

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**  
**“ANTONIO NARRO”**  
**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



**Evaluación de rendimientos en la extracción por prensado del aceite de semilla de calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) tratada enzimáticamente**

**POR:**

**ARMANDO MONROY LÓPEZ**

**T E S I S**

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**Diciembre del 2007**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS**

**POR:**

**ARMANDO MONROY LÓPEZ**

**Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como  
Requisito**

**Parcial para Obtener el Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**APROBADA**

\_\_\_\_\_  
**M.C. María Hernández González**

**Presidente**

\_\_\_\_\_  
**M.C. Heliodoro de la Garza Toledo**

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
**M.P. Francisco Centeno Hernández**

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
**Lic. Laura Olivia Fuentes Lara**

**Vocal**

-----  
**Ing. José Rodolfo Peña Oranday.**

**Coordinador de la División de Ciencia Animal.**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.**

**Diciembre del 2007.**

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por el estar siempre a mi lado protegiéndome así como el que me permitiera culminar mis estudios profesionales.

A mi **Alma Terra Mater** por cobijarme en sus entrañas y hacer de mi un hombre profesionista y de bien.

Al **MC. María Hernández González** por compartirme parte de su sabiduría dirigiendo este trabajo así como el tiempo, amistad, paciencia y cariño brindada sin condiciones.

A mis **Compañeros de ICTA** gracias por compartir conmigo momentos inolvidables en la carrera así mismo por que siempre estuvieran allí cuando mas los necesitaba en las buenas o en las malas.

A mis **Profesores** por guiarme por el buen camino y compartirme conocimientos científicos, morales y culturales.

A los Laboratoristas **Carlos, Carlos Alberto, Guadalupe Moreno, Alejandra, Mildred** por instruirme y brindarme mucho de su tiempo en la parte experimental del proyecto.

Al **Personal que Labora en la UAAAN** por brindar sus servicios a beneficio de la formación de los estudiantes.

Al **MC Heliodoro de la Garza Toledo** por darme oportunidad de realizar pruebas en instalaciones de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Al **MP Francisco Centeno Hernández** por brindarme su tiempo y conocimientos para la estructuración de este proyecto.

## DEDICATORIAS

A mi Esposa **Angélica Bello Rivera** por compartir tiempo de su vida a mi lado, por regalarme momentos inolvidables en esta vida así como brindarme todo su apoyo incondicional y orientarme por este camino que todos recorreremos, te amo.

A mi hija **Camila Monroy Bello** por ser la inspiración de lograr algo más cada día y por ser un regalo que la vida me dio en mi etapa de estudiante, te amo bebé.

A mis padres

**Sr. Luis Monroy Mejía**

**Sra. Josefina López Sánchez**

Por darme la vida y por orientarme en el camino del buen ser, así como brindarme todo su apoyo para levantarme de los tropezones que la vida me puso, por todo su apoyo moral, social y económico mil gracias, que todo esto me llevo a ser alguien en la vida, gracias por creer en mi, los amo.

A mis hermanos **Luis, Mónica, Margarita, Enrique, Israel y Maribel** por brindarme su amistad y hermandad por toda esta vida, pero en especial a **Israel, Maribel, Enrique y Mónica** por estar a mi lado el tiempo en el cual me forme como un profesionalista y darme todo el apoyo incondicional en todo los sentidos, así mismo por comprenderme y estar conmigo en las buenas y en las malas, los quiero.

A mis cuñados **Juan y Lourdes** por ser personas admirables y muy trabajadoras, pero en especial a **Juan** que en este largo camino me tendió la mano para todo y nunca me dio la espalda, muchísimas gracias.

A la familia **Bello Rivera** por presentarse en mi vida y ser una familia unida, fuerte y admirable, por brindarme todo su apoyo y confianza incondicional, mil gracias.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>4</b>
<b>2.- REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1.- Características generales de la planta.....	4
2.2.- Descripción morfológica.....	5
2.3.- Origen y distribución. ....	6
2.4.- Potencial Alimenticio y/o Industrial .....	7
2.5.- Importancia económica como cultivo.....	8
2.6.- Los principales componentes de las semillas oleaginosas.....	9
2.6.1- Los lípidos.....	9
2.6.2.- Los ácidos grasos .....	10
2.6.2.1.- Ácidos grasos saturados. ....	11
2.6.2.2.- Ácidos grasos insaturados. ....	11
2.6.3.- Ácidos grasos esenciales. ....	11
2.6.3.1.- Ácidos grasos Omega 3. ....	12
2.6.3.2.- Ácidos grasos Omega 6. ....	13
2.6.3.3.- Ácidos grasos Omega 9. ....	13
2.7.- Métodos de extracción de aceites .....	14

2.7.1.- Centrifugación .....	14
2.7.2.- Prensa de expulsor, de tornillo o extrusor.....	14
2.7.3.- Prensa hidráulica.....	15
2.7.4.- Presionado frio o fresco .....	15
2.7.5.- Solvente .....	15
2.7.6.- Uso de CO <sub>2</sub> Supercrítico.....	15
2.7.7- Biolixiviación .....	15
2.8.- La celulosa.....	16
2.8.1.- Hidrólisis de celulosa .....	17
2.8.2.- Métodos de extracción de complejos enzimáticos a gran escala. ....	18
2.8.2.1.- Extracción por métodos químicos .....	18
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>23</b>
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1.- Localización. ....	23
3.2.- Determinación de celulosa y lignina. ....	23
3.3.- Determinación del tiempo óptimo de digestión enzimática .....	24
3.4.- Digestión de la muestra .....	24
3.5.- Métodos de extracción de aceite .....	25
3.5.1- Extracción de grasa por método Soxhlet.....	25
3.5.2.-. Extracción de grasa por método de prensado .....	26
3.6.- Análisis de IR.....	27
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>28</b>
<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1.- Determinación de celulosa y lignina .....	28
4.2.- Determinación de la concentración y tiempo óptimo de digestión enzimática.....	28
4.3.- Comparación de rendimientos en para la extracción con y sin pre tratamiento por método Soxhlet. ....	30

4.4.- Comparación de rendimientos en para la extracción con y sin pre tratamiento por método de prensado. ....	32
4.5.- Comparación de rendimientos entre la extracción con solventes y prensado pre tratados enzimáticamente. ....	32
4.6.- Análisis de IR. ....	34
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>37</b>
<b>5.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>6.- RECOMENDACIONES</b> .....	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>39</b>
<b>7. – BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	<b>44</b>
<b>8.- ANEXOS</b> .....	<b>44</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <b>Clasificación taxonómica</b> .....	<b>4</b>
Tabla 2. <b>Contenido de celulosa y lignina en las semillas de calabacilla loca</b> .....	<b>28</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de formación de ácidos grasos esenciales en animales y vegetales (Hemming, 1996).....	12
Figura 2. Estructura del Ácido graso $\alpha$ -linolénico. ....	12
Figura 3. Estructura del Ácido $\alpha$ -linoléico. ....	13
Figura 4. Estructura del Ácido graso oleico. ....	13
Figura 5. Modo de acción de la celulasa en sistema de celulosa – celulasa (Ryu Mandels, 1980, citados por Wiseman, 1985). ....	18
Figura 6. Determinación de celulosa y lignina en muestra de calabacilla loca.....	23
Figura 7. Determinación de azúcares.....	24
Figura 8. Degradación de la semilla por actividad celololítica. ....	25
Figura 9. Extracción de grasa por método Soxhlet.....	26
Figura 10. Extracción de aceite por el método de prensado.....	26
Figura 11. Muestras estudiadas en IR.....	27
Figura 12. Velocidades iniciales de reacción ( $V_0$ ). ....	29
Figura 13. Concentracion de azúcares a travez del tiempo. ....	30
Figura 14. Prueba de Tukey para extracción de aceite en función al tiempo y tipo de muestra.....	31
Figura 15. Rendimientos en % con y sin tratamiento enzimatico en la extracion por prensado.....	32
Figura 16. Comparación de rendimientos de aceite entre prensado y solventes.....	32
Figura 17. Análisis IR en aceite de la semilla de Calabacilla Loca. ....	34

## RESUMEN

La presente investigación se llevo acabo en VI etapas, las cuales permiten proponer el uso de un proceso de Biolixiviación en semillas de calabacilla loca ya que esta, entre otros componentes contiene un 7.19% de Celulosa y 5.26% de Lignina, los cuales favorecen a la aplicación de enzimas celulolíticas (Celulosa) para llevar acabo la degradación de las zonas amorfas de la semilla dejando mas disponibles, el compuesto de interés (Aceite), mediante la aplicación de un pH de 4.5 y a una Temperatura de 55°C en un sistema de agitación constante, valorándose cinco diferentes concentraciones por once tiempos mediante la formación de azúcares totales (Técnica del Fenol sulfúrico, Dubios, 1956) y azúcares reductores (Técnica del Ácido Dinitrosalicílico, Miller, 1959).

Se estableció que a una concentración del 0.05% de enzima por un tiempo de 120 min son los óptimos, llevándose acabo una digestión de semilla con las condiciones ya antes mencionadas para su estudio en dos métodos de extracción de aceite (Soxhlet y Prensado).

En la extracción mediante solventes se aplicaron cinco tiempos, de los cuales a las 4 hrs se obtiene un mayor costo-beneficio ya que tiempos posteriores no reportan niveles considerablemente diferentes, por lo cual con la aplicación de este se obtiene un mayor ahorro de energéticos, mano de obra, compuestos químicos, etc. así como la recuperación de un aceite de menores niveles de compuestos solubles en aceite como pigmentos por su poco tiempo de exposición al lavado continuo con el solvente.

El método de prensado resulto ser más bajo en niveles recuperación de aceite pero más alto en la relación costo-beneficio por su rápida obtención y menor aplicación de recursos, así como la obtención de un aceite de mayores niveles de pureza por el tipo de proceso, el cual no aplica sustancias que pudiesen dejar residuos tóxicos y temperaturas altas las cuales son precursoras de la oxidación del aceite así como menores pérdidas en el refinado por el bajo arrastre de impurezas.

Finalmente se realizó la caracterización del aceite crudo mediante la aplicación de un IR, lo cual demostró que los aceites obtenidos mediante los diversos tratamientos, presentaron como ácidos grasos predominantes al oleico y linoléico.

---

## CAPÍTULO I

### 1.- INTRODUCCIÓN

La calabacilla loca (*Cucurbita foetidissima*) es una planta perene, herbácea, tosca y áspera al tacto, crece en los meses de abril a octubre en México, puede ocupar superficies que actualmente no son utilizadas en forma alguna por otros cultivos tradicionales (maíz, frijol, trigo, etc.) ya que requiere de mínima humedad y de suelos no muy especializados para expresar su máxima producción, y aquí el estudiar los componentes principales de este cultivo, en especial sobre el contenido de aceite en semillas que en estudios anteriores reportan niveles de 33% de este y dentro de los ácidos grasos que lo componen contiene un 63% de ácido linoléico componente principal de los aceites comestibles.

Los frutos secos se encuentran entre los alimentos funcionales diseñados por la naturaleza, la semilla de la calabacilla loca es una de ellas por su alto contenido en lípidos insaturados (mono insaturados y poli insaturados) que en los últimos años se ha visto un incremento en el consumo de alimentos de tipo saludable y grasas que en su composición contengan ácidos grasos que no causen daños al organismo como los llamados omegas.

Se realizó una extracción de aceite de esta semilla por dos métodos (Soxhlet y Prensado) valorando su rendimiento en volumen y optimizando su liberación mediante pre tratamiento con enzimas celulolíticas.

Con esta investigación se pretende sentar las bases para la mejor extracción de aceite mediante semillas de oleaginosas (*Calabacilla loca*), con métodos comunes

---

aumentando su recuperación con actividad enzimática y beneficiar a las industrias extractoras de este tipo de productos.

La calabacilla loca se visualiza como una alternativa para solucionar el problema de importaciones de semillas oleaginosas que van destinadas a la producción de aceites crudos y refinados, así como para darle una importancia agronómica a este cultivo que en la actualidad se considera como una maleza. Con su explotación generamos empleos y cubrimos la falta de producción de semillas oleaginosas para la generación de aceites.

---

## HIPÓTESIS

Es posible obtener aceite a partir de semillas oleaginosas (*Cucurbita foetidissima*) mediante procesos mecánicos (prensado), incrementando sus rendimientos mediante pre tratamientos con enzimas celulolíticas.

## OBJETIVO GENERAL

Obtener aceite a partir de la semilla de la calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) por el método de prensado y arrastre con solventes, mejorando los rendimientos de extracción mediante pre tratamiento enzimático.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar el contenido de fibra (celulosa y lignina).
- Buscar la concentración y tiempo óptimo para la mejor hidrólisis enzimática.
- Extraer el aceite de la semilla previamente degradada y sin tratar mediante arrastre por solventes y comparar rendimientos.
- Extraer el aceite de la semilla previamente degradada y sin tratar mediante prensado y comparar rendimientos.
- Realizar análisis IR para la evaluar la pureza del aceite crudo extraído.

---

## CAPÍTULO II

### 2.- REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1.- Características generales de la planta

A la calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) se le conoce también como “Calabacilla”, “Calabaza Búfalo”, “Chilacayote”, “calabacilla Amarga o Apestosa”, “Chichicallotli”, “Ayoztic”, “Calabaza missoury” (Stevenson 1948, Bemis y Whitaker 1969). Al paso de los años esta planta fue nombrada de diferentes maneras, en 1817 *Cucúrbita foetidissima* por Humboldt, Bonpland y Kunth, en 1820 *Cucumis perennis* por James, en 1825 *Cucúrbita foetidissima Kunth* por Seringe, en 1852 *Pepo Foetidissima* por Britt, en ese mismo año Asa Gray la nombro *Cucumis perennis*, en 1881 le nombro finalmente *Cucúrbita foetidissima* Cogniaux, nombre que guarda hasta la actualidad (Bailey 1943).

La tabla 1 presenta la clasificación taxonómica de la planta (Bemis *et al.* 1970).

Tabla 1.- Clasificación taxonómica

Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledónea
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Tribu	Cucurbitineae
Género	<i>Cucúrbita</i>
Especie	<i>Foetidissima</i>

---

## 2.2.- Descripción morfológica

Es una planta perenne, herbácea, tosca y áspera al tacto, crece durante los meses de abril a octubre (en México), posee numerosos tallos (guías) rastreros de 4-6 m de longitud estos son débiles, delgados y escabrosos; nacen de una raíz principal extendiéndose de forma circular, la mayoría de estos produce ramificaciones secundarias las cuales también producen frutos.

La raíz principal es de gran tamaño por lo que posee gran capacidad de almacenamiento de reserva; es pivotante, su peso es variable habiéndose reportado peso en fresco de 72Kg (Dittmer y Talley, en 1964), 45 Kg para una raíz de 3 años de crecimiento (Curtis, 1972), 4 a 6 Kg de dos años de crecimiento (Berry *et al.* 1978 y Bemis *et al.* 1978), sin embargo, Whitaker y Bemis(1975) encontraron una raíz hasta de 30 Kg de la misma edad.

Las hojas son lanceoladas-triangules de 10 a 13 cm de largo, estas nacen de los nudos en forma alternada cuyo espaciamento es de 10 a 20 cm, son de color verde grisáceo pubescente en el haz y escabrosas en el envés, con peciolos gruesos y escabrosos; zarcillos gruesos y cortos enrollados sobre tallos y peciolos.

Las flores son monoicas unisexuales (masculinas y femeninas) sobre la misma planta, gamopétala de color amarillo anaranjado, de 10 a 12 cm de longitud, emerge individualmente, la polinización entre flores es cruzada, no obstante que estas están sobre la misma planta; siendo necesaria la polinización para el desarrollo del fruto y semilla.

---

Los frutos son redondos y periformes de diferentes tamaños (5-8cm) dependiendo la estación de crecimiento y la competencia entre plantas durante el crecimiento (Curtis 1974, Bemis et al 1975 y Scheerens *et al* 1978), son de color verde con franjas blancas con pulpa muy filamentosa. Whitaker y Bemis (1975) reportan producciones máxima de 250 frutos por planta: Chávez y Gómez (1978) señalan rangos de 2-6 frutos por planta a los dos años, 46-156 frutos por planta a los tres años; y Bemis *et al.* (1978) reporta medias de 48.3 frutos por planta con un rango de 18-90 frutos a los dos años. Curtis (1974) encontró rangos de 0-300 frutos por planta para tres cosechas las cuales corresponden probablemente al primero, segundo y tercero años de vida de la planta. El peso de los frutos esta en función al tamaño, este por lo general es tricarpelar, aunque puede presentar hasta 4 a 5 carpelos.

Las semilla son pequeñas oblongas-ovaladas de aproximadamente 12 mm de largo y 6-7 mm de ancho con los márgenes obtusos, el numero de semillas por fruto lo reportan Whitaker y Bemis (1975) encontrando en plantas de dos años frutos con 300 semillas; Bemis et al (1978) reportan frutos con 222.5 semillas y un rango 115-300. Para plantas de tres años Be-Amir (1968) encontró 292 semillas, y Costa (1972) en planta de 7 años reporto 315 semillas y un rango de 173-448. Scheerens *et al.* (1978) examinó colectas de diferentes localidades y encontró una media de 225 semillas por fruto y un rango de 87-386.

### **2.3.- Origen y distribución.**

La calabacilla loca posee una amplia distribución en Norteamérica desde el oeste de los Estados Unidos hasta el sur de Guanajuato, se puede encontrar de forma silvestre en cualquier parte del árido mexicano y regiones similares. Bemis *et al.* (1969) reporta la

---

siguiente distribución desde Guanajuato (México), el desierto Chihuahuense, al Altiplano, Dakota del sur y el suroeste de Estados Unidos (Colorado, Nuevo México y Arizona) y en el Noroeste y Este del Estado de Sonora y Sur de California. El mismo autor cita que James (1920) la encontró creciendo desde las inhóspitas tierras que se encuentran a lo largo de las montañas rocallosas hasta la confluencia de Arkansas y Boiling Spring Fork hasta los orígenes del Río Colorado. Así mismo afirma que el género *Cucurbita*, es nativo del Continente Americano, y consideran como probable centro de origen a las regiones tropicales y semitrópicas del Sur de México.

#### **2.4.- Potencial Alimenticio y/o Industrial**

El uso de la semilla de calabacilla loca para la obtención de aceite y proteína se puede justificar al compararla con otras fuentes de extracción de las mismas características.

Esta semilla es únicamente superada por la semilla de soya (37.9%) y ajonjolí (41.3%) en cuanto a proteína y aceite se refiere, las semillas de algodón y girasol tiene una concentración de proteína mas baja que la calabacilla loca, por lo tanto esta especie puede competir por estos rubros, con otras oleaginosas en explotación actual teniendo como ventaja que esta planta requiere de mínima humedad, de suelos no muy especializados y de mínimos cuidados.

La semilla de la calabacilla loca contiene 61% de ácido linoléico; componente principal de los aceites comestibles y ácidos grasos esenciales en la dieta alimenticia tanto por humanos como por animales. Este porcentaje es superado nada más por el cártamo (75%), lo que nuevamente pone de manifiesto tanto el potencial como la calidad que posee la Calabacilla loca.

---

Todo lo antes descrito esta basado en la información técnico-científico generadas por diversos investigadores (Curtis 1946, 1972, 1973 y 1974; Bemis *et al.* 1967, 1975, 1977 y 1978; Berry *et al.* 1974, 1976 y 1978; Bolley *et al.* 1950, Shahani *et al.* 1951, Jacks *et al.* 1972, Whitaker 1975 y Weber *et al.* 1976), así como la obtenida por la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, (1974-1983).

## **2.5.- Importancia económica como cultivo**

La demanda de aceites vegetales va en aumento año con año, debido a la alta tasa de crecimiento de la población y a la baja producción de los mismos, de acuerdo a De la Garza H. (1978) México tiene que producir 20,000 toneladas mas de aceite cada año para cubrir las necesidades de consumo, no obstante que la industria aceitera Nacional ha llegado a ocupar un lugar importante entre las industrias de transformación.

En el año 2005 en México se produjeron 1, 193, 989 ton de aceites comestibles entre crudos y refinados con un valor de 11, 924 mdp y se vendieron 1, 166, 940 ton con un valor total de 11,705 mdp (Censos económicos INEGI, 2005) En la actualidad, los cultivos de oleaginosa que mas contribuyen en la producción de aceite en México son; el cártamo, algodón, ajonjolí, copra, soya y girasol.

Por lo anterior, la Calabacilla loca se vislumbra como una posible alternativa para solucionar en parte la escasez que se tiene de aceite comestible y de otros productos alimenticios; esto es en base a sus bondades y cualidades, así como a su producción y calidad de: aceite, proteínas, almidón y a otros usos como forrajes.

---

La calabacilla loca puede ocupar superficies que actualmente no son utilizadas en forma alguna por otros cultivos tradicionales (maíz, frijol, trigo, etc.) ya que esta especie requiere de mínima humedad y de suelos no muy especializados para expresar su máxima producción. (De la Garza H. 1978).

## **2.6.- Los principales componentes de las semillas oleaginosas**

### **2.6.1- Los lípidos**

La palabra lípidos proviene del griego *lipos*, que significa “grasa” (Badui, 1996); estos son compuestos orgánicos insolubles en agua, pero solubles en solventes tales como éter, hexano, cloroformo, etc. Tienen grupos hidrocarbonados como parte principal de la molécula (Zdzislaw E 2003).

Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos (Duckworth, 1966) contribuyendo a la textura y en general a las propiedades sensoriales del producto (Badui, 1996). Las principales fuentes de obtención de estos son los tejidos animales y semillas de oleaginosas (*calabacilla loca*) (Quemas, 2003).

Los lípidos se clasifican como “simples” o “complejos” dependiendo del tamaño o detalles estructurales de la molécula. Los lípidos simples incluyen hidrocarburos y alcoholes, estos son neutrales en cuanto a carga. Los lípidos complejos como los Fosfolípidos y Glicolípidos pueden tener más o menos carga y también son referidos como polares. (Anon. 1997)

---

Las semillas constituyen la fuente principal de los aceites vegetales comerciales usados en la industria, el contenido de glicéridos en la semilla no es estándar de una planta a otra, aunque sean de la misma especie se han llegado a encontrar contenidos menores al 1% y mayores o iguales a 70%. (Wolff I.A., 1966)

### **2.6.2.- Los ácidos grasos**

Los ácidos grasos no se encuentran en la naturaleza como tales, están formando parte de los triglicéridos, esterios de colesterol y fosfolípidos (Jensen, 1995; Hamosh, 1995).

Los ácidos grasos se pueden clasificar de diferentes formas, una de ellas es en función al número de átomos de carbono que presentan como los ácidos grasos de cadena corta (2-4 carbonos), de cadena media (6-10 carbonos), de cadena larga (12-22 carbonos) y de cadena muy larga (mayor o igual de 24 carbonos) (Agostoni y col 2001).

Otra clasificación es en función del número de dobles enlaces que presenta la cadena, de esta manera se diferencian entre ácidos grasos saturados, cuando no presentan dobles enlaces, mono insaturados cuando presentan un doble enlace y poli insaturados cuando presentan más de un doble enlace (Giovannini y col. 1995; Agostini y col. 2001). Igualmente, en función de la posición del doble enlace se puede distinguir tres series metabólicas principales, n-9, n-6 y n-3, también conocidas como w-9, w-6, w-3 (Agostoni y col. 2001).

Los ácidos grasos se destacan también por sus implicaciones nutricionales y dietéticas. El tejido adiposo y los lípidos neutros del tejido muscular constan mayormente de triglicéridos y en mayor grado de colesterol, esterios de colesterol, monoglicéridos y diglicéridos. Todos estos compuestos, a excepción del colesterol, contienen ácidos grasos en su estructura molecular que son de importancia en el metabolismo humano por su influencia en la salud. Los ácidos grasos más abundantes en el tejido adiposo

---

animal (Cerdo) son: oleico (40-50%), palmítico (20-25%), linoléico (10-20%), esteárico (10-15%), y en menor cantidad: palmitoleico (2-4%), linolénico (0.5-1%) y mirístico (0.2-0.3%). (Díaz, 1993).

#### **2.6.2.1.- Ácidos grasos saturados.**

Los ácidos grasos saturados no poseen dobles ligaduras en sus estructuras y estos varían de  $C_4$  a  $C_{20}$ , siendo los más comunes el palmítico ( $C_{16}$ ) y el esteárico ( $C_{18}$ ). El punto de fusión de los ácidos grasos saturados es directamente proporcional al tamaño de su cadena de átomos de carbono, por lo que los de  $C_4$  a  $C_8$  son líquidos a temperatura ambiente ( $20-25^\circ\text{C}$ ), mientras que los de  $C_{10}$  en adelante son sólidos a la misma temperatura (Badui, 1996).

#### **2.6.2.2.- Ácidos grasos insaturados.**

Los ácidos grasos no saturados poseen dobles ligaduras en sus estructuras, estos ácidos predominan sobre los saturados, todos los ácidos no saturados que existen en la naturaleza son líquidos a temperatura ambiente. Su punto de fusión disminuye a medida que aumenta su insaturación y su sensibilidad a las reacciones de oxidación es mayor cuando más insaturado sea, cuando esos ácidos poseen una sola ligadura se les nombra monoinsaturados y cuando contienen más de una se les nombra poliinsaturados (Badui, 1996).

#### **2.6.3.- Ácidos grasos esenciales.**

Existen dos ácidos grasos poliinsaturados (AGP) que el cuerpo no puede producir; el ácido linoléico y el ácido alfa linolénico, estos se deben obtener de la dieta y se les conoce como ácidos grasos esenciales. Una vez en el cuerpo se pueden convertir en otros AGP, como el ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA) (Zdzislaw E., Anna K. 2003). En la Figura 1 se muestra las

estructuras de los ácidos grasos esenciales y la posición de los dobles enlaces formados en animales y vegetales.

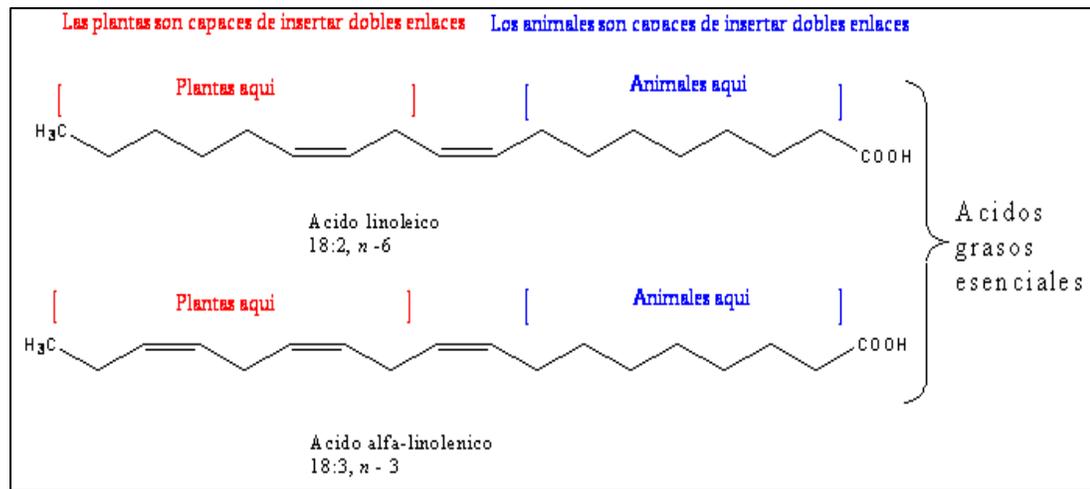


Figura 1. Diagrama de formación de ácidos grasos esenciales en animales y vegetales (Hemming, 1996)

### 2.6.3.1.- Ácidos grasos Omega 3.

El Omega-3 más representativo es el ácido  $\alpha$ -linolénico (Figura 2), descrito como 18:3, n-3, debido a que posee 18 carbonos, con 3 enlaces, el primero de los cuales (n) se ubica en el 3° átomo de carbono contando desde el carbono metil terminal.

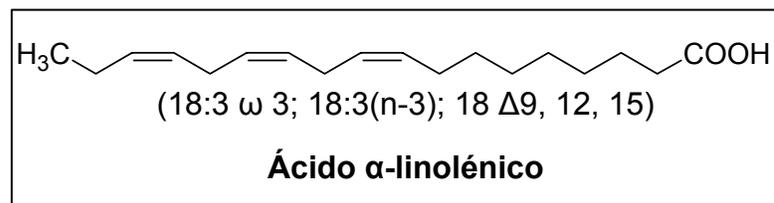


Figura 2. Estructura del Ácido graso  $\alpha$ -linolénico.

El ácido graso  $\alpha$ -linolénico se puede encontrar en carne de pescado, aceite de linaza y cereales, formando parte importante de los tejidos corporales, lo más importante de este ácido graso son los componentes que se derivan de él para mantener un equilibrio

de los nutrientes que se forman a partir del ácido linoléico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Maggie B. Covington, M.D. 2004).

### 2.6.3.2.- Ácidos grasos Omega 6.

El ácido graso más representativo de la familia Omega-6 en la naturaleza es el linoléico (Figura 3), cuyo metabolismo dentro de los seres vivos da lugar al ácido  $\gamma$ -linoléico, ácido araquidónico, entre otros compuestos (Maggie B. Covington, M.D. 2004).

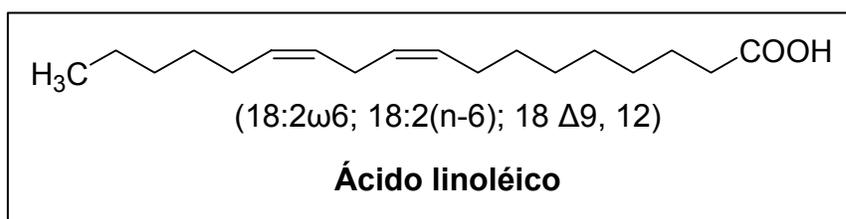


Figura 3. Estructura del Ácido  $\alpha$ -linoléico.

El ácido graso linoléico se encuentra más comúnmente en verduras, frutas, frutos secos, cereales y semillas (Maggie B. Covington, M.D. 2004)

### 2.6.3.3.- Ácidos grasos Omega 9.

El ácido graso más representativo de la familia de los Omega 9 es el oleico (Figura 4), este ácido puede ser sintetizado por los mamíferos a partir del ácido graso saturado esteárico (C18:0), sin embargo se considera necesario en el organismo. Es el ácido graso más común en las grasas naturales (Maggie B. Covington, M.D. 2004).

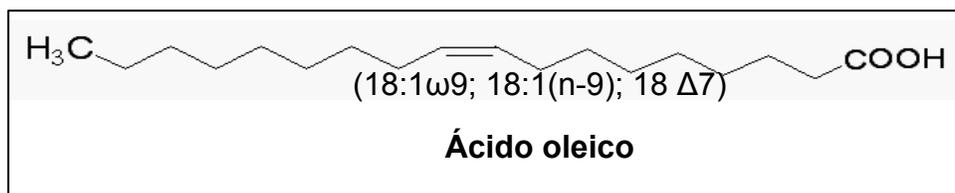


Figura 4. Estructura del Ácido graso oleico.

---

Los ácidos grasos no los podemos encontrar en la naturaleza como tales por que estos forman parte de los triglicéridos, esteroides de colesterol y fosfolípidos, se destacan por su importancia en la nutrición y dieta de los humanos, animales etc. Las fuentes de obtención de ácidos grasos son dos la animal y vegetal siendo de mas importancia la vegetal por su alto contenido de ácidos grasos no saturados, presentándose en forma de aceite a temperatura ambiente, su obtención se realiza de semillas de oleaginosas ya que estas en promedio contienen niveles muy altos de aceite por medio de la aplicación de cualquier método de extracción. (Jensen, 1995; Hamosh, 1995)

## **2.7.- Métodos de extracción de aceites**

### **2.7.1.- Centrifugación**

Las materias, generalmente tras ser prensadas, se separan por una centrifugadora en sólidos, aceite y agua. Es el opuesto de la decantación natural o de reposo (Ramírez, 1998).

### **2.7.2.- Prensa de expulsor, de tornillo o extrusor.**

Es un extractor mecánico continuo, en donde el aceite se exprime de la materia prima en un solo paso, bajo alta presión (Ramírez, 1998).

El expulsor de aceite es un tornillo de alta presión usada para extraer aceite de semilla y cascara, como las semillas de algodón, salvado, arroz, calabaza, girasol, etc. Esta prensa consta de una rosca helicoidal continua o eje de gusano, que gira concéntricamente dentro de un cilindro estático perforado (barril). Al transportarse el material a lo largo de la longitud del barril, se produce un incremento de la presión que ocasiona que el aceite sea expelido y drenado a través de pequeños surcos de la jaula. El material comprimido o desaceitado se descarga en un extremo del barril y el aceite y

---

algunos sólidos se recogen en la base de la prensa para una posterior clarificación (Ramírez, 1998)

### **2.7.3.- Prensa hidráulica**

Un método de extracción mecánico por lotes. El aceite se extrae de la semilla oleaginosa comprimida (Ramírez, 1998)

### **2.7.4.- Presionado frío o fresco**

Se utiliza en el prensado mecánico, donde no se aplica un calor adicional al producto crudo. No es un método práctico de extracción para todos los aceites vegetales, es especialmente recomendado como método de extracción preferido, ya que ayuda al aceite a mantener su estado original (Ramírez, 1998).

### **2.7.5.- Solvente**

Este es un método de extracción opuesto al mecánico. La materia prima se empapa y disuelve en el solvente (hexano) formando una mezcla llamada miscela. Esta miscela se escurre de la torta y, posteriormente, la miscela se calienta a temperaturas elevadas para eliminar el solvente por medio de su evaporación (Ramírez, 1998).

### **2.7.6.- Uso de CO<sub>2</sub> Supercrítico**

La extracción se realiza a 40°C y presiones entre 300 y 500kg/cm<sup>2</sup>, a un flujo de CO<sub>2</sub> del orden de 500 mL/min (Ramírez, 1998).

### **2.7.7- Biolixiviación**

Es el uso de microorganismos para solubilizar compuestos, de manera que sus elementos puedan ser extraídos a partir de un material, cuando el agua u otro solvente son filtrados a través de estos (Ramírez, 1998).

---

El uso de enzimas (celulasa), en medios óptimos degrada la pared celular, lo que facilitaría la extracción de aceite. Esta enzima actúa sobre compuestos insolubles tales como la celulosa permitiendo la obtención de aceite con mayor pureza y calidad. Mediante la actividad enzimática se incrementa el rendimiento de extracción, ya que existe una degradación de toda la celulosa en la corteza de la semilla permitiendo la liberación de mayor cantidad de aceite a la hora del prensado.

### **2.8.- La celulosa**

La celulosa se puede considerar como la molécula orgánica más abundante en la naturaleza, así como el componente estructural de los tejidos vegetales en la pared celular. Es un polímero lineal de varios miles de glucosas unidas por enlaces ( $1\beta\rightarrow4$ ). Tiene una estructura lineal o fibrosa, en la cual se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas, haciéndolas impenetrables al agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Badui 1993, Wiseman 1991).

La configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales las cuales están unidas por enlaces hidrogeno intramolecular, formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Eriksson 1985).

En la catálisis una región relativamente pequeña de la enzima entra en contacto directo con el sustrato y se le conoce como centro activo este comprende las partes de la estructura proteica implicadas en la unión con el sustrato, en la que se compara la enzima con una cerradura y el sustrato con su llave correspondiente (Belitz, 1992).

---

### **2.8.1.- Hidrólisis de celulosa**

Se puede llevar a cabo de manera química, utilizando álcalis o ácidos, o por vía enzimática.

La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático, el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; Endoglucanasa, que ataca al azar enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa, Exoglucanasa actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa,  $\beta$ -glucosidasa hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Beldman 1988).

Cuando ya se degradaron las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la siguiente etapa donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción de la endoglucanasa y exoglucanasa (Beldman 1988).

Finalmente una etapa en la cual se hidroliza la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4 glucosidasa; por que las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (figura 5)

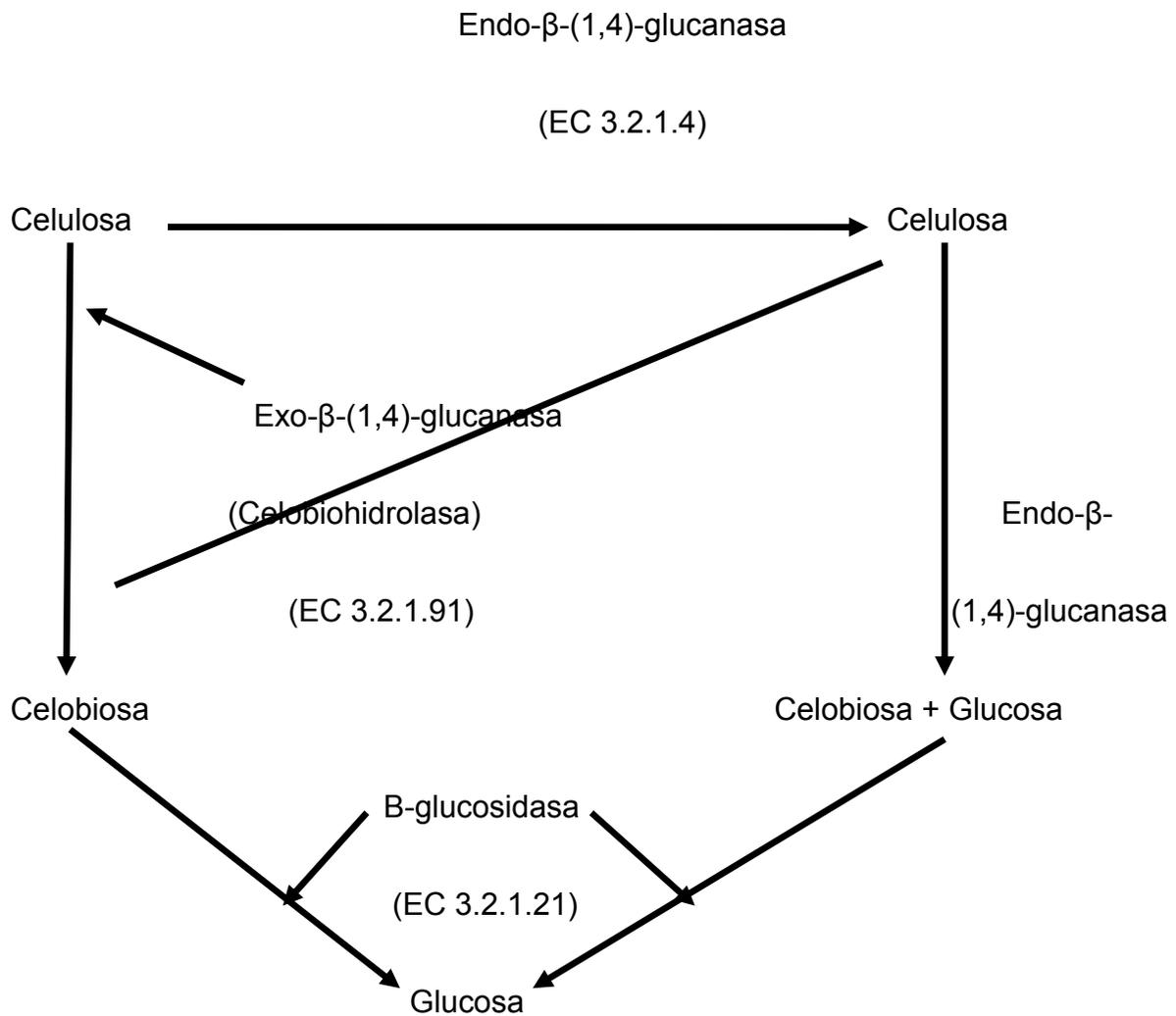


Figura 5. Modo de acción de la celulasa en sistema de celulosa – celulasa (Ryu Mandels, 1980, citados por Wiseman, 1985).

## 2.8.2.- Métodos de extracción de complejos enzimáticos a gran escala.

### 2.8.2.1.- Extracción por métodos químicos

#### 2.8.2.1.1.- Álcalis

Se realiza sometiendo a las bacteria a un pH alcalino, entre 11 y 12.5 durante 20 min, el éxito del tratamiento alcalino depende de la estabilidad de la enzima en cuestión a pH elevados, este método inactiva las proteasas que pudieran existir, a la vez que reduce

---

la contaminación por pirógenos de la preparaciones de enzima para el uso terapéutico (Wiseman, 1991).

#### **2.8.2.1.2.- Lisozima y EDTA**

La lisozima es una enzima producida comercialmente a partir de clara de huevo de gallina que cataliza específicamente la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos de los mucopéptidos de las paredes de las células bacterianas. Las bacterias Gram-positivas, en las que el mucopéptido está más extendido por la pared dándole más rigidez que a las bacterias Gram-negativas, son más susceptibles a la lisozima, si no que hace falta añadir necesariamente el EDTA para producir la liberación de lipopolisacáridos de la envoltura de la pared, esta técnica raramente se utiliza a gran escala de las enzimas bacterianas, dando un costo elevado de la Lisozima. (Wiseman, 1991)

#### **2.8.2.1.3.- Detergentes**

Los detergentes pueden ser compuestos iónicos, lauril sulfato sódico, aniónico y el bromuro de cetildietilamónico, y no iónicos como los distintos tipos de Tween y de Tritón. Estas condiciones de fuerza iónica bajan y en un pH apropiado, los detergentes se combinan con las lipoproteínas formando micelas. Por lo tanto los constituyentes lipoprotéicos de las membranas biológicas pueden solubilizarse o las membranas hacerse permeables. (Wiseman, 1991)

Los detergentes iónicos son más reactivos que los no iónicos y pueden dar lugar a la disociación de las lipoproteínas, lo que a su vez produce posteriormente a la desnaturalización, precipitación y, ocasionalmente, a la hidrólisis de los enlaces

---

peptídicos de las proteínas. Por esta razón los detergentes no son ideales para la extracción de enzimas (Wiseman, 1991).

#### **2.8.2.1.4.- Shock por enfriamiento**

El efecto del shock por enfriamiento (una reducción rápida de T° desde la normal de crecimiento a 0°C) indica que las bacteria Gram-negativas son mas sensibles a este proceso que las Gram-positivas. Sin embargo para la ruptura celular a gran escala, el shock por enfriamiento es una técnica difícil de emplear por que existen dos limitaciones mas importantes impuestas por este método, que el choque frio un efecto muy pequeño o nulo en las suspensiones celulares. (Wiseman, 1991)

#### **2.8.2.1.5.- Shock osmótico**

Este método se a utilizado para la extracción de enzimas hidrolíticos y proteínas ligadoras a partir de bacterias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* y *E. coli*). El método incluye el lavado de las bacterias con una solución tamponada, para liberarlas del medio de cultivo y posteriormente su incorporación en una solución tamponada de sacarosa al 20%, en la que se deja que las células alcancen el equilibrio, perdiendo parte de su agua interna, que se elimina de la superficie por centrifugación. La pasta de células obtenidas se dispersa rápidamente en agua a unos 4°C.

El súbito aumento de la de la presión osmótica del interior de las células hace que se produzca la liberación de algunos constituyentes celulares. (Wiseman, 1991)

---

## **2.8.2.2.- Extracción por métodos físicos**

### **2.8.2.2.1.- Sonificación**

El término ultrasonido se utiliza para designar a los sonidos con frecuencia situadas por encima del nivel del oído humano. Se ha observado que algunas bacterias son muy resistentes a la disrupción ultrasónica. La eficiencia de este tratamiento con ultrasonido depende de varios parámetros medioambientales, como el pH, T°, la fuerza iónica del medio de suspensión y el tiempo de exposición.

La aplicación para la disrupción de cantidades elevadas de bacterias se ve limitada por la dificultad de transmitir suficiente potencia a grandes volúmenes de suspensión.

(Wiseman, 1991)

### **2.8.2.2.2.- Congelación y descongelación**

Los efectos de congelación y descongelación de microorganismos son similares a los obtenidos con los shock por enfriamiento y osmótico. Además del enfriamiento rápido y de la congelación del soluto intra y extracelular, la formación de cristales de hielo intra y extracelular produce daño a la célula. La eficiencia de este método en la liberación de proteínas en general es limitado, ya que solo se libera del 10% de las proteínas solubles totales en la operación, e incluso en la de bacterias Gram-negativas; además puede dar lugar a pérdidas de actividad enzimática. (Wiseman, 1991)

---

#### **2.8.2.2.3.- Cizalla sólida**

La ruptura de la células se debe a las fuerzas de cizalla ejercidas al pasar la pasta a través del pequeños orificios, aunque también colaboran los cristales de hielo formado en la pasta congelada. La disrupción celular mediante cizalla solida es un excelente método para obtener enzimas y preparaciones de paredes bacterianas. (Wiseman, 1991)

#### **2.8.2.2.4.- Cizalla líquida**

En el sistema de cizalla líquida para la disrupción de cloroplastos, la suspensión se hace pasar a través de una válvula de aguja a presiones de hasta 137 MPa, con un flujo de hasta 10 ml/min. La temperatura de salida se mantiene en torno a 15°C con CO<sub>2</sub> y el aparato tiene una capacidad de procesamiento de bacterias equivalente a 300 mg de proteína. (Wiseman, 1999)

---

## CAPÍTULO III

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Localización.

El desarrollo de este trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el Departamento de Nutrición y Alimentos de la misma, ubicada en la ex-hacienda de Buenavista, así como en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila ubicadas en la ciudad de Saltillo Coahuila México.

La semilla se obtuvo de un proyecto anterior (Calvo 2003) realizado en la UAAAN, el cual le quito olor, sabor y algunos compuestos tóxicos como las saponinas.

#### 3.2.- Determinación de celulosa y lignina.

En esta etapa se realizaron una pruebas de contenido (%) de fibra (celulosa y lignina) mediante el método de Van soest, 1968 (Figura 6).



Figura 6. Determinación de celulosa y lignina en muestra de calabacilla loca.

### 3.3.- Determinación del tiempo óptimo de digestión enzimática

Se procedió a la aplicación de un proceso de digestión enzimática (Figura 7), empleando una celulasa para dicho proceso, en un medio acuoso (buffer de acetatos) con un pH de 4.5 y una temperatura de 55°C en agitación constante, evaluando cinco concentraciones de enzima 0%, 0.5%, 0.10%, 0.15%, 0.20% en relación (p/p) con 2g de muestra de semilla de calabacilla loca en once tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300,360 minutos valorándose mediante la formación de azúcares totales (Técnica del Fenol sulfúrico, Dubois, 1956) y azúcares reductores (Técnica del Ácido Dinitrosalicílico, Miller, 1959).



Figura 7. Determinación de azúcares.

### 3.4.- Digestión de la muestra

Se realizó la molienda de la muestra mecánicamente, tomándose 10 g de muestra de calabacilla loca en un matraz de 500 ml adicionándole una cantidad determinada de buffer en donde la muestra pudiera estar totalmente suspendida, agregando 1ml por cada 2 g de muestra, sometiéndola a un baño maría por 120 min, tiempo de mayor hidrólisis enzimática, posteriormente se filtró por 12 h y se introdujo a una estufa desecadora por 24 h (Figura 8).

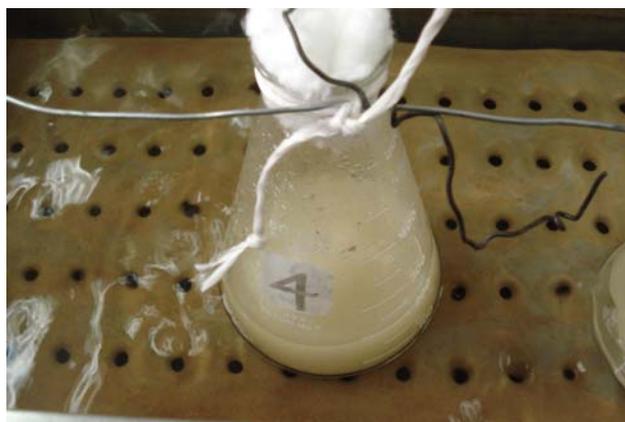


Figura 8. Degradación de la semilla por actividad celulolítica.

### **3.5.- Métodos de extracción de aceite**

En esta etapa se experimento con dos diferentes métodos de extracción (Soxhlet y Prensado) en ellos valorándose dos diferentes muestras (Con tratamiento enzimático y Sin tratamiento enzimático).

#### **3. 5.1- Extracción de grasa por método Soxhlet.**

En esta etapa se determino grasa por el método impuesto por la A.O.A.C, (1990), reduciendo la semilla a un tamaño de partícula de 2 mm en un molino Willey con una malla de descarga de 2 mm, donde se valoraron dos muestras (semilla sin tratamiento y semilla con tratamiento) por triplicado tomándose 2 g de muestra en ambas y sometíéndolas al método Soxhlet con 250 ml de hexano a diferentes tiempos 4, 6, 8, 10, 12 hrs que la totalidad de las muestras fueron de 30 (Figura 9).



Figura 9. Extracción de grasa por método Soxhlet.

### 3.5.2.- Extracción de grasa por método de prensado

En esta etapa se determina la cantidad de grasa por un método de prensado hidráulico (Figura 10) aplicando una presión de 30,000lb de fuerza con un prensa Enerpoc de modelo puji401B en tres tiempos de 3 ség. en dos muestras distintas (semilla sin tratamiento y semilla con tratamiento) en donde previamente se redujo la partícula a 2 mm por un molino Willey, los resultados se obtuvieron por diferencias de peso (peso inicial – peso final) en donde se colocaron 3 g de muestra en una plancha de acero protegida por un capa de cartón el cual absorbía el aceite en su totalidad dejando al descubierto la muestra sin contenido de grasa la cual se recuperaba para evaluación.



Figura 10. Extracción de aceite por el método de prensado.

---

### 3.6.- Análisis de IR

Después de haber realizado la extracción de aceite crudo (Figura 11), se sometió a un análisis IR con un espectrómetro FT-IR Nicolet 550.



Figura 11. Muestras estudiadas en IR

---

## CAPÍTULO IV

### 4.- RESULTADOS

#### 4.1.- Determinación de celulosa y lignina

Derivado del procedimiento descrito en el capítulo anterior se obtuvieron los siguientes resultados para la cuantificación de celulosa y lignina en esta prueba (Tabla 2)

Tabla 2. Contenido de celulosa y lignina en las semillas de calabacilla loca.

<b>CELULOSA</b>	<b>LIGNINA</b>
7.19%	5.26%

Con los datos anteriores es posible establecer que las celulasas, son las enzimas adecuadas para degradar el pericarpio de las semillas en estudio, facilitando la obtención del componente de interés (aceite).

#### 4.2.- Determinación de la concentración y tiempo óptimo de digestión enzimática.

Una vez concluida la etapa anterior, se realizó un análisis estadístico consistente en una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), por medio de la cual se dedujo que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones de enzima a 0.05%, 0.15% y 0.20% (anexo 1), las cuales presentaron casi la misma velocidad de reacción (Figura 12).

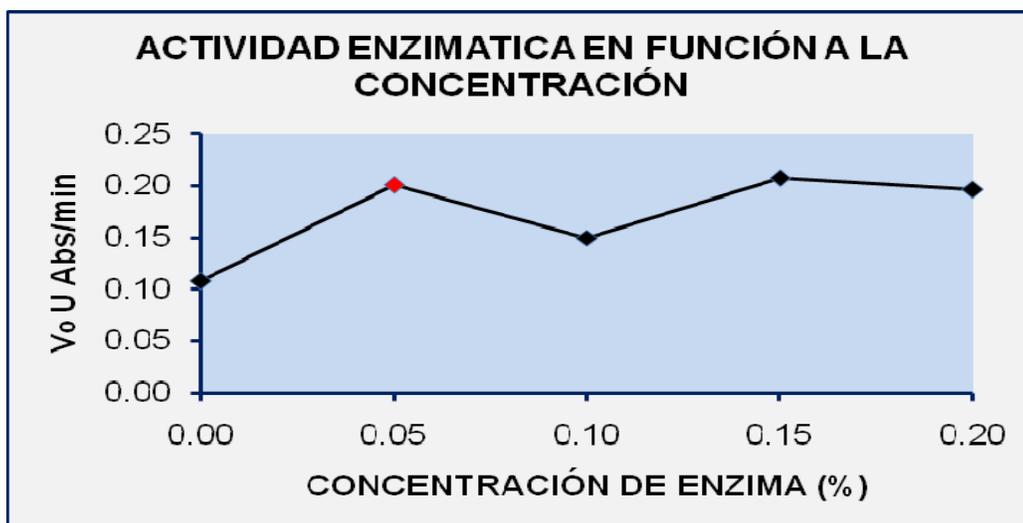


Figura 12. Velocidades iniciales de reacción ( $V_o$ ).

De lo anterior se sugiere el uso de la concentración al 0.05% de enzima ya que esto representa un ahorro de 2/3, con la misma eficiencia, representando una buena opción ya que estudios similares realizados por Guerra, Zúñiga (2003), reportan concentraciones de hasta el 2% a fin de lograr resultados similares a los aquí expuestos, permitiendo citar que esta celulasa es efectiva por que en menores concentraciones obtenemos igual de beneficios, lo cual representa un buen ahorro de tipo económico.

La grafica 13 expresa que el tiempo de 120min es el óptimo para un mejor costo-beneficio ya que presenta diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), con respecto a los 90, 45, 30, 15 y 0 min. de contacto, no así con los posteriores de 180, 240, 300, 360 min., por lo que la aplicación del mismo implica obtener la misma eficiencia que con tiempos mayores obteniendo un ahorro considerable de recurso. Lo anterior es similar a lo reportado por Guerra, Zúñiga (2003), quienes realizan una digestión enzimática para facilitar la extracción de aceite de pipa de uva por un método de prensado en frío en un tiempo óptimo de degradación de 3hrs.

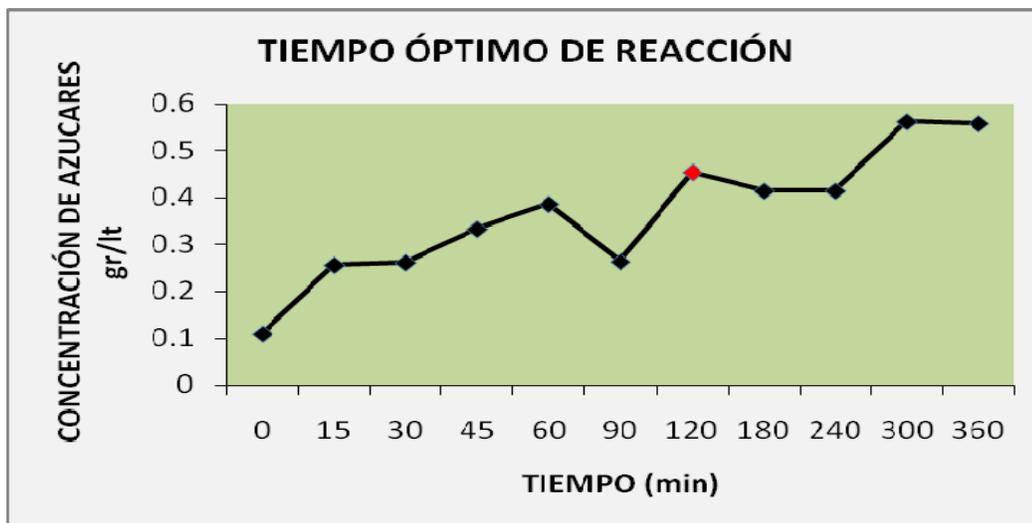


Figura 13. Concentración de azúcares a través del tiempo.

#### 4.3.- Comparación de rendimientos en para la extracción con y sin pre tratamiento por método Soxhlet.

Los datos obtenidos de la metodología correspondiente se analizaron con una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), evaluando el porcentaje de aceite obtenido en función a tiempo y tipo de muestra (Con enzima y sin enzima). Los resultados del estadístico indican que el mejor tiempo fue de 12 h (Figura 14); sin embargo, es a las 4 horas de extracción con muestra pretratada cuando se obtiene un mayor beneficio-costos ya que existe una mínima diferencia entre estos dos tiempos y el menor por consiguiente, a gran escala, representa un ahorro importante de recursos económicos.



Figura 14. Prueba de Tukey para extracción de aceite en función al tiempo y tipo de muestra.

Los rendimientos de extracción de aceite en Soxhlet, sin tratamiento enzimático en esta etapa son similares a los reportados por Calvo (2003), y son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ), de los obtenidos con el mismo procedimiento con pre tratamiento enzimático, el cual logra mejores rendimientos (Figura 14).

El aceite recuperado a través de los tiempos presenta diferentes coloraciones en el caso de las 4h con tratamiento enzimático contiene un color amarillo muy claro y el de sin tratamiento es igual pero con un nivel mas oscuro, y posteriormente entre mas tiempo mas subía su tonalidad, esto debido probablemente al arrastre de compuestos solubles en aceite como algunos pigmentos lo cual puede mejorar el rendimiento de extracción, pero se obtendrá un aceite menor pureza el cual al someterse al proceso de blanqueado, mermará considerablemente sus rendimientos.

#### 4.4.- Comparación de rendimientos en para la extracción con y sin pre tratamiento por método de prensado.

En este método los resultados obtenidos la diferencia es estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ), entre los dos tipos de muestras ya que el rendimientos es mayor en la muestra con pre tratamiento enzimático. (Figura 15).

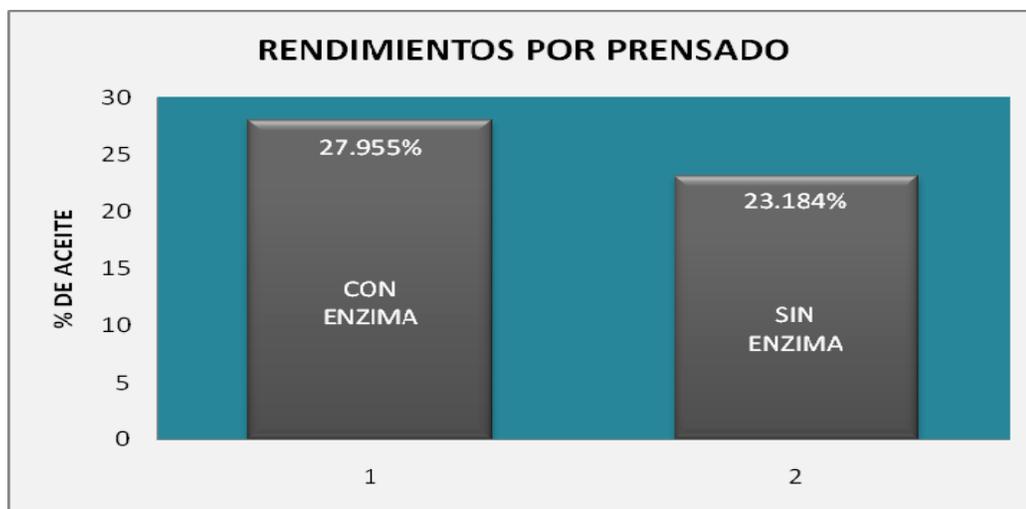


Figura 15. Rendimientos en % con y sin tratamiento enzimático en la extracción por prensado.

#### 4.5.- Comparación de rendimientos entre la extracción con solventes y prensado pre tratados enzimáticamente.

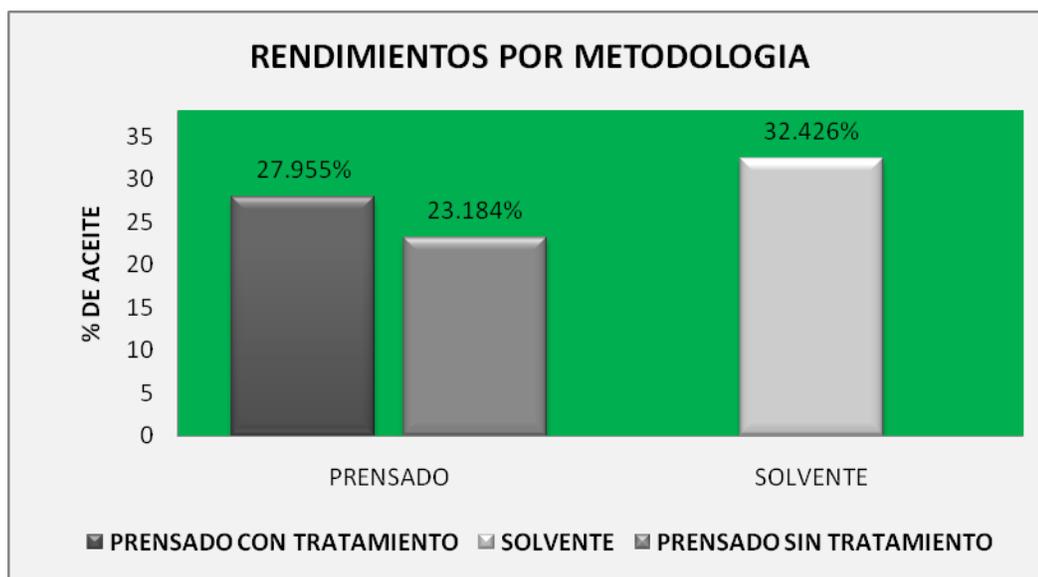


Figura 16. Comparación de rendimientos de aceite entre prensado y solventes.

---

Las comparación de rendimientos entre las muestras son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), siendo la muestra extraída con solvente la que mayores rendimientos presentó, 34.426 %, en contraste con el método de prensado donde para la muestra sin tratamiento enzimático se obtienen rendimientos del 23.184% y de 27.950% para la muestra pre digerida, lo que representa perdidas del 27.400% y 13,81% respectivamente, reduciéndose en casi un 50% las perdidas en este proceso (Figura 16).

Por otro lado el método tradicional mediante solventes (hexano compuesto toxico y volátil) deja residuos no favorables para la composición del aceite, además, para su aplicación se necesita mayor inversión en energéticos, compuestos químicos, mano de obra e igualmente para realizar su blanqueado, al contrario del prensado que es un método mas económico y por el cual se obtiene un aceite de mayor propiedades el cual no fue expuesto a temperaturas elevadas, lo cual favorece a su descomposición de tipo oxidativa e hidrolítica (del Castillo, 2006), sin dejar de lado los residuos adquiridos por el contacto con reactivos químico, impactando directamente en los rendimientos a la hora del refinado, como lo muestran los resultados obtenidos en un estudio similar, por Calvo (2003), el cual reporta una perdida del 58.334% en el refinamiento del aceite de semilla de calabacilla loca.

#### 4.6.- Análisis de IR

En esta etapa los aceites obtenidos, de los diversos tratamientos fueron sometidos a un análisis IR presentado en la Figura 17, del cual es posible citar que los espectros no son idénticos, pero presentan similitudes en cuanto a la frecuencia de absorción de los picos.

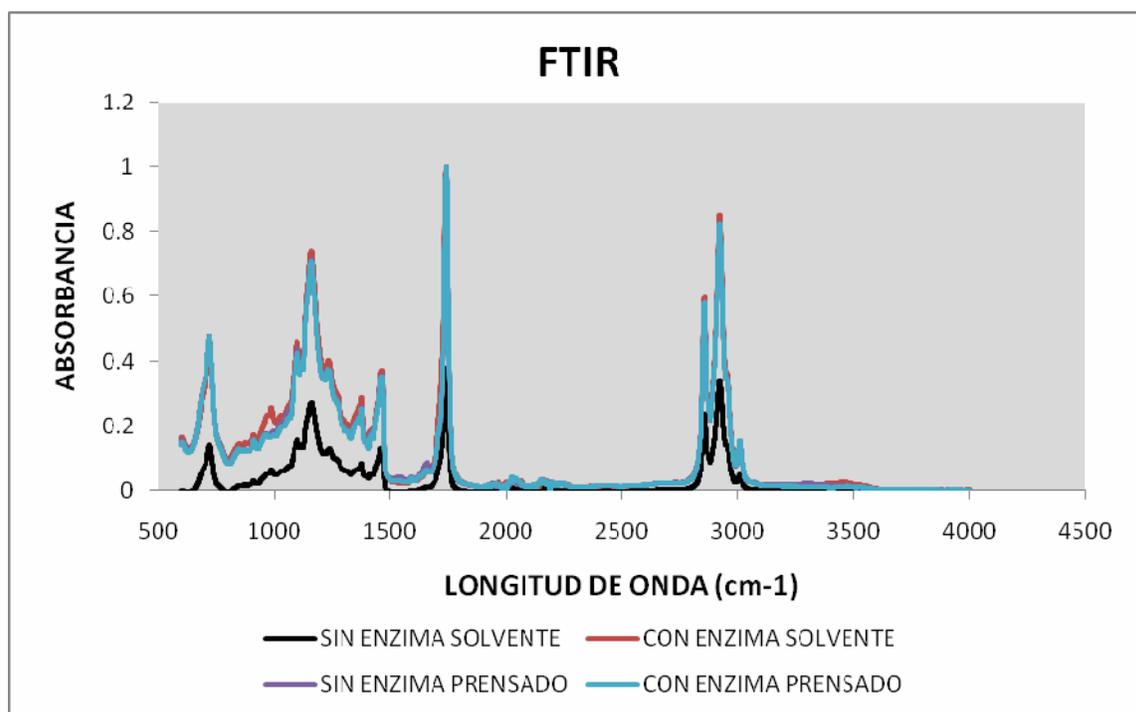


Figura 17. Análisis IR en aceite de la semilla de Calabacilla Loca.

En la Figura 17 es posible apreciar claramente que las muestras con tratamiento de prensado, con y sin pre tratamiento enzimático, se superponen lo que indica que ambos aceites comparten en gran medida los mismos grupos funcionales como son COOH, esqueleto alifático y número de dobles enlaces.

---

Por otra parte la muestra obtenida mediante el tratamiento de extracción por solvente sin predigestión enzimática presenta notables diferencias en relación con las otras tres muestras; lo cual puede deberse a la presencia de otro tipo de compuestos que pudieron ser arrastrados en el medio extractor junto con el aceite de interés o bien cambios originados por el proceso térmico al que fue sometido ya que como es conocido, los lípidos presentan daños de tipo oxidativo e hidrolítico (del Castillo, 2006), al ser tratados de esta manera, lo que al momento del refinado dará pérdidas en función a los rendimientos.

La región de los 4000 a los 2500  $\text{cm}^{-1}$  es la región de vibración de los enlaces X-H, donde X se señala para los enlaces O-H, C-N, N-H. En la Figura 17 se observan unos pequeños picos asociados a la región 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , los cuales es posible asociar a enlaces C-H, ya que los ácidos grasos tienen un buen número de enlaces alifáticos de este tipo.

En el rango de los 1020 a 1105  $\text{cm}^{-1}$  se asocia a la vibración de enlace de C-O, del grupo carboxílico o del grupo éster, en los 1160  $\text{cm}^{-1}$  se asocia también al enlace C-O y es probable que los primeros intervalos se deban a vibraciones tipo flexión y el siguiente a tipo extensión.

En el rango de 1241-1460  $\text{cm}^{-1}$  se asocia a la presencia de fenoles o de compuestos fenólicos, debido tanto a los enlaces C-O y de manera simultánea al enlace OH de los aromáticos.

Se aprecia un gran pico que se asocia con los enlaces C=C de los alquenos a los 1637  $\text{cm}^{-1}$ , y una pequeña banda a los 2854 y 2924  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a CH<sub>2</sub> simétrico y CH<sub>2</sub> asimétrico.

---

La presencia de absorción en la zona cercana a los 1550  $\text{cm}^{-1}$  para todas las muestras es indicativo de la presencia del ácido oleico que se absorbe a los 1554  $\text{cm}^{-1}$  y concuerda con los estudios previos realizados por Calvo 2003, quien menciona haber este tipo de compuestos presentes en muestras de aceite de calabacilla loca, la presencia de picos en las zonas asociadas a los dobles enlaces C=C, sugiere la presencia de ácidos grasos insaturados como pudiera ser el linoléico reportado por Chávez en 1978, al trabajar con aceites de esta fuente.

---

## CAPÍTULO V

### 5.- CONCLUSIONES

La semilla de calabacilla loca esta constituida entre otros componentes por fibras, de las cuales en un 7.19% de celulosa y 5.26% de lignina lo que favorece a la aplicación de una enzima celulolítica (celulasa) ya que mediante su metabolismo degradara las zonas amorfas de la celulosa dejando mas disponible el compuesto de interés.

De las concentraciones y tiempos usados para la determinación de la mejor hidrólisis enzimática se concluyo que la de mayores beneficios fue la de 0.05% ya que no presenta diferencias estadísticamente significativa con las posteriores Tukey ( $p < 0.05$ ), y la aplicación de esta da como consecuente la misma eficiencia con un ahorro de 2/3 partes de enzima lo que representa mayor rentabilidad.

En cuanto a el tiempo optimo de reacción se estableció que a los 120 min de degradación se obtiene la mayor concentración de azúcares totales, siendo este estadísticamente significativo Tukey ( $p < 0.05$ ), al compararlo con los de 180, 240, 300 y 360 min. La aplicación de estos resultados a escalas industriales representa un considerable ahorro de energéticos, sustancias químicas lo que se transforma en utilidad neta para esta.

En cuanto a los métodos de extracción (Soxhlet y Prensado) se puede concluir que el de mayores rendimientos fue Soxhlet al obtener un 9.242 % mas, que el método de prensado y un 10.778% con anterior pretratamiento enzimático, pero si se observa desde el punto de vista costo-beneficio el método de prensado es la mejor alternativa ya que se obtiene un aceite denominado extra virgen por el tipo de proceso, el cual no permite el contacto con otras sustancias que pudiese dejar residuos tóxicos sobre este

---

y además no aplica temperaturas altas las cuales son precursoras de la oxidación del aceite y lo cual impactara directamente en el proceso de refinado por ser un aceite menos lastimado, por los procesos antes citados, ya que estudios previos muestran perdidas de hasta 58% durante el proceso de refinado para aceites extraídos mediante el uso de solventes.

Del análisis IR es posible concluir que los aceites obtenidos mediante los diversos tratamientos, presentaron como ácidos grasos predominantes al oleico y linoléico. Así mismo las muestras obtenidas bajo las condiciones de prensado indican un buen grado de esterificación y amplia similitud entre ellas, en contraste la muestra obtenida mediante reflujo con solvente, muestra la existencia de otro tipo de compuestos que pudieron ser arrastrados por el solvente, además del propio aceite, lo cual repercutirá en el rendimiento final del aceite extraído al momento del refinado.

## **6.- RECOMENDACIONES**

Se sugiere trabajar en el proceso de refinado, mediante procesos físicos Guerra, Zúñiga (2003), y comparar eficiencias entre los rendimientos una vez concluido este proceso.

---

## CAPÍTULO VI

### 7. – BIBLIOGRAFÍA

**AGOSTONI C et al** (2001). Long-chain poly saturate fatty acid concentration in human hind milk are constant throughout twelve months of lactation. In: D.S. Newburg, Edition, Bioactive components of human milk; and lactation interna, Kluwer, Academic publishers, New York.

**ANON** 1997. Official methods and recommended practice of the American Oil Chemists' Society, in Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, AOCS Press, Champaign, IL.

**BA-AMIR**, M.A. and W.P. Bemis 1968. Frutri and seed development in *Calabacilla foetidissima*. Eco. Bot. 22:297-299.

**BADUI** D Salvador. 1996. Química de los alimentos. Editores S.A DE C.V

**BADUI** Delgar Salvador (1993). Química de los alimentos, tercera edición, editorial Universid, México D.F. 117, 118 pp.

**BAILER**, L.H, 1943. Species of cucurbita genetic. Herb. 6:267-322.

**BELDMAN** G, Voragen AGJ. Rombouts FM, Pinik W (1988). Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering. Journal 31: 173-178.

**BEMIS**, W.P., 1963. Interspecific hybridization in Cucurbita II. *C. moschata* poir xerophytic species of cucurbita. Journal of heredity 54:285-289.

---

**BEMIS**, W.P., 1964. Interspecific hybridization in Cucurbita. Department of horticulture. University of Arizona. Journal of heredity washinton, D.C.LIV.

**BEMIS**, W.P., J.W. Berry and C.W. Weber. Breeding, 1977. Domestication and utilization of the buffalo gourd, Department of plant sciences, university of Arizona.

**BEMIS**, W.P., W.P. Berry and C.W. Weber. 1978. The Buffalo Gourd, a potential crop for arid lands. Arid Lands Newsletter, University of arid zona 8:1.

**BERRY**, J.W., C.W. Weber, W.P. Bemis, J. Sheerens 1976. Protein, lipid, and carbohydrate components of xerophytic cucurbits. Journal of the Arizona academy of science 11:16.

**BERRY**, J.W., W.P. Bemis, C.W. Weber and T. Philip 1975 Cucurbita root stretches:isolation and some properties of starches from Cucurbita foetidissima HBK AND C. Food chemistry 23:825.

**BERRY**, J.W., C.W. C.W. Weber, M.L, Dreher and W.P, Bemis 1976. Chemical composition of buffalo gourd, a potential food source. Journal of food science 41:465-466.

**BERRY**, J.W., 1976. Research note chemical composition of buffalo gourd, a potential food source. Tucson colle of agriculture university of Arizona. Journal of food science 41:465-466.

**CHAVEZ** J.L, H Gomez 1978. La calabacilla loca (Cucurbita foetidissima HBK) aportaciones a su domesticación U.A.A.A.N.

---

**CURTIS, L.C**, 1946. The possibilities of using species of perennial cucurbits as source of vegetable fats and protein. The chemurgic digest 5:221-224.

**CURTIS, L.C**, 1974. An attempt to domesticate a wild, perennial, xerophytic gourd, Cucurbita foetidissima. Progress Report IV. Arid lands Agriculture development program. Beirut Libano.

**CURTIS, L.C**, 1974. The domestication of a wild perennial xerophytic gourd, Cucurbita foetidissima, the buffalo gourd.

**DÍAZ, I.** (1993) Modificación de la composición lipídica durante procesos tecnológicos del jamón curado. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

**DUBOIS, M.**, Guilles, K.A, Hamilton, J.K, Rebers, P.A y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:530 pág. final.

**ERIKSON KE;** Wood TM (1985). Biodegradation of cellulose: biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi T (ed). Academic Press, New York. 469 – 503pp.

**HAMOSH M** (1995). Lipid metabolism in pediatric nutrition. North Am. 12, 839-859.

**JENSEN RG.** (1995). Hand book of milk composition, Academic Press, San Diego.

**M. GUERRA, M. E. ZÚÑIGA.** 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipas de uva, Vitis vinifera, por prensado en frío. Pág. 234-278

**MAGGIE B.** Covington, M.D. 2004. Omega-3 Fatty Acids. University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland. American Family Physician. Volume 70, # 1, 134-140.

---

**MILLER**, G.L, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31:426-428.

**MORRIS**, rich. 2002. Cucurbita foetidissima. Plants for a future.

**MUGGLI**, R. Nutritional aspects of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, Agro-Food-Industry Hi-Tech, Jan./Feb., 35-36, 1997.

**ROLANDO**, M. 1985. Los productos de las plantas: Una visión integral. Publicación, Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)., pág. 36-39.

**TEJADA**, 1992. Manual de control de calidad y análisis de alimentos para animales. Pág. 334-345.

**VAN SOEST**, P,J., and R.H. Wine, 1968. Determinación de fibra por el método detergente-acido. J. Assoc off. Chem. 51:780.

**WISEMAN**, 1991. Manual de biotecnología de las enzimas. Ed. Acribia Zaragoza, España. Paginas consultadas: 7 – 39, 334 y 335.

**WOLFF**, I.A. 1966. Sience 154, 1140.

**ZDZISLAW E.**, Anna K. 2003. Chemical Functional Properties of Food lipids. USA. Pag. 196.

---

## 7.1.- CONSULTAS WEB

1. - (Web 1). Disponible en

<http://www.ramirez.8m.net/aceite.htm> 15/10/07. 6:40pm

2.- (Web 2). Disponible en

<http://www.argenbio.org/glosario/index.php?letra=b> 15/10/07. 6:34pm

3. - (Web 3). Disponible en

<http://www.uclm.es/profesorado/jvillasenor/esp/ingbioq/hidr%C3%B3lisis%20enzimatica.pdf>. 29/11/06. 8:11pm

4. - (Web 4). Disponible en

INEGI. CENSOS ECONÓMICOS 2005. Cantidad y valor de ventas de los productos elaborados según clase de actividad. Fabricación de aceites y grasas vegetales comestibles. Disponible en:

[http://www.inegi.gob.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/encuestas/establecimientos/eim/resumen/2005/pro\\_v1.xls](http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/encuestas/establecimientos/eim/resumen/2005/pro_v1.xls) 17/11/2007; 16:10 pm.

5. - (Web 5). Disponible en

<http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/hdec/HdeC4.html>. 30/10/2006  
3:26 pm.

6. - (Web 6). Disponible en

<http://www.holistica.net/nutricion/articulos/temperaturadecoccionyenvejecimiento.asp.html>. 26/11/2007 11:09am

## CAPÍTULO VII

### 8.- ANEXOS

#### Anexo 1: Prueba de Tukey para Vo

Concentración				Vo
0.15	A			0.20766667
0.05	A			0.20066667
0.2	A			0.19633333
0.1		B		0.15000000
0			C	0.10800000

#### Anexo 5: Prueba de Tukey para la determinación del tiempo optimo de digestión.

Tiempo				Concentración azucares gr/lts
300	A			0.56203474
360	A			0.55789909
120	A	B		0.45326716
180	A	B		0.41397849
240	A	B		0.41397849
60	A	B		0.38585608
45		B		0.33250620
90		B	C	0.26302730
30		B	C	0.26095947
15		B	C	0.25558313
0			C	0.10835401

#### Anexo 2: Prueba de Tukey en cuestión a tiempo para la extracción con solvente.

Tiempo h			% de aceite
12	A		36.241667
10	A	B	35.639167
4		B	35.412500
6		B	35.170000
8		B	35.103333

#### Anexo 3: Prueba de Tukey para rendimiento en extracción por solvente.

Tipo de muestra			% de aceite
Con enzima	A		38.482000
Sin enzima		B	32.544667

---

**Anexo 4: Prueba de Tukey para rendimientos en extracción por prensado.**

<b>Tipo de muestra</b>			<b>% de aceite</b>
Con enzima	A		27.955286
Sin enzima		B	23.184347