecopetalum mexicanum*

Es un árbol o arbusto de 2-25 m de altura, generalmente de 8 a 15 hojas alternas, medianas o grandes, con forma elíptica u ovalada. La flor es blanca, de 8 mm de largo; son abundantes y vistosas. La floración se presenta en Julio-Septiembre. La fruta que es la parte comestible de esta planta es una drupa de color verde durante su crecimiento u café en la maduración. Los frutos en su interior tienen una semilla blanca de 7-9 mm de largo y de 6-7 mm de ancho; la cual se encuentra cubierta por una cáscara dura de color negro (Gutiérrez, 1994).

Dependiendo de donde se cultive, se conoce con diferentes nombres tales como cacaté (Chiapas y Tabasco), cacaté de septiembre (Simojovel, Chiapas) o cachichín (Misantla, Veracruz) (Martínez, 1987). Se ha determinado que el cacaté aparte de su contenido de aceite contiene altas cantidades de potasio, calcio y magnesio (Gutiérrez, 1994).

La semilla de esta especie es comestible no obstante su sabor es amargo. Su distribución se da en México particularmente en los estados de Veracruz, y Chiapas, también se ha reportado en Guatemala (Gutiérrez, 1994).

La semilla de esta especie es comestible, los pobladores de la región centro de Chiapas (Zoques, Tzotziles y Mestizos) lo consumen crudos o cocidos en forma de guisos, asados o hervidos (Chávez *et al.*, 2009). Según Cruz, (2004), ésta semilla tiene un alto contenido en grasa del 33%.



## CAPÍTULO VIII

### METODOLOGÍA

#### PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

##### VIII.1.- Materia prima.

El residuo acuoso de cacaté empleado en este proyecto, correspondió al sub-producto obtenido después de realizar un tratamiento enzimático en donde se utilizó un preparado enzimático denominado *Cryztalzyme Cran*, las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática se obtuvo de un estudio previo descrito por Borraz, (2012). A partir de esta investigación se tomó las condiciones empleadas al tratamiento que obtuvo mayor producción de aceite de cacaté en la extracción enzimática, las condiciones fueron; relación sólido-líquido 1:5 (v/v), temperatura de 50°C a 80 rpm y el tiempo de incubación de 4 horas. Para la obtención del residuo acuoso del piñón (*Jatropha curcas*), se utilizaron las mismas condiciones del tratamiento enzimático empleado en el cacaté descrito por Borraz, (2012).

##### VIII.2.- Determinaciones fisicoquímicas.

###### VIII.2.1.- DETERMINACIÓN DE pH (AOAC, 1990, 981.12)

Para la medición de pH se usó un potenciómetro digital (OAKTON pH 510), previa calibración del potenciómetro, se enjuagó el electrodo con agua destilada y se secó cuidadosamente, el potenciómetro se calibró con buffer pH 7 y buffer pH 4, posteriormente el electrodo se introdujo en la muestra de 10 mL y se tomó el pH.

###### VIII.2.2.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDEZ TITULABLE (AOAC, 1990, 973.42)

Para esta determinación el residuo acuoso obtenido de la hidrólisis enzimática el cacaté y piñón con sus respectivas replicas se les realizó una dilución en un matraz Erlenmeyer (muestra de fase acuosa residual y agua destilada de 1:1), a un volumen final de 10 mL luego se adicionó 4 gotas de fenolftaleína. La determinación se realizó por titulación con una solución valorada de NaOH 0.1N (ver anexo XII.1) hasta mantener el vire al color rosa por 1 min.



### VIII.2.3.- DETERMINACIÓN °BRIX (AOAC, 1990, 969.38B)

Esta determinación se realizó utilizando un refractómetro manual (ATAGO), previo a la lectura se comprobó que el refractómetro se calibró, colocando una gota de agua destilada a 20 °C y tomando lectura directa desde su lente. Después de comprobar su calibración se prosiguió a colocar 1 gota de muestra tomada directamente de las muestras acuosa residual, sin realizar ninguna dilución, en el cristal del refractómetro, se cerró el aparato y se puso contra luz para observar la escala directamente del lente óptico. Esta determinación se realizó por triplicado en cada una de las muestras.

### VIII.2.4.- DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (NMX-F-103-1982)

Esta determinación está basada en los °Brix presentes en el residuo acuoso. Por lo que la determinación se basó en el apartado anterior de determinación de °Brix y se tomaron nuevamente las mismas condiciones del apartado VIII.2.3.

### VIII.3.- DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES POR EL MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO (DUBOIS *et al.*, 1972)

Para esta determinación se realizó previamente una curva patrón con sacarosa a una concentración de 0.1 mg/mL; para la cual se pesó 0.0025 g de sacarosa y se colocó en un matraz aforado de 25 mL y aforó con agua destilada.

Se colocó 1 mL de la muestra acuosa residual diluida a  $10^{-3}$  con agua destilada en un tubo de ensaye de 16 X160 mm para posteriormente agregar 0.5 mL de fenol al 5% (ver anexo XII.1) e inmediatamente se agregó 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado; se agitó en un vortex y se dejó reposar por 10 min, luego se colocó a un baño maría a 30°C durante 15 min, para la posterior lectura en el espectrofotómetro una longitud de onda de 490 nm.

Para tener una muestra acuosa residual diluida a  $10^{-3}$  se colocó 1 mL de muestra acuosa pura y 9 mL de agua destilada para una dilución de  $10^{-1}$ , de esta se tomó 1 mL y se agregó 9 mL de agua destilada para una dilución de  $10^{-2}$ , nuevamente se tomó 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  y se llevó a un volumen final de 10 mL de agua destilada para obtener la dilución final de  $10^{-3}$ . Para posteriormente realizar el mismo procedimiento que en la curva patrón.



#### VIII.4.- DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MÉTODO DE DNS, ÁCIDO-3,5-DINITROSALICÍLICO (MILLER *et al.*, 1958).

Este método se calibró mediante una curva estándar de sacarosa a una concentración de 0.1 mg/mL por medio de espectrofotometría UV-Vis por el método de fenol-sulfúrico. El cual se sometió a un análisis estadístico de regresión lineal (anexo XII.2).

##### VIII.4.1.- Curva de calibrado de glucosa

A partir de una solución patrón de glucosa 1 mg/mL y por dilución con agua destilada, se preparó una gama de soluciones de glucosa en distinta concentración, tal y como se indica en la Tabla VIII.1.

TABLA VIII.1.- Concentraciones de glucosa a partir de una solución de (1 mg/ml) para la curva patrón de glucosa.

Tubo	mL de glucosa (1 mg/mL)	agua destilada (mL)	Concentración de Glucosa (mg/mL)
0 (Blanco)	0	1	-
1	0.1	0.9	0.01
2	0.2	0.8	0.02
3	0.3	0.7	0.03
4	0.4	0.6	0.04
5	0.5	0.5	0.05
6	0.6	0.4	0.06
7	0.7	0.3	0.07
8	0.8	0.2	0.08
9	0.9	0.1	0.09
10	1	0	0.1

A cada tubo se añadió 1 mL del reactivo DNS, incubándose posteriormente la mezcla en un baño maría a 100 °C durante 5 minutos; se agregó 8 mL de agua destilada y después se tomó lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 570 nm, se utilizó como blanco la mezcla del tubo 0. Las muestras se trabajaron por triplicado.

Para las muestras acuosas residuales se realizó una dilución en relación 1:10; por lo que se tomó 0.1mL de muestra acuosa y 0.9 mL de agua destilada para



tener un volumen final de 1 mL, posteriormente se realizó el mismo procedimiento que en la curva patrón.

### VIII.5.- DETERMINACIÓN DE FENOLES

Se realizó una previa curva patrón con ácido gálico a una concentración de 1200  $\mu\text{g/mL}$  (anexo XII.2); para la cual se pesó 0.06 g de ácido gálico y se aforó a 50 mL con agua destilada. Posteriormente se preparó una serie de soluciones del ácido en distinta concentración, tal y como se indica en la Tabla VIII.2.

TABLA VIII.2.- Concentraciones diferentes a partir de una solución patrón de ácido gálico 1200  $\mu\text{g/mL}$

TUBOS	(mL) de solución madre de Ácido Gálico 1200 $\mu\text{g/MI}$	(mL) de agua destilada	Concentración de Ácido Gálico en $\mu\text{g/mL}$
0 (Blanco)	0	5	0
1	0.5	4.5	120
2	1	4	240
3	1.5	3.5	360
4	2	3	480
5	2.5	2.5	600
6	3	2	720
7	3.5	1.5	840

A cada tubo se añadió 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N (anexo XII.1), posteriormente se colocó 1 mL de carbonato de sodio al 20 % (anexo XII.1), se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada y se dejó reposar por 30 min para estabilizar la reacción, pasado ese tiempo se determinó la absorbencia a 765 nm, utilizando como blanco la mezcla del tubo 0. Las muestras se trabajaron por triplicado, en el transcurso de esta determinación se realizó con luces apagadas y con un trapo oscuro que cubrió los tubos con las muestras y reactivos todo el tiempo.

Para las muestras acuosas residuales no fue necesario realizar diluciones. Se siguió el mismo procedimiento que en la curva patrón, tomando 0.1 mL de muestra y siguiendo la tabla VIII.3.



TABLA VIII.3.- PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Tubo	mL de muestra residual acuoso	Folin-ciocalteu 1N (mL)	(mL) Carbonato de calcio 20% (p/v)	H <sub>2</sub> O destilada	Agitación en vortex (min)	Esperar 30min	Leer a 765nm
0 (BLANCO)	0.1	0.5	1	3.4	1	"	"
C1 <sup>1</sup>	0.1	0.5	1	3.4	1	"	"
P1 <sup>2</sup>	0.1	0.5	1	3.4	1	"	"

<sup>1</sup> Tubo con muestra de cacaté, se trabajo por triplicado

<sup>2</sup> Tubo con muestra acuosa de piñón, trabajado por triplicado

### VIII.6.- DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS (Wrolstrad R. 1993)

Se preparó dos soluciones buffer, uno a pH 4.5 de acetato de sodio 1M y una solución buffer a un pH de 1.0 de cloruro de potasio a 0.02N. Se diluyó las muestras residuales del cacaté y piñón con las soluciones buffer con un factor de dilución 1:5 debe ser el mismo para ambas muestras (pH 1,0 y pH 4,5). Por lo que se tomó 1mL de muestra residual y 5 mL de solución buffer. En el caso de la muestra residual de piñón se filtró con papel filtro whatman para evitar la turbidez.

Una vez diluidas las muestras se procedió a mide su absorbancia de la solución con muestra a pH 4.5 y pH 1.0 a la longitud de onda de 510 nm y 700 nm respectivamente como se muestra en la Tabla VIII.4.



TABLA VIII.4.- Medición en espectrofotómetro

MUESTRA	$\lambda$ 510 $\eta\text{m}$	$\lambda$ 700 $\eta\text{m}$
cacaté	muestra diluida a pH 1.0	muestra diluida a pH 4.5
piñón	muestra diluida a pH 1.0	muestra diluida a pH 4.5

Se procedió a realizar los cálculos basados en la Ley de Lambert-Beer



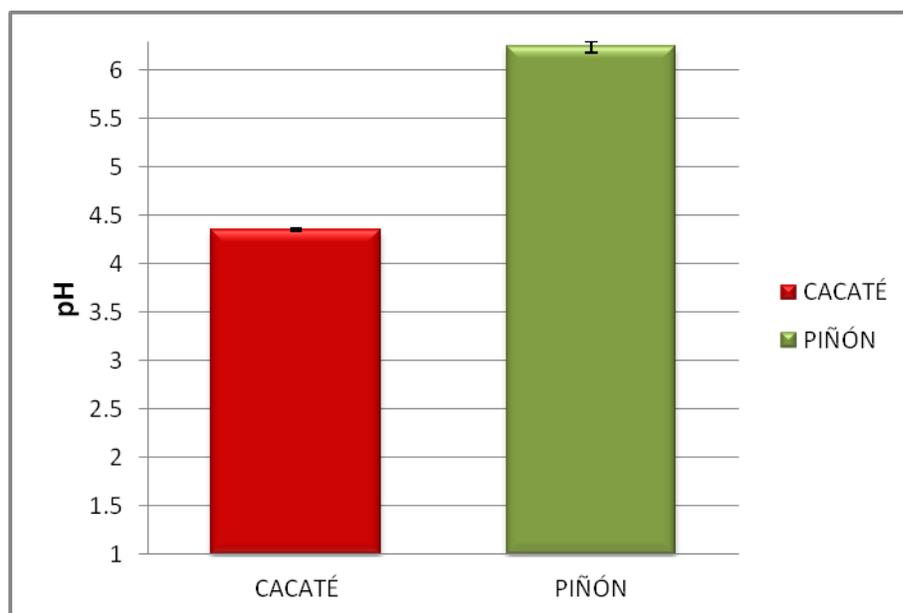
## CAPÍTULO IX

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### IX.1.- CARACTERÍSTICA FÍSICOQUÍMICA DEL RESIDUO ACUOSO DEL CACATÉ Y PIÑÓN

##### IX.1.1.- pH

En la Figura IX.1 podemos observar el pH presente en el agua residual del cacaté y piñón del cual se obtuvo un pH ácido de  $4.3527 \pm 0.0899$  para el cacaté y para el piñón fue ligeramente ácido con un pH de  $6.2458 \pm 0.2738$ .



Figura

IX.1.- Comparación de pH del cacaté y piñón.

Según Pérez *et al.*, (2009) el agua residual del proceso de extracción del almidón de yuca contiene valores de pH de 4.20 – 4.45, el pH presente del agua residuales de la obtención del aceite de oliva o alpechines utilizando olivex, es de 4,7 (Borga *et al.*, 1992). Abalos, (2007) en el trabajo de caracterizaron el aguas residuales de la planta refinadora de aceites ERASOL, en el cual obtuvieron un pH de 9.7.

El pH es un aspecto de gran importancia para determinar la calidad del agua residual. Esto debido fundamentalmente a que el rango en el cual se desarrollan los procesos biológicos corresponden a un intervalo de 6.5- 8.5 (Castrillón *et a.*,



2006). Por lo que un agua residual con un pH inadecuado presenta dificultades de tratamiento durante los procesos biológicos. En el caso del piñón el pH se encuentra en este rango siendo mas susceptible a contaminación microbiana sin embargo en pH del cacaté es bastante acido y según Raybaudi *et al.*, (2006) uno de los principales factores que influye en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos es la acidez del medio. Las bacterias capaces de causar enfermedades no pueden crecer a valores de pH por debajo de 3.9 a 4.0, por lo que ambas aguas residuales pueden ser propensas o muy susceptibles a la contaminación con microorganismos.

### IX.1.2.- °Brix y sólidos solubles totales

En la figura IX.2 se muestran los sólidos solubles que determinan el contenido de azúcares solubles presentes en las muestras ya que el azúcar es a menudo el principal componente de los sólidos solubles. En el residuo acuoso de cacaté se obtuvo  $5.0444 \pm 0.0509$  °Brix y en el piñón se obtuvo  $2.0556 \pm 0.0694$  °Brix.

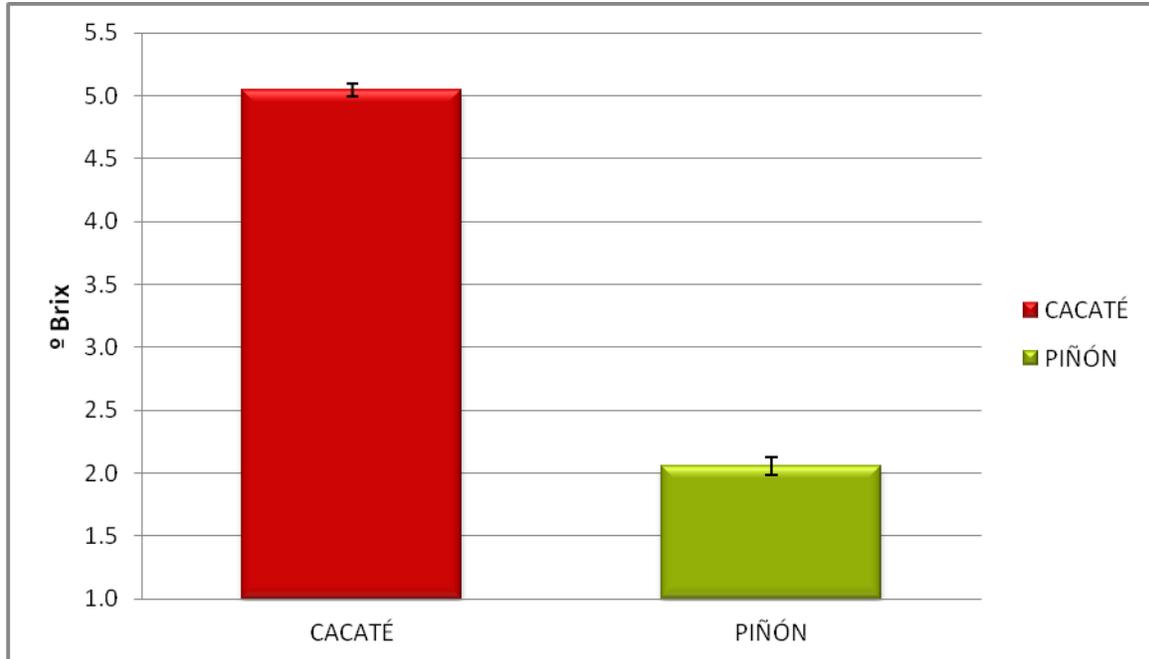


Figura IX.2.- Comparación de °Brix del cacaté y el piñón

La hidrólisis enzimática actúa sobre los polímeros presentes en la pared celular de los endospermos de la semilla, rompiendo estos polímeros en moléculas más pequeñas de azúcares, de esta forma incrementan el contenido de azúcares solubles en la fase acuosa.

Las mediciones de las concentraciones de azúcares solubles no es un predictor del rendimiento de aceite liberado por la acción de la enzima debido a que puede existir la formación de una emulsión impidiendo la separación del aceite libre (Ricochon *et al.*, 2011). Esto justifica los resultados obtenidos en esta determinación ya que aunque no correspondía de este proyecto la finalidad de la obtención de aceite, en el caso del tratamiento de *Jatropha* fue notable la extracción de aceite después de la centrifugación, en cambio en el caso del cacaté no se presentó nada de aceite, al comparar los °Brix obtenidos del residuo del cacaté y el piñón (Figura IX.2) es claro observar el contenido de azúcares disueltos es mayor en el cacaté que en el piñón, a pesar de que en el piñón hubo mayor producción de aceite.

### IX.1.3.- Ácido titulable

El porcentaje de ácido cítrico en el agua residual del piñón fue el más bajo con  $0.0493 \pm 0.0145$  % de ácido cítrico y en el cacaté presentó  $0.1273 \pm 0.0333$  % de ácido cítrico (figura IX.3).

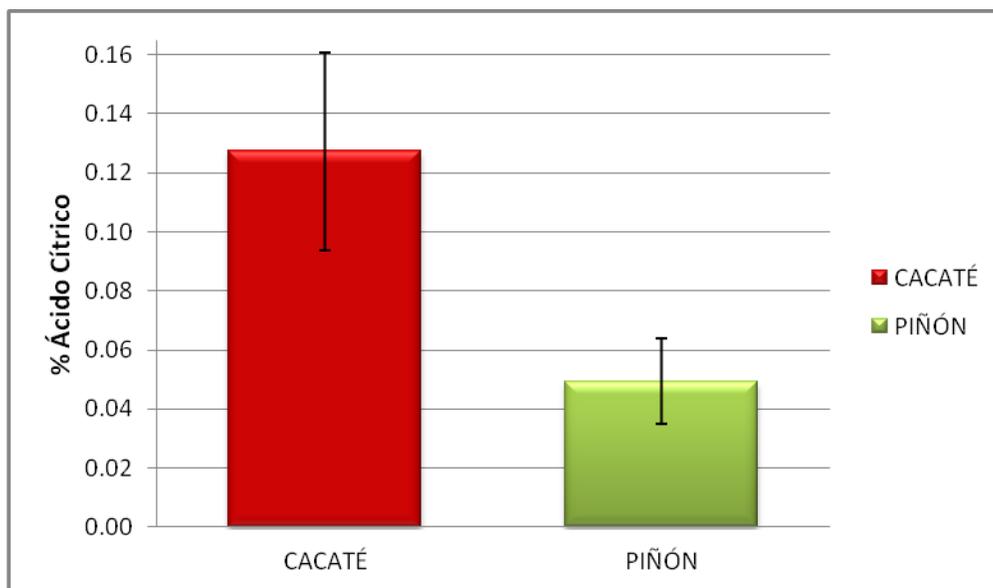


Figura IX. 3.- Grafica comparativa del % de ácido cítrico el residuo acuoso de cacaté y piñón

El grado de acidez indica el contenido en ácidos libres. Estos ácidos son los que proporcionan sabor, olor. Según Gropelli, (2008) menciona que los efluentes industriales de naturaleza ácida, se debe básicamente a la presencia de distintas concentraciones de ácido láctico, ácido cítrico e incluso ácido acético. Todos ellos tienen valores de pKa muy bajos, por lo cual, acidifican significativamente el efluente, pero son biodegradables. La concentración de ácido cítrico reportado por Gropelli es de 10 a 35 ppm, comparado con los resultados obtenidos en el cacaté y piñón es muy bajo y esto dependerá de la materia prima.

## IX.2.- Azúcares Reductores

En la Figura IX.5 se muestra la concentración de azúcares reductores obtenidos, del cual en el cacaté se obtuvo  $1.5820 \pm 0.0899$  mg/mL nuevamente fue más bajo en comparación con el piñón, que se obtuvo  $3.4583 \pm 0.2738$  mg/mL

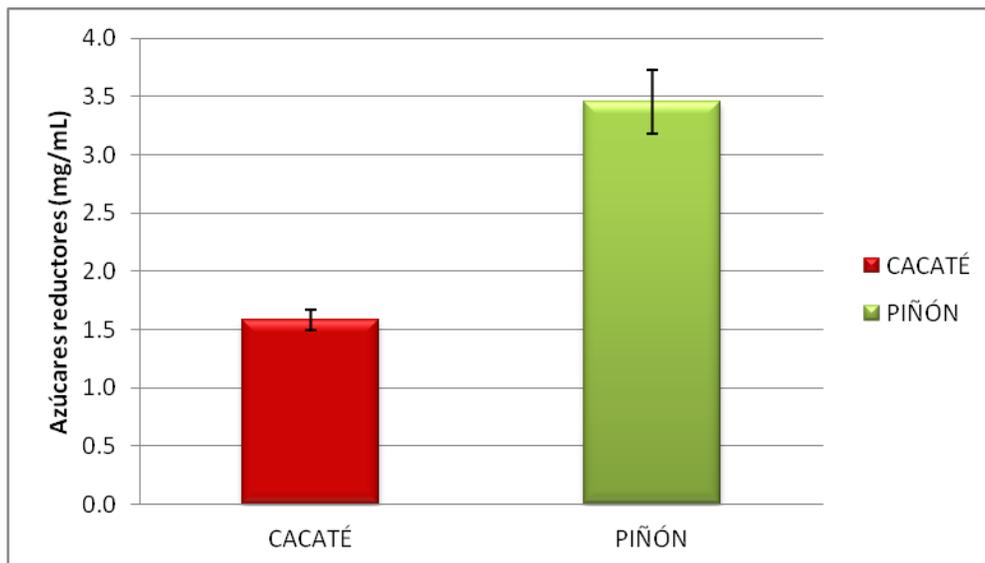


Figura IX.5.- Concentración de azúcares reductores del piñón y cacaté

Podemos comparar estos resultados con las de un estudio realizado por Gutierrez, (1997) en el cual se midió la concentración de glucosa en 8 corrientes superficiales afectadas solamente por residuales domésticos, los valores obtenidos de glucosa nunca fueron mayores de 15 mg/L, pero al aplicar el método a un río afectado por descargas de aguas residuales azucareras la



concentración de glucosa es de 2100 mg/L aumenta muy drásticamente y si comparamos los resultados de cacaté y piñón nos encontramos debajo de estos valores. Los carbohidratos son las primeras sustancias degradadas por las bacterias, con producción de ácidos orgánicos (por esta razón, las aguas residuales estancadas presentan una mayor acidez).

El residuo de la extracción del aceite, es la llamada torta que corresponde aproximadamente al 50% del peso de la semilla. Un estudio sobre el uso de la torta mostró que mediante un proceso de hidrólisis ácida y sacarificación enzimática, el residuo líquido generó 75 g/L de azúcares reductores (Macedo *et al.*, 2011). Basándonos en este resultado observamos que el residuo sólido queda con la mayor concentración de azúcares reductores y en el residuo líquido presenta concentraciones mínimas de azúcares reductores sin embargo si se realizara algún trabajo de fermentación utilizando este residuo acuoso sería más factible tomar en consideración que se obtendría mayor rendimiento del residuo de piñón que el del cacaté aun que es importante tomar en cuenta que los azúcares fermentables presentes en el residuo se encuentran conjuntas con otras sustancias que podrían ser peligrosas para su reutilización.

### IX.3.- Azúcares Totales

En la Figura IX.7 se muestra la gráfica del resultado promedio de la concentración de azúcares totales, el residuo líquido de cacaté obtuvo  $49.0663 \pm 1.6786$  mg/mL en comparación con el piñón, en el que se obtuvo  $51.4788 \pm 0.4069$  mg/mL.

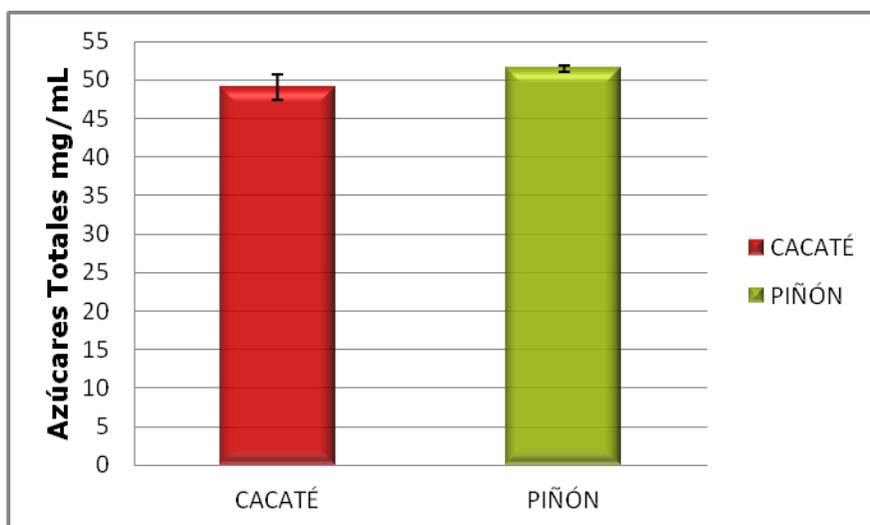


Figura IX.7.- Concentración de azúcares reductores del piñón y cacaté

Scotti, (1968) describe a los azúcares totales como compuestos orgánicos presentes en aguas residuales domésticas, este con un 50% de carbohidratos totales, Tebutt, (1977) con un 25% de carbohidratos totales y Metcalf and Eddy (1979) con un 25-50 % de carbohidratos totales de aguas residuales domesticas. Según estudio realizado por Borja *et al.*, (1992) en donde se determinaron las características del agua residual de la extracción de aceite del alpechín obtenido con el coadyuvante olivex, se determinaron azúcares totales, los cuales presentaron una concentración de 5.1%. Por lo que al comparar estos resultados con los obtenidos en otros autores podemos observar que el residuo acuoso de cacaté y piñón son una fuente importante de azúcares, siendo importante investigar más al respecto.

#### IX.4.- Fenoles Totales

La importancia de los compuestos fenólicos ha sido atribuido principalmente a la capacidad antioxidante, teniendo efectos benéficos y perjudiciales para la salud, tal es el caso del café que entre los más de 1 000 compuestos químicos que han sido descritos en el café, 19 han actuado como carcinógenos (Gutiérrez, 2002).

En la Figura IX.9 se muestra la grafica de la concentración de fenoles totales, del residuo acuoso del cacaté y el piñón, del cual el cacaté fue mas bajo con  $144.6370 \pm 2.5756 \mu\text{g/mL}$  en comparación que el piñón, que se obtuvo  $340.4518 \pm 21.6271 \mu\text{g/mL}$ .

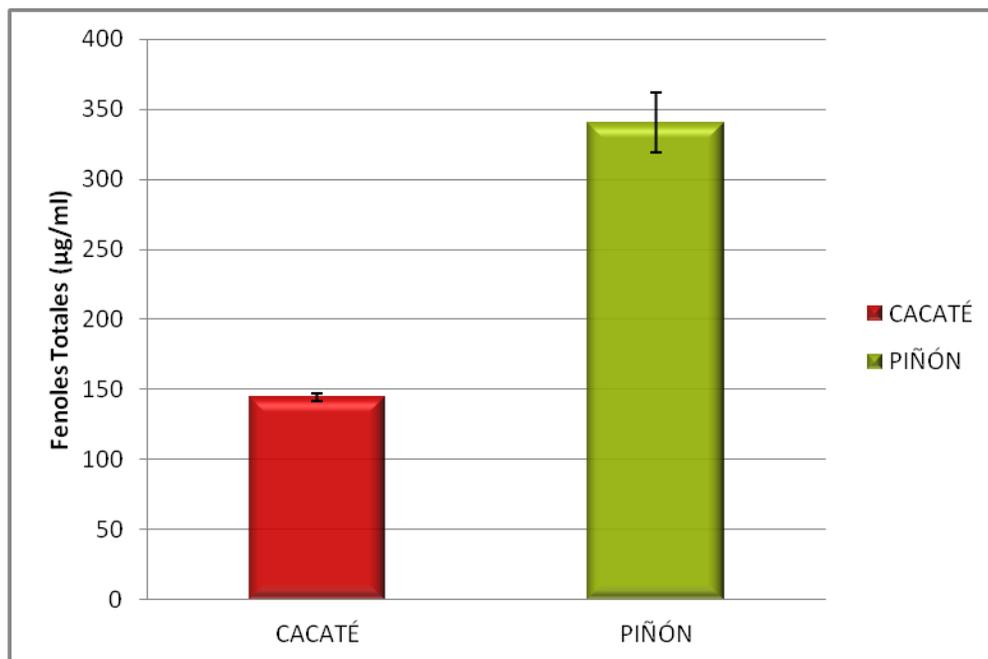


Figura IX.9.- Concentración de fenoles totales del piñón y cacaté

Según estudio realizado por Borja *et al.*, (1992) el cual se basó en la caracterización de agua residual de la extracción de aceite de aceitunas utilizan olivex, agregándose esta solución durante el batido por medio de una bomba dosificadora, una de estas determinaciones fue la presencia de fenoles totales (ac. cafeico) con un concentración de 1,705 mg/mL, Hoyos *et al* 2006 reporta una concentración de 2.84 g/L de fenoles totales del residuo liquido del alpechín, siendo este superior a los valores determinados del agua residual del cacaté y piñón esto debido a la diferencia que existe entre las materias primas.

### IX.5.- Antocianinas

La determinación del contenido de antocianinas descrito por Wrolstad, (1993), está basada en la Ley de Lambert-Beer (anexo XII.3). Basándonos de esto se obtuvo una concentración de antocianinas presente en el residuo acuoso de cacaté de  $3.0081 \pm 0.0035$  mg/L y en el del piñón una concentración de  $2.7825 \pm 0.0015$  mg/L. en la Figura IX.11. se muestra la diferencia de concentraciones.

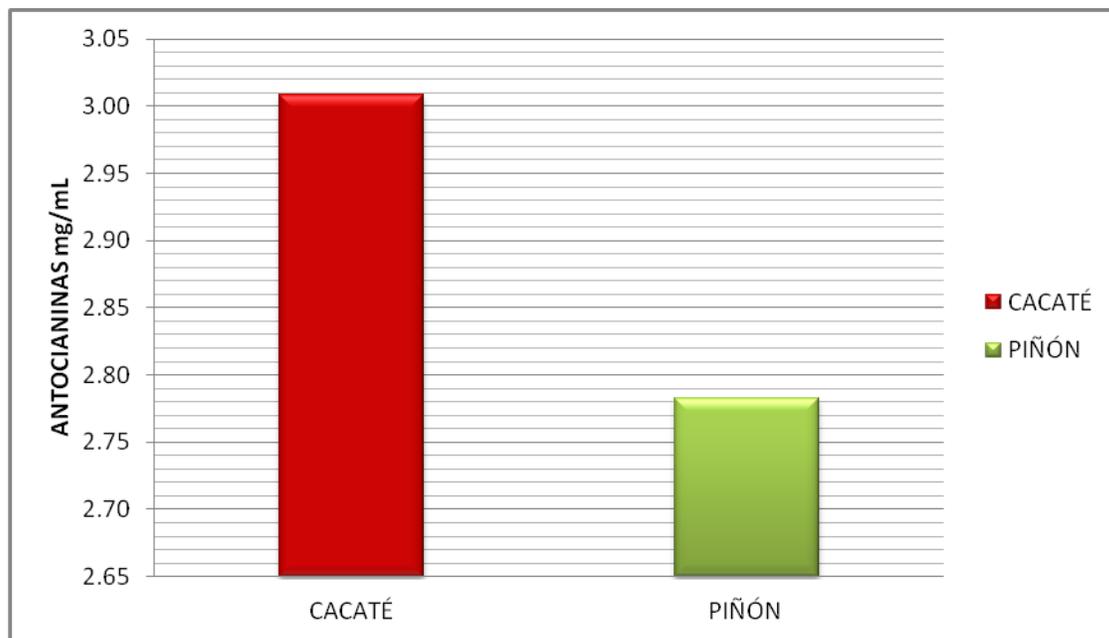


Figura IX.11.- Concentración de antocianinas en residuo acuoso de cacaté y piñón



Las concentraciones obtenidas de antocianinas en ambas determinaciones fueron muy bajas al ser comparados con otros autores por ejemplo, Kähkönen *et al.*, (2003) que determinaron cuantitativamente los compuestos fenólicos por HPLC, presentes en algunas especies de arándano (*Vaccinium myrtillus*), arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea*) y grosellero negro (*Ribes nigrum*), encontrando que el mayor contenido de antocianinas de las bayas que se consumen en Finlandia se encuentra en los arándanos (300-600 mg/100g de peso fresco) y en el grosellero negro (80 a 810 mg/100 g). Hoyos *et al* 2006 reporta una concentración de 5% de antocianinas (oleocianina) del residuo luquido de la extracción de aceite de olivo o alpechín.

Estos rendimiento bajos pudieron deberse a que las antocianinas son destruidas por el calor durante el procesamiento y almacenamiento, según Timberlake y Henry, (1986) un incremento logarítmico en la destrucción de la antocianina ocurre con un incremento en la temperatura, como los tratamientos fueron sometidos a una temperatura de ebullición al momento de inactivar la enzima puede ser que estas en su mayoría se destruyeran.



## CAPÍTULO X

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### CONCLUSIONES

En el agua residual del cacaté y piñón se encontró presencia de azúcares reductores, azúcares totales y fenoles, aunque se encontró presencia de antocianinas estas no se encuentran en proporciones grandes para su reutilización.

Comparando los resultados del residuo acuoso del cacaté y piñón observamos que el piñón siempre fue el de mayor concentración en cada una de las determinaciones, sin embargo este no fue el caso en la determinación de antocianinas que presentó mayor concentración en el caso del cacaté.

Se logró obtener información fisicoquímica del agua residual del cacaté y piñón, otorgando una ligera perspectiva de lo importante que es analizar el agua residual de las extracciones de aceites y no únicamente en el aceite empleando diferentes semillas oleaginosas.

#### RECOMENDACIONES

A pesar de que el presente proyecto logró obtener información importante de los residuos acuosos, hicieron falta determinaciones que por falta de organización no se lograron obtener por lo que es importante remarcar que estas determinaciones juegan un papel importante en las normas estipuladas hacia las aguas residuales (NMX-AA-034-SCFI-2001, NMX-AA-038-SCFI-2001, NMX-AA-030-SCFI-2001, NMX-AA-028-SCFI-2001) ya que es importante no solo fijarnos en lo productivo que puede llegar a ser el residuo acuoso de cacaté y piñón, sino que también en las desventajas que este nos ofrece al medio ambiente, por ejemplo la turbiedad que presenta un agua residual debido a que este tiene una importancia sanitaria, ya que refleja una aproximación del contenido de materias coloidales, minerales u orgánicas, por lo que puede ser indicio de contaminación. Siendo necesario realizar todas las determinaciones que marcan las normas de calidad mencionadas para aguas residuales. Por lo que se recomienda hacer las siguientes determinaciones:

- DQO
- DBO5
- Sólidos totales
- Sólidos sedimentables
- Sólidos suspendidos
- Sólidos disueltos



## CAPÍTULO XI

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalos A., Marañón A., Fernández J.M., Aguilera I. y Despaigne M.F. 2007. Caracterización de las aguas residuales de la planta refinadora de aceite comestible ERASOL. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 38(3):220-223

Alcántara B. 2007. Extracción de aceite de cacaté. Tesis de maestría en Ing. Química.p.56

Aguilera A. F., Augur C., Prado L. A., Aguilar C. N. y Favela E. 2008. Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. Chemical Papers. 62: 4, 440-444.

Badui-Dergal S. 1999. Química de los Alimentos. Editorial Alhambra. México. 648 p.

Borraz C. A. (2012), Extracción acuosa-enzimática del aceite de la semilla de cacaté (*Oecopetalum mexicanum*), Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.

Borja P., Mendoza A. y González B.A. 1992. Estudio cinético de la digestión anaerobia de alpechín procedente de la extracción de aceite utilizando Olivex, previamente biotratado con *Geotrichum Candidan*. 43(4):219-225.

Castrillón Q.O., Bedoya M.O. y Montoya .D.O. 2006. Efecto del pH sobre el crecimiento de microorganismos durante la etapa de maduración en pilas estáticas de composta. Ingeniería Agrícola. 1(2):88-98

Cruz C.A. 2004. Valor nutritivo de alimentos no convencionales del Municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas. Tesis de Licenciatura de Nutrición. UNICACH. p. 28, 54, 60, 68-69.

Chávez Q.E., Roldán T.J., Sotelo O.B.E., Ballinas D.J. y López Z.E.J. 2009. Plantas comestibles no convencionales en Chiapas, México. Revista de Salud Pública y Nutrición. 10(2):1-10.

Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden. Columbia University Press. New York, USA.

Festy Daniele. 2007. Antioxidantes Guía Práctica. Ed. Robinbook. p. 96

Fennema. 1993. Química de los Alimentos. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, España. 1095 p.



Flemming N. y Jan de J. 2009. Producción de aceite de *Jatropha curcas* L., para el desarrollo local en Mozambique. Fundación FACT.

Giusti M. y Wrolstad R. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.

Gutiérrez, B.C. 1994.  *Icacinaceae*. Flora de Veracruz. *Acta Botánica Mexicana*. 80:1-16.

Gutierrez D.J. 1997. Determinación de carbohidratos en aguas residuales de la industria azucarera y cuerpos de agua contaminados. Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente. Ciudad de la Habana, Cuba.

Groppelli. 2008. Tratamiento anaeróbico de efluentes ácidos agroindustriales. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS Argentina*. No 100.

Heller J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Hoyos G., Neto L.M. y Camacho R.F. 2006. Estudio de la cinética de degradación de las aguas residuales de la industria de extracción de aceite de olivo. Centro Interamericano de Recurso del Agua (CIRA).

Kähkönen M.P., Heinämäki J., Ollilainen V. and Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci. Food Agric.*, 83, 1403-1411

Martínez M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. p. 1247.

Marcano Deanna y Hasegawa Masahisa. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda ed. p. 165, 118

Macedo A. L., Santos R. S., Pantoja L. and Santos, A. S. 2011. Pequi cake composition, hydrolysis and fermentation to bioethanol. *Braz. J. Chem. Eng.* 28(1): 9-15.

Metcalf and Eddy, Inc. (1979) *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. 2a. Ed., USA.

Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition. Washington DC. 2005.



- Orozco C., Pérez A., González M., Rodríguez F. y Alfayate J. 2004. Contaminación ambiental. Una visión desde la Química. Thomson ed. España. pp. 590,
- Pabòn G. (2009). Estudio de las características botánicas y etnobotánicas de jatropa(*Jatropha curcas* L.). Cultivos energéticos alternativos. pp. 25-38.
- Pedraza S.E.A. y Cayón S.D.G. 2010. Caracterización morfofisiológica de la *Jatropha curcas* L. variedad Brasil. Vol, 59: num 1.
- Pérez V.A., Torres L.P. y Silva L.J. 2009. Tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. Optimización de variables ambientales y operacionales. Dyna. 76(160):139-148
- Robbins R. 2003. Phenolic acids in foods. An overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. 51:2866-2887.
- Ricochon G., Elfassy A., Pages X., Piffaut B., Girardin M. y Muniglia L. 2011. Correlation between the release of sugars and uronic acid and free oil recovery following enzymatic digestion of oil seed cell walls. Bioresource Technology. 102:9599-9604.
- Santiago, 1998. Guía para el control y preservación de la contaminación industrial. Comisión Nacional del Medio Ambiente-Región metropolitana.
- Scotti S. (1968). *Natureza dinâmica da composição dos esgotos*, Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), São Paulo.
- Timberlake, C.F.; Henry, B.S. (1986). Plant pigments as natural food colours. Endeavour NS 10:31-36.
- Tebbutt t.H.Y. (1977) *Principles of water quality control*. 2a. Ed., Oxford.
- Vinson J.A., Yousef A., Dabbag., Mamdouh M., Sherry and Jinhee Jang. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. J. Agric. Food Chem. 43(11):2800-2802.
- Wong D. 1995. Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría. Ed. Acribia, S. A. España. 476 p.
- Wrolstad R. 1993. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Oregon State University Agricultural Experiment Station Bulletin 624.
- Zamarripa C. y Díaz P. 2008. Aéreas de potencial productivo de piñón *Jatropha curcas* L., con especies de interés bioenergética con México. Comité Nacional sistema-producto oleaginosas.



## CAPÍTULO XII

### ANEXOS

#### **XII.1.- SOLUCIONES**

- Preparación de NaOH 0.1N

Pesar 0.4g de NaOH y llevarlo a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

- Preparación de fenol al 5 %

En un matraz aforado colocar 5 mL de fenol concentrado y aforar con agua destilada.

- Folin Ciocalteu 1N

Por lo general este viene a nivel reactivo con una concentración de 2N, para llevarlo a 1N se necesita hacer una dilución 1:1 con agua destilada en completa oscuridad.

- Carbonato de sodio al 20%

Se pesó 20g de carbonato de sodio y se aforó a 100 mL de agua destilada

- Reactivo de DNS. Acido 3,5-dinitrosalicílico

1. Agua destilada	1416.0 mL
2. DNS	10.6 g
3. NaOH	19.8 g
4. Tartrato de sódico y potásico	306.0 g
5. Fenol fundido	7.6 mL
6. Metabisulfito de sodio	8.3 g

En este orden se van a ir colocando los reactivos en un frasco ámbar sujeto a agitación magnética para su perfecta disolución, agregar el reactivo siguiente siempre y cuando haya disuelto el anterior, conservar a refrigeración.



## XII.2.- CURVAS DE CALIBRACIÓN

### Azúcares reductores

Se calibró el método de determinación de azúcares reductores por medio de espectrofotometría UV-Vis por el método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS), usando glucosa como estándar.

En la Tabla IX.5 se presentan los valores de Densidad Óptica a 765 nm correspondientes a las distintas concentraciones de glucosa, las mediciones se realizaron por triplicado. Cada valor representa la media aritmética de 3 repeticiones.

TABLA XII.1.- Concentraciones de glucosa y densidad óptica correspondiente

TUBOS	Glucosa (mg/mL)	$\lambda$ 570 $\eta$ m DO <sup>3</sup>	$\delta^2$
<sup>1</sup> B	0	0	
1	0,1	0,032 $\pm$ 0,004	
2	0,2	0,074 $\pm$ 0,001	
3	0,3	0,129 $\pm$ 0,002	
4	0,4	0,181 $\pm$ 0,012	
5	0,5	0,240 $\pm$ 0,034	
6	0,6	0,319 $\pm$ 0,001	
7	0,7	0,380 $\pm$ 0,002	

<sup>1</sup> Tubo blanco con agua destilada

<sup>2</sup> Desviación estándar de la media aritmética

<sup>3</sup> Densidad Óptica a 765 nm

Los datos de la Tabla XII.1 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración y la ecuación que vincula a las dos variables. El análisis de regresión permite obtener una relación con la variable dependiente “y” (Densidad óptica a 765 nm) y con una variable independiente “x” (concentración de glucosa mg/L).

Como resultado del análisis se obtuvo la siguiente curva de ajuste (Figura IX.4):

$$Y = 0.5875 X - 0.0414$$

$$R^2 = 0.9962$$

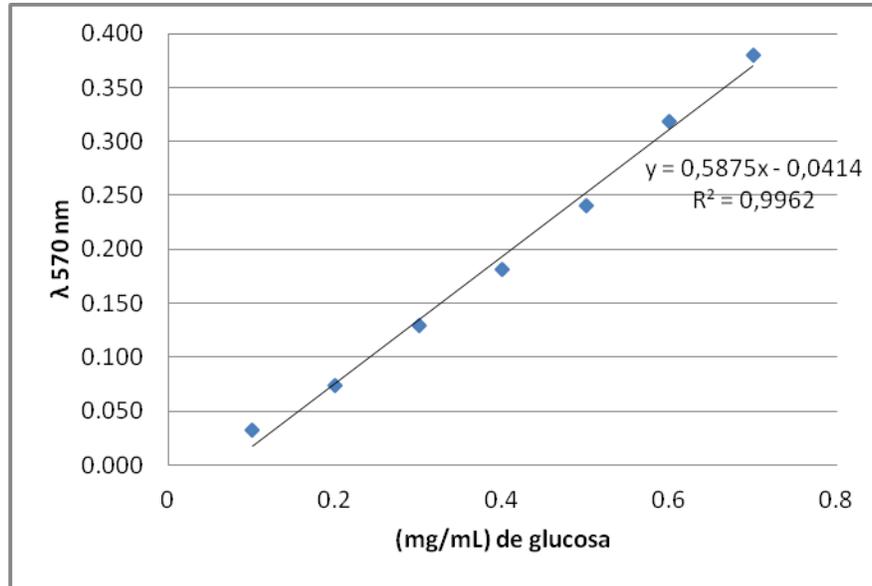


Figura XII.1.- Curva de calibración para azúcares reductores

Mediante un reacomodo de la ecuación general de línea recta se obtiene la concentración de azúcares reductores:

Ecuación general;	$Y = MX + B$
Reacomodo;	$X = (Y - B) / M$

DONDE:

Y = Densidad óptica (DO) a 765 nm

M = Pendiente (mL/mg)

X = Concentración de azúcares reductores en (mg/mL)

B = Ordenada al origen

$R^2$  = Coeficiente de determinación o correlación

Mediante la ecuación modificada se hacen las determinaciones de concentración de azúcares reductores expresado en mg/mL.



## Azúcares Totales

Este método se calibró mediante una curva estándar de sacarosa a una concentración de 0.1 mg/mL por medio de espectrofotometría UV-Vis por el método de fenol-sulfúrico.

En la Tabla XII.2 se presentan los valores de Densidad Óptica a 490 nm correspondientes a las distintas concentraciones de sacarosa, las mediciones se realizaron por triplicado. Cada valor representa la media aritmética de 3 repeticiones.

TABLA XII.2.-Concentraciones de sacarosa y densidad óptica correspondiente

TUBOS	Sacarosa (mg/mL)	$\lambda$ 490 nm DO <sup>3</sup>	$\delta^2$
<sup>1</sup> B	0	0±	0
1	0,01	0,115 ± 0,007	
2	0,02	0,212 ± 0,014	
3	0,03	0,513 ± 0,017	
4	0,04	0,647 ± 0,016	
5	0,05	0,745 ± 0,009	
6	0,06	0,964 ± 0,026	
7	0,07	1,231 ± 0,021	
8	0,08	1,352 ± 0,005	
9	0,09	1,430 ± 0,004	
10	0,1	1,640 ± 0,024	

<sup>1</sup> Tubo blanco con agua destilada

<sup>2</sup> Desviación estándar de la media aritmética

<sup>3</sup> Densidad Óptica a 765 nm

Los datos de la Tabla IX.7 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración y la ecuación que vincula a las dos variables. El análisis de regresión permite obtener una relación con la variable dependiente “y” (Densidad óptica a 490 nm) y con una variable independiente “x” (concentración de glucosa mg/L).

Como resultado del análisis se obtuvo la siguiente curva de ajuste (Figura XII.2):

$$Y = 17.225 X - 0.0625$$

$$R^2 = 0.9901$$

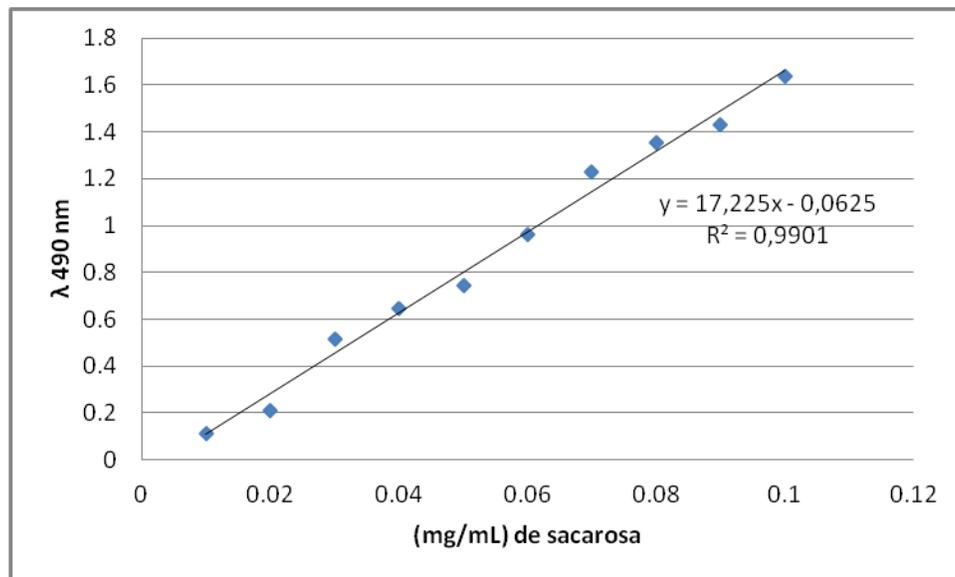


Figura XII.2.- Curva de calibración para azúcares totales.

Como se menciona en el apartado XII.1 se tomara la ecuación general modificada para las determinaciones de la concentración de azúcares totales expresado en mg/mL.

### Fenoles Totales

El método fue calibrado mediante una curva por medio del reactivo de Folin Ciocalteu, empleando ácido gálico como patrón a una concentración de 1200 µg/mL por medio de espectrofotometría UV-Vis.

En la Tabla IX.9 se presentan los valores de Densidad Óptica a 765 nm correspondientes a las distintas concentraciones de ácido gálico, las mediciones se realizaron por triplicado.



TABLA XII.3.-Concentraciones de ácido gálico y densidad óptica correspondiente

TUBOS	Ácido Gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$ 765nm <sup>3</sup> DO	$\delta^2$
<sup>1</sup> B	0	0	
1	120	0,053 $\pm$	0,015
2	240	0,184 $\pm$	0,013
3	360	0,305 $\pm$	0,04
4	480	0,466 $\pm$	0,012
5	600	0,585 $\pm$	0,023
6	720	0,749 $\pm$	0,015
7	840	0,881 $\pm$	0,006

<sup>1</sup> Tubo blanco con agua destilada

<sup>2</sup> Desviación estándar de la media aritmética

<sup>3</sup> Densidad Óptica a 765 nm

Como en las determinaciones pasadas los datos de la tabla XII.3 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración y la ecuación que vincula a las dos variables. El análisis de regresión permite obtener una relación con la variable dependiente “y” (densidad óptica a 490 nm) y con una variable independiente “x” (concentración de glucosa mg/l).

Como resultado del análisis se obtuvo la siguiente curva de ajuste (Figura XII.3):

$$Y = 17.225 X - 0.0625$$

$$R^2 = 0.9901$$

Se tomara la ecuación general modificada para las determinaciones de la concentración de fenoles totales. En la Tabla XII.3 se muestran las lecturas de densidad óptica de cada muestra necesarias para la aplicación de la ecuación, así también los resultados de la concentración de fenoles totales expresado en  $\mu\text{g/mL}$ .

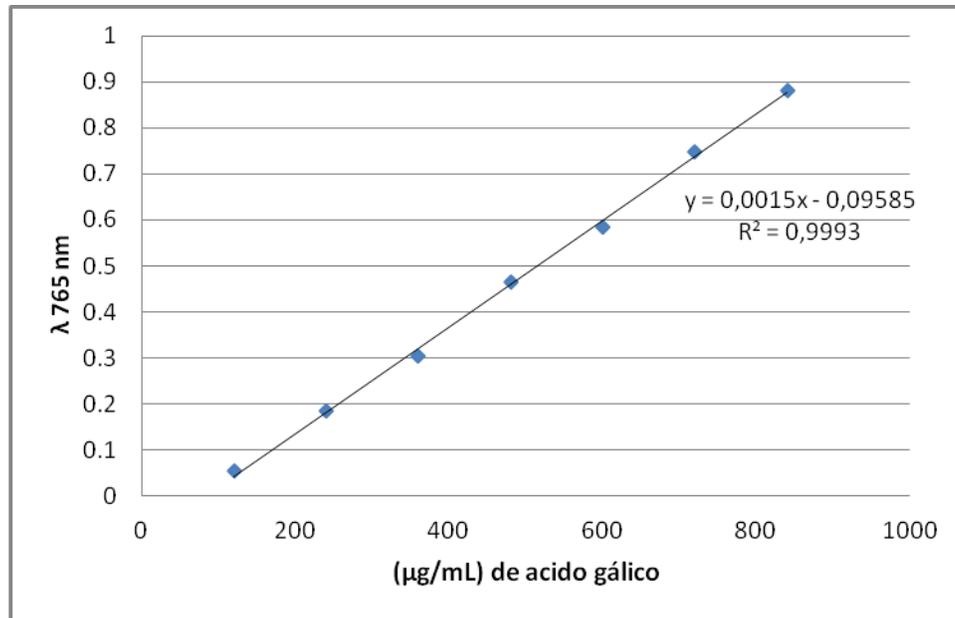


Figura XII.3.- Curva de calibración para fenoles totales.

### XII.3.- ANTOCIANINAS

La determinación del contenido de antocianinas descrito por Wrolstad, (1993), está basada en la Ley de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot L.$$

Donde:

A= absorbancia que es medida con un espectrofotómetro.

$\epsilon$  = corresponde a la absorbancia molar, una constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda. Se pueden utilizar los valores de absorbancia molar para pigmentos purificados tomados de la literatura, haciendo innecesario determinarlos. La absorbancia molar también se conoce como coeficiente de extinción molar.

C = es la concentración molar

L = es la longitud de recorrido en cm y la mayoría de las cubetas para espectrofotómetro tienen una longitud de uno.

La concentración en mg/L puede ser determinada multiplicando por el peso molecular del pigmento multiplicado por el factor de dilución, en este caso fue de cinco.



Al reestructurar la ecuación de Lambert-Beer queda de esta manera

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot L}$$

En el reporte de Wrolstad, (1993), muestra una tabla en donde se observa diversos tipos de antocianinas que presentan algunas frutas, sus respectivos pesos moleculares, coeficientes de extinción y longitud de onda de absorción máxima, (Figura XII.4).

PIGMENT	MW*	LOG $\epsilon$	$\epsilon$	SOLVENT	$\lambda$	REFERENCE
PGD-3-glu (callistephin)	433.2	4.35	22,400	1% HCl/H <sub>2</sub> O	520	Goodwin, p. 541
		4.50	31,600	1% HCl/MeOH	516	Goodwin, p. 541
Cyd-3-gal (Idaein)	445.2	4.48	30,200	1% HCl/MeOH	530	Goodwin, p. 541
		4.62	41,700	HCl/ETOH	535	Fuleki & Francis
		4.49	30,900	HCl/ETOH	535	Fuleki & Francis
Cyd-3-rut	595.2	4.46	28,800	1% HCl/H <sub>2</sub> O	541	Goodwin, p. 541
Cyd-3-glu (Chrysanthem in or Asterin)	445.2	4.47	29,600	0.01% HCl/MeOH	528	Blundstone & Crean,
		4.43	26,900	Aqueous Buffer pH 1	510	Jurd & Aseh
Dpd-3-glu (Myrtillin)	465.2	2.90	795	1% HCl/MeOH	543	Fuleki & Francis
Cyd-3-soph	611.2					
Cyd-3-(2 <sup>G</sup> -xy1rut)	727.2					
Cyd-3-(2 <sup>G</sup> -glurur)	757.2					
Mvd-3-glu (Oenin)	493.5	4.44	28,000	10 <sup>-1</sup> N HCl	520	Niketic-Aleksic & Hrazdina
Mvd-3,5-diglu (Malvin)	655.5	4.57	37,700	10 <sup>-1</sup> N HCl	520	Niketic-Aleksic & Hrazdina

Figura XII.4.- Antocianinas que presentan algunas frutas; pesos moleculares (MW), coeficientes de extinción ( $\epsilon$ ); longitud de onda de absorción máxima ( $\lambda$ ).

Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y el coeficiente de extinción de cianidina-3-galactósido descrito en la Tabla IX.11, cuyo peso molecular es 445,2 y su absorbancia molar 29,600.

La absorbancia se obtiene sustrayendo el valor obtenido a pH 4,5 del valor obtenido a pH 1,0, de la siguiente manera:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} \text{ pH } 1,0 - A_{700 \text{ nm}} \text{ pH } 1,0) - (A_{510 \text{ nm}} \text{ pH } 4,5 - A_{700 \text{ nm}} \text{ pH } 4,5)$$



Mediante la sustitución de los valores obtenidos y tomando en cuenta el factor de dilución de 5, se presenta la Tabla XII.4, que contiene las concentraciones en mg/L de antocianinas presentes en el residuo acuoso del cacaté y piñón siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = \frac{A}{\epsilon \cdot L} \cdot PM \cdot 10^3 \cdot FD$$

Tabla XII.4.- Concentración de antocianinas presentes en el residuo acuoso del cacaté y piñón

Muestra	pH	$\lambda_{510}$ $\eta\text{m}$	$\delta^1$	$\lambda_{700}$ $\eta\text{m}$	$\delta^2$	A	Concentración de antocianinas (mg/L)
Cacaté	1,0000	0,0690 ± 0,0013	0,0240 ± 0,0026	0,0400			3,0081 ± 0,0035
Cacaté	4,5000	0,0480 ± 0,0032	0,0430 ± 0,0043	0,0370			
Piñón	1,0000	0,0370 ± 0,0010	0,0130 ± 0,0011	0,0370			2,7825 ± 0,0015
Piñón	4,5000	0,0150 ± 0,0100	0,0280 ± 0,0019				

<sup>1</sup> Desviación estándar de las lecturas de absorbancia a 510  $\eta\text{m}$

<sup>2</sup> Desviación estándar de las lecturas realizadas a una absorbancia de 700  $\eta\text{m}$