



TECNOLOGICO NACIONAL DE MEXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ

“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ACUOSA  
ENZIMÁTICA DE ACEITE DE SEMILLAS DE  
*Ricinus communis*”

INGENIERIA BIOQUIMICA

Presentado Por:

Díaz Suarez Pablo Fernando

Numero de Control: 14270366

Asesor: Dr. Arnulfo Rosales Quintero

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Julio del 2019

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Descripción de la organización</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. Nombre de la organización</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2. Ubicación de la organización</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Problemas a resolver</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>7</b>
<b>4.1. Objetivo general</b> .....	<b>7</b>
<b>4.2. Objetivos particulares</b> .....	<b>7</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>8</b>
<b>6.- Marco teórico</b> .....	<b>10</b>
<b>6.1. Higuierilla</b> .....	<b>10</b>
6.1.1. Aplicaciones principales del aceite de ricino.....	12
6.1.2. Aceite de ricino.....	12
6.1.3. Composición química.....	13
6.1.4. Propiedades físicas.....	14
<b>6.2. Lípidos</b> .....	<b>15</b>
6.2.1. Importancia de las grasas y los aceites.....	15
6.2.2. Clasificación de los lípidos.....	16
6.2.2.1. Ácidos grasos.....	16
6.2.2.2. Ácidos grasos saturados.....	17
6.2.2.3. Ácidos grasos insaturados.....	17
6.2.2.4. Ácidos grasos sustitutos.....	18
6.2.2.5. Acilgliceridos.....	18
6.2.2.6. Fosfogliceridos.....	18
6.2.2.7. Ceras.....	18
6.2.2.8. Esteroles.....	19
<b>6.3. Métodos de extracción de aceites</b> .....	<b>19</b>
6.3.1. Prensado discontinuo.....	20
6.3.2. Prensado continuo.....	20
6.3.3. Método químico.....	21
6.3.3.1. Extracción con solventes.....	22
<b>6.4 Aplicación de enzimas en la extracción de aceites</b> .....	<b>22</b>

6.4.1. Definición de enzima .....	22
6.4.2.-Factores que influyen en la actividad enzimática.....	23
6.4.2.1. Efecto del pH.....	23
6.4.2.2. Efecto de la temperatura.....	23
6.4.2.3. Efecto de la concentración/Actividad de agua .....	24
6.4.2.4. Efecto de la presencia de inhibidores .....	25
6.4.3. Ventajas del uso industrial de las enzimas .....	25
6.5.4. Enzimas utilizadas en la degradación de paredes celulares para la obtención de aceites vegetales.....	26
6.5.4.1. Pectinasas .....	27
6.5.4.2. Celulasas .....	27
6.5.4.3. Hemicelulasas.....	28
6.4.5. Antecedentes de empleo de enzimas en la extracción de aceites de diferentes fuentes .....	29
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>32</b>
<b>7.1. Materia prima.....</b>	<b>32</b>
7.1.1. Enzimas .....	32
<b>7.2. Análisis proximal.....</b>	<b>33</b>
7.2.1. Determinación de humedad .....	33
7.2.2. Determinación de grasa total ( extracto etéreo).....	33
7.2.3. Determinación de cenizas.....	34
<b>7.3. Caracterización del aceite.....</b>	<b>35</b>
7.3.1. Índice de acidez .....	35
7.3.2. Índice de Yodo .....	37
7.3.3. Índice de saponificación .....	39
7.3.4. Estabilidad de Oxidación de aceites .....	41
7.3.5. Perfil de ácidos grasos.....	42
<b>7.4. Diseño de la investigación - procedimiento experimental.....</b>	<b>43</b>
7.4.1. Diseño experimental .....	44
<b>8. Resultados .....</b>	<b>46</b>
8.1 Caracterización de la materia prima .....	46
8.2 Estudio de rendimientos de enzimas (Celulasa, Hemiselulasa, Peptinasa y viscozyme L.) en la extracción acuosa de semillas de higuera.....	47
8.3. Extracción acuosa de semillas de higuera.....	51
8.4. Extracción acuosa enzimática .....	56
8.5. Caracterización del aceite.....	58
8.6. Perfil de ácidos grasos.....	59

<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>60</b>
<b>10. Recomendaciones.....</b>	<b>61</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo I. Planta de Higuera.....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo II. Competencias Desarrolladas y Aplicadas.....</b>	<b>66</b>
<b>Competencias Desarrolladas y Aplicadas .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## Índice de figuras

Figura 1.- Anatomía de la higuera (Rendón, 2009).....	11
Figura 2.- Triglicérido del aceite de ricino (Cornejo, 2012).....	12
Figura 3. Semillas de higuera.....	46
Figura 4. Semillas de higuera secas y descascarilladas.....	46
Figura 5. Semillas de Higuera ( <i>Ricinus communis</i> ). ....	65
Figura 6. Planta de Higuera.....	65

## Índice de Tablas

Tabla 1.- Taxonómica de la planta de higuera. ....	11
Tabla 2.- Propiedades típicas del aceite de ricino. ....	13
Tabla 3.- Composiciones de ácidos grasos de aceite de ricino (Scholz, 2008) .....	14
Tabla 4.- Niveles de los factores que intervienen en el tratamiento enzimático.....	45
Tabla 5. Resultados del análisis proximal. ....	47
Tabla 6. Evaluación del rendimiento de la enzima celulasa. ....	48
Tabla 7. Evaluación del rendimiento de la enzima Hemicelulasa. ....	48
Tabla 8. Evaluación del rendimiento de la enzima Peptinasa. ....	49
Tabla 9. Evaluación del rendimiento del complejo enzimático Viscozyme L. ....	50
Tabla 10. Rendimiento obtenido de una mezcla del compuesto enzimático de Viscozyme L. + Peptinasa.....	51
Tabla 11. Evaluación de la temperatura, teniendo como óptimo la temperatura de 80° C.....	52
Tabla 12. Evaluación de la relación sólido: líquido, teniendo como óptimo la relación 1:4 .....	53
Tabla 13. Evaluación de pH, se observó que a partir de pH 5 a pH 7 el incremento del rendimiento se mantuvo. ....	54
Tabla 14. Evaluación de rpm, teniendo como óptimo 250 rpm. ....	54
Tabla 15. Evaluación del tiempo, se observó que el tiempo no tuvo una diferencia en el rendimiento de la extracción.....	55
Tabla 16. Niveles de factores codificados. ....	56
Tabla 17. Rendimientos promedio (%) de la extracción acuosa enzimática de aceite de semillas de higuera (Ricinus communis). ....	57
Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas de los aceites de semillas de ricino obtenidos por extracción Soxhlet (SE), extracción (AE), y extracción acuosa enzimática (AEE). ....	58
Tabla 19. Composición de ácidos grasos de aceites de semillas de ricino obtenida por diferentes métodos de extracción. ....	59
Tabla 20. Competencias Desarrollada y Aplicaciones .....	67

## **Agradecimientos**

A mi asesor el Dr. Arnulfo Rosales Quintero y a la Dra. Veymar Guadalupe Tacías Pascasio por su gran apoyo, paciencia y dedicación, especialmente por inspirarme cada momento a lograr mis metas y a seguir preparándome profesionalmente como ingeniero.

A mis padres Fernando Díaz Méndez y Brígida Suarez Gómez por lograr brindarme su apoyo incondicional, ya que sin su colaboración no hubiera logrado una meta mas en mi vida.

A mis amigos, por su gran amistad y a mi novia por su gran apoyo, paciencia y aprecio para lograr mi meta.

A mis profesores de la carrera que me brindaron su apoyo constante y los compañeros de laboratorio por su tolerancia.

## Resumen

En este proyecto se llevo a cabo la extracción de aceite de semillas de higuera mediante extracción acuosa y tratamiento enzimático usando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para lograr maximizar el rendimiento al emplear un tratamiento enzimático previo a la extracción con solventes para obtener aceite de semillas de higuera (*Ricinus communis*), el cual contiene un 56.64 % de aceite. También se evaluó el efecto que tiene este tratamiento sobre las características de la calidad de los aceites obtenidos. Los factores evaluados del tratamiento enzimático fueron: el tipo de enzima (Celulasa, Hemicelulasa, peptinasa y Vizcozyme L. un complejo enzimático con mezclas celulíticas con una actividad de amplia gama de carbohidrasas), concentración de enzima (2, 2.5, 3, 3.5, y 4% resp. al sustrato), relación solido: líquido (1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6), tiempo de hidrólisis (4, 5, 6, 7 y 8 horas) y las rpm (100, 150, 200, 250 y 300). Los óptimos obtenidos fueron: concentración de enzima=3.5%, relación solido: líquido= 1:3, tiempo de hidrólisis= 7 horas, rpm= 250 y el tipo de enzima fue vizcozyme L. lo que logro alcanzar un rendimiento experimental de 74.55% en comparación del rendimiento obtenido con la extracción convencional (sin aplicación de enzimas). En cuanto al efecto del tratamiento enzimático sobre la calidad del aceite; la humedad y compuestos volátiles, índice de refracción, índice de acidez, índice de acidez y índice de saponificación se ven significativamente afectados cuando se aplican enzimas al ser comparados con la extracción convencional; así mismo los ácidos grasos libre y el valor acido no se ve significativamente afectados. Es por ello que la aplicación de esta tecnología aplicando enzimas es viable y puede resultar rentable por los niveles de higuera que se produce a nivel nacional.



## Introducción

Los aceites esenciales, como extractos de plantas han sido utilizados desde tiempos remotos para la obtención de aromas y sabores. En los últimos años se han estudiado los extractos y aceites esenciales de semillas, condimentos y especias desde el punto de vista funcional. Se han realizado estudios si los aceites esenciales contienen actividad antimicrobiana, si tienen función como agentes antioxidantes o si aportan nutrientes (*Peredo, 2009*). Los métodos de extracción de los aceites determinan el uso de los mismos. Debido al disolvente puede contaminarse o limitar su uso, esto de acuerdo a su toxicidad del disolvente y el método utilizado para su eliminación.

Los métodos de extracción de aceites que se han registrado actualmente son: extracción mecánica, extracción por solventes. Una vez obtenidos los aceites se les da diferentes tipos de usos, que va desde el uso alimenticio como usos industriales en fabricación de cosméticos, fabricación de plásticos y empleado en la extracción y fabricación de hidrocarburos, es el caso del llamado biodiesel que por medio de una reacción de transesterificación. es obtenido, de manera simple, se puede realizar de aceites usados, así como diferentes tipos de grasas animales sino también todo tipo como de origen vegetal (*González, 2012*).

Los métodos más utilizados a nivel industrial de extracción de aceites de semillas son en las que hacen uso de solventes orgánicos, esencialmente hexano, y el prensado. El caso del primero es más eficiente, sin embargo, los solventes orgánicos utilizados son tóxicos e inflamables, como de altos costos energético y la desolventización daña las propiedades fisicoquímicas del aceite. Para conservar la calidad de los principios bioactivos del aceite, tales como ácidos grasos polinsaturados y antioxidantes, es conveniente un método de extracción suave como el prensado en frío, sin embargo este último presenta bajos rendimientos (*Hoffmann, 1989; Norris, 1982*).

Para la extracción de aceite de semillas oleaginosas se conocen diferentes métodos para la obtención, el uso de solventes con o sin pre-prensado procesos más utilizados a nivel industrial, en el cual la semilla se somete a extremas condiciones como altas presiones o temperaturas, resultando eficiente en cuanto a los

rendimientos de extracción, aunque la calidad del aceite como la harina desgrasada es disminuida (Hoffmann, 1989), causada por la inactivación de vitaminas y sustancias activas presentes en la materia prima.

Actualmente debido a las grandes desventajas de los métodos de extracción de aceites conocidos, ha surgido la importancia de investigar nuevos métodos alternativos para la obtención de aceites.

La extracción de aceite se realiza de forma convencional y aplicando un proceso de refinado que no conserva sus características nutritivas. Un método nuevo de mejorar la extracción de aceite es la extracción por métodos enzimáticos utilizando una tecnología limpia, como una alternativa para los procesos a nivel industriales ya que es más simple y ecológico, no requiere disolventes orgánicos; que son tóxicos e inflamables, que generan un alto costo energético y la desolventización daña la calidad del producto, ni se exponen a altas temperatura (Rubio y Beltrán, 2010)

Las ventajas que llevan a utilizar el método enzimático para extraer el aceite de las semillas es evitando emplear disolventes y altas temperaturas que destruyen los antioxidantes, por lo que el aceite es una fuente importante de ácidos grasos insaturados, con gran potencial antioxidante (Graciani, 2006)

La extracción enzimática acuosa (AEE) ha sido considerada como un método innovador para la extracción simultánea de aceite y proteína, basada en la hidrólisis enzimática de celulosa y hemicelulosa para disminuir las defensas tisulares de las semillas oleaginosas mediante la digestión de las paredes celulares. La eficiencia de la extracción de lípidos de las algas, y ayuda a liberar los compuestos deseados en la solución de extracción (Quiang Liu *et al.* 2019)

## **2. Descripción de la organización**

### **2.1. Nombre de la organización**

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

### **2.2. Ubicación de la organización**

Carretera Panamericana Km. 1080 s/n. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
C.P. 29050

Apartado Postal: 599

Teléfono: (961) 6150461

Fax: (961) 61 5 16 87

RFC: TNM140723GFA

CONTACTO: <http://www.ittg.edu.mx>

### **3. Problemas a resolver**

Actualmente en la extracción de aceites esenciales, se emplean diferentes métodos los más aplicados son los métodos químicos y físicos. Es decir, métodos de prensado en frío, pre-prensado, los cuales no afectan en mayor parte las propiedades físico químicas de la materia prima; pero una desventaja de este método es que tiene rendimientos bajos.

Los métodos químicos para la extracción de aceites mediante el uso de solventes, los más comunes son: hexano, éter de petróleo y otros derivados de petróleo, los cuales son tóxicos, y causan los daños en el producto, debido a la exposición de la alta temperatura que destruyen los antioxidantes y otras propiedades físicas del producto. La desventaja de este método es que el uso de solventes es causa de contaminación del medio ambiente, pues dichos solventes limitan su uso por su toxicidad y el método utilizado para su eliminación.

Es por esto que actualmente se propone el uso de enzimas como alternativas para lograr extraer aceites esenciales, siendo así una tecnología limpia, como una alternativa para los procesos a nivel industriales siendo un método ecológico, evitando así el uso de solventes orgánicos. Teniendo como ventaja evitar el uso de solventes y exponer a altas temperatura de la materia prima, conservando así sus antioxidantes y otras propiedades físicas del aceite.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

Optimizar la extracción de aceite de semillas de higuera mediante extracción acuosa y tratamiento enzimático

### **4.2. Objetivos particulares**

- Realizar un análisis proximal.
- Optimizar las condiciones para la extracción de aceite de las semillas de higuera mediante extracción acuosa variando la relación sólido/líquido, rpm, tiempo de agitación, pH y temperatura.
- Optimizar las condiciones para la extracción de aceite de las semillas de higuera mediante tratamiento enzimático variando la relación sólido/líquido, rpm, tiempo de agitación, pH, temperatura y porcentaje de enzima.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas del aceite obtenido en las condiciones óptimas.
- Evaluar un perfil de ácidos grasos y su capacidad antioxidante del aceite obtenido en las condiciones de mejor rendimiento.

## 5. Justificación

La planta de Higuierilla (*Ricinus communis* L.) es una opción de materia prima para la producción de aceite a partir de sus semillas, ya que en comparación de otros productos como: soja, girasol, canola, grasas o aceites animales; no compite con cultivos alimenticios por lo que es considerada una planta con semillas tóxicas. Actualmente el uso del aceite de Ricino ha generado un gran interés a nivel mundial debido a que es utilizada principalmente en producción de biocombustibles, en la industria de los cosméticos, farmacéutica, en la fabricación de pinturas, plásticos, lubricantes entre otros. Sin embargo, las reformas agrarias actuales de México prohíben consignar un terreno de cultivo alimenticio para la producción de bioenergéticos, debido, a que la Higuierilla podría considerarse en biocultivos o sembrarla en terrenos que no sean utilizados para el cultivo alimenticio. (Díaz Estrada,2015)

El aceite extraído de *Ricinus communis* L. (higuierilla) por sus características (lubricante, resistente a altas temperaturas, alta viscosidad y densidad), es un producto de los más empleados para la novedosa industria oleoquímica, que permiten su transformación en varios productos derivados del petróleo como el biodiesel.

En México el cultivo de la higuierilla no es considerada como un beneficio en sí, por lo que es considerada una maleza, es decir, no tiene la importancia o el impacto que tiene en otros países como España, Brasil, India entre otros debido a la falta de información sobre las propiedades físicas y el uso de su aceite extraído de las semillas.

La higuierilla tiene un fácil crecimiento, crece de manera silvestre, adaptándose a las condiciones climáticas ambientales de cada región, contiene un alto rendimiento de aceite en sus semillas, tiene bajos requerimientos de agua para crecer y cuenta con un ciclo de producción de frutos semestral de 5 años por planta como durabilidad; ahorrando un gasto económico de la siembra. (Armendáriz J.,2013)

El Ricino es una planta heliófila y xerófila; tiene la ventaja de poder adaptarse a ambientes áridos y amante al sol. Es originaria del este de África, considerablemente de Etiopía. Es decir que es una planta tolerante a la sequía, exigente en calor luminosidad (Cornejo, 2012).

La superficie cultivada de higuera a nivel mundial en el 2014 fue de 1'442,812 ha, con una producción total de 1'951,509 t de semilla. Los países productores más relevantes son: India con 1'040,000 ha, China 57,000 ha, Brasil 63,498 ha, y con una producción de grano de 1'644,000 t, 50,000 t y 37,572 t, respectivamente (FAOSTAT, 2017).

En 2015 a nivel mundial se importaron 602,816 t de aceite de higuera, los tres principales países importadores fueron China (226,984 t), Francia (67,716 t) y Estados Unidos (60,791 t), con valor total de 842.179 millones de dólares, y para los tres países importadores esto representó 291.829, 93.924 y 91.304 millones de dólares, respectivamente. Por otra parte, México importó 3,723 t de aceite de higuera, con un valor de 6.965 millones de dólares (Trade Map, 2016).

## 6.- Marco teórico

### 6.1. Higuera

Higuera (*Ricinus communis*)

La higuera es una planta herbácea en los países de clima templado, arborescente, y con 8-10 m de altura en los intertropicales y subtropicales [8], esto incluye a países como Colombia. Se adapta a suelos de baja calidad y clima semiárido, por su sistema radicular, que busca humedad en profundidad y hojas con sistema de cierre de estomas (puntos de intercambio de ), que disminuye la evapotranspiración.

En condiciones climáticas favorables, con un alto grado de humedad ambiental y calor adecuado, puede alcanzar varios metros de altura, así en estado silvestre es un árbol que alcanza los 10 metros de altura.

La planta de higuera es originaria del sureste de la región mediterránea y de África del este, así mismo se presume tener su origen en la India, como ser nativa de América. En la actualidad se ha distribuido por todas las regiones tropicales del mundo, principalmente en lugares con climas cálidos, tropicales, por ser una planta heliófila y xerófila puede adaptarse a los climas secos. La higuera se desarrolla fácilmente como una planta “nativa”( Comar.et.al; 2004).

Las semillas de la higuera se caracterizan su compuesto de aceite fijo (el oleum ricino), en el que entre 35% a 55% lo constituyen los glicéridos de los ácidos ricinoleico, isoricinoleico, ricina y ricinina (un alcaloide con fórmula  $C_8H_8N_2O_2$ ). Las semillas de higuera se componen de grasas en un promedio de 70%, del que el 68% corresponde a tricinoleína (un glicérido del ácido ricinoléico), 20% son proteínas, y el resto le corresponde a la ricina (una albúmina de toxicidad, que a dosis de mínimo 0.03 gramos se considera letal, y que a su vez correspondería a 25 gramos de semillas) y a las enzimas con presencia de lipasa (que en la aplicación industrial se emplean en la producción de detergentes, aun en la industria de leche, queso, panaderías, para mejoras en los sabores, bebidas, etc.) y vitaminas como la E (Leal, 2009).



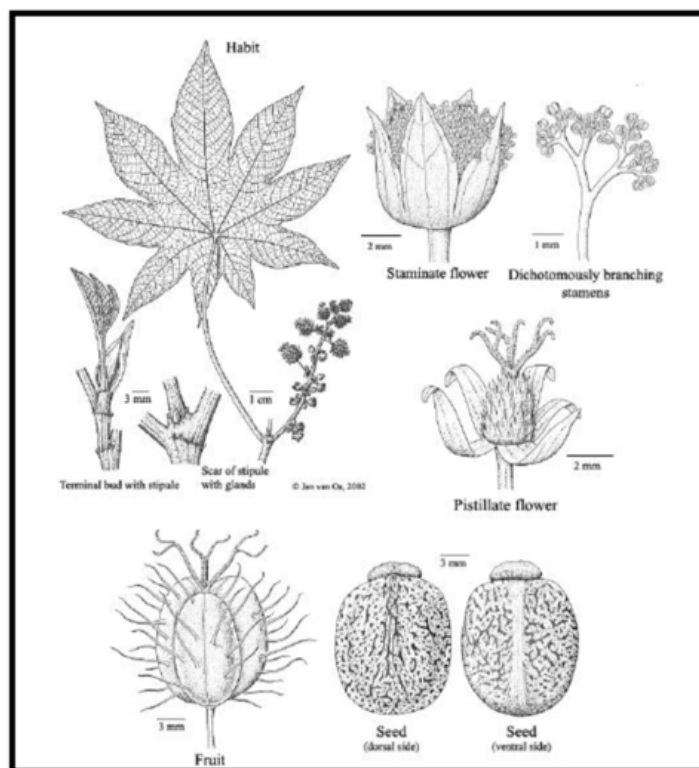


Figura 1.- Anatomía de la higuera (Rendón, 2009)

Tabla 1.- Taxonómica de la planta de higuera.

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Traqueobionta</i>
Supervisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbiales</i>
Nombre científico	<i>Ricinus communis</i>

### 6.1.1. Aplicaciones principales del aceite de ricino

El producto principal de la higuera es el aceite, llamado “aceite de ricino” o “castor oil”. Es una materia prima importante para la industria química. Es utilizada en la composición de numerosos productos como pinturas, barnices, cosméticos, lubricantes, plásticos, etc. El aceite de higuera posee características químicas que lo califican como el único de su naturaleza. Está compuesto casi que exclusivamente (90%) de un único ácido graso (ácido ricinoleico) que contiene un radical hidroxilo que lo hace soluble en alcohol a baja temperatura, es muy viscoso y con propiedades físicas especiales.

### 6.1.2. Aceite de ricino

El aceite de higuera llamado también aceite de ricino o “castor oil” se extrae de las semillas de la higuera o ricino (*Ricinus communis*). Su principal componente es el ácido ricinoléico (ácido cis-12-hidroxi octadeca-9-enoico), el cual se encuentra formando el triglicérido simple denominado triricinoleína (figura 2), cuya concentración en porcentaje por peso es cercana al 90%. Adicionalmente, en el aceite de higuera se pueden encontrar pequeñas cantidades de tripalmitina, triestearina y otros triglicéridos mixtos. Dada su naturaleza química, el aceite de higuera es un líquido altamente viscoso, miscible en alcohol y ácido acético y de bajo punto de solidificación (Aguilera, 2014).

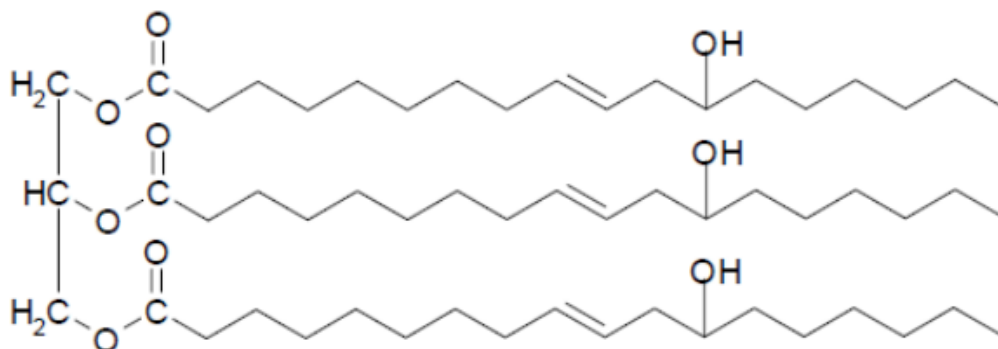


Figura 2.- Triglicérido del aceite de ricino (Cornejo, 2012)

El aceite de ricino, como todos los otros aceites vegetales, tiene diferentes propiedades físicas y químicas que varían con el método de extracción. El aceite de

ricino prensado en frío tiene un valor bajo de acidez, bajo índice de yodo y un índice de saponificación ligeramente superior al del aceite extraído por solvente, y es de color más claro. Las propiedades típicas se dan a continuación (Tabla 2)

*Tabla 2.- Propiedades típicas del aceite de ricino.*

Propiedades	Aceite prensado en frío	Aceite extraído por solvente	Aceite deshidratado
Gravedad específica	0.961 – 0.963	0.957 – 0.963	0.926 – 0.937
Valor ácido	3	10	6
Valor de yodo	82 - 88	80 - 88	125 – 145
Valor saponificación	179 - 185	177 - 182	185 - 188

### 6.1.3. Composición química

Al igual que otros aceites vegetales, el aceite de ricino es un triglicérido de diversos ácidos grasos y alrededor de 10% de glicerina. Los ácidos grasos constan de aproximadamente 80- 90% de ácido ricinoleico, 3-6% de ácido linoleico, 2-4% de ácido oleico y 1-5% de ácidos grasos saturados (ácidos esteárico, palmítico, dihidroxiesteárico y eicosanoico). También contiene ácido linolenico (alrededor del 0.3%). El alto contenido de ácido ricinoleico es la razón para el valor versátil del aceite de ricino en la tecnología ya que la presencia de grupos hidroxilo y dobles enlaces hace que el aceite sea adecuado para muchas modificaciones y reacciones químicas (ver tabla 3). En comparación con otros aceites vegetales, el aceite de ricino tiene una muy alta proporción de ácidos grasos insaturados (18:1).

Una proporción relativamente alta de estos ácidos puede encontrarse sólo en el aceite de girasol de alto oleico (HO), que aparece, sin embargo, como ácido oleico. En el aceite de higuera es ácido ricinoleico, el único ácido graso insaturado con una función hidroxilo en el carbono 12 que aparece en los aceites vegetales naturales. La viscosidad extraordinariamente alta del aceite de higuera se atribuye a la presencia de este grupo hidroxilo (Scholz, 2008).

Tabla 3.- Composiciones de ácidos grasos de aceite de ricino (Scholz, 2008)

Ácido graso		Proporción	
		Aceite de higuera	
		Según DIN	Según Bockisch
		55939(%) [García,2009]	(%) [Ogunniyi, 2006]
Ácido ricinoleico	C 18:1-OH	86-92	82-90
Ácido linoleico	C 18:2	2.8-6	3.0-6
Ácido oleico	C 18:1	2.5-4	2.0-4
Ácido palmítico	C 16:0	1-1.5	1-1.5
Ácido esteárico	C 18:0	0.5-1.5	-
Ácido linolenico	C18:3	0.2-0.8	0.2-0.6

#### 6.1.4. Propiedades físicas

El aceite de higuera es un aceite inodoro, viscoso y no secante, que en su estado natural tiene un sabor suave inicialmente y después es desagradable; es de color amarillo-verde a amarillo-marrón. En su estado procesado también puede ser claro. A diferencia de otros aceites se caracteriza por su indigestibilidad, solubilidad en alcoholes en cualquier proporción, pero tiene una limitada solubilidad en disolventes alifáticos de petróleo, alta higroscopicidad y viscosidad extraordinariamente alta. Con un índice de yodo inferior a 90, el aceite de higuera es un aceite no secante. Los largos tiempos de almacenamiento no representan un problema en condiciones herméticas (Ogunniyi, 2006, Scholz, 2008).

En cuanto a las propiedades relacionadas con el combustible, el alto valor calorífico y el alto índice de cetano son una ventaja junto con el bajo contenido de fósforo y residuos de carbono. La desventaja es que el aceite de ricino tiene una viscosidad significativamente más alta a temperaturas menores de 50 oC, y posiblemente también una compresibilidad más alta, que otros aceites vegetales. Esto puede causar problemas en la extracción y la inyección.

Una desventaja adicional es su higroscopicidad, que causa un contenido de agua relativamente alto, y por ende, posiblemente, el crecimiento de algas, problemas de

filtración y corrosión. El aceite de ricino también se caracteriza por su extraordinaria estabilidad oxidativa y baja temperatura. Se afirma que, con excepción de la viscosidad, densidad y número de cetano, no hay limitaciones en el uso de ésteres a base de aceite de higuera como combustible y que puede ser posible cumplir con los valores límite de dilución o mezcla con el combustible diesel convencional (Scholz, 2008).

## **6.2. Lípidos**

La palabra lípidos proviene del griego lipos, que significa grasa y cuya aplicación no ha sido bien establecida, originalmente se definía como una sustancia insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos como cloroformo, hexano y éter de petróleo (Badui, 2006).

Los lípidos son grupos de compuestos constituidos por carbono, hidrogeno y oxigeno que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque también contiene fosforo y nitrógeno, desempeñan, muchas funciones en los tejidos, además de que son la fuente energética más importante, ya que cada gramo genera 9 Kcal (38.2 KJ). Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos y contribuyen a la textura y en general a las propiedades generales de la nutrición; no hay una distinción entre ambos grupos, aun cuando algunos consideran que las grasas son de origen animal y los aceites de origen vegetal o bien las grasas son sólidas a temperatura ambiente, mientras que los aceites son líquidos. Sus principales fuentes son las semillas oleaginosas y los tejidos animales (Badui, 2006).

### **6.2.1. Importancia de las grasas y los aceites**

Los aceites y las grasas han sido reconocidos como nutrientes esenciales tanto en las dietas de los animales como en la de los humanos. Constituyen la fuente de energía más concentrada conocida, aportan ácidos grasos esenciales (precursores de importantes hormonas, las prostaglandinas). El conocimiento de la composición

química de las grasas y aceites y de las fuentes a partir de las que se obtiene es esencial para comprender la nutrición y la bioquímica de las grasas. (Steven Ziller *et al.* 1994).

## **6.2.2. Clasificación de los lípidos**

Los lípidos se clasifican según sus propiedades físicas o químicas que los caracterizan. Una manera de clasificarlos a los lípidos es dividirlos en tres grandes grupos en función de su estructura química.

### **6.2.2.1. Ácidos grasos**

En forma pura, todas las grasas y los aceites están constituidos exclusivamente por triacilgliceridos (o triglicéridos), los que a su vez son esteres de ácidos grasos con glicerol, por consiguiente, dichos ácidos representan un gran porcentaje de la composición de los triacilgliceridos y en consecuencia de las grasas y los aceites (Badui *et al.* 2006).

Los triglicéridos se componen fundamentalmente de tres ácidos grasos unidos por enlaces éster a una molécula de glicerol. 100 gramos de grasa rinden aproximadamente 95 gramos de ácidos grasos.

Las propiedades de físicas y químicas de las grasas dependen en gran medida de los tipos y proporciones de los ácidos grasos que los constituyen, así como del modo en que se distribuye en el esqueleto del glicerol. La variabilidad de estos parámetros es el resultado de las exigencias fisiológicas del animal o de la planta que las produce. (Ziller, *et al.*, 1994). Los ácidos grasos se producen industrialmente a partir de diferentes fuentes de grasas y se utilizan en la elaboración de diferentes tipos de aditivos en la industria alimentaria. Los de 16 a 18 carbonos, palmítico, oleico y estérico, se emplea como emulsificante en forma de sus respectivos esteres, además las sales de calcio y magnesio del palmítico y del esteárico se usan como antiaglomerantes en vegetales deshidratados y en otros productos secos porque son insolubles en agua y, al recubrir las partículas sólidas repelen el agua y evitan la aglomeración.

Para su estudio los ácidos grasos se han dividido en dos grandes grupos los saturados y los insaturados (Badui *et al.* 2006).

### **6.2.2.2. Ácidos grasos saturados**

Varia de 4 a 26 carbonos y su temperatura o punto de fusión aumenta con el peso molecular o largo de la cadena; así los de C4 a C8 son líquidos a 25°C, mientras que los de C10 en adelante son sólidos y su solubilidad en agua es inversamente proporcional al peso molecular.

Los saturados son mucho más estables que los insaturados, ante la oxidación, sin embargo en condiciones de temperatura muy alta (más de 180°C), como llega a suceder en el freído, y en presencia de oxígeno, pueden sufrir reacciones oxidativas (Badui, 2006).

### **6.2.2.3. Ácidos grasos insaturados**

Debido a su insaturación, estos compuestos tienen una gran reactividad química ya que son propensos a la saturación y a transformaciones oxidativas y de isomerización. Son muy abundantes en los aceites vegetales y marinos; su temperatura de fusión disminuye con el aumento de las dobles ligaduras y siempre es menor que la de los saturados para una misma longitud de cadena. Los de una insaturación se llaman monoenoicos o monoinsaturados, y a los de más de una se les denomina polienoicos o poliinsaturados; en el primer caso, la mayoría presenta la doble ligadura entre los carbonos 9 y 10.

En los últimos años se han llevado a cabo diversas modificaciones genéticas que han permitido desarrollar semillas con perfiles de ácidos grasos distintos; algunos ya son una realidad comercial, mientras que otros están en proceso de desarrollo. Por ejemplo, el aceite de soya bajo en linolenico (<3%) y alto oleico (>80%), la palma baja en palmítico y en esteárico y alta en oleico; oleína de palma con bajo punto de enturbiamiento (<5°C); canola alta en oleico y baja en linolenico, girasol sin ceras, etc. Estas modificaciones, en general, le confieren más estabilidad a los aceites y facilitan su procesamiento industrial, en detrimento, en ocasiones de su valor

biológico para la reducción del contenido de ácidos grasos indispensable (Badui *et al.* 2006).

#### **6.2.2.4. Ácidos grasos sustitutos**

También llamados ácidos Hidroxigrasos, el más conocido es el ácido ricinoleico

#### **6.2.2.5. Acilgliceridos**

Son lípidos neutros o sin carga, derivados de la reacción de esterificación entre el glicerol y una, dos o tres moléculas de ácidos grasos en las posiciones 1,2 y 3 o  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  del glicerol (Badui *et al.* 2006)

#### **6.2.2.6. Fosfogliceridos**

Son diacilgliceridos cuyo glicerol está ligado a una molécula de ácido fosfórico, que a su vez, se enlaza a una base nitrogenada (colina o etanolamina), a la cerina o a un alcohol, como el inositol.

Se oxidan fácilmente, pero en algunos casos funcionan como antioxidantes naturales que protegen a los lípidos que lo contienen; es decir, de acuerdo con su concentración, pueden actuar como antioxidantes o como prooxidantes (Badui *et al.* 2006).

#### **6.2.2.7. Ceras**

Son ésteres de un alcohol monohidroxilado de cadena larga como un ácido graso, son muy resistentes a la hidrólisis. Funcionan como agentes protectores en la superficie de las hojas, los tallos y los frutos, al igual en el pelo, la lana y las plumas de los animales y en los peces; son sólidos en frío, pero líquidos y moldeables en caliente y su temperatura de fusión varía de 40 a 100°C.



### **6.2.2.8. Esteroles**

Son sustancias integradas por el grupo perhidrociclopentanofenantreno, una cadena hidrocarbonada y un grupo alcohol, y se encuentra tanto en el reino vegetal como en el animal (Badui *et al.* 2006).

Se oxidan fácilmente, pero en algunos casos funcionan como antioxidantes naturales que protegen a los lípidos que lo contienen; es decir, de acuerdo con su concentración, pueden actuar como antioxidantes o como prooxidantes (Badui *et al.* 2006).

## **6.3. Métodos de extracción de aceites**

El propósito principal de emplear métodos de recuperación o extracción de aceites es obtener triglicéridos con un alto rendimiento y pureza para generar co-productos de máximo valor. Las fuentes oleaginosas son procesadas por uno de los siguientes tipos de procesos: Extracción mecánica (proceso discontinuo y continuo) y la extracción por solventes. El tipo de proceso extractivo preferido depende de la cantidad del aceite presente en la semilla, la cantidad de aceite residual en la torta, la cantidad de proteína desnaturalizada permitida, la capacidad de inversión y el impacto ambiental generado (O'Brien, 2009).

Desde hace muchos años los aceites han sido un papel importante en la vida del ser humano, debido a que en casos lo han empleado como fuente de energía, al utilizarlo como combustible en las antorchas para generar luz.

Las grasas vegetales se obtienen extrayendo el aceite con solvente o exprimiendo la semilla oleaginosa mediante presión. Históricamente se emplea un sistema que consistía en exprimir la semilla en frío o en caliente. Estos métodos han sido sustituidos por la extracción con solvente sola o combinada con un prensado previo que mejora el rendimiento (Ziller *et al.* 1994).

### **6.3.1. Prensado discontinuo**

Este es el procedimiento más antiguo y casi único de extracción de aceite (Bailey, 1984). Se basa en la aplicación de la presión sobre una masa de productos oleaginosos confinados en bolsas, telas, mallas u otros artificios adecuados. Las prensas discontinuas se pueden dividir en dos tipos principales: las “abiertas”, en las cuales el producto oleaginoso debe estar encerrado entre filtros de tela; y en las “cerradas”, que prescinden de esos filtros y en las cuales la materia oleaginosa se introduce en una especie de jaula.

Este mismo autor menciona que el rendimiento en la obtención de aceite por prensado mecánico depende de una serie de factores relacionados con la afinidad del aceite por los sólidos de las semillas. Entre estos factores se encuentra: el grado de humedad, método de cocción y composición química de la semilla; además las semillas alteradas retienen, generalmente, más aceite que las sanas. Para una carga determinada de semillas, acondicionada y lista para prensado, el rendimiento en aceite depende de la velocidad a que se aplica la presión, el máximo de ésta, tiempo de drenaje del aceite a la presión total y temperatura o viscosidad del aceite (Bailey, 1984). La torta generada en este proceso tiene un contenido de aceite residual desde 15 hasta 18% (O’Brien, 2009).

### **6.3.2. Prensado continuo**

El aparato que se utiliza comúnmente para extraer el aceite de la materia oleaginosa es el “expeller”, el cual es un dispositivo mecánico que utiliza un tornillo horizontal con un diámetro del cuerpo creciente cuyo objetivo es aumentar la presión sobre la materia prima a medida que avanza a través del tornillo. El cilindro alrededor del tornillo está perforado de tal manera que permite incrementar la presión interna para que en primera instancia desaloje el aire y posteriormente el aceite a través del cilindro. Al final de todas las operaciones, se suele hacer pasar el aceite por un filtro prensa para eliminar aquellas partículas que, por su tamaño pequeño, no han sido separadas por las rejillas (Shahidi, 2005).

La torta proveniente del expeller presenta un contenido de aceite residual entre 3 y

10%. Esta torta es normalmente transformada en harina y expandida como fuente proteica (O'Brien, 2009).

### **6.3.3. Método químico**

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido utilizada tradicionalmente para obtener lípidos de fuentes animales y vegetales, para el caso de las micro algas, el solvente es por lo general adicionado a la biomasa seca aunque en algunos casos es utilizado en biomasa con cierta cantidad de agua, lo que disminuye los costos globales del proceso, pero disminuye también la eficiencia de la extracción. (González *et al.* 2009).

Una metodología basada en solventes químicos fue propuesta por Folch *et al.* En 1957, la cual extrae lípidos tanto polares, como no polares, esto se logra debido a la utilización de un solvente apolar, el cual disuelve los lípidos neutros, en combinación con un solvente relativamente polar, el cual disuelve los lípidos polares presentes en la muestra sometida a extracción, estas propiedades de los solventes fueron originalmente aprovechadas para desarrollar un método basado en la mezcla metanol/cloroformo, seguido de una purificación de los extractos con una solución de KCl. El aceite de ricino posee una composición química peculiar, debido al alto contenido (87-97%) de ácido ricinoleico (ácido cis-12-hidroxi octadeca-9-enoico). La presencia del grupo hidroxilo provee de características únicas tanto al aceite de ricino como a sus derivados: polaridad, alta viscosidad y gravedad específica, además de permitir su completa solubilidad en alcoholes. (García y cota., *et al.* ; 2009).

Un inconveniente que presentan los métodos de extracción con solvente químico son las grandes cantidades de dichos solventes que se deben utilizar para obtener cantidades significativas de aceite, esto implica mayores costos de operación, una alternativa para la disminución de estos costos es la reutilización de solvente, sin embargo, esto disminuye la eficiencia de la extracción, ya que la pureza del solvente es la fuerza impulsora de la transferencia de masa. (González *et al.* 2009).

### **6.3.3.1. Extracción con solventes**

Este método es el más eficiente. El proceso de extracción con solventes empieza cuando se pone en contacto la materia prima oleaginosa con el solvente. Las micelas del solvente que se encuentran en la superficie del material se difunden a través de la pared celular hacia los cuerpos oleosos localizados dentro de las células. La micela rápidamente solubiliza a los cuerpos oleosos. Mientras las micelas continúan entrando y solubilizando al aceite, la presión interna se acumula y la micela concentrada se difunde de regreso fuera de la célula. Esta micela concentrada se difunde a través de las paredes de las células adyacentes y eventualmente alcanza la superficie de la partícula. Una vez que la micela concentrada alcanza a las demás de afuera del material oleaginoso, se solubiliza con ellas y las concentra. Este proceso continúa hasta que la concentración de las micelas dentro de las células del material oleaginoso se equilibre con la concentración de la micela fuera del material (Shahidi, 2005).

Una vez que termina el proceso extractivo, se procede a la separación de las partículas agotadas de las micelas concentradas con el aceite. Esto se puede realizar en una centrifuga o en un filtro. Luego de la separación de los sólidos, se buscará separar las micelas del solvente del aceite; esto se logra mediante una destilación fraccionada en la que se obtiene por separado el aceite y el solvente recuperado (Shahidi, 2005).

Los solventes se pueden emplear tanto para extraer el aceite residual a partir de tortas provenientes de prensado hidráulico (con un contenido de 15- 18% de aceite) como para oleaginosas íntegras en forma de hojuelas (previamente extruidas con el fin de expandir la estructura de la semilla y facilitar el ingreso del solvente) (O'Brien, 2009).

## **6.4 Aplicación de enzimas en la extracción de aceites**

### **6.4.1. Definición de enzima**

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica. Como todas las proteínas, están formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El que una proteína tenga actividad catalítica, es decir enzimática, depende de su secuencia de aminoácidos que determina la conformación de la cadena. Solamente unos pocos grupos reactivos de la proteína enzimática, que se sitúan en el llamado centro activo, son responsables de la catálisis (Nelson y Cox, 2005).

El centro activo se compone del centro catalítico y del centro de enlace (separados espacialmente). El primero es el responsable de la naturaleza química de la reacción catalizada (especificidad de acción), el segundo de la afinidad por el sustrato (especificidad de sustrato). Mientras que el centro catalítico puede ser relativamente inespecífico, la especificidad del centro de enlace es extremadamente alta, de tal forma que solo unas pocas sustancias de naturaleza química muy parecida pueden ser empleadas como sustrato (Nelson y Cox, 2005).

## **6.4.2.-Factores que influyen en la actividad enzimática**

### **6.4.2.1. Efecto del pH**

La mayoría de las enzimas posee un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH, la actividad disminuye. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, así como de otros muchos factores que son por lo general difíciles de analizar cuantitativamente (Nelson y Cox, 2005). Este comportamiento ácido-base de la enzima depende de los grupos ionizables que posee, ya que los cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo (Wiseman, 1991).

### **6.4.2.2. Efecto de la temperatura**

Al igual que ocurre con la mayoría de reacciones químicas, las velocidades de las

reacciones catalizadas por enzimas se incrementan con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activo. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica, aproximadamente, por cada 10 °C de aumento de la temperatura ( $Q_{10} = 2,0$ ) (Nelson y Cox, 2005).

Aunque las reacciones catalizadas por los enzimas parecen, con frecuencia, poseer una temperatura óptima, el pico que se observa al representar la actividad catalítica frente a la temperatura se produce porque las enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por acción del calor y se inactivan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa un cierto punto. La aparente temperatura “óptima” es, por tanto, la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica del enzima al sobrepasar una temperatura crítica (Nelson y Cox, 2005).

#### **6.4.2.3. Efecto de la concentración/Actividad de agua**

Normalmente las actividades de las enzimas tienen lugar in vitro en medios acuosos, aunque las reacciones enzimáticas in vivo pueden ocurrir no sólo en el citoplasma, sino también en las membranas celulares, en los depósitos de lípidos y en el sistema de transporte electrónico, donde se sabe que la transferencia de electrones ocurre en una matriz lipídica (Fennema, 2000).

Existen diversos métodos para evaluar el efecto de la actividad de agua sobre las enzimas. Uno de ellos consiste en desecar cuidadosamente una muestra biológica no calentada (o sistema modelo) que contenga actividades enzimáticas, equilibrarla a varias actividades de agua y medir la actividad enzimática. De esta manera se ha observado que por debajo de una actividad de agua de 0,35 (menos de uno por ciento del agua total) no hay actividad de la fosfolipasa sobre la lecitina. Otro caso observado es el de la  $\beta$ -amilasa, la cual no tiene actividad sobre el almidón hasta alrededor de una actividad de agua de 0,8 (aproximadamente un dos por ciento del agua total); su actividad aumenta unas quince veces hasta 0,95 (aproximadamente doce por ciento del agua total). A partir de estos ejemplos, se pudo concluir que el contenido total de agua tiene que ser menos que 1-2 % para evitar la actividad

enzimática (Fennema, 2000).

#### **6.4.2.4. Efecto de la presencia de inhibidores**

A partir del estudio de los inhibidores de las enzimas se ha obtenido información de importancia sobre el mecanismo y los caminos de la catálisis enzimática, la especificidad de sustrato de las enzimas, la naturaleza de los grupos funcionales en el centro activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la molécula de la enzima (Nelson y Cox, 2005).

Muchos otros productos de origen animal y vegetal contienen sustancias capaces de inhibir la actividad catalítica de algunas enzimas: su función biológica no es muy clara, aunque en muchos casos forman parte de diversos mecanismos reguladores o de defensa contra depredadores. Entre los inhibidores más conocidos están los que evitan la acción de proteasas, que se encuentran en las leguminosas y en el maíz, trigo, arroz, la papa y otros alimentos. Además de estos existen otros inhibidores de proteasas, como el ovomucoide y el ovoinhibidor de la clara de huevo. Los cereales contienen inhibidores de amilasas, cuya función es proteger contra los depredadores, impidiendo la degradación del almidón, y por tanto el desarrollo de infecciones. También se han identificado inhibidores de lipasas y de algunas enzimas pépticas (Badui, 1990).

#### **6.4.3. Ventajas del uso industrial de las enzimas**

En la actualidad se conocen miles de enzimas, sólo algunas se producen a escala industrial para emplearse tanto en la manufactura de alimentos como de las materias primas para su elaboración. Cada día aumenta el número de reacciones que se efectúan por rutas enzimáticas, y esta tendencia seguramente aumentará a medida que existan más catalizadores de este tipo en el comercio, a precios accesibles (Badui, 1990).

El empleo de enzimas tiene muchas ventajas, entre ellas destacan:

- Son de origen natural y por lo tanto no deben ser tóxicas.
- Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables.
- Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y de pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni de equipos muy costosos.
- Actúan a bajas concentraciones.
- Su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de la enzima.
- Son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado.

Por otra parte, la principal limitante es que algunas de ellas son muy costosas y no se consiguen fácilmente; sin embargo, es conveniente hacer un balance de las ventajas y desventajas que trae consigo llevar a cabo una determinada reacción con enzimas, o con otros métodos químicos o físicos. Cabe indicar que en este sentido hay muchas innovaciones tecnológicas que están logrando hacer esta tecnología más económica, como es el caso de la ingeniería genética que modifica el material genético de los microorganismos y los hace sobre productores de enzimas (Badui, 1990).

#### **6.5.4. Enzimas utilizadas en la degradación de paredes celulares para la obtención de aceites vegetales**

La pared celular vegetal está compuesta por dos membranas: la primera compuesta de una matriz amorfa de pectina, hemicelulosa y proteínas con microfibrillas de celulosa; y la segunda prevalecen la celulosa y hemicelulosa (Sineiro *et al.* 1998). Las enzimas utilizadas para degradar paredes celulares son del tipo carbohidrasas, las cuales generalmente son específicas para un enlace glucosídico en particular (Reed, 1975).



Por esta razón, Sineiro *et al.* (1998) recomiendan emplear celulasas y hemicelulasas. Las pectinasas son también efectivas, sobre todo en vegetales y frutas ya que las pectinas son componentes estructurales de estos.

#### **6.5.4.1. Pectinasas**

El término pectinasas o enzimas pectolíticas concierne sólo a enzimas que degradan la parte galacturónica de estas sustancias. Así las enzimas que degradan las cadenas laterales (arabinasa, galactanasas, etc.) no son consideradas dentro de las enzimas pectolíticas. En consecuencia, las enzimas que degradan los enlaces  $\alpha$ -1,4 entre los residuos del ácido galacturónico y las enzimas desesterificantes de estos ácidos constituyen el grupo de pectinasas (Bruchmann, 1980).

Las pectinasas se pueden clasificar en (Bruchmann, 1980):

**Pectinestearasas:** La enzima solo separa grupos metilo que se encuentren en la proximidad de grupos carboxilo libres. La pectina totalmente esterificada con metanol es atacada lentamente. La hidrólisis empieza por un extremo y va progresando en la dirección de formación de la cadena. La pectinestearasa es una enzima muy específica que ataca casi únicamente a los grupos metilos de las sustancias pépticas.

**Poligalacturonasas:** Las enzimas de este tipo hidrolizan en general enlaces  $\alpha$ -1,4-D-galacturonidos en los pectatos y otros galacturónidos. Se pueden distinguir varios tipos de actividades dependiendo de si las cadenas de pectina son descompuestas cuando están metiladas o cuando no lo están, y si el ataque empieza por cualquier punto no seleccionado (endoenzimas) o por el final de la cadena (exoenzimas).

**Pectatoliasas:** Esta enzima elimina restos  $\Delta$ -4,5-D-galacturónicos de la pectina, ejerciendo así una despolimerización no hidrolítica.

#### **6.5.4.2. Celulasas**

Las celulasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4-glucano de las cadenas de celulosa y de sus productos de degradación dando como molécula final a la glucosa (Bruchmann,

1980). La celulasa no es ninguna enzima aislada sino un sistema enzimático que posee por lo menos tres actividades: endoglucanasa (EC.3.2.1.4), celobiohidrolasa (EC. 3.2.1.91), exoglucosidasa (EC. 3.2.1.74) y  $\beta$ -glucosidasas (EC. 3.2.1.21) (Fennema, 2000).

La mejor fuente de obtención de preparados técnicos capaces de atacar a la celulosa cristalina es el hongo *Trichoderma viride*. También los preparados obtenidos a partir del *Aspergillus niger* tienen cierta importancia (Bruchmann, 1980).

El pH óptimo de los sistemas celulolíticos suele estar entre 4 y 6. Son termoestables y la temperatura óptima para alguno de ellos se encuentra alrededor de 60 °C (Bruchmann, 1980). Además, Reed (1975) menciona que estas enzimas son fuertemente inhibidas por gluconolactonas.

#### **6.5.4.3. Hemicelulasas**

Existen varias endo- y exo- pentanasas (hidrolasas), debido a la gran complejidad de las hemicelulosas. Las enzimas de tipo endo- son de dos tipos: las arabanasas que hidrolizan los enlaces glucosídicos 1,4- $\alpha$ -D-arabinopiranosilo en el esqueleto lineal de los arabanos y las xilanasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos 1,4-  $\beta$ -D-xilanopiranosilo en xilanos y arabinoxilanos. Las enzimas del tipo exo- de un primer grupo actúan en el extremo no reductor de los arabanos (las arabinosidasas), xilanos (xilosidasas) y las arabinoxilanos (xilanosidasas). Los enzimas del tipo exo- del segundo tipo (arabinosidasas) eliminan unidades arabinofuranosílicas laterales de los arabinoxilanos (Fennema, 2000).

Algunos hongos producen cantidades considerables de pentosanasas. También existen varias endo y exo pentosanasas en niveles muy bajos en el trigo. La concentración de algunas pentosanasas aumenta en unas 6-10 veces durante la germinación de las semillas. Se cree que las pentosanasas están primariamente localizadas en el salvado, pero se desconoce dónde están localizadas las enzimas que son sintetizadas de nuevo durante la germinación (Fennema, 2000).

#### **6.4.5. Antecedentes de empleo de enzimas en la extracción de aceites de diferentes fuentes**

Domínguez *et al.* (1994) mencionan que existen muchas aplicaciones de enzimas en extracción de grasas y aceites como: extracción de aceites, producción de mono y diglicéridos, transformaciones de esteroides y ácidos grasos, etc. En el caso de procesos de extracción de aceites, dos ventajas son ofrecidas por este tratamiento: los rendimientos más elevados y la mejor calidad de las tortas obtenidas. Hace algunas décadas, esta tecnología no era considerada viable debido al alto costo de las enzimas. Sin embargo, en estos últimos años, con el desarrollo de la ingeniería genética y la biotecnología, es posible obtener enzimas con un precio significativamente menor.

Wiseman (1991) menciona que existen varias publicaciones acerca del empleo de enzimas en la extracción de aceites a partir de pescados, levaduras y semillas de colza, palma y soya. Por ejemplo, las celulasas y pectinasas se emplean en la extracción del aceite de palma. En la soya y el pescado, la mayor parte del aceite está asociado con proteínas, de forma que la adición de proteasas incrementa el rendimiento de aceite y de proteína.

La acción enzimática, al igual que el tratamiento térmico o mecánico, daña las paredes celulares, aumentando la permeabilidad del aceite. Un gran número de enzimas ha sido utilizado para mejorar la extractibilidad del aceite de semillas: amilasas, glucanasas, proteasas, pectinasas, asimismo las celulasas y hemicelulasas. (Domínguez *et al.*, 1994)

Taha y Hassanein (2007) trabajaron en un tratamiento enzimático aplicado a semillas de algodón. Utilizaron proteasas de diferentes fuentes, puras y mezcladas. Estos autores reportan un incremento en la extractabilidad del aceite de 27,73 por ciento en comparación con el control. Estos dos investigadores aplicaron una extracción mecánica.

Por otra parte, Zúñiga et al. (2003) reportan un rendimiento de extracción de 98,6 por ciento al aplicar una mezcla de enzimas sobre avellanas (Guevina avellana mol). Estos autores trabajaron con un doble prensado a 39.2 MPa con la aplicación previa de un precalentamiento de la materia prima.

Ranalli y Serraiocco (1996) evaluaron el efecto de la aplicación del complejo enzimático "Olivex" sobre tres variedades de frutos de olivo. El método de extracción utilizado fue uno mecánico el cual se trabajó a una presión máxima de 380 kg/cm<sup>2</sup>. Bajo estas condiciones, estos investigadores obtuvieron un rendimiento de 88,8 por ciento en base al fruto.

Soto *et al.* (2007) aplicaron una mezcla de complejos enzimáticos "Olivex" y Celulasas sobre borrajas. El mayor rendimiento se obtuvo trabajando bajo las siguientes condiciones: doble prensado (39,2 MPa), precalentamiento de la materia prima (70 °C por 5 minutos) y condiciones específicas para el tratamiento enzimático (0,25 por ciento de enzimas, temperatura de reacción de 45°C, 20 por ciento de humedad y nueve horas de reacción); con lo cual el rendimiento se elevó por encima de 95 por ciento a comparación del tratamiento control que se encuentra por debajo de 90 por ciento. Además, estos autores reportan que la calidad del aceite obtenido no cambió significativamente.

Badr y Sitohy (1992) optimizaron el tratamiento enzimático para la extracción acuosa de aceite de semillas de girasol. Estos investigadores utilizaron celulasas, hemicelulasas, pectinasas y proteasas de diferentes fuentes. El mayor rendimiento reportado fue el de la proteinasa ácida (57, 08 por ciento) respecto al tratamiento control (41,6 por ciento), las que fueron tratadas bajo las siguientes condiciones: 2 por ciento de concentración de enzima, 30 por ciento de concentración de sustrato y un tiempo de reacción de tres horas.

Domínguez et al. (1995) obtuvieron aceite de soya a partir de una extracción acuosa de las habas previamente acondicionadas y tratadas enzimáticamente con complejos multienzimáticos. Estos autores obtuvieron un incremento en el

rendimiento de extracción de 10 por ciento respecto al proceso de extracción acuoso.

Latif y Anwar (2008) trabajaron con semillas de moringa (*Moringa concanensis*) a las que sometieron a una extracción acuosa asistida y no asistida (control) con complejos enzimáticos. El contenido de aceite de la semilla reportado es de aproximadamente 38,4 por ciento. Las condiciones del tratamiento enzimático que se emplearon fueron las siguientes: 2 por ciento de concentración de enzima. Con el tratamiento control se obtuvo un rendimiento de 15,41 por ciento mientras que con el tratamiento enzimático con el complejo "Kemzyme" (mezcla de  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -glucanasa, celulasas, proteasas y xilanasas) fue de 27,46 por ciento.

Guerra y Zúñiga (2003) utilizaron un tratamiento enzimático para aumentar el rendimiento de extracción de las semillas de uva (*Vitis vinifera*) con un prensado en frío. Estos rendimientos aumentaron desde alrededor de 60 por ciento con el tratamiento control hasta por encima de 70 por ciento con una concentración de 2 por ciento del complejo "Ultrazym 100G". Esto significó un aumento de aproximadamente 26 por ciento en cuanto al rendimiento de extracción.

Schwartz et al. (2007) aplicaron dos complejos enzimáticos ("Pectinex" y "Olivex") y una mezcla de ambos para facilitar la extracción del aceite de palta (*Persea Americana*). El mayor rendimiento se obtuvo con la mezcla de los complejos enzimáticos con el que se alcanzó el valor de 82,2 por ciento con una concentración de enzima de 0,06 por ciento. Se menciona además que las propiedades fisicoquímicas del aceite crudo son adecuadas.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Materia prima

Las semillas de higuierillas fueron compradas a los productores, posteriormente fueron lavadas, secadas al medio ambiente, descascarilladas, trituradas con una picadora moulinex type 643, almacenadas en frascos ámbar en condiciones de refrigeración hasta el momento de su uso.

#### 7.1.1. Enzimas

Las enzimas empleadas son las mencionadas a continuación:

- El complejo multienzimático Viscozyme L

El complejo multienzimático contiene una mezcla de enzimas celulíticas con una actividad de amplia gama de carbohidrasas, que incluyen arabanasa, celulasa,  $\beta$ -glucanasa, hemicelulasa y xilanasa. Enzimas que son extraídas y purificadas a partir de *Aspergillus sp*, complejo de enzimas degradantes de la pared celular de *Aspergillus sp*.

- Celulasa (Sigma Aldrich)

Celulasa extraída a partir de *Aspergillus niger*. Es posible determinar su actividad mediante el empleo de papel filtro o CMC como sustrato. Se empleó una temperatura de 37°C y pH 6 durante su aplicación.

- Hemicelulasa (Sigma Aldrich)

Polisacárido formado por los mismos mono- sacáridos que la cadena de celulosa, pero con una estructura ramificada que facilita la unión entre moléculas de celulosa, y también entre ésta y la pectina.

- Peptinasa

Son sustancias enzimáticas, especializadas en romper los enlaces peptídicos de las proteínas. Para ello utilizan moléculas de agua, por lo que se clasifican como hidrolasas.

## 7.2. Análisis proximal

Las semillas de higuera y el aceite se sometieron a un análisis proximal.

### 7.2.1. Determinación de humedad

Para determinar la humedad de las semillas, se fundamenta en la pérdida de agua hasta llevar a peso constante, para luego colocar en una estufa como se describe a continuación.

- 1.- Se pesó 5 ±0.2 gramos de muestra dentro una charola de aluminio de capacidad de 5 cm de diámetro y 0.8 de profundidad (tarado previamente) tomándolo cuidadosamente con las pinzas (realizándolo por duplicado).
- 2.- las muestras fueron colocadas en una estufa a una temperatura de 105°C hasta llegar a peso constante (aproximadamente por 3 a 4 horas).
- 3.- Las muestras se colocaron en un desecador por 30 minutos para enfriar y pesar la muestra.
- 3.- Se reportó el % de pérdida de peso como humedad.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

### 7.2.2. Determinación de grasa total ( extracto etéreo)

La determinación de grasa o aceite total se extrae a partir de la muestra seca con el uso de solventes orgánicos, utilizando el equipo de extracción Soxhlet como se describe a continuación.

1.- Se pesó 5 gramos de materia prima totalmente secas y se colocaron en los cartuchos de extracción. Previamente pesar el matraz de balón llevado a peso contante.

2.- El cartucho se colocará en el equipo Soxhlet y se agregará 200 ml de hexanos (equivalentes a dos sifonadas). Se activó el equipo y se mantuvo en extracción durante 8 horas de arrastre por solvente.

3.- El extracto se recogió en el matraz balón de destilación y se procedió a evaporar hasta eliminar todo el hexano (punto de ebullición del hexano 68°C) con el rota vapor. El matraz balón se colocará en la estufa durante 2 horas para eliminar el residuo de hexano a 60-68°C. Seguidamente se enfrían en un desecador.

4.- El peso se cuantificará en una balanza analítica. Para sustituir los diferentes pesos en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{C - (B - A)}{C} \times 100$$

En donde: A = Peso del matraz de balón de destilación limpio y seco.

B = Peso del matraz de balón de destilación con la grasa.

C = Peso de la muestra en gramos.

### **7.2.3. Determinación de cenizas**

La cantidad de materia incombustible restante obtenida luego de someterla a una calcinación en un equipo como la mufla. Como se describe a continuación:

1.- Se tomaron 20 gramos de muestra de semillas y se colocaron en la estufa a 105°C hasta llegar a peso constante. Para luego dejar enfriar la muestra durante 30 minutos en un desecador. Previamente se usaron crisoles para llevarlo a peso constate en el cual se colocará la materia prima.



2.- Se pesaron 5 g de semillas con una balanza analítica y se colocaron en un crisol limpio y seco tarado previamente.

3.- Seguidamente el crisol y la muestra se colocaron en la mufla a 550°C durante 4 o 6 horas, hasta notar que la muestra este totalmente de color gris-blanco.

4.-Despues de la incineración, enfriar el crisol colocándolo en el desecador por una hora y luego pesar en una balanza analítica.

5.- Obtenidos los pesos anteriores utilizar la ecuación siguiente reemplazando los siguientes datos:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

En donde: A = Peso del crisol a peso constante con muestra seca (g).

B = Peso de crisol con cenizas (g).

C = Peso de la muestra seca (g).

## **7.3. Caracterización del aceite**

El producto obtenido fue sometido a los siguientes análisis fisicoquímicos:

### **7.3.1. Índice de acidez**

Para caracterizar el índice de acidez consiste en cuantificar a los ácidos grasos libres presentes en el producto, los que se encuentran formados por hidrólisis de los triacilglicéridos.

El valor obtenido se representa como el número de gramos de ácidos grasos libres contenidos en 100 g de grasa. La metodología siguiente fue al que se realizo:

Preparación de disoluciones

Preparación de KOH 0.01N ( Etanólico):

Pesar 0.56 g de hidróxido de potasio disolver con 100 mL de etanol a 96° y seguidamente pasarlo a un matraz aforado de 1L, enfriar a temperatura ambiente y aforar con el mismo etanol.

Disolución de Etanol: Éter (1:1).

Medir 100 mL de etanol 96° y colocarlo a un matraz Erlenmeyer. Adicionar 100 mL de éter etílico mezclar y agitar. Neutralizar al momento de usarse con hidróxido de potasio etanólico a 0.01N utilizando como indicador fenolftaleína.

Desarrollo

- 1.- Se peso  $5 \pm 0.2$  g de muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- 2.- Añadir 50 mL de la mezcla disolvente (alcohol-éter etílico) previamente neutralizado con KOH 0.01N agitar y mezclar.
- 3.- Agregar 1 mL de Fenolftaleína.
- 4.- Titular la mezcla con la solución de hidróxido de potasio valorada, agitando frecuentemente hasta que una coloración rosa persista durante 30 seg.

Expresión de Resultados

Los resultados se expresan en miligramos de hidróxido de potasio de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de acidez (\% de ácido oléico)} = \frac{V_{\text{hidroxido}} * M * N}{10 * P_{\text{aceite}}} \quad (1)$$

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56.1 * V_{\text{hidroxido}} * N}{P_{\text{aceite}}} \quad (2)$$

En donde:

V= volumen en mL de la disolución en KOH utilizada

N= normalidad exacta de la solución de KOH utilizada

M= masa molecular del ácido graso en que se expresa la acidez (Mn ácido Oléico=282 g/mol; Mm ácido Palmítico= 256g/mol; Mm ácido Laúrico= 200g/mol)

P=peso en gramos del aceite problema

56.1=equivalente químico de la potasa

N=normalidad de la solución de hidróxido de potasio

V= mL de disolución valorada de hidróxido de potasio, gastados en la titulación de la muestra

P=masa de la muestra en gramos

### **7.3.2. Índice de Yodo**

Es una medida de la insaturación de los ácidos grasos que componen el aceite o grasa.

La cantidad de gramos de yodo que son absorbidos por cien de gramos de muestra. Se adiciona en exceso el halógeno para que una parte reaccione con la muestra y el resto en la titulación con tiosulfato de sodio, mediante el uso de almidón como indicador, realizando el método de Wijs:

#### **Preparación de disoluciones**

1.- Yoduro de Potasio (KI) al 15%

Se pesan 75 g de yoduro de potasio y disolver en 500ml de agua destilada.

Seguidamente pasar la solución a un frasco color ámbar.

## 2.-Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) al 0.1N

Se disuelve 25 g de tiosulfato de sodio pentahidratado y aforar el volumen a un litro de agua destilada hervida y enfriada a 45°C. Seguidamente pasar la solución a un frasco color ámbar.

## 3.- Solución de almidón al 1%

Pesar 1g de almidón en un vaso de precipitado y se forma una suspensión con aproximadamente 20 mL de agua destilada. Se hierve aproximadamente 80 mL de agua destilada y en caliente se adiciona la suspensión anterior agitando y calentando hasta disolución de almidón. ( La solución debe prepararse diariamente cuando se utilice, debido a que no estable)

### **Desarrollo:**

1.- Se peso 0.3 g de aceite en un matraz Erlenmeyer y duplicado con tapa y un matraz como testigo. Anotando el peso exacto obtenido.

2.- Se añadió en cada matraz Erlenmeyer 20 mL de cloroformo con ayuda de una pipeta volumétrica para disolver el aceite. Añadir con otra pipeta 10 mL de reactivo de Wijs.

3.- Se agitan suavemente y se dejan reposar por 45 minutos en la oscuridad ( el exceso de yodo debe ser mayor o igual al 60% de la cantidad añadida).

4.- Anadir a los Erlenmeyer 10 mL de solución de KI al 15%, agitar vigorosamente y seguidamente añadir 50 mL de agua destilada, lavando cualquier cantidad de yodo libre de la tapa.

5.- Titular el yodo con tiosulfato a 0.1N añadiéndolo gradualmente, con una agitación constante, hasta que el color amarillo de la solución casi desaparezca.

6.- Se agregó 20 gotas de almidón como indicador. Continuar la titulación hasta que le color azul desaparezca completamente.

7.-Al finalizar la titulación, tapan el Erlenmeyer y agitar vigorosamente de manera que todo el yodo remanente en la capa de cloroformo pase a la capa de yoduro de potasio. Correr un blanco con la muestra.

### **Expresión de resultados**

El número de mililitros de tiosulfato 0.1N requeridos por el blanco ( $V_B$ ) menos los usados en la determinación de la muestra ( $V_M$ ) dan la cantidad de tiosulfato equivalente al yodo absorbido por la grasa o el aceite. Ecuación para calcular el % en peso de yodo absorbido.

$$\text{Índice de Iodo} = \frac{(V_B - V_M) \times N \times 12.67}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

En donde:

$V_B$ = volumen de tiosulfato gastado en el blanco.

$V_M$ = volumen de tiosulfato gastado en la muestra

$N$ = Normalidad del tiosulfato

12.67= equivalente del Yodo

### **7.3.3. Índice de saponificación**

El índice de saponificación es la cantidad de hidróxido de potasio expresado en miligramos, necesario para saponificar un gramo de aceite o grasa.

Este método se basa en la reacción química de los triglicéridos con un álcali, formándose jabones o sales alcalinas de los ácidos grasos y glicerina.

#### **Preparación de soluciones**

1.-Preparación de Hidróxido de potasio en solución alcohólica (KOH)

Disolver 40 g de KOH, en un 1L de alcohol etílico al 95% y enfrié para conservar la temperatura  $\leq 15^{\circ}\text{C}$ . La solución debe de permanecer clara y transparente.

2.-Solución indicadora de fenolftaleína-1% en alcohol etílico al 95%

Pesar 1g de fenolftaleína y disolverlo en 100 mL de etanol.

3.- Ácido clorhídrico 0.5N

Para preparar un litro de solución de 0.5N de HCl de densidad 1.19 y al 37% se necesitan 41.34 mL de ácido clorhídrico concentrado.

Nota: Para preparar la disolución de ácido recuerde colocar en un matraz aforado un aparte de agua destilada para posteriormente incorporarle el ácido.

#### **DESARROLLO:**

1.- Colocar en el matraz Erlenmeyer la cantidad de muestra empleada para la determinación esta debe ser de 5 g y debe estar seca y filtrada.

2.- Agregue 50 mL de disolución de hidróxido de potasio (KOH) alcohólica con una probeta de 50 mL.

3.- Prepare y conduzca determinaciones en blanco simultáneamente con la muestra y similares en todos aspectos, excepto por el aceite.

4.- Conecte el condensador y lleve a ebullición lenta pero constante hasta que la muestra esté completamente saponificada. Esto normalmente requiere de 1 h para muestras normales. Asegúrese que no haya ninguna fuga.

5.- Después de que el matraz y el condensador se han enfriado pero no lo suficiente para formar un gel, lave el interior del condensador con una pequeña cantidad de agua destilada.

6.- Desconecte el condensador, agregue aproximadamente 1 mL del indicador de fenolftaleína y titule con la solución 0.5 N de HCl.

7.- Registre el volumen de la solución requerida para la titulación.

Expresión de resultados

$$\text{Índice de saponificación} = (B - M) * N * 56.1) / P$$

En donde:

B= Volumen, mL 0,5N HCl requeridos para titular el blanco

M= Volumen, mL 0.5N HCl requeridos para titular la muestra

N= Normalidad de la solución de HCl

P= Peso de la muestra en gramos

56.1= Equivalente del hidróxido de potasio

Nota: Algunas muestras, particularmente aquellas que sean difíciles de saponificar pueden requerir mas de 1 hora de reflujo. La claridad y homogeneidad de la solución de prueba son indicadores parciales de la saponificación completa, pero no representan un criterio absoluto.

### **7.3.4. Estabilidad de Oxidación de aceites**

El procedimiento para determinar Estabilidad oxidación y es aplicada en general a todas las grasas, aceites y biodiesel.

#### **Descripción del método**

La estabilidad de oxidación de los aceites (OSI) se define como el punto de cambio máximo de la tasa de oxidación o matemáticamente como el máximo de la segunda derivada de la conductividad con respecto al tiempo. (Ver figura 1). En este método para determinar el periodo de inducción (medida de la estabilidad oxidativa) se hace

pasar una corriente de aire purificado a través de una muestra de aceite o grasa en un baño con termostato. El aire saliente de la muestra de aceite o grasa se hace pasar por un recipiente que contiene agua desionizada. Se monitorea continuamente la conductividad del agua conforme se lleva a cabo la oxidación.

El ácido orgánico que se forma predominantemente es el ácido fórmico. Para esta determinación se usa el equipo Rancimat. En este aparato se consigue determinar rápidamente la estabilidad de oxidación de muestras de aceites o grasas y por consiguiente su periodo de inducción, mediante la oxidación acelerada de la muestra y el registro constante de los cambios en la conductividad eléctrica del agua, que recoge los compuestos volátiles formados durante la reacción.

### **7.3.5. Perfil de ácidos grasos.**

Para determinar el perfil de ácidos grasos, se utilizó un cromatógrafo de gases por lo cual las muestras fueron convertidas a metil ésteres. Se llevó a cabo una hidrólisis alcalina utilizando 100  $\mu$ L de cada muestra y 1 mL de una solución de NaOH 0.5 M preparada con metanol grado HPLC. La reacción se llevó a cabo a 80°C durante 20 minutos en baño maría con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mL de BF<sub>3</sub>/MeOH al 14%, y se mantuvo a 20°C durante 20 minutos, con agitación constante.

Posteriormente se realizó la extracción de los metil ésteres utilizando 1 mL de hexano grado HPLC. El extracto hexánico obtenido al finalizar la esterificación, se inyectó por triplicado 1  $\mu$ L de cada una de las muestras en el cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 5975 inert XL (Net work GC system), equipado con una columna DBWax de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu$ m de espesor de película. La temperatura de entrada fue de 150 °C, la cual se mantuvo durante 5 minutos y posteriormente se elevó hasta 210°C usando una rampa de calentamiento de 30°C/min. De 210°C pasó a 213°C a una velocidad de 1°C/min, finalmente de esta temperatura pasó a 225°C a una velocidad de 20°C/min, durante 20 minutos haciendo un total de 30.6 minutos por corrida por muestra. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min. La temperatura



del inyector fue de 250°C, inyección Split con una relación de 50:1. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada una de las señales cromatográficas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL.

#### **7.4. Diseño de la investigación - procedimiento experimental**

En el siguiente trabajo se buscó comparar los rendimientos entre la extracción del aceite por solventes y no asistida por enzimas con el fin de demostrar si la optimización es efectiva. Para demostrar este hecho, se muestra la metodología que se empleo:

**a. Materia Prima.** Se utilizaron semillas de higuera las cuales fueron obtenidas directamente de los productores.

**b. Selección.** Las semillas de higuera fueron seleccionadas y se eliminaron las de mal estado o dañadas.

**c. Lavado.** En esta operación se procedió a separar a las semillas de las impurezas (restos de tallos, piedras, hojas secas, cascara de la misma semilla, etc.) y que pudieran encontrarse entre las semillas, además de semillas secas.

**d. Secado.** Esta operación unitaria tuvo el objetivo de reducir la humedad de la materia prima lavada como método de conservación. Se llevó a cabo en un secador a una temperatura de 60°C.

**e. Tratamiento enzimático.** En esta operación, se sometieron a las semillas previamente acondicionadas según las variables que se manipulará (tipo de enzima a emplear, concentración de la enzima, relación materia prima: agua y tiempo de hidrólisis, rpm ). El objetivo de este tratamiento es degradar las paredes celulares para que se libere el aceite más fácilmente y de esta manera el rendimiento de extracción aumente.

Se llevó a cabo en un equipo de baño maría para que la temperatura se mantenga constante de acuerdo a la enzima durante todo el tratamiento. El pH de la materia prima acondicionada es de aproximadamente 6.25 -6.45, la cual se requiere ajustar

para que se encuentra dentro del rango de acción de las enzimas empleadas, por lo que el pH se considerará un parámetro. La temperatura del medio dependerá del tipo de enzima empleado (Viscozyme L.: 50°C, Peptinasa: 40°C, Celulasa y Hemicelulasa: 37°C). Los factores a evaluar son el tipo de enzima, concentración de enzima, relación sólido/líquido, pH y el tiempo de hidrólisis, tiempo de agitación, r.p.m..

**e. Centrifugación.** La centrifugación se realizó con el objetivo de separar el aceite crudo de restos de partículas y de humedad absorbida por las semillas en el tratamiento térmico. Esta operación se llevó a cabo a 4500 rpm por un tiempo de 30 minutos tal como lo realizaron Badr y Sitohy (1992), se utilizaron tubos Falcón de 50ml aforando a los 50ml, seguidamente la parte superior suspendida (mezcla de aceite y partículas de semillas con poca densidad) era transferida a tubos ependor de 2ml utilizando 2 tubos por cada tubo Falcón, debido a que la pasta suspendida era aproximadamente 3.5 a 4 ml.

Los tubos ependor eran centrifugado a 10000 rpm por un tiempo de 30 minutos, para separar la mezcla de aceite y partículas finas de las semillas, seguidamente era pesados en tubos de cristal de 5 ml previamente llevados a pesos constantes esto para obtener el rendimiento. Para producción masiva el aceite se colocó en frasco color ámbar previamente llevado a peso constante.

#### **7.4.1. Diseño experimental**

Los factores a evaluar presentaron variables continuas con las que es posible aplicar la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para optimizar esta operación (empleando a Viscozyme L. como la enzima óptima para la extracción). Esta se divide en las siguientes partes.

**a. Screening:** Se procedió a identificar todos los factores que pueden afectar el rendimiento de extracción del aceite en el tratamiento enzimático. Los cuales son los siguientes factores que se muestran en la siguiente cuadro.

Tabla 4.- Niveles de los factores que intervienen en el tratamiento enzimático.

	-2	-1	0	1	2
Enzima	2	2.5	3	3.5	4
Tiempo	4	5	6	7	8
Agitación	100	150	200	250	300
RSL	1:02	1:03	1:04	1:05	1:06

Para lograr establecer los valores de los niveles que se representan en el cuadro anterior, se tomó como referencia la experimentación de investigación, evaluando a cada enzima a utilizar con sus factores óptimos para la extracción. Utilizando un modelo de primer orden para optimizar la extracción enzimática de aceite. Además de los factores presentados, considerando al tipo de enzima “Viscozyme L” como un factor que afecta el rendimiento de la extracción. Seguido de la identificación de los factores,

**b. Maximización del rendimiento:** Se utilizó un Diseño Central Compuesto (DCC) para determinar las condiciones óptimas de operación en el tratamiento enzimático.

**c. Validación de la maximización:** Se procedió a llevar a cabo la extracción aplicando los niveles optimizados de los factores evaluados y obtener el rendimiento optimizado experimental para ser comparado con el valor predicho por el modelo matemático.

## 8. Resultados

### 8.1 Caracterización de la materia prima

Figura 3 y 4. Se muestra las semillas de Higuera que se caracterizó realizando un análisis proximal, con el objetivo de determinar la composición de las semillas de higuera.



Figura 3. Semillas de higuera.



Figura 4. Semillas de higuera secas y descascarilladas.

Los datos obtenidos durante el análisis a proximal para la caracterización de la composición de las semillas de higuierilla se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del análisis proximal.

	Composición		
	Humedad	Cenizas	Grasa Cruda
	Porcentaje (%)		
Higuierilla ( <i>Ricinus Communis L.</i> )	2.635	3.55	56.6384

En la tabla 5, se puede observar que la semilla de higuierilla dentro de su composición contiene un porcentaje de humedad 2.635, cenizas 3.55 y 56.6384.

Para la determinación de grasa cruda de la semillas de higuierilla se llevó a cabo mediante la extracción Soxhlet utilizando como solvente n-hexano. Obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 5.

El aceite que se obtuvo de la semilla de higuierilla utilizada presento un color transparente. El porcentaje de rendimiento de aceite extraído de las semillas fue de un 56.6384% como se muestra en la tabla 5. Teniendo un rendimiento mayor de 51.59% como reportan Sánchez Iris, 2012.

## **8.2 Estudio de rendimientos de enzimas (Celulasa, Hemiselulasa, Peptinasa y viscozyme L.) en la extracción acuosa de semillas de higuierilla.**

Se estudiaron los rendimientos de las siguientes enzimas para la extracción acuosa enzimática de semillas de higuierilla con las condiciones óptimas de cada enzima (temperatura, pH), los factores de relación solido:líquido, rpm, tiempo de hidrólisis y % de enzima fueron las variables constantes para cada enzima, ajustando el procedimiento con un pretratamiento de hervido como reportan Qiang Liu *et al.* 2019.

Los resultados que acontinuacionse muestras, en algunos casos se tieness factores de estudios simples, esto es debido a los factores optimos del uso de la activada de cada enzima.

Tabla 6. Evaluación del rendimiento de la enzima celulasa.

Celulasa (1:6, 200 rpm, 4h, 2% enzima, hervido)		
	Temperatura	
	45 °C	50° C
pH 4	1.3222	1.7152
	1.3217	1.6901
Rendimientos (%)	47.21	60.80

En la tabla 6, se puede observar el rendimiento de la extracción enzimática utilizando a la celulasa como la enzima activa en la reacción, utilizando sus factores óptimos la temperatura 45 y 50 °C, y un pH 4. Siendo el pH 4 contante para las dos temperaturas en 45°C se obtuvo un 47.21% de rendimiento, mientras que a 50°C se obtuvo un 60.80% en rendimiento; siendo a 50°C el mejor rendimiento de extracción acuosa enzimática de aceite utilizando como enzima activa a la celulasa.

Tabla 7. Evaluación del rendimiento de la enzima Hemicelulasa.

Hemicelulasa ( 1:6, 200rpm, 4h, 2% Enzima, hervido)				
	Temperatura		Rendimientos (%)	
	40° C	45°C	40°C	45°C
pH 5	1.1708	1.0112	43.84	32.29
	1.2842	0.7974		
pH 6	0.8958	0.4679	31.51	18.04
	0.8691	0.5425		

Se evaluó el rendimiento de la extracción acuosa enzimática de aceite de semillas de higuierilla utilizando a la hemicelulasa como enzima activa en la reacción. Se consideró los factores óptimos de la enzima pH 5 y 6, temperatura 40°C y 45°C.

Los resultados se pueden observar en la tabla 7, en el cual se obtuvo que a pH 5; a 40°C el rendimiento fue de 43.84% y en 45°C su rendimiento fue 32.29%, se observó la decadencia de rendimiento a los 45°C debido a que la hemicelulasa no soporta temperaturas mayores a los 45°C. Los resultados para pH 6 con temperatura de 40°C se obtuvo un rendimiento de 31.51%, a los 45°C se obtuvo un rendimiento de 18.04% se observó que el rendimiento fue afectado notoriamente por la temperatura; como se mencionó anteriormente más el efecto del pH 7 el cual es menos acida.

Considerando los resultados de la tabla 7, se puede apreciar que el mejor rendimiento para la extracción acuosa enzimática de las semillas de higuera utilizando a la hemicelulasa como enzima activa en la reacción, es con un pH 5 y a una temperatura de 40°C, con un 43.84% de rendimiento en la extracción, comparada con lo reportado Sánchez Iris, 2012 de la extracción con solventes con un rendimiento de 51.59%, mientras que en nuestra extracción por solvente obtuvimos un 56.6384% de rendimiento ; la hemicelulasa no sería una buena enzima para llevar a cabo la experimentación de la extracción acuosa enzimática de semillas de higuera.

Tabla 8. Evaluación del rendimiento de la enzima Pectinasa.

Pectinasa (1:6, 200 rpm, 4h, 2% enzima, hervido)		
	Temperatura	Rendimiento (%)
	40° C	
pH 4	1.2821	46.71
	1.3339	
pH 5	1.6842	61.33
	1.7507	

En la tabla 8, se muestran los resultados obtenidos del estudio para evaluar el rendimiento de la extracción acuosa enzimática de las semillas de higuera utilizando Pectinasa como enzima activa en la reacción. Se estudió a pH 4 y pH 5, con una temperatura de 40°C. En pH 4 se obtuvo un rendimiento de 46.71%, para pH 5 se obtuvo un rendimiento de 61.33%; se notó el incremento del rendimiento

para pH 5, debido a que peptinasa tiene una mejor actividad en la reacción menos acida, sin embargo esto no asegura que si incrementamos el pH mejore el rendimiento, es decir, si aumentamos el pH 6 o 7 esto hará que la peptinasa pierda actividad de reacción pues ya estaría en un medio básico.

El uso de la enzima peptinasa mejoro el rendimiento de la extracción de semillas obteniendo un 61.33% a pH 4 a 40°C, sobrepasando el rendimiento obtenido con el uso de solventes que fue de un 56.6384%.

Tabla 9. Evaluación del rendimiento del complejo enzimático Viscozyme L.

Viscozyme L. (1:6,200rpm, 4h,2% enzima,hervido)		
	Temperatura	Rendimiento (%)
	50°C	
pH 3.5	1.6598	60.51
	1.7293	
pH 4	1.7986	62.69
	1.7824	
pH 5	1.7126	63.15
	1.8242	

En la tabla 9, se puede observar los resultados obtenidos del estudio del rendimiento del complejo enzimático Viscozyme L. para la extracción de aceite de semillas de higuera. Se estudió pH 3.5, 4 y 5 con una temperatura de 50°C.

En pH 3.5 se obtuvo un rendimiento de 60.51%, en pH 4 el rendimiento fue de 62.69%, mientras que pH 5 su rendimiento fue de 63.15%. Debido a que la temperatura fue constante para evaluar el pH, se puede apreciar el incremento del rendimiento al aumentar el pH, puesto que viscozyme L. es un complejo enzimático tiende a tener una mejor actividad enzimática en pH un poco alto como pH 5.



Tabla 10. Rendimiento obtenido de una mezcla del compuesto enzimático de Viscozyme L. + Pectinasa

Viscozyme L. + Pectinasa (1:6, 200 rpm, 4h, hervido, 1% + 1% enzima)		
	Temperatura	Rendimiento (%)
	45 °C	
pH 5	1.7408	61.84
	1.7226	

En la tabla 10, se observa el rendimiento obtenido para el estudio de una mezcla de enzimas Viscozyme L. + Pectinasa, este complejo de enzimas se estudió a pH 5 el cual fue el mejor como se menciona observa en las tablas 8 y 9, y a una temperatura de 45°C, debido a que le mejor rendimiento para petinasa fue 40°C y para viscozyme L. fue de 50°C.

Estudiando estos parámetros se obtuvo un rendimiento de 61.84%, este rendimiento fue casi cercano para el uso de solo peptinasa el cual se obtuvo un rendimiento de 61.33% a pH 5 y 40°C, pero no mayor para Vizcozyme L. el cual tuvo un rendimiento de 63.15%. Este coctel de enzimas no tuvo un rendimiento mayor por causa que la aunque el pH fue el indicado, la temperatura no fue la indicada para el uso de los dos; puesto que ambas enzimas estuvieron expuestas a temperaturas fuera de su óptima para complacer bien su actividad enzimática.

### 8.3. Extracción acuosa de semillas de higuera

Se realizaron varios experimentos al azar para optimizar la extracción acuosa de semillas de higuera, considerando los factores que pueden afectar el rendimiento de la extracción de aceite, temperatura, relación solido: liquido, pH, rpm y tiempo de Hidrólisis. A continuación, se muestran los experimentos realizados:

Tabla 11. Evaluación de la temperatura, teniendo como optimo la temperatura de 80° C

Evaluación de la temperatura a 250 rpm, realacion 1:6, 4 h de hidrólisis, pH nulo.				
Temperatura	Peso gr		Rendimiento %	
	M1	M2	M1	M2
40	1.0889	1.0739	38.75	38.22
50	1.1058	1.1009	39.35	39.18
60	1.1013	1.1237	39.19	39.99
70	1.7101	1.6925	60.86	60.23
80	1.8031	1.7632	64.17	62.75

En la tabla 11 podemos apreciar los rendimientos al momento de evaluar la temperatura para la extracción acuosa de higuera, manteniendo el resto de las variables estables, así con un tiempo de hidrólisis de 4 horas, relación sólido: líquido de 1:6, pH nulo y 250 rpm, para apreciar la temperatura óptima.

En la tabla 11, se puede apreciar los resultados obtenidos del estudio de la temperatura en la extracción acuosa de semillas de higuera. Teniendo en cuenta que al incremento de la temperatura el rendimiento fue mejorando debido a someter las semillas a altas temperaturas se logró romper la estructura de las semillas liberando la mayor cantidad de aceite posible. La temperatura optima fue de 80°C como se muestra en la tabla 11 con un rendimiento de 62.75% siendo mayor que la extracción por solventes (56.63%).

Tabla 12. Evaluación de la relación sólido: líquido, teniendo como optimo la relación 1:4

Evaluación de relación (Sólido/Líquido), Temperatura 80°C, 4 horas de hidrólisis, pH nulo, 250 rpm.				
Relación (W/V)	Peso gramos		Rendimiento %	
	M1	M2	M1	M2
1;2	1.7623	1.7971	62.72	63.95
1;4	2.0084	2.0344	71.47	72.40
1;6	1.9095	1.9147	67.95	68.14
1;8	1.5581	1.5950	55.45	56.76
1;10	1.2991	1.3213	46.23	47.02

Considerando el resultado obtenido de la tabla 11 donde se evaluó la temperatura óptima (80°C) para la extracción acuosa de semillas. Se estudió la relación sólido : líquido como puede observarse en la tabla 12, teniendo un mejor rendimiento en la relación 1:4 con un rendimiento de 72.40%, el rendimiento mejoro en un 10% utilizando la temperatura de 80°C.

Tabla 13. Evaluación de pH, se observo que a partir de pH 5 a pH 7 el incremento del rendimiento se mantuvo.

Evaluación de pH, Temperatura 80°C, relación 1:4, 4 horas de hidrólisis, 250 rpm.				
pH	Peso gramos		Rendimiento %	
	M1	M2	M1	M2
3	1.6842	1.7381	59.94	61.85
4	1.9338	2.0149	68.82	71.70
5	2.0459	1.9976	72.81	71.09
6	2.0095	2.0138	71.51	71.67
7	2.023	1.9987	71.99	71.13

En la tabla 13, se puede observar los resultados obtenidos del estudio de pH para la extracción acuosa de semillas de higuierillas, teniendo los resultados anteriores de la tabla 11 y 12. Se consideró que el pH solo fue afectado en pH 3 debido al medio acido, a diferencia del pH 4, 5, 6 y 7 se obtuvo el mismo rendimiento de 71%.

Tabla 14. Evaluación de rpm, teniendo como optimo 250 rpm.

Evaluación de rpm, temperatura 80°C, relación 1:4, pH nulo, 4 horas de hidrólisis.				
rpm	Peso gramos		Rendimiento %	
	M1	M2	M1	M2
100	1.0851	1.176	38.62	41.85
200	1.6914	1.696	60.19	60.36
250	2.0154	2.0204	71.72	71.90

En la tabla 14, se puede apreciar los resultados del estudio de la evaluación de rpm en el rendimiento de la extracción acuosa de semillas de higuera. Teniendo como referencia los factores óptimos de la tabla 11, 12 y 13; se observó que para 100, 200 y 250 rpm fue incrementando como fue aumentando las rpm. El mejor rendimiento fue a 250 rpm con un 71,90%, con los datos de la tabla 13 se puede considerar que el rendimiento es afectado por los rpm.

Tabla 15. Evaluación del tiempo, se observó que el tiempo no tuvo una diferencia en el rendimiento de la extracción.

Evaluación del tiempo, temperatura 80°C, relación 1:4, pH nulo, 250 rpm.				
Horas	Peso gr		Rendimiento %	
	M1	M2	M1	M2
4	1.9806	1.9898	70.48	70.81
8	2.008	1.9519	71.46	69.46
12	1.9404	1.9805	69.05	70.48
16	1.9955	2.0224	71.01	71.97
20	1.9693	1.9876	70.08	70.73
24	1.9263	1.9461	68.55	69.26

Teniendo los resultados de óptimos de las tablas 11, 12, 13 y 14 (temperatura, relación sólido: líquido, pH y rpm).

En la tabla 15, se obtuvieron los resultados al evaluar el tiempo para la extracción acuosa de semillas de higuera. Se puede observar que desde la hora 4 a 24 el rendimiento de la extracción no incrementó, es decir, se mantuvo estable a diferencia de los resultados anteriores obtenidos en el cual el rendimiento era de 71% en la tabla 15 el rendimiento puede variar un poco de 68 a 71% esto es debido a errores de la manipulación de las muestras.

Los resultados obtenidos para el óptimo de cada estudio de los factores fueron los siguientes: Temperatura 80°C, relación solido: liquido 1:4, pH nulo debido a que tuvo un incremento de rendimiento, rpm de 250 y un tiempo de reacción de 4 horas puesto que al incrementar las horas de reacción el rendimiento era continuo.

## 8.4. Extracción acuosa enzimática

En la extracción acuosa enzimática se llevaron a cabo una serie de experimentos usando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para lograr maximizar el rendimiento al emplear un tratamiento enzimático previo a la extracción con solventes para obtener aceite de semillas de higuera (*Ricinus communis*), en los que se realizaron 28 experimentos con duplicados, los factores a estudiar fue el tiempo de agitación, relación solido: líquido, porcentaje de enzima, rpm. Mientras que el pH y la temperatura fueron los óptimos de la enzima Viscozyme L.

Tabla 16. Niveles de factores codificados.

Factor Natural	Niveles de factores codificados				
	-2	-1	0	1	2
Enzima	2	2.5	3	3.5	4
Tiempo	4	5	6	7	8
Agitacion	100	150	200	250	300
RSL	1:02	1:03	1:04	1:05	1:06

En la tabla 16, se puede apreciar los factores codificados para el estudio de la extracción acuosa enzimática de semillas de higuera utilizando como enzima activa en la reacción a Viscozyme L., teniendo en cuenta los factores naturales como % de enzima, tiempo de reacción, agitación y relación solido.: líquido.

Tabla 17. Rendimientos promedio (%) de la extracción acuosa enzimática de aceite de semillas de higuera (*Ricinus communis*).

Run	Enzima	Tiempo	Agitación	RSL	Respuest a 1 (%)	Respuest a 2 (%)
1	-1	-1	-1	-1	63.91	65.22
2	-1	-1	-1	1	75.58	76.59
3	-1	-1	1	-1	71.14	71.31
4	-1	-1	1	1	71.27	72.79
5	-1	1	-1	-1	59.40	59.19
6	-1	1	-1	1	61.68	61.61
7	-1	1	1	-1	68.16	67.92
8	-1	1	1	1	74.17	72.38
9	1	-1	-1	-1	68.98	68.22
10	1	-1	-1	1	65.06	64.82
11	1	-1	1	-1	71.80	72.16
12	1	-1	1	1	72.56	72.32
13	1	1	-1	-1	61.61	61.02
14	1	1	-1	1	64.43	65.06
15	1	1	1	-1	74.14	74.97
16	1	1	1	1	73.01	72.30
17	-2	0	0	0	67.79	68.68
18	2	0	0	0	71.10	71.73
19	0	-2	0	0	72.59	72.27
20	0	2	0	0	73.36	73.02
21	0	0	-2	0	34.85	36.49
22	0	0	2	0	72.20	73.16
23	0	0	0	-2	58.01	57.31
24	0	0	0	2	64.56	65.38
25	0	0	0	0	71.73	73.10
26	0	0	0	0	72.67	72.32
27	0	0	0	0	73.93	73.12
28	0	0	0	0	71.80	71.25

En la tabla 17, se muestran los experimentos realizados, para encontrar el mejor rendimiento el cual fue el experimento número 15 con los factores de % de enzima de 3.5, tiempo de reacción de 7 horas, rpm de 250 y relación sólido: líquido de 1:3. Teniendo un rendimiento de 74.14 y 74.97% teniendo un aproximado a lo que reportan Qiang Liu *et al.* 2019 con un rendimiento de 77.53%.

## 8.5. Caracterización del aceite

Para la caracterización del aceite obtenido se llevaron a cabo pruebas fisicoquímicas como se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Propiedades fisicoquímicas de los aceites de semillas de ricino obtenidos por extracción Soxhlet (SE), extracción (AE), y extracción acuosa enzimática (AEE).

Propiedades Fisicoquímicas	SE		AE		AEE
Valor ácido (mg KOH/g)	1.01 ± 0.01		0.46 ± 0.02		2.45 ± 0.02
Ácido graso libre (%)	0.51 ± 0.01		0.23 ± 0.01		1.23 ± 0.01
Valor de Yodo (g/100g)	54.8 ± 3.29		58.72 ± 1.79		58.01 ± 0.04
Valor de saponificación (mg KOH/g)	194.12 ± 1.60		194.29 ± 1.49		194.34 ± 1.24
Estabilidad Oxidativa (h)	24.03 ± 5.24		49.40		79.18

Los resultados del presente trabajo demuestran que las muestras de aceite de higuera extraída por método de solventes, extracción acuosa y extracción acuosa enzimática se encuentran dentro de los límites tolerables para aceites vegetales y los que resultados son muy semejantes a los obtenidos por diversas muestras de aceites vegetales comestibles que actualmente se utilizan como materia prima para el uso industrial.



## 8.6. Perfil de ácidos grasos

Se realizó el perfil de ácidos grasos para apreciar la composición del aceite extraído de las semillas de higuera en los tres métodos empleados, Extracción Soxhlet, extracción acuosa y extracción acuosa enzimática.

Tabla 19. Composición de ácidos grasos de aceites de semillas de ricino obtenida por diferentes métodos de extracción.

Ácidos grasos	Composición de ácidos grasos (%)		
	SE	AE	AEE
Ácido palmítico (C16:0)	2.16 ± 0.15	2.05 ± 0.06	2.20 ± 0.07
Ácido estearico (C18:0)	2.68 ± 0.16	2.57 ± 0.12	2.31 ± 0.15
Ácido oleico (C18:1)	7.87 ± 0.29	7.12 ± 0.28	7.41 ± 0.35
Ácido linoleico (C18:2)	7.33 ± 0.32	7.06 ± 0.30	7.55 ± 0.33
Ácido linolénico (C18:3)	0.71 ± 0.02	0.67 ± 0.01	0.74 ± 0.02
Ácido ricinoleico (12-OH C18:1)	79.23 ± 1.84	80.53 ± 1.92	79.79 ± 2.94
Ácido grasos saturado (SFA)	4.84 ± 0.22	4.62 ± 0.15	4.71 ± 0.27
Ácido grasos monoinsaturados (MUFA)	87.10 ± 0.78	87.66 ± 0.76	86.64 ± 0.80
Ácido grasos poliinsaturados (PUFA)	8.05 ± 0.46	7.72 ± 0.56	8.66 ± 0.52

## 9. Conclusiones.

- Se lograron los objetivos planteados en el presente trabajo ya que se caracterizó los métodos de extracción para el aceite de higuera (*Ricinus Communis*), para el uso industrial.
- Se estandarizó un método central para la extracción de aceite de semillas de higuera. A través de este trabajo se demuestra que el uso del método enzimático es posible para llevar a cabo la extracción acuosa de aceite de higuera para la producción industrial de aceite esenciales, además demuestra el mejoramiento del rendimiento de la extracción al utilizar enzimas sustituyendo el método de solventes, sin dudar de un método más adaptable para el medio ambiente.
- Se demostró la identificación del rendimiento para cada método de extracción, es decir, para el método con solventes y extracción acuosa tuvieron menor rendimiento que la extracción acuosa enzimática. Con la finalidad de demostrar que el método con solventes puede ser sustituido utilizando enzimas para la extracción de aceite de semillas de higuera.
- Se obtuvieron buenos rendimientos como buenos resultados en las propiedades del aceite con la extracción acuosa enzimática de semillas de higuera (*Ricinus communis*).

## **10. Recomendaciones.**

Se recomienda hacer un estudio de mezclas de enzimas para un mejor rendimiento en la extracción acuosa enzimática.

Se debe tener en consideración ajustar el pH correctamente, debido a que es un factor muy importante para tener una mejor actividad con la enzima.

Se debe añadir la enzima al final, cuando se tenga el lote de los experimentos a realizar, con el fin de que la enzima no tarde mucho tiempo sin estar en agitación.

Escalar a nivel biorreactor enzimático para estudiar variables como mezclado y agitación.

## 11. Referencias.

César A. Collao, Emilia Curotto y María E. Zúñiga. (2007). Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites*. 58 (1), 10-14, 2007.

Cornejo María & Estrada Obdulia. (2012). Caracterización de aceite de higuierilla (*Ricinus communis*) de dos variedades silvestres para la producción de biodiesel en la región del Valle de Mezquital, Hidalgo. Tesis de Posgrado. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C.

Díaz Ranulfo. (2015). Caracterización del Biodiésel obtenido a partir del aceite de semillas de Higuierilla silvestre (*Ricinus communis* L.). Tesis de pregrado. Universidad Instituto Politécnico Nacional, Mexico.

Sánchez Iris. (2012). Obtención y caracterización de biodiesel a partir de aceite de semillas de *ricinus communis* (Higuierilla) modificadas genéticamente y cultivadas en el eje cafetalero. Tesis de pregrado. Universidad Tecnológica de Pereira.

García, t. de la Cruz, v. m. Nájera, i. Sánchez, o. Purificación de biodiesel obtenido de aceite de *Ricinus*. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Departamento de Procesos y Tecnología, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM-Cuajimalpa, 2009.

Huertas Karina. (2012). Obtención y caracterización de biodiesel a partir de aceite de semillas de *Ricinus communis*. (HIGUERILLA) Modificadas genéticamente y cultivadas en el eje cafetalero. Tesis de pregrado. Universidad Tecnológica de Pereira.

Peredo-Luna H.A., E. Palou-García y A. López-Malo. (2019). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 3-1: 24-32

León Glicerio, Osorio María. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L.. *Rev Cubana Farm* vol. 49 no. 4, versión Online ISSN 1561-2988.

Leal, D. A. Caracterización morfométrica de cico ecotipos de higuierilla (*Ricinus communis*) en la ESPOL "Campus Gustavo Galindo". Trabajo de grado Ingeniero Agropecuario. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, 2009, 110 p.

Qiang Liu, Peiwang Li, et al. (2019). Optimization of Aqueous Enzymatic Extraction of Castor (*Ricinus communis*) Seeds Oil Using Response Surface Methodology. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, Vol. 13, 1-9, 2019

Qing-Yan Gai, Jiao Jia, Pan-Song Mu, et al. (2013). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigotica* seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products* 45(2013) 303-311.

Rendón, N. Triviño, J. P. Producción y Exportación de la Higuierilla (*Ricinus communis* L.) a Colombia como Materia Prima para la Elaboración de Biocombustibles. Trabajo de grado Ingeniero en Gestión Empresarial Internacional. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Economía y Negocios, 2009. 199 p.

Sajid Latif, Farooq Anwar. (2011). Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. S. Latif, F. Anwar/Food Chemistry 125 (2011) 679-684.

Scholz, V. Nogueira, J. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. En: Biomass and Energy, 2008, no. 32, p. 95-100.

Ying-lao Zhang, Shuai Li, Cai-ping Yin, Dong-hua Jiang, Fang-fang Yan, Ting Xu. (2012). Response surface optimization of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. Food Chemistry 135 (2012) 304–308.

## Anexo I. Planta de Higuera.



*Figura 5. Semillas de Higuera (Ricinus communis).*



*Figura 6. Planta de Higuera.*

## **Anexo II. Competencias Desarrolladas y Aplicadas.**

Durante el periodo de residencia profesional realizada en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez logre obtener nuevas experiencias profesionales. Durante la realización de la experimentación para la extracción de aceite de semillas de higuera, aplique los conocimientos adquiridos durante mi formación de Ingeniero Bioquímico, que me ayudaron a entender con mayor facilidad el tema de la extracción acuosa y tratamiento enzimático de aceite de semillas de higuera. A continuación, menciono algunos conocimientos aplicados de cada una de las asignaturas que me complementaron durante mi formación profesional.

**Cinética Química y Biológica:** Se aplicaron los conocimientos de los principios de la cinética de las reacciones químicas catalizadas, así las propiedades de que se analizan en los datos experimentales para proponer y demostrar la eficiencia y rendimiento de las enzimas utilizadas.

**Bioquímica:** Se aplicó la capacidad de percibir a través de sus sentidos los sucesos que tienen lugar en el interior de las reacciones de experimentación. Utilizando los diversos instrumentos y técnicas experimentales que permiten estudiar las reacciones propuestas.

**Fisicoquímica I:** Se aplicaron los conceptos de equilibrio termodinámico y equilibrio de fases.

**Química Analítica:** Se aplicó el campo que hace impredecible una reacción con la práctica totalidad de las ciencias experimentales y con la tecnología industrial, colaborando a la resolución de los problemas y convertirlos en un poderoso auxiliar para el desarrollo e investigación.

**Bioquímica del Nitrógeno y Regulación:** Se aplicaron las competencias necesarias para diseñar, seleccionar, adoptar, operar, controlar, simular, optimizar y escalar equipos y procesos en los que se aprovechen de manera sustentables los recursos bióticos.



Durante el periodo de mi residencia profesional se desarrollaron y aplicaron competencias profesionales que se describen en la siguiente tabla de manera detallada:

*Tabla 20. Competencias Desarrollada y Aplicaciones*

Competencias Desarrollada y Aplicaciones	¿Dónde se aplico?
Capacidad de Análisis y Síntesis	En la lectura de artículos científicos, documentos de páginas web, libros, sitios online de publicaciones científicas y otros para el desarrollo del contenido teórico relacionado a cada proceso.
Capacidad Crítica	En la selección y modificación de algunas de las variables de proceso experimental para corregir variables no previstas, para repetir la experimentación.
Automotivación	Con interés constante por la investigación y la realización de la experimentación de extracción de aceite.
Análisis de Problemas	En solucionar los problemas que impedían llevar a cabo la experimentación.
Comunicación Escrita	En la redacción y uso de los datos obtenidos de los rendimientos de cada experimento de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)
Compromiso	En la entrega de avances y cumplimiento de las responsabilidades asignadas en tiempo y forma.
Capacidad de Comprender la Visión del Asesor	La capacidad de detectar información importante de la asesoría oral con mi asesor y personal capacitado de laboratorio.
Iniciativa	La capacidad de idear y crear alternativas para poder facilitar la realización de los experimentos de extracción.
Planificación y Organización	Cumplir con los objetivos del plan de trabajo de acuerdo a lo pronosticado.