



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**“APROVECHAMIENTO INTEGRAL DEL FRUTO DE CACATÉ (*Oecopetalum
mexicanum*) APLICANDO TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA”**

PRESENTA:

JORGE IVÁN JIMÉNEZ ROSARIO

ASESORA:

DRA. SANDY LUZ OVANDO CHACÓN

REVISORES:

ING. JAQUELINE LEYRA HERNÁNDEZ

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS. 05 DE JULIO DE 2012.

ÍNDICE

| CONTENIDO | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------------|------|
| CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO II.- JUSTIFICACIÓN | 2 |
| CAPÍTULO III.- OBJETIVOS | 3 |
| III.1- Objetivo general..... | 3 |
| III.2- Objetivos específicos..... | 3 |
| CAPÍTULO IV.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE REALIZÓ EL PROYECTO | 4 |
| CAPÍTULO V.-PROBLEMAS A RESOLVER | 7 |
| CAPÍTULO VI.- ALCANCES Y LIMITACIONES | 8 |
| VI.1.- Alcances..... | 8 |
| VI.2.- Limitaciones..... | 8 |
| CAPÍTULO VII.- FUNDAMENTO TEÓRICO | 9 |
| VII.1.- Antecedentes del cacaté..... | 9 |
| VII.2.- Descripción botánica del cacaté (<i>Oecopetalum mexicanum</i>)..... | 9 |
| VII.3.- Importancia de los aceites..... | 10 |
| VII.4.- Semillas Oleaginosas..... | 10 |
| VII.5.- Componentes de la pared celular de las semillas..... | 10 |
| VII.5.1.- Celulosa..... | 10 |
| VII.5.2.- Hemicelulosa..... | 11 |
| VII.5.3.- Lignina..... | 11 |
| VII.6.- Métodos de extracción de aceite..... | 12 |
| VII.6.1.- Por solvente..... | 12 |
| VII.6.2.- Por prensado..... | 12 |
| VII.6.3.- Con enzimas..... | 13 |
| VII.6.3.1.- Investigaciones realizadas utilizando enzimas..... | 13 |
| CAPÍTULO VIII.- PROCEDIMIENTO DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS | 15 |
| 8.1.- Preparación de la harina..... | 15 |
| 8.2.- Análisis bromatológico..... | 15 |
| 8.2.1.- Cenizas..... | 15 |
| 8.2.2.- Humedad..... | 15 |
| 8.2.3.- Grasa cruda..... | 15 |
| 8.2.4.- Fibra cruda..... | 16 |
| 8.2.5.- Proteína..... | 16 |
| 8.2.6.- Fibra Neutra Detergente..... | 17 |
| 8.3.- Hidrólisis enzimática..... | 17 |
| CAPÍTULO IX.- RESULTADOS Y DISCUSIONES | 18 |

| | |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 9.1.- Análisis bromatológico..... | 18 |
| 9.2.- Hidrólisis enzimática..... | 19 |
| CAPÍTULO X.- CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES..... | 21 |
| 10.1.- Conclusión..... | 21 |
| 10.2.- Recomendaciones..... | 21 |
| CAPÍTULO XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES..... | 22 |
| CAPÍTULO XII.- ANEXOS..... | 22 |
| 12.1.- Fórmulas empleadas..... | 24 |
| 12.2.- Memoria de cálculo..... | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1.- Hojas y semillas frescas de <i>Oecopetalum mexicanum</i> | 9 |
| Figura 2.- Semillas de <i>Oecopetalum mexicanum</i> | 10 |
| Figura 3.- Estructura de celulosa..... | 10 |
| Figura 4.- Representación de la extracción Soxhlet..... | 12 |
| Figura 5.- Composición de las fracciones de la semillas de cacaté..... | 18 |
| Figura 6.- Comparación del rendimiento entre una extracción de aceite... | 20 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla IX.1. Composición bromatológica de la semilla de cacaté..... | 19 |

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La principal fuente vegetal de aceite son las semillas oleaginosas, la composición y estructura de la semilla condiciona el proceso al que se someten con el fin de extraer el aceite (Sineiro *et al.*, 1998). El aceite se encuentra en las células vegetales, ligado a proteínas y carbohidratos (Grasso *et al.*, 2007).

Las técnicas de extracción de aceites más aplicadas a nivel industrial a partir de semillas oleaginosas son las que involucran solventes orgánicos (principalmente hexano) y el prensado. El primero es más eficiente, sin embargo, los solventes orgánicos son tóxicos e inflamables, y son de alto costo energético (Zúñiga *et al.*, 2007).

Las investigaciones de procesos alternativos de extracción se ha centrado últimamente en el empleo de enzimas como auxiliares tecnológicos en la extracción de aceites vegetales, esto podría representar una nueva perspectiva de desarrollo para las industrias debido a las condiciones durante el proceso (Grasso *et al.*, 2007; Vioque, 1994).

El proceso acuoso ofrece ventajas sobre los sistemas de extracción comúnmente empleados, pues no se emplean disolventes tóxicos o de manejo peligroso; además de la seguridad. Este proceso permite obtener un aceite limpio y claro. Se ha visto el efecto favorable de la digestión enzimática de las paredes celulares con pectinasas, amilasas o proteasas, que junto con enzimas celulolíticos y hemicelulolíticos favorecen la extracción aceite (Domínguez *et al.*, 1995). La aplicación del tratamiento enzimático durante los procesos de extracción de aceites vegetales permite elevar los rendimientos de extracción (Sineiro *et al.*, 1998).

En Chiapas, hay más de 100 alimentos vegetales autóctonos, algunos de los cuales son ricos en macronutrientes, especialmente en lípidos. El cacaté o cachichín, es un fruto silvestre comestible que se distribuye y consume en algunas regiones de México (Veracruz, Chiapas, Tabasco) y Guatemala. Estudios anteriores ha demostrado que el cacaté es una fuente rica en aceite (Ballinas *et al.*, 2009).

En este proyecto de residencia profesional se llevó a cabo un proceso enzimático haciendo uso integral del fruto de cacaté para determinar si es viable hacer uso entero de dicha semilla o únicamente del endospermo.

CAPÍTULO II

II. JUSTIFICACIÓN

La alimentación ha sido, y seguirá siendo una necesidad y derecho fundamental del ser humano. A través de ella obtenemos nutrimentos energéticos. Los lípidos forman parte de la dieta, ya que aportan energía, y se obtienen mayoritariamente de cultivos oleaginosos. Algunas semillas oleaginosas se utilizan como alimentos, mientras que otras se someten a procesos para la obtención de grasas o aceites. El problema que ha representado los aceites a partir de origen vegetal es su extracción, ya que estos se encuentran en la parte interior de la semilla, lo cual representa un proceso más, y un gasto energético por consiguiente. Actualmente se utiliza la extracción por solvente, siendo el hexano el medio extractor, para ello se requiere de altas temperaturas para su proceso. También se ha determinado que el uso de este proceso representa un riesgo para la salud y para el medio ambiente, aunque ha demostrado ser un método efectivo sobre otros, ya que extrae la mayor cantidad de aceite disponible en la materia prima a pesar de sus inconvenientes. La semilla de *Oecopetalum mexicanum* es producida en nuestro Estado y consumida por las personas que habitan en la zona costa, ya que es de ahí su origen. Son frutas de sabor amargo ricas en aceite, según estudios anteriores demuestran que contiene un 35% de grasa, mayor que otros aceites, como son: el aguacate que contiene 17.9%, y la soja con 22.1%. Su consumo debe promoverse en la región por su contenido en aceite. En este trabajo se propone la extracción de aceite a partir de una semilla no convencional utilizando enzimas.

CAPITULO III

III. 1 OBJETIVO GENERAL

Aprovechar el fruto entero del árbol cacaté (*Oecopetalum mexicanum*) para la extracción de aceite empleando tecnología enzimática.

III.2 Objetivos específicos

1. Determinar la composición bromatológica de la harina de cacaté.
2. Seleccionar un complejo enzimático que permita la liberación del aceite a partir de la harina de cacaté.

CAPÍTULO IV

IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

El proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

IV.1 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 las carreras 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.

IV.2 Servicios que presta la institución

- i. Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo

regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el postgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- ii. Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- iii. Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- iv. Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que cuenta el sistema.
- v. Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.

Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

IV.3. Políticas y normas:

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

IV.4. Descripción del departamento de ingeniería química y bioquímica:

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de

Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

IV.5. Objetivos.

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

IV.6.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.

IV.7.Visión.

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

IV.8. Localización.

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se encuentra ubicado en la carretera Panamericana Km. 1080 de esta ciudad.

CAPÍTULO V

V. PROBLEMAS A RESOLVER

- Generar información sobre la extracción de aceite del fruto de cacaté aplicando hidrólisis enzimática en una harina compuesta por testa y endospermo.

CAPÍTULO VI

VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

VI.1.- ALCANCES

En este proyecto se pretende aprovechar la semilla de cacat e demostrando que el tratamiento enzimático favorece la liberación de aceite partiendo de una harina integrada por el fruto entero.

VI.2.- LIMITACIONES

- Los equipos para realizar el proceso de molienda y tamizado se encuentran en otro laboratorio, por lo cual, dependemos del tiempo del encargado para tener acceso a los equipos.
- El tiempo que requiere los tramites para hacer uso de algunos equipos.

CAPÍTULO VII

VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

VII.1.- Antecedentes del cacaté:

O. mexicanum fue descrita por Greenman y Thompson en 1914 basándose en una colecta de Purpus de 1912, proveniente de Misantla, Veracruz. Esta especie aparte de crecer en Veracruz también se reporta para Chiapas y Guatemala (Gutierrez, 1994). Se conoce con los nombres de cacaté (Simojovel, Chiapas), cachichin (Misantla, Veracruz), jamacuquiaca (lengua zoque, Tapalapa, Chiapas), en la figura 1 se puede apreciar las hojas del fruto y semilla (Matínez, 1987).



Figura 1. Hojas y semillas fresca de *Oecopetalum mexicanum*.

VII.2.- Descripción botánica del cacaté (*Oecopetalum mexicanum*)

La familia *Icacinaceae* esta conformada por aproximadamente 60 géneros y 400 especies. En el estado de Veracruz (México) se registran las siguientes cuatro especies: *Calatola mollis*, *C. laevigata*, *Mappia racemosa* y *Oecopetalum mexicanum* (Gutiérrez, 1994).

O. mexicanum es un árbol o arbusto de 2-25 m de altura. Las hojas son simples, pecioladas, de 15-25 cm de largo, 7-10 cm de ancho, margen entero. La inflorescencia es de tipo terminal o axilar, la flor posee cinco pétalos blancos, oblongo-lanceolados con anteras amarillas; el fruto es verde y café al madurar, globosa, rugosa, y 1 a 2 cm de ancho (Gutierrez, 1994). La semilla es de color blanco como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Semillas de *Oecopetalum mexicanum*.

VII.3.- Importancia de los aceites

El hombre deriva la energía que precisa de tres principales elementos nutritivos: proteínas, grasas e hidratos de carbono (Trevejo y Maury, 2002), los aceites como es bien conocido representan la mayor cantidad como fuente de calorías en la dieta, aproximadamente 9 Kcal por gramo de grasa en comparación a la 4 Kcal por gramo para las proteínas y carbohidratos (Pasquel *et al.*, 2002).

VII.4.- Semillas oleaginosas

Las semillas oleaginosas son aquellas que contienen aceite vegetal, se caracterizan por tener grasas o aceites de alta calidad. El aceite en las oleaginosas se encuentra dentro de la célula vegetal en forma libre o unida a otras macromoléculas como proteínas y carbohidratos (Taha y Hassanein, 2007; Domínguez *et al.*, 1995). Los aceites de uso comercial en alimentos provienen de diversas fuentes, unas más tradicionales que otras, convencionalmente se extraen por prensado o por solvente como el hexano, o por combinación de ambos. Existen muchas materias primas de donde se puede extraer estos lípidos como son: cacao, colza, aceituna, ajonjolí, cacahuete, girasol, etc. (Herrera, 2010; Musa-Ozcan, 2006; Badui-Dergal, 1990).

VII.5.- Componentes de la pared celular de las semillas

VII.5.1- Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante en la biosfera, es el constituyente principal de la pared celular de las plantas, y esta puede estar presente en un estado relativamente puro o en asociación con otros compuestos como la

hemicelulosa y lignina (Hernández *et al.*, 1999), la celulosa funciona como barrera estructural que limita la liberación de componentes de interés para la industria. Desde el punto de vista químico es un polímero de unidades de D-glucosa unidas por enlaces del tipo β 1,4 como se muestra en la figura 1, por lo tanto la celulosa es esencialmente insoluble. Puede ser hidrolizada a glucosa por ácidos fuertes. Si bien ninguna de las enzimas de los mamíferos la desdobla, pero si puede ser desdoblada por las enzimas de los hongos y bacterias (Ovando y Waliszewski, 2005).

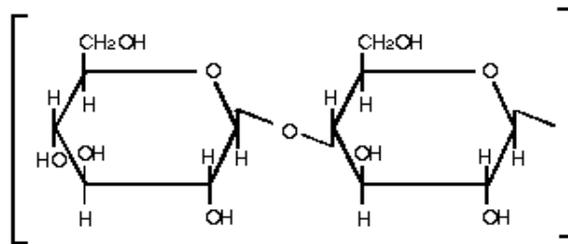


Figura 3. Estructura de la celulosa.

VII.5.2.- Hemicelulosa

La hemicelulosa es un grupo de polisacáridos solubles en agua, forman parte de las paredes celulares de las plantas. La hemicelulosa es menos resistente a la degradación que la celulosa y se define como un carbohidrato soluble en álcalis diluidos. Es la fracción de la pared celular más asociada a la lignina (Ordóñez, 1998)

VII.5.3.- Lignina

La lignina después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal, la mayor parte de esta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con la hemicelulosa y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa, además este compuesto provee la rigidez a la pared celular. Desde el punto de vista estructural, se trata de un polímero aromático tridimensional sintetizado a partir de la fenilalanina (Dávila y Vázquez, 2006; Pazo, 2008).

VII.6.- Métodos de extracción de aceite:

VII.6.1.- Por solventes

Para la obtención de aceites de semillas o frutos secos, se utiliza la extracción con disolventes. Con este método se obtiene una extracción mas completa (Trevejo y Maury, 2002). Como se puede apreciar en la figura 4, en este método el disolvente se calienta, se volatiliza y se condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente. Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso. Los inconvenientes de este proceso son los daños a la salud y al medio ambiente (Bard y Sitohy, 1992).

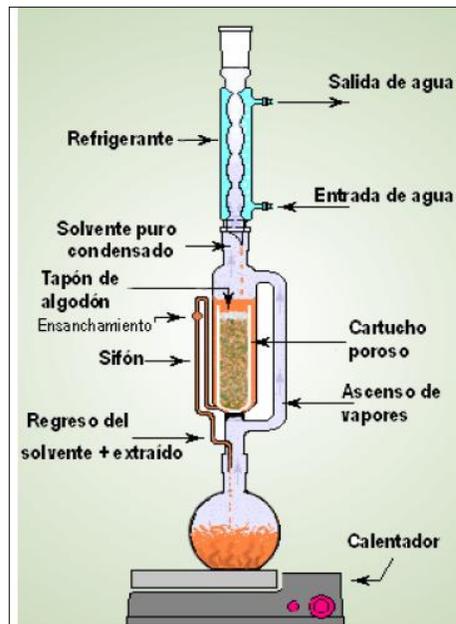


Figura 4. Extracción con Soxhlet.

VII.6.2.- Por prensado

La extracción por prensado consiste en la separación de los líquidos contenidos en productos sólidos mediante la aplicación de fuerzas de compresión, en este método la semilla oleaginosa esta condicionada a pasar a través de una prensa hidráulica donde es aplastada para liberar el aceite contenido en la semilla de modo que las gotas de aceite desgarran y rompen las paredes de las células y salen al exterior (Trevejo y Maury, 2002). Con este método se recupera sólo el 70-80% del aceite disponible. Sin embargo es el método más seguro y con menos pasos en su proceso en comparación con la extracción por solvente (Tasan *et al.*,

2011). Este método no es muy eficiente, aunque si se le da un pretratamiento enzimático puede mejorar el rendimiento de extracción (Schwartz *et al.*, 2007).

VII.6.3.- Con enzimas

La aplicación del tratamiento enzimático durante los procesos de extracción de aceites vegetales permite elevar los rendimientos de extracción y mejorar la calidad nutricional de las harinas. Las actividades celulasa y hemicelulasa son las más adecuadas para degradar la pared vegetal, pues éstos son los polisacáridos mayoritarios de la misma, de esta forma facilitan la extracción y recuperación del aceite; las pectinasas también son efectivas puesto que las sustancias pécticas son componentes estructurales de materiales vegetales, responsables de la coherencia e integridad de los tejidos (Sineiro *et al.*, 1998).

El uso de algunos preparados celulolíticos en el proceso de extracción ha tenido un efecto positivo sobre el rendimiento de la extractibilidad del aceite (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005), puesto que aumenta el rendimiento de aceite, y es dependiente de las condiciones del tratamiento (Zúñiga *et al.*, 2007). Durante la extracción se emplea agua como disolvente extractor (Domínguez *et al.*, 1995).

VII.6.3.1.- Investigaciones realizadas utilizando enzimas.

Extracción del aceite de semilla de uva (*Vitis vinifera*).

En este estudio analizaron el efecto de la incorporación de enzimas sobre el rendimiento de extracción del aceite por prensado en frío. La finalidad de emplear el prensado en frío, posterior a la adición de la enzima fue preservar los compuestos activos presentes en la semilla de uva y minimizar el impacto medioambiental en comparación con los métodos convencionales de extracción de aceite que utilizan altas temperaturas (Guerra y Zuñiga, 2003).

El tratamiento enzimático se efectúa previo al prensado con una enzima comercial Ultrazym 100G y su efectividad se compara con un control sin catalizador. Obtuvieron un rendimiento de extracción de aceite del 72% b.s. se logra con el pre-tratamiento enzimático durante 4 h. a 50°C, y 60% de humedad, y un tamaño de partícula de 0.6 mm, con una concentración de Enzima/Sustrato de 0.5 y 2% (p/p)0,5 y 2% (p/p) superando en un 26 % al control.

Concluyeron que la incorporación de un tratamiento enzimático es una alternativa factible para extraer el aceite de semilla de uva bajo condiciones de operación moderadas del proceso mejorando el rendimiento de extracción en comparación con el mismo tipo de proceso sin enzima (Guerra y Zuñiga, 2003).

Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío

Evaluaron el proceso de extracción de aceite de la semilla de onagra con cuatro preparados enzimáticos comerciales (Ultrazym 100G, Cellubrix, Pectinex Ultra SP y Maxoliva), el cual fue evaluado bajo distintas condiciones de incubación: relación enzima/sustrato, tiempo, humedad y temperatura. El rendimiento aumentó un 12% cuando se realizó un doble prensado en frío sobre la semilla tratada con una mezcla enzimática formulada con Ultrazym 100G y Cellubrix en razón 1:1, concentración enzima/sustrato del 2% p/p (base húmeda), durante 15 horas de incubación a 45°C y 40% de humedad.

Concluyeron que la incorporación de un tratamiento enzimático al proceso aumenta el rendimiento de extracción de aceite de onagra y que el tratamiento enzimático, mejora el potencial antioxidante de la harina residual y amplía su potencial nutricional al reducir su contenido en fibras (Collao y col., 2007).

CAPÍTULO VIII

VIII. PROCEDIMIENTO DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

VIII.1 PREPARACIÓN DE LA HARINA.

Se utilizó un lote de 2 kg de materia prima la cual se encontraba en estado de congelación, fueron descongeladas a temperatura ambiente al menos 4 horas antes de su uso. Posteriormente se procedió a la molienda en un molino de discos marca Engineering Industrial, cabe mencionar que el fruto se molió entero (testa y endospermo). Posteriormente fueron separadas las partículas en un tamiz vibratorio obteniendo una partícula de 0.539 mm con un tamiz de malla 40 (Guerra y Zúñiga, 2003). La muestra fue colocada en frascos color ámbar de capacidad de 1 litro hasta su posterior uso. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

VIII.2 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

VIII.2.1 CENIZA (AOAC, 2005, 942.05 b)

Se pesó 2 gramos de muestra molida y se colocaron en crisoles de porcelanas las cuales estaban a peso constante, posteriormente fueron sometidas en mufla a 550°C durante 2 horas. Finalmente las cenizas fueron determinadas por diferencia de pesos utilizando la fórmula correspondiente (ver capítulo XII).

VIII.2.2 HÚMEDAD (AOAC, 2005, 950.46 b)

Se peso 10 gramos de muestra molida, y fueron colocadas en charolas de aluminio, las cuales estaban a peso constante, se colocaron las cápsulas en el horno el cual se encontraba a 95°C, se dejaron ahí hasta su peso constante para determinar la humedad por diferencia de peso mediante la fórmula correspondiente (ver capítulo XII).

VIII.2.3 GRASA CRUDA (AOAC, 2005, 960.39 b)

Se utilizó 5 gramos de muestra y se colocó en el cartucho Whatman, después este fue colocado en el extractor del equipo soxhlet, el cual fue montado por completo, añadiendo previamente 150 ml de hexano al matraz balón. Se dejo el equipo montado sobre una parrilla de calentamiento y a partir del primer reflujo se esperaron 5 horas. Posteriormente el matraz balón fue colocado en un rota-vapor para evaporar el hexano, después fue colocado a peso constante el matraz, finalmente se determina el porcentaje de grasa contenida en la muestra por diferencia de pesos según la fórmula para dicha determinación (ver capítulo XII).

VIII.2.4 FIBRA CRUDA (AOAC, 2005, 962.09)

Se pesó 1 gramo de muestra seca y libre de grasa, y se colocó en un matraz balón de 250 mL, se agregó 150 mL de ácido sulfúrico al 1.25%. El matraz se conectó a un refrigerante recto colocado en forma vertical para hacer reflujo; se calentó y cuando empezó a hervir se esperaron 30 minutos, al final del tiempo se apagó y se dejó enfriar por 2 minutos. Se filtró la muestra en un crisol de filtración y se lavó con agua destilada hirviendo hasta eliminar todo el ácido. Se raspó con una espátula y se colocó la muestra en el matraz balón de 250 mL. Se agregó 150 mL de NaOH al 3.25% y se conectó nuevamente al refrigerante, ebullo por 30 minutos. Se filtró con un papel filtro a peso constante y se lavó con agua destilada hirviendo hasta eliminar todo el hidróxido de sodio, luego se hicieron 2 lavados más, 50 mL con alcohol etílico y 50 mL con éter de petróleo. La muestra y el papel filtro fueron colocados en crisol que estaba a peso constante, y fueron colocados en una estufa a 95°C hasta obtener peso constante. Después, se quemó la muestra en un incinerador a 550°C durante 2 horas, se pesó y por diferencia de peso según la fórmula se obtuvo la cantidad de fibra presente en la muestra (ver capítulo XII).

VIII.2.5 PROTEÍNA (AOAC, 2005, 928.08)

Se pesó 0.5 gramos de muestra seca. Se colocó en un matraz de digestión y se le agregó 0.5 gramos de mezcla catalizadora, 0.3 g de K_2SO_4 y 3 mL de H_2SO_4 concentrado. Se colocó el matraz en el digestor, se calentó al principio a baja temperatura y después se aumentó la temperatura girando el matraz ocasionalmente, hasta obtener una solución verde claro aproximadamente como 40 min, al término se esperó que enfriara en la campana de extracción. Luego, la muestra se vació en un matraz de destilación de 300 mL. Se agregó 200 mL de agua destilada y 1 mL de Na_2SO_4 al 10%, lentamente se adicionó 15 mL de NaOH al 40%. El matraz se instaló al equipo de destilación, en la salida del refrigerante se puso un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 10 mL de ácido bórico al 4% y gotas de indicador de rojo de metilo con azul de metileno. Las primeras gotas del destilado viraron el color del indicador de violeta a verde, de lo contrario se enfrió y se le agregó más NaOH al 40%. La destilación se detuvo hasta que unas gotas del destilado no dieron alcalinidad con el papel tornasol. Se retiró el matraz receptor, apagando la fuente de calor, se lavó el refrigerante con agua destilada, y se tituló con HCl 0.1N. Después se procedió a realizar los cálculos correspondientes (ver capítulo XII).

VIII.2.6 DETERMINACION DE FIBRA NEUTRA DETERGENTE (Van Soest)

Se pesó 1 gramo de muestra, molida y seca, se colocó dentro de un matraz de bola fondo plano de 250 mL, donde se le adicionó 100 mL de solución neutra detergente, seguidamente se le agregó 2 ml de decahidronaftaleno y 0.5 mL de sulfito de sodio. Se colocó el refrigerante, se empieza a tomar el tiempo desde la primera ebullición y se espera 60 min. Transcurrido el tiempo se esperó que enfriará, en un embudo Buchner se colocó cuidadosamente el papel filtro, después se vacía la muestra aun caliente y se enciende la bomba de vacío para hacer mas efectivo la filtración, se lava 3 veces con 50 mL de agua destilada caliente 90-100°C, hasta eliminar coloración, se realizó otro lavado mas con acetona, siguiendo el procedimiento anterior. Se esperó que seque y después de un tiempo transcurrido se colocó en un horno a 60 °C durante 2 horas, al termino de este tiempo se transfirió a un desecador donde se esperó 30 min, y finalmente se pesó, y se realizaron los cálculos de acuerdo a la fórmula para esta determinación (ver capítulo XI).

VIII.3 HIDRÓSILIS ENZIMÁTICA

15 gramos de harina molida y seca se adicionaron a 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón. Posteriormente 15 µL de enzima celulasa y se incubo durante 3.5 horas, a 80 rpm y 50°C (Domínguez *et al*, 1995, Guerra y Zúñiga, 2003). Transcurrido el tiempo de la hidrólisis los matraces fueron colocados en un baño caliente a una temperatura de 100°C durante 5 minutos para la inactivación de la enzima. Después la muestra se colocaron en tubos Falcón de 50 mL, cuidando que el peso de cada tubo fueran iguales, posteriormente la muestras fueron centrifugados a 4000 rpm durante 40 minutos a una temperatura de 4°C. Se separaron las fases, y la fase líquida fue colocada en tubos Falcón de 50 mL y guardados en refrigeración. Mientras que fase sólida fue secada a temperatura ambiente durante 24 hrs.

CAPÍTULO IX

IX. RESULTADOS Y DISCUSIONES

IX.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

Inicialmente se determinó el peso promedio del fruto que estuvo en congelación, el cual fue de 2.65 gramos. En la figura 5, se demuestra la fracción mayoritaria en la semilla, el cual le corresponde a la cascara con el $52\% \pm 0.16$, la fracción comestible del fruto le corresponde el $48\% \pm 0.11$, este último menor el reportado por Ballinas (2009) con un valor de 53%, tomando en cuenta que este valor fue determinado de un fruto fresco, y el mostrado en el gráfico fue secado a temperatura ambiente durante 3 horas, el cual se ve afectado por la evaporación del agua contenido en el fruto.

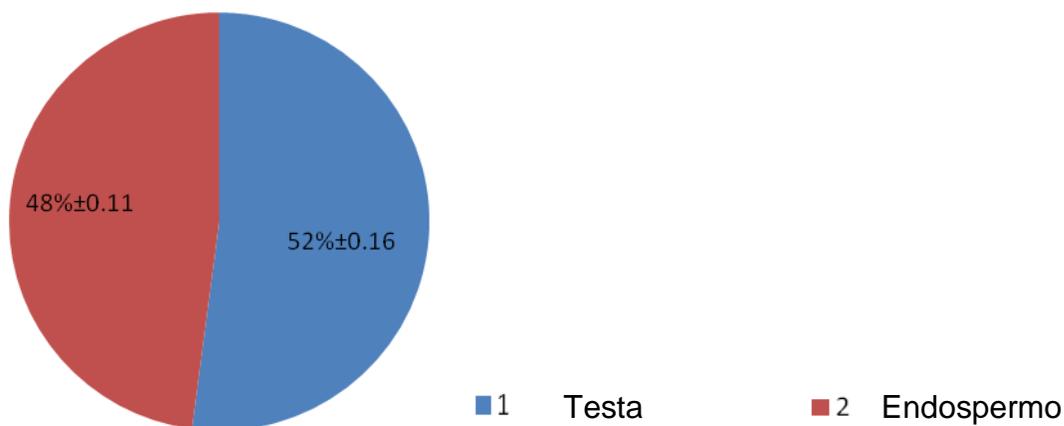


Figura 5. Componentes de las fracciones de la semilla de cacaté.

En este proyecto se obtuvo en extracción de aceite un valor de 13.19 ± 0.27 , siendo que la semilla del cacaté se caracteriza por su contenido en aceite, el cual ha sido demostrado por Ballinas *et al.*, (2009) quien obtuvo un valor de 35% de aceite, empleando la materia seca y sin cascara, aplicando el método de Soxhlet con hexano, en este trabajo el valor obtenido podría deberse a la presencia de cascara, mas sin embargo, se ha demostrado que la cascara también contienen aceite como en el caso de la cascara de girasol según Curvetto (2005) la cascara de la semilla de girasol contiene 5% de aceite, en el cacaté la fracción mayoritaria es la testa, se tendría que realizar una extracción exclusivamente a la cascara para así determinar si contiene o no aceite en ella, con esto se podría decir que la presencia de la cascara si influyó en la determinación ya que es la fracción mayoritaria, y el resto que pertenece al endospermo no todo es aceite,

este y añadido a los errores que pudiera haber existido en la determinación son los causantes de que este valor sea menor al de Ballinas (2009).

Tabla IX.1. Composición bromatológica de la semilla de cacaté

| Componente | Porcentaje |
|--------------------------------|-------------|
| Ceniza | 3.11 ±0.20 |
| Húmedad | 14.52 ±0.38 |
| Grasa cruda | 13.19 ±0.27 |
| Fibra cruda | 4.03 ±1.12 |
| Proteína | 24.41 ±2.35 |
| Fibra Neutra Detergente | 49.75±1.29 |
| Fibra Ácida Detergente | Nd |
| Lignina | Nd |

Los resultados presentados corresponden a la media ± DS (n=3).

Determinaciones realizadas en base seca.

Nd: No determinado.

Los valores de cenizas y fibra en este trabajo fueron de 3.11 ±0.20, 4.03 ±1.12 respectivamente son relativamente similares a los obtenidos por el trabajo de Ballinas (2009), estos valores los cuales fueron de 3.15 para ceniza, y 4.15 para fibra, por lo tanto, en este aspecto no se ve afectado por la presencia de la testa de la semilla, lo que destacó en este trabajo fue el porcentaje de proteína el cual fue de 24.41 ±2.35 comparado con el trabajo de Ballinas (2009) con un valor de 12.09% obtenido por el método Kjeldahl usando el factor 6.25, aquí se ve reflejado la presencia de la cascará, la cual contiene nitrógeno.

IX.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Para la selección del complejo enzimático a utilizar se debió contar con los resultados de Fibra Neutra Detergente, Fibra Ácida Detergente y Lignina, sin embargo, existen diversos trabajos en los cuales no es necesario tener estos valores para elegir una enzima, ya que existe información acerca de las actividades de las enzimas, y se han obtenidos excelentes resultados (Schwartz, 2007). Por tal motivo, se utilizó un complejo enzimático de celulasa, ya que bibliográficamente se ha demostrado que este es el componente mas abundante, y difícil de degradar. A pesar que se duplicó el tiempo de centrifugación no se logró observar la presencia de aceite en los tubos Falcón, investigaciones anteriores han descrito que el pretratamiento enzimático mejora la extracción de

aceite, así que se realizó la extracción de aceite mediante Soxhlet (aunque esto no forma parte del proyecto), en la figura 6 se muestra el efecto enzimático, el cual se ve notablemente el rendimiento de la extracción de aceite.

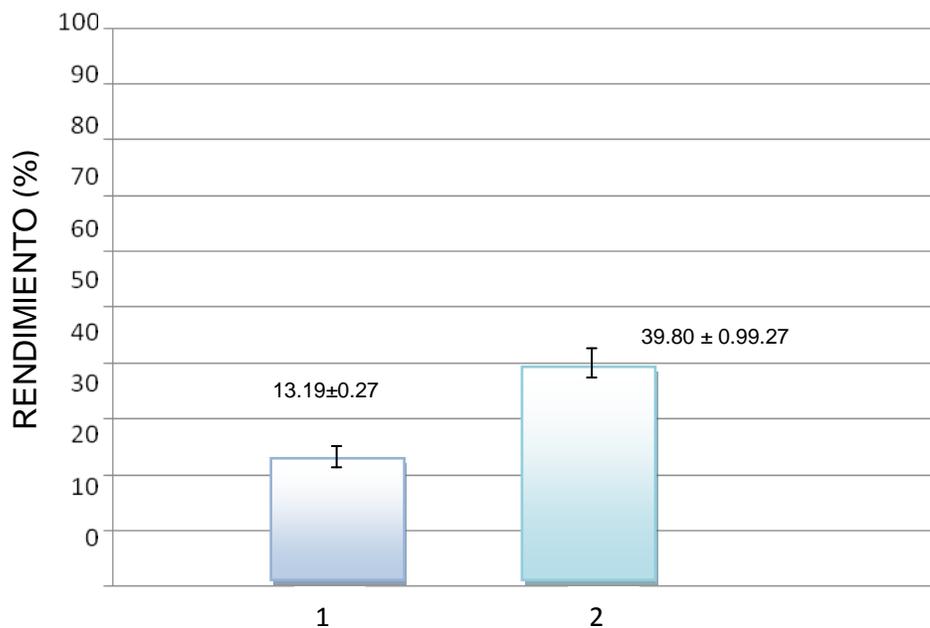


Figura 6. Comparación del rendimiento entre una extracción de aceite (1) sin tratamiento enzimático y (2) con pre-tratamiento enzimático con Soxhlet.

CAPÍTULO X

X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

X.1. CONCLUSIONES

La composición bromatológica nos determina el valor nutricional, y los resultados obtenidos para el cacaté demuestran que es una semilla rica en fibra, proteína y una fuente importante con alto contenido de aceite, por lo que debe promoverse para extraer aceites a partir de una semilla no convencional. Aunque no se llegó al objetivo de extraer aceite mediante enzima haciendo el uso integral de la semilla, se puede demostrar que la presencia de la cascará no tuvo efecto en la liberación del aceite esto lo demuestra la extracción de aceite mediante Soxhlet posterior a la hidrólisis, se ve que mejora la extracción, aunque esto implique otro proceso, lo cual se pretende evitar, hacer uso de solventes orgánicos, y dar lugar a enzimas.

X.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar un complejo enzimático con otras actividades enzimáticas.
- También se sugiere comprobar con diversos tamaños de partícula hasta obtener el de mejor rendimiento.
- Realizar análisis bromatológicos a la testa de la semilla.

CAPÍTULO XI

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES:

- Badui-Dergal S. 1990. Química de los alimentos. Editorial Alhambra. México. Pág. 211.
- Ballinas E. J., Selvas M. A., García A., Aguilar O. A. y Caballero A. 2009. Valor nutricional del aceite del cacaté, *Oecopetalum mexicanum*. Revista Chilena de Nutrición. pág. 70.
- Bard F. H. y Sitohy M. Z. 1992. Optimizing conditions for enzymatic extraction of sunflower oil. Grasas y aceite. 43:281-282.
- Curvetto N.R., Figlas D., González Matute R. y Demastro S. 2005. Cáscaras de semilla de Girasol, Cultivos de Shiitake en Bolsas. Capítulo 4:127-133.
- Dávila G. y Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Revista Mensaje Bioquímico. XXX.
- Domínguez H., Núñez M. J. y Lema J. M. 1995. Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados. Grasas y Aceite. 46:11-13.
- Grasso F., Maroto B., Camusco C. y Zaritzky N. 2007. Modelado de la extracción con hexano molido de soja pretratado enzimáticamente. Grasas y aceites. 58:117-121.
- Guerra E.G. y Zúñiga M.E. 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinífera*, por prensado en frío. Grasas y Aceites. 54(1):53-57.
- Gutiérrez B.C. 1994. *Icacinaceae*. Flora de Veracruz. Acta Botánica Mexicana. 80:1-16.
- Hernández Santoyo A., García Hernández E., y Rodríguez Romero A. 1999. Celulosomas: Sistemas multienzimáticos. Journal of the Mexican Chemical Society. 43:137-142.
- Herrera Valencia W. Hernández Londoño C. y Montealegre Ramírez Y. 2010. Potencial industrial de plantas oleaginosas del Caquetá Colombiana. Ingenierías & Amazonia. 3(1):28-39.
- Martínez M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. p. 1247.

Musa-Ozcan M. 2006. Determination of the mineral compositions of some selected oil-bearing seeds and kernels using inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES). *Grasas y Aceites*. 57:211-218.

Pazo Rencoret J. D. 2008. Estudio de lignina y lípidos en madera de eucalipto: Caracterización química en distintas especies y su evolución durante la fabricación y blanqueo químico y enzimático de la pasta de papel. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. España.

Ordóñez Pereda J. A. 1998. Tecnología de los alimentos: Componentes de los alimentos y procesos. Editorial Síntesis S. A. Villahermosa, Madrid. España. Pág. 95.

Ovando-Chacón S.L. y Waliszewski K.N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(042):113-122.

Pasquel A., Castillo A., Sotero V. y García D. 2002. Extracción de la cáscara de *Bactris gasipaes* HBK usando Dióxido de carbono presurizado. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 2:1-14

Sineiro J., Núñez M.J. y Domínguez H. 1998. Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales. *Grasas y Aceites*. 49:191-202.

Schwartz M., J.A. Oleata, P. Undurraga y V. Costa. 2007. Mejoramiento del rendimiento de extracción del aceite de palta (aguacate). *Proceedings VI World Avocado Congress*. Viña Del Mar, Chile.

Tasan M., Gecgel U. y Demirci M. 2011. Effects of storage and industrial oilseed extraction methods on the quality and stability characteristics of crude sunflower oil (*Helianthus annuus* L.). *Grasas y Aceites*. 62:389-398.

Trejejo C.E. y Maury L.M.I. 2002. Extracción y caracterización del aceite de *Poraqueiba sericea* Tulasne (Umarí). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 2(2):1-18.

Van Soest P. y Wine R.H. 1967.

Vioque E., Vioque J. y Pastor J.E. 1994. Estudio de la composición en ácidos grasos del aceite de las semillas en algunas plantas silvestres españolas. *Grasas y Aceites*. 45:161-163.

Zúñiga M. E., Curotto E. y Collao C. A. 2007. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de onagra, *Oenothera biennis*, por prensando en frío. *Grasas y Aceites*. 58:10-14.

CAPÍTULO XII

XII. ANEXOS.

XII.1.2. FÓRMULAS EMPLEADAS

Fórmula 1. Determinación de cenizas.

$$\text{Contenido de ceniza (\%)} = 100 \frac{A - B}{C}$$

Donde:

A = Peso del crisol con muestra (g)

B = Peso del crisol con ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

Fórmula 2. Determinación de humedad.

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = 100 \left(\frac{(B-A) - (C-A)}{(B-A)} \right)$$

Donde:

A = Peso de la charolilla seca y limpia (g)

B = Peso de la charolilla + muestra húmeda (g)

C = Peso de la charolilla + muestra seca (g)

Fórmula 3. Determinación de grasa cruda.

$$\text{Contenido de grasa cruda (\%)} = 100 \frac{B - A}{C}$$

Donde:

A = Peso del matraz limpio y seco (g)

B = Peso del matraz con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

Fórmula 4. Determinación de fibra cruda.

$$\text{Contenido de fibra cruda (\%)} = 100 \frac{A - B}{C}$$

Donde:

A = Peso del crisol con el residuo seco (g)

B = Peso del crisol con la ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

Fórmula 5. Determinación de proteína.

Nitrógeno en la muestra (%) = $100[(A \times B)/C] \times 0.014$

Proteína cruda (%) = Nitrógeno en la muestra * 6.25

Donde:

A = Acido clorhídrico usado en la titulación (mL)

B = Normalidad del ácido estándar

C = Peso de la muestra (g)

Fórmula 6. Determinación de fibra neutra detergente.

Cálculos de % fibra neutra detergente:

$$\% \text{ Fibra ácida detergente} = 100 \frac{W_2 - W_1}{S}$$

Donde:

S= g de muestra seca

W₁= Peso del papel filtro

W₂= Papel filtro después de 2 horas de secado.

Fórmula 7. Determinación de fibra ácida detergente.

Cálculos de % fibra ácida detergente:

$$\% \text{ Fibra ácida detergente} = 100 \frac{W_2 - W_1}{S}$$

Donde:

S= g de muestra seca

W₁= Peso del papel filtro

W₂= Papel filtro después de 2 horas de secado.

XII.2. MEMORIA DE CÁLCULO:

Cálculos de Ceniza:

Muestra 1:

$$A= 38.9311$$

$$B=38.9887$$

$$C=2$$

$$\text{Contenido de ceniza (\%)}= 100((38.9311 - 38.9887)/2)= 2.88$$

Muestra 2

$$A= 38.9586$$

$$B= 37.0219$$

$$C=2.0000$$

$$\text{Contenido de ceniza (\%)}= 100((38.9586 - 37.0219)/ 2.0011)= 3.16$$

Muestra 3:

$$A= 30.5844$$

$$B= 30.6509$$

$$C=2.004$$

$$\text{Contenido de ceniza (\%)}= 100((30.5844 - 30.6509)/ 2.004)= 3.29$$

CÁLCULOS DE HÚMEDAD:

Muestra 1:

$$A= 18.4790$$

$$B=28.4816$$

$$C=27.0320$$

$$\text{Húmedad (\%)} = 100(((28.4816-18.4790) - (27.0320-18.4790))/(28.4816-18.4790))= 14.49$$

Muestra 2:

$$A= 19.3009$$

$$B=29.3073$$

$$C=27.8152$$

$$\text{Húmedad (\%)} = 100(((29.3073-19.3009) - (27.8152-19.3009))/(29.3073-19.3009))= 14.91$$

Muestra 3:

A=18.8871
B= 28.8933
C=27.4780

Húmedad (%) = $100(((28.8933-18.8871) - (27.4780-18.8871))/(28.8933-18.8871))=$
14.14

CÁLCULOS DE GRASA CRUDA:

Muestra 1:
A=93.7400
B=94.4114
C=5.0063

Contenido de grasa cruda (%) = $100((94.4114 - 93.7400)/5.0063)=$ 13.41

Muestra 2:

A=104.1982
B=104.8427
C=5.0024

Contenido de grasa cruda (%) = $100((104.8427 - 104.1982)/5.0024)=$ 12.88

Muestra 3:

A=97.3431
B=98.0099
C=5.0098

Contenido de grasa cruda (%) = $100((98.0099 - 97.3431)/5.0098)=$ 13.30

CÁLCULOS DE FIBRA CRUDA:

Muestra 1:

A=32.4332
B=32.4544
C=0.4137

Fibra cruda (%) = $100((32.4332 - 32.4544)/0.4137)=$ 5.1244

Muestra 2:

A=36.9726
B=36.9856
C=0.4502

$$\text{Fibra cruda (\%)} = 100((36.9726 - 36.9856)/0.4502) = 2.88$$

Muestra 3:

$$A = 38.9319$$

$$B = 38.9495$$

$$C = 0.4274$$

$$\text{Fibra cruda (\%)} = 100((38.9319 - 38.9495)/0.4274) = 4.11$$

CÁLCULOS DE PROTEÍNA CRUDA:

Muestra 1:

$$A = 1.4$$

$$B = 0.1$$

$$C = 0.0512$$

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = 100[((1.4 \times 0.1)/0.0512) \times 0.014] = 3.82$$

$$\text{Proteína cruda} = 23.92$$

Muestra 2:

$$A = 1.6$$

$$B = 0.1$$

$$C = 0.0519$$

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = 100[((1.6 \times 0.1)/0.0519) \times 0.014] = 4.31$$

$$\text{Proteína Cruda} = 26.97$$

Muestra 3:

$$A = 1.3$$

$$B = 0.1$$

$$C = 0.0509$$

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = 100[((1.3 \times 0.1)/0.0509) \times 0.014] = 3.57$$

$$\text{Proteína cruda} = 22.34$$

CÁLCULOS DE FIBRA NEUTRA DETERGENTE:

Muestra 1:

$$S = 1.0014$$

$$W_1 = 1.1704$$

$$W_2 = 1.6799$$

$$\% \text{ Fibra Neutra Detergente} = 100((1.6799 - 1.1704)/1.0014) = 50.87\%$$

Muestra 2:

$$S=1.0050$$

$$W_1=1.1892$$

$$W_2=1.6923$$

$$\% \text{ Fibra Neutra Detergente: } 100((1.6923-1.1892)/1.0050)= 50.05 \%$$

Muestra 3:

$$S= 1.0032$$

$$W_1=1.1890$$

$$W_2=1.6739$$

$$\% \text{ Fibra Neutra Detergente: } 100((1.6739-1.1890)/1.0032)= 48.33\%$$

CÁLCULOS DE GRASA DESPUÉS DEL PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Muestra 1:

$$A=104.3218$$

$$B=106.2515$$

$$C=5.0012$$

$$\% \text{ Grasa: } 100((106.2515-104.3218)/5.0012)= 38.58\%$$

Muestra 2:

$$A=93.8518$$

$$B=95.8812$$

$$C=5.0022$$

$$\% \text{ Grasa= } 100((95.8812-93.8518)/5.0022)= 40.57\%$$

Muestra 3:

$$A=93.8518$$

$$B=95.8366$$

$$C=5.0027$$

$$\% \text{ Grasa} = 100((95.8366-93.8518)/5.0027)= 29.67\%$$