

# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**“Optimización del tratamiento enzimático asistido con  
ultrasonido para la extracción de aceite a partir de semillas de  
moringa (*Moringa oleífera*)”**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta

**I.B.Q. María Luisa José Zamora**

Dra. Delia E. Páramo Calderón  
Director

Dr. Andrés Aguirre Cruz  
Co-Director

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. 2017

---

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad del Papaloapan por todas las facilidades y apoyo brindado para realizar mis estudios durante la Maestría en Biotecnología, por brindarme el espacio físico y los equipos necesarios para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Biotecnología.

Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), por la colaboración en este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por otorgarme las facilidades para la realización de este trabajo de investigación.

Al Instituto Tecnológico de Tuxtepec, por haberme brindado su apoyo durante la experimentación del proyecto de investigación.

A la Dra. Delia E. Páramo Calderón, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por su apoyo otorgado en la dirección de la tesis, por su amistad y por sus valiosas aportaciones.

Al Dr. Andrés Aguirre Cruz, por haberme aceptado a formar parte de su equipo de trabajo, por su auxilio en los resultados obtenidos, por la atención brindada, por su valioso aporte en cuanto a la orientación de este estudio y por su disposición en la dirección de la tesis.

Al Dr. Julián Peña Castro por la provision de las enzimas empleadas durante el trabajo de investigación.

Al Dr. Alejandro Aparicio Saguilán, por su amistad, por ayudarme a interpretar resultados y apoyo durante el trabajo experimental.

A mis amigos y compañeros de la maestría a Demetrio, Ofelia, Nancy Cruz, Avenamar, Xóchitl, Carmín, a la química Luz, Karina, y Jair por brindarme su amistad durante mi estadío por la UNPA.



## **Dedicatoria**

### **A MI DIOS**

*Por haberme brindado la fuerza y paciencia, para resistir en este camino tan especial para mí, por haberme brindado agallas por el ser que habitaba dentro de mí, pero sobre todo por habérmela entregado tan llena de vida.*

### **A MI HIJA**

*Gracias mi vida por haber resistido, gracias por ser mi pequeña Isabella, porque cada día que pasaba tú me recordabas que tenía que continuar, pero sobre todo por siempre esperarme con tus bracitos abiertos cada que vez que llegaba.*

### **A MI MADRE**

*Teresa Zamora González, mama Tere lo hiciste muy bien, te agradezco haber hecho de mí una mujer fuerte y decidida, por todos esos días diciéndome fíjate donde pisas, cuídate del urbano, te adoro mama por haberme apoyado en mis malas y buenas decisiones Y por perdonar mis errores.*

*¡Gracias ma!*

### **A CARLOS MI ESPOSO**

*Por esos días tan difíciles, por motivarme para seguir adelante y por confiar en mí.*

*A mis hermanos Adolfo, Marcos y Gabriel, por su enorme apoyo, comprensión y cariño.*

---

# ÍNDICE

Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Moringa oleífera</i> .....	3
2.1.1 Descripción botánica.....	3
2.1.2 Composición química de las semillas.....	4
2.1.3 Usos y aplicaciones.....	6
2.1.4 Productos elaborados a partir de las semillas.....	6
2.2 Procesos de extracción del aceite.....	8
2.2.1 Procesos convencionales.....	8
2.2.1.1 Extracción por prensado.....	8
2.2.1.2 Extracción acuosa.....	9
2.2.1.3 Extracción con disolvente.....	9
2.2.1.4 Extracción por medio de lixiviación.....	10
2.2.1.5 Extracción por medio de percolación.....	10
2.2.1.6 Extracción tipo soxhlet.....	10
2.2.2 Procesos no convencionales.....	11

---

---

---

2.2.2.1 Extracción con fluidos supercríticos.....	11
2.2.2.2 Extracción con ultrasonido.....	11
2.2.2.3 Extracción con microondas.....	13
2.3 Tratamientos previos al proceso de extracción.....	14
2.3.1 Acondicionamiento.....	14
2.3.2 Molienda.....	14
2.3.3 Laminado.....	14
2.4 Enzimas.....	15
2.4.1 Pretratamiento enzimático.....	16
2.4.2 Factores que afectan la actividad enzimática.....	19
2.5 Optimización.....	19
2.5.1 Metodología empleada para optimizar el proceso.....	20
2.5.1.1 Características de la metodología empleada.....	21
2.5.1.2 Finalidad de la Metodología de superficie de respuesta.....	21
2.5.1.3 Ventajas y desventajas de la Metodología de superficies de respuestas.....	21
2.5.1.4 Principales propiedades de superficie de respuesta.....	21
2.5.2 Diseño experimental para el análisis por metodología de superficie de respuesta (MSR).....	23
2.5.2.1 Diseños de primer orden .....	23
2.5.2.2 Diseños de segundo orden .....	24
2.6 Síntesis de antecedentes.....	25
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>IV. HIPOTÉSIS.....</b>	<b>27</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 Objetivo general.....	28

---

---

5.2 Objetivos específicos.....	28
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
6.1 Materia prima.....	28
6.2 Materiales y reactivos.....	29
6.3 Metodología.....	29
6.3.1 Acondicionamiento de la materia prima.....	29
6.3.1.1 Limpieza y deshidratación de las semillas.....	29
6.3.1.2 Molienda.....	29
6.3.2 Análisis químico proximal.....	29
6.3.2.1 Determinación del contenido de humedad.....	30
6.3.2.2 Determinación del contenido de proteína.....	30
6.3.2.3 Determinación del contenido de lípidos.....	31
6.3.2.4 Determinación del contenido de cenizas.....	32
6.3.2.5 Determinación del contenido de fibra.....	32
6.3.3 Pre-tratamiento enzimático.....	33
6.3.4 Extracción del aceite.....	33
6.3.4.1 Extracción asistida por ultrasonido.....	33
6.3.4.2 Extracción tipo Soxhlet.....	34
6.3.5 Caracterización morfológica empleando microscopia electrónica de barrido (SEM).....	34
6.3.6 Determinación de la calidad del aceite.....	34
6.3.6.1 Índice de acidez.....	34
6.3.6.2 Índice de yodo.....	35
6.3.6.3 Índice de saponificación.....	35
6.3.6.4 Índice de peróxido.....	36

---

---

6.3.7 Determinación de la estabilidad térmica del aceite por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	36
6.4 Diseño experimental y análisis estadístico.....	37
6.5 Optimización del proceso.....	38
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
7.1 Composición química proximal de la harina obtenida de semillas de moringa.....	39
7.2 Pre-tratamiento enzimático.....	40
7.3 Extracción de aceite.....	42
7.3.1 Extracción por ultrasonicación.....	42
7.3.2 Extracción por Soxhlet.....	45
7.4 Caracterización morfológica.....	47
7.4.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	47
7.5 Determinaciones químicas.....	50
7.6 Análisis térmico.....	53
7.7 Optimización del proceso del proceso de extracción de aceites de la harina de las semillas de Moringa oleífera.....	56
7.7.1 Análisis de gráficos de MSR.....	58
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de moringa.....	3
Tabla 2. Composición química de las semillas de moringa.....	4
Tabla 3. Composición de ácidos grasos de algunos aceites vegetales.....	5
Tabla 4. Parámetros de calidad del aceite de moringa.....	5
Tabla 5. Análisis de calidad para aceites comestible.....	7
Tabla 6. Productos elaborados a partir de las semillas de moringa.....	8
Tablas 7. Clasificación de las enzimas según la Internacional Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).....	16
Tabla 8. Actividad catalítica del complejo enzimático ACCELLERASE® 1500.....	16
Tabla 9. Ventajas y desventajas de la metodología de superficie de respuesta.....	22
Tabla 10. Condiciones para el diseño experimental del pretratamiento enzimático.....	37
Tabla 11. Matriz del diseño experimental para el tratamiento enzimático.....	38
Tabla 12. Análisis químico proximal de la harina obtenida a partir de semillas de moringa.....	40
Tabla 13. Matriz experimental del pretratamiento enzimático.....	42
Tabla 14. Tiempos de sonicación en muestras con y sin hidrólisis.....	44
Tabla 15. Contenido total de grasa en cuantificación por soxhleth.....	47
Tabla 16. Análisis químicos de la calidad del aceite de la harina de las semillas de <i>Moringa Oleifera</i> .....	52
Tabla 17. Transiciones térmica de aceite de moringa extraído por método convencional (LS) y con pretratamiento (LS1) *.....	56
Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) de RSM para pretratamiento enzimático.....	58

---

## ÌNDICE DE FIGURAS

Figura.1 Proceso de cavitación (Zheng y Sun, 2006).....	13
Figura 2. Mecanismo de extracción de aceite por disolvente (Karnofsky, 2001).....	18
Figura 3. Porcentaje de grasas obtenidos apartir de la harina de moringa utilizado tratamiento enzimático y ultrasonido.....	45
Figura 4. Muestras de harina de moringa con pre-tratamiento enzimático y sometidas a ultrasonido utilizando diferentes potencias (20, 50, 70, 100 y 110 W).....	45
Figura 5. Porcentajes de grasa obtenidos apartir de la harina de moringa sin ningún tratamiento y cuantificada a diferentes tiempos de extracción (1, 2, 3, 4 y 5 h).....	47
Figura 6. Micrografia de una muestra de harina obtenida de semillas de moringa sin pretratamiento enzimático (a) y con pretratamiento enzimático (b).....	50
Figura 7. Micrografias de SEM de harina de moringa hidrolizada con la mejor condición del pretratamiento enzimático. Magnificaciones: a) 5000x, b) 65005x, c) 2500x y d) 15000x.....	51
Figura 8. Termogramas de aceite de moringa: a) extraído por el método convencional (LS) y b) extraído con pretratamiento óptimo (LS1).....	55
Figura 9. Gráfica de superficie de respuesta tridimensional en la que se observa el rendimiento de aceite esperado en función de la temperatura y la concentración de la enzima.....	60
Figura 10. Gráfica de contornos de la MSR correspondiente al rendimiento de aceite en función de la temperatura y concentración de la enzima.....	61

---

## RESUMEN

En este trabajo se realizó la investigación de la optimización del pre tratamiento enzimático asistido con ultrasonido para la extracción de aceite a partir de semillas de moringa (*Moringa Oleífera*). Con el fin de obtener un mayor rendimiento de aceite. Se realizaron las primeras pruebas presuntivas disminuyendo primeramente el tamaño de partícula de la muestra, ya que esto permitió que el complejo enzimático que se utilizó tuviera mayor superficie de contacto. Posteriormente, se realizaron algunas pruebas como el análisis químico proximal de la muestra tratada y del control se realizó su caracterización morfológica. La parte experimental consistió en realizar un diseño experimental (diseño Box-Behnken) utilizando el análisis de la metodología de superficie de respuesta, dicho diseño se elaboró desde el software desing expert 7.0. Donde, las variables independientes involucradas fueron: temperatura, tiempo y concentración enzimática (ACCELLERASE 1500), con un total de 15 experimentos, utilizando la metodología de superficie de respuesta para optimizar el proceso de extracción de aceite ya que esta estrategia experimental nos permite resolver el efecto que tienen estas variables sobre el rendimiento del aceite de moringa.

El aceite de moringa sin tratamiento enzimático presento un valor de 14.41% de aceite, a diferencia del obtenido por la extracción por soxhlet ( 35.23%), en comparación con el aceite extraído en combinación de métodos, arrojó un 72.89%, lo cual indica, que el utilizar enzimas favore el rendimiento en extracción de aceites. Por otro lado, el análisis de calorimetría diferencial de barrido arrojó que el aceite de moringa presenta un 18.9°C de punto de fusión, esto quiere decir que los resultados probablemente difieren en el porcentaje de sus ácidos grasos. Se realizaron algunas determinaciones de calidad, tales como, el índice de yodo, ácidos grasos libres, índice de acidez, índice saponificación y peróxido, tales valores fueron relativamente bajos. Sin embargo, el aceite de moringa se caracteriza por ser un aceite con alta estabilidad oxidativa, estos cambios probablemente se le atribuye a las características del cultivo.

la caracterización morfológica estudiada por microscopia electrónica de barrido mostrò el efecto que presentaban las muestras tratadas con enzima, demostrando que la disminución del tamaño de partícula, es el factor de mayor relevancia que acelera la actividad hidrolítica a, facilitando la extracción de aceite en la muestra; a diferencia de la muestra control en donde se aprecia claramente los gránulos de harina de la muestra sin ser extraída.

La técnica de metodología de superficie de respuesta se utilizó para optimizar las variables independientes para la máxima extracción de aceite. A partir de los valores optimizados de temperatura extracción (60 °C), concentración enzimática (300 µl) y tiempo de residencia (174 h), el rendimiento máximo de aceite obtenido fue 97.55%, usando cloroformo: metanol (2:1) como

---

disolventes. Una vez optimizadas las variables del modelo de regresión de superficie de respuesta ajustado a los datos experimentales de la harina de las semillas de moringa, mostrò un buen ajuste del coeficiente de determinación (96.4%). El rendimiento máximo extraído del aceite de las semillas de moringa fue altamente significativo. Durante la validación, el modelo explicó los resultados experimentales obtenidos con un 72.89%, es decir que existe la probabilidad de que la función que el modelo predijo tenga que ser ajustado, para que los resultados del modelo de regresión se han más precisos y confiables.

---

## ABSTRACT

In this work the investigation of the optimization of the enzymatic pretreatment assisted with ultrasound for the extraction of oil from moringa seeds (*Moringa Oleifera*) was carried out. In order to obtain a higher oil yield. The first presentive tests were carried out by first decreasing the particle size of the sample, since this allowed the enzymatic complex that was used to have a larger contact surface. Subsequently, some tests were performed as the proximal chemicals of the treated sample and the control was carried out to perform its morphological characterization. The experimental part consisted in performing an experimental design (box-behknen design) using the analysis of the response surface methodology, this design was elaborated from software desing expert 7.0. Where, the independent variables involved were: (ACCELLERASE 1500), with a total of 15 experiments, using the response surface methodology to optimize the oil extraction process, since this experimental strategy allows us to solve the effect of these variables on yield of moringa oil.

Moringa oil without enzymatic treatment presented a value of 14.41% of oil, unlike that obtained by the extraction by soxhlet (35.23%), compared to oil extracted in combination of methods, yielded a 72.89%, which indicates, that using enzymes favors the performance in extracting acites. On the other hand the differential scanning calorimetry analysis showed that the moringa oil has a similar flavor to that of peanut oil. It was found that the melting point is 18.9 °C, meaning that the results are likely to differ in the percentage of their fatty acids. Some quality determinations were made, such as the iodine number, free fatty acids, acid number, saponification index and peroxide, such values were relatively low. However moringa oil is characterized by being an oil with high oxidative estabilidad, these changes probably are related to the characteristics of the culture.

The morphological characterization studied by scanning electron microscopy showed the effect of the samples treated with enzyme, showing that the decrease of the particle size is the most important factor that accelerates the hydrolytic activity, facilitating the extraction of oil in the sample; unlike the control sample where granules of the sample are clearly seen without being extracted.

The technique of surface response methodology was used to optimize the independent variables for maximum oil extraction. From the optimized values of extraction temperature (60 ° C), enzymatic concentration (300 µl) and residence time (174 h), the maximum oil yield obtained was 97.55% using chloroform: methanol (2: 1) as solvents. After optimizing the variables of the response surface regression model adjusted to the experimental data of the moringa seed meal, it showed a good adjustment of the coefficient of determination (96.4%). The maximum yield of the oil from the moringa seeds was highly significant. During validation, the model explained the experimental results obtained with a 72.89%, ie there is a probability that the function that the predicted model has to be adjusted, so that the results of the regression model are more accurate and reliable.

## I. INTRODUCCIÓN

La moringa (*Moringa oleifera*) es una planta medicinal muy valiosa, distribuida en los trópicos y regiones subtropicales. El árbol de moringa se ha extendido a gran parte de Asia, casi toda África, América del Sur, parte de América del Norte y algunas partes de Europa. Tiene importantes aplicaciones en la nutrición, la agricultura, el control del suelo, purificación de agua, aplicaciones industriales, alimento para ganado y también para el tratamiento de varios tipos de enfermedades en los seres humanos (Patel *et al.*, 2010).

El aceite de la semilla de moringa contiene ácidos grasos similares a los que se han encontrado en el aceite de oliva, por lo que se puede utilizar como un posible sustituto para dicho aceite (Ramachandran *et al.*, 1980). El contenido de ácidos grasos presentes en el aceite de moringa son: 68.9% de ácido oleico, 3.8% de ácido linoleico, 1.5% de ácido mirístico, 3.6% de ácido palmítico, 10.8% de ácido esteárico, 6.3% de ácido behénico y 0.13% de ácido lignocérico (Alfaro y Martínez, 2008). Este aceite tiene el potencial para ser usado a nivel industrial, por ejemplo, puede emplearse para producción de aceite comestible de alta calidad, como materia prima para la elaboración de cosméticos o bien para obtención de biocombustible.

Generalmente, los aceites vegetales se extraen de las semillas oleaginosas por diversos métodos, el proceso clásico usado es la aplicación de una fuerza mecánica con el fin de romper las paredes celulares del material vegetal. Aunque estos procesos tienen la ventaja de ser operaciones simples con costos de operación relativamente bajos, presentan algunas desventajas, principalmente por el bajo rendimiento del aceite (Tano-Debra *et al.*, 1995 a, b).

Los métodos tradicionales para extraer aceite de las semillas son casi siempre lentos e ineficientes. Estos implican extraer los granos, machacarlos y hervirlos durante tiempo largos. Después de hervir, es necesario colarlos a través de una tela a un recipiente limpio. Luego hay que dejarlos reposar durante la noche para que el aceite se separe del agua. Quizás haya algunos restos flotando en la superficie del aceite. Una vez que se ha extraído el aceite, la torta que queda tiene todas las propiedades de la semilla fresca para tratar y purificar el agua que se encuentre contaminada. Además, tiene un 60% de proteínas, y se puede usar como fertilizante (Kasolo *et al.*, 2011).

Las enzimas se han utilizado desde hace cientos de años; actualmente están interviniendo en muchos procesos industriales. Las características del aceite de semilla de *M. oleifera* puede ser muy conveniente, especialmente con la tendencia actual de la sustitución de los aceites vegetales poliinsaturados ya son los que contienen altas cantidades de ácidos monoinsaturados (Corbett, 2003).

---

---

La aplicación del tratamiento enzimático durante los procesos de extracción de aceites vegetales permite elevar los rendimientos de extracción y mejorar la calidad nutricional de las harinas. El empleo de enzimas como auxiliares tecnológicos en la extracción de aceites vegetales podría representar una nueva perspectiva de desarrollo para las industrias del sector debido a las condiciones suaves durante el procesado, lo que mantiene la calidad del aceite y la proteína (Garagay, 1983; Graille *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 1994).

Para lograr la extracción de aceite, que se encuentra en vacuolas intracelulares, han de romperse las paredes y membranas celulares. El tratamiento mecánico y térmico causa esta ruptura de las estructuras celulares, pero en ocasiones no es suficiente y parte del aceite permanece sin extraer. Las actividades celulolítica y hemicelulolítica son las más adecuadas para degradar la pared vegetal, pues éstos son los polisacáridos mayoritarios de la misma; las pectinasas también son efectivas puesto que las sustancias pécticas son componentes estructurales de materiales vegetales, responsables de la coherencia e integridad de los tejidos. Se sabe que las mezclas de enzimas y los complejos de actividad múltiple son más eficaces que los enzimas purificados.

Por lo anterior, se ha planteado la combinación de un pre tratamiento enzimático asistido por ultrasonido que se ha venido utilizando para mejorar las condiciones de procesamiento y mejorar el rendimiento de la extracción de aceite. Para el pre tratamiento se ocupa una mezcla de enzimas (mezcla de endo/exo glucanasas, hemicelulasas y  $\beta$ -glucanasas) sobre la materia prima y posteriormente se realiza la extracción con solvente asistida por ultrasonido. En el presente trabajo primero se establecieron las condiciones para el pre tratamiento enzimático (temperatura, tiempo, concentración de enzima) optimizando las variables utilizadas en el proceso mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Una vez establecidas las condiciones del pretratamiento enzimático, se procedió a realizar la extracción del aceite asistida por ultrasonido.

---

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 *Moringa oleífera*

*Moringa oleífera* es un árbol muy versátil, excepcionalmente nutritivo y con una variedad de usos potenciales. Es la especie más ampliamente cultivada de la familia Moringácea (ver Tabla 1), que tiene de 10 a 12 especies nativas distribuidas desde la región Norte de África hasta el Sudeste de Asia (Parrotta, 1993). Tales especies son parte de un grupo pequeño de plantas dentro del orden Brassicales. Es originaria del norte de la India y actualmente abunda en todo el Trópico.

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de moringa**

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Brassicales
Familia	Moringaceae
Genero	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Moringa oleífera</i>

Fuente: Adaptado de Kasolo *et al.*, 2011.

Actualmente en México se han encontrado ejemplares en la Costa del Pacífico que se han adaptado a las condiciones climáticas regionales (Pérez, 2010) y se han localizado desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California (al sur de la Paz y de Todos Santos) y las llanuras calientes del sur del Istmo de Tehuantepec (Olson y Fahey, 2011).

#### 2.1.1. Descripción botánica

La moringa es un árbol perenne caducifolio. Presenta rápido crecimiento, aproximadamente 3 m en su primer año pudiendo llegar hasta 5 m en condiciones ideales; en etapa adulta llega a los 10 o 12 m de altura máxima.

---

El árbol produce vainas colgantes color marrón, triangulares, de 30 a 120 cm de largo por 1.8 cm de ancho, divididas longitudinalmente en 3 partes cuando se secan; llegan a alcanzar de 20 a 45 cm de largo (en ocasiones hasta 120 cm). En su interior contiene incrustadas aproximadamente 20 semillas globulares de 1 cm de diámetro. Su rusticidad lo hace muy fácil de cultivar (Alfaro y Martínez, 2008).

### 2.1.2. Composición química de las semillas

Patel *et al.* (2010) describieron la composición química y nutricional de las semillas de moringa. Los estudios indican que las semillas son antipiréticas, agrias y amargas, poseen actividad antimicrobiana y son utilizadas para tratamiento y purificación de aguas residuales y de ríos. En la Tabla 2 se muestra su composición química.

**Tabla 2. Composición química de las semillas de moringa.**

Componente	%
Proteína	46.58
Lípidos	32.60
Carbohidratos	11.16
Humedad	6.52

Fuente: Alfaro y Martínez, 2008.

Actualmente se sabe que el aceite obtenido a partir de las semillas de moringa puede ser comestible, es de sabor agradable y se asemeja al aceite de oliva en su composición de ácidos grasos (Ramachandran *et al.*, 1980; Lowell, 2002). El aceite de moringa contiene todos los ácidos grasos principales encontrados en el aceite de oliva, además del ácido behénico (ver Tabla 3), por lo que constituye una alternativa para ser utilizado como un posible sustituto del aceite de oliva.

Las características del aceite de moringa puede ser muy conveniente, especialmente con la tendencia actual de sustituir los aceites vegetales poliinsaturados por aquellos que contienen altas cantidades de ácidos monoinsaturados (Corbett, 2003). Estos aceites con alto contenido de ácido oleico en su composición, han demostrado ser muy estables para algunas aplicaciones incluyendo el freído (Warner & Knowlton, 1997). El aceite de moringa es un aceite altamente estable y presenta una textura, sabor y olor aceptables.

**Tabla 3. Composición de ácidos grasos de algunos aceites vegetales.**

Fuentes	Contenido de Ácidos Grasos (%)						
	Mirístico	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Behénico
Coco	19	8	3	6	2	-	-
Girasol	-	7	5	22	61	-	-
Palma	3	52	5	18	12	2	-
Oliva	-	12	3	75	7	-	-
Soya	-	10	2	19	62	3	-
Moringa	1.5	3.6	10.8	68.9	3.8	-	6.3

Fuente: Badui, 2010

Se han realizado evaluaciones sensoriales del aceite de moringa y se ha encontrado que el sabor y olor han sido comparados con el del aceite de cacahuete. La torta obtenida de la prensa después de la extracción presenta cargas positivas que le atribuyen propiedades coagulantes, las cuales han sido explotadas en tratamientos de clarificación de aguas residuales. (Sutherland *et al.*, 1994). En cuanto a la estabilidad oxidativa del aceite, se ha reportado estudios sobre las propiedades que permiten determinar la calidad del aceite entre ellos, los índices de saponificación, de yodo y de peróxido y el grado de acidez.

**Tabla 4. Parámetros de calidad del aceite de moringa.**

Índice	%
Saponificación	182.2
Yodo	64.2
Peróxido	4.5
Acidez	3.5

Fuente: Alfaro y Martínez, 2008.

---

Los índices de saponificación y peróxido reflejan el grado de oxidación del aceite, mientras que el índice de yodo, es una medida del grado de insaturación de los ácidos grasos. En la Tabla 4 se muestran los valores de estos parámetros reportados para el aceite de moringa.

### **2.1.3 Usos y aplicaciones**

Casi todas las partes del árbol de *Moringa oleifera* presentan un alto valor nutrimental. Por esta razón, las distintas partes del árbol han tenido diversas aplicaciones, por ejemplo en las prácticas de la medicina tradicional el aceite se aplica externamente para enfermedades de la piel (Foidl *et al.*, 2001).

El aceite también puede ser empleado para consumo humano, fabricación de jabones, cosméticos y como lubricante de relojes (Ramachandran *et al.*, 1980). Los residuos de la extracción del aceite de las semillas pueden utilizarse como acondicionador del suelo o como fertilizante y tienen potencial para ser utilizados como suplemento alimenticio avícola y ganadero (Folkard y Sutherland, 1996).

El polvo de la semilla bien triturada produce proteínas solubles con carga neta positiva; actúa como coagulante independientemente del pH del agua (Sutherland *et al.*, 1989).

Como se ha descrito, esta planta presenta relevantes aplicaciones e innumerables usos tradicionales que se han venido empleando, actualmente se siguen realizando diversos proyectos con una amplia gama de aplicaciones.

### **2.1.4 Productos elaborados a partir de las semillas**

En general las principales fuentes de aceites vegetales provienen de las semillas y frutos oleaginosos.

Los aceites de origen vegetal son triglicéridos de ácidos grasos, obtenidos únicamente de fuentes vegetales, que además están constituidos por pequeñas cantidades de materia insaponificable, ácidos grasos libres y otros lípidos. En base a su composición química, la glicerina se esterifica en sus tres posiciones con ácidos grasos. Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas con grupos carboxilo (COOH) en el extremo de la cadena lineal, pueden ser saturados o insaturados.

El aceite vegetal como producto alimenticio, es una sustancia que se ha obtenido a través de frutos o semillas con un alto contenido en dichos ácidos grasos, como el fruto del olivo y de las semillas como la colza, soya, girasol, cacahuate, algodón, coco, palma y algunos frutos secos. Como se sabe los aceites comestibles son muy indispensables para mantener el equilibrio de los lípidos, colesterol y lipoproteínas, además de que proporcionan vitamina A, D, E y K.

Los aceites vegetales tienen la característica de mantenerse líquidos a temperatura ambiente, al contrario de las grasas de origen animal, que suelen ser sólidas a esta temperatura, esto se debe a que tienen mayor contenido de ácidos grasos saturados. También existen productos obtenidos a partir de los aceites vegetales que tienen un estado sólido, debido a la hidrogenación de sus ácidos grasos, es decir, que han sido sometidos a un proceso de saturación, un ejemplo son las margarinas vegetales. Sin embargo, las características fundamentales que definen a los aceites es si son aceite virgen o por prensado en frío, el primero es obtenido por procedimiento mecánico y por aplicación de calor, los cuales pueden ser purificados por lavado, sedimentación, filtración y centrifugación. Mientras que los aceites por prensado en frío se obtienen por procedimientos mecánicos, sin la aplicación del calor, del cual pueden o no ser lavado, centrifugado, sedimentado o filtrado.

Para poder determinar la calidad de un aceite es necesario recurrir a técnicas de control de calidad donde dichos análisis reflejan las propiedades sensoriales, físicas y químicas del aceite (Tabla 5).

**Tabla 5. Análisis de calidad para aceites comestibles**

<b>Análisis sensorial</b>	<b>Análisis físicos</b>	<b>Análisis químicos</b>
Color	Densidad	Índice de Ester
Olor	Viscosidad	Índice de yodo
Sabor	Refracción	Índice de peróxido
apariencia	Punto de fusión	Índice de acidez
		Índice de saponificación
		Insaponificables

Fuente: Alfaro y Martínez, 2008

En el presente trabajo se planteó utilizar las semillas de moringa como materia prima ya que presentan de 30-40 % de aceite y un alto contenido de valor proteico. Este aceite es altamente estable y resistente a la rancidez, también es de gran utilidad para producir biodiesel. El aceite de la semilla de moringa se utiliza además como lubricante para maquinaria fina y el polvo de las semillas es un excelente purificador de agua logrando desprender el 99% de todas las bacterias, algas y sedimentos. En la Tabla 6 se mencionan algunos productos obtenidos a partir del aprovechamiento de las vainas, cáscaras y semillas.

---

**Tabla 6. Productos elaborados a partir de las semillas de moringa.**

<b>Planta de moringa</b>	<b>Productos</b>
Semillas	Aceites
Cáscara	Biocombustible
Vainas	Alimento para ganado

Fuente: Alfaro y Martínez, 2008

## **2.2 Procesos de extracción del aceite**

La extracción es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos solventes no miscibles o miscibles entre sí, generalmente uno acuoso y otro orgánico, que están en contacto a través de una interfase (Proestos y Komaitis, 2006). Históricamente existen tres procesos de extracción comunes tales como el prensado hidráulico, el prensado expeller y la extracción con solventes. Sin embargo, actualmente se conocen diversos métodos físicos, químicos/térmicos y mecánicos o en combinación de los mismos con la finalidad de obtener un mayor rendimiento de extracción.

### **2.2.1 Procesos convencionales**

En la actualidad existen varios métodos para obtener los aceites vegetales según procedan de frutos o semillas oleaginosas, entre ellos podemos mencionar los que se realizan por medios mecánicos (prensado) o por medios químicos que comprenden los métodos de extracción por solventes o a la vez en combinación de ambos. A continuación se describen brevemente cada uno de ellos.

#### **2.2.1.1 Extracción por prensado**

Este método utiliza material vegetal proveniente de frutos o semillas oleaginosas el cual consiste en someter a presión el material vegetal, ya sea en prensas tipos batch o en forma continua dicho tipo de prensado obtiene la presión mediante un eje horizontal que gira y que está provista de tornillos sin fin ordenados de tal forma que al mismo tiempo se va prensando el material vegetal en el cual se va ejerciendo una presión creciente. El orden de las presiones usadas para expulsar el aceite fuera de las semillas es de 700 a 3,000 kg/cm<sup>2</sup> (Cheftel & Cheftel, 1980).

---

Sin embargo, también se realiza el prensado discontinuo el cual, consiste en aplicar presión sobre el material vegetal, que este confinados en mallas, telas, filtros u otros artificios adecuados con la finalidad de que al aplicar presión de forma mecánica se obtenga un buen rendimiento ya que este estará influenciado por una serie de factores como la afinidad del aceite por los sólidos de las semillas donde la humedad presente y la composición química de la semilla será un factor fundamental para la extracción del aceite (Bailey, 1961).

Mientras que las prensas de tornillo como los expellers han reemplazado a los originales equipos hidráulicos y son usadas para una amplia variedad de materiales oleaginosos (Mustakas, 1980).

### **2.2.1.2 Extracción acuosa**

Los procesos de extracción acuosa (AEP, por sus siglas en inglés) surgieron originalmente como una alternativa a los procesos de extracción por solvente. Fueron propuestos por ser seguros y de bajo costo. Además, sería posible la recuperación simultánea de aceite y proteína (concentrada o aislada) a partir de materiales oleaginosos (Cater *et al.*, 1974).

La extracción de aceite por AEP se basa en aprovechar la insolubilidad del aceite en agua que en la disolución del aceite, ya que componentes de las oleaginosas solubles en agua difunden en el agua más rápidamente que el aceite, liberando aceite que previamente estaba enlazado a la estructura original. Este método involucra procesos como el mezclado, molienda y descascarado de semillas oleaginosas en agua caliente y de esta forma separar las fases de agua y aceite. El aceite es cuidadosamente removido de la superficie del agua y secado para remover humedad residual (Rosenthal *et al.*, 1996).

La aplicación de esta técnica para diferentes materiales oleaginosas requiere de condiciones específicas (tales como pH y temperatura de extracción) debido a las diferencias en la composición química y estructura física de cada semilla (Rosenthal *et al.*, 1996).

### **2.2.1.3 Extracción con disolventes**

Se basan principalmente en la selección de solventes, temperatura o agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masas (Gao y Liu, 2005). El proceso ha de buscar que el sólido, o el líquido, o ambos, estén en movimiento continuo (agitación, este se puede ejecutar por lotes o en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo soxhlet). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud (Sánchez, 2006).

---

#### **2.2.1.4 Extracción por medio de lixiviación**

Las extracciones por medio de lixiviación, utilizado para materias oleaginosas con un contenido de aceite superior al 40%, requieren además de un proceso de eliminación de los solventes y escamación intermedias. Este tipo de extracción es un proceso en el que el disolvente líquido pasa a través de un sólido pulverizado para que se produzca una homogeneización de dicha disolución.

Para aumentar la eficiencia de éste proceso de extracción, se emplean extractores modernos que operan en proceso continuo, con lecho móvil a contracorriente, obteniéndose dos corrientes: la fase líquida de miscela (constituida por solvente y aceite) y la fase sólida que es el residuo lignocelulósico. De acuerdo con la eficiencia de operación en el proceso y con la composición del material oleaginoso, una fracción de aceite queda ligada a la torta (Marcos, 1994).

#### **2.2.1.5 Extracción por medio de percolación**

La percolación se realiza mediante una lluvia de disolvente de manera que llegue a toda la masa, sin llenar todos los espacios vacíos que existen entre las semillas. La velocidad del disolvente en contacto con la superficie de semilla es grande ya que el líquido escurre velozmente por efecto de la gravedad (Bollobás *et al.*, 2006).

Este proceso al operar a alta velocidad requiere de varios reciclados del mismo y se realizarán varias etapas de lavado, con el fin de poner en contacto la semilla con el disolvente de menor contenido con la finalidad de extraer el aceite. Se trata por tanto de una extracción en distintas etapas, aunque sea de modo continuo y nunca podrá realizarse un perfecto lavado en contracorriente (Bollobás *et al.*, 2006).

#### **2.2.1.6 Extracción tipo soxhlet**

El equipo de extracción tipo Soxhlet se utiliza para realizar procesos de extracción sólido/líquido. Técnicamente, es una operación de transferencia de masa, donde un disolvente extrae selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida (Rodríguez, 2008). Este equipo realiza un sin fin de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material. La extracción Soxhlet sigue las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un balón 2) ebullición del

---

solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces que sea necesaria hasta que el aceite total sea removido o se termine el tiempo de exposición de la muestra o lo que ocurra primero. Lo extraído se va concentrando en el matraz de fondo plano para su posterior cuantificación (Núñez, 2008).

## **2.2.2 Procesos no convencionales**

Los aceites son sustancias que requieren de diferentes métodos de extracción que cada día sean más eficientes; por esta razón se ha planteado el uso de métodos alternativos como: la extracción por fluidos supercríticos, el uso de microondas y la técnica de ultrasonificación (Vázquez *et al.*, 2001).

### **2.2.2.1 Extracción con fluidos supercríticos**

Es una técnica de separación de sustancias disueltas o incluidas dentro de una matriz, basada fundamentalmente en la capacidad que tienen determinados fluidos en estado supercrítico (FSC) de modificar su poder disolvente, el cual se encuentra entre el líquido y el gas, por lo que puede penetrar en los sólidos con mayor facilidad. Es decir, un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico (Vinatoru, 2001).

### **2.2.2.2 Extracción con ultrasonido**

La creciente demanda de productos con aspectos frescos, ha promovido el empleo de métodos alternativos de conservación, que además no modifiquen ni cambien la estructura del alimento. El uso del ultrasonido de alta intensidad o también conocido como de poder o de baja frecuencia, ha demostrado ser una tecnología emergente viable para el tratamiento de alimentos, promoviendo la homogeneización y la emulsificación de sus ingredientes, la conservación al inactivar enzimas responsables del deterioro fisicoquímico, el mejoramiento de la calidad sensorial y prolongar la vida útil de los productos al inhibir la carga microbiana (Mason *et al.*, 2005).

El ultrasonido consta de ondas elásticas cuya frecuencia se transmite sobre el umbral del oído humano (aproximadamente 20 kHz) (Mason *et al.*, 2005). Se pueden distinguir tres tipos de ondas: longitudinales, que se desplazan en el sentido del ordenamiento de las partículas; ondas tipo

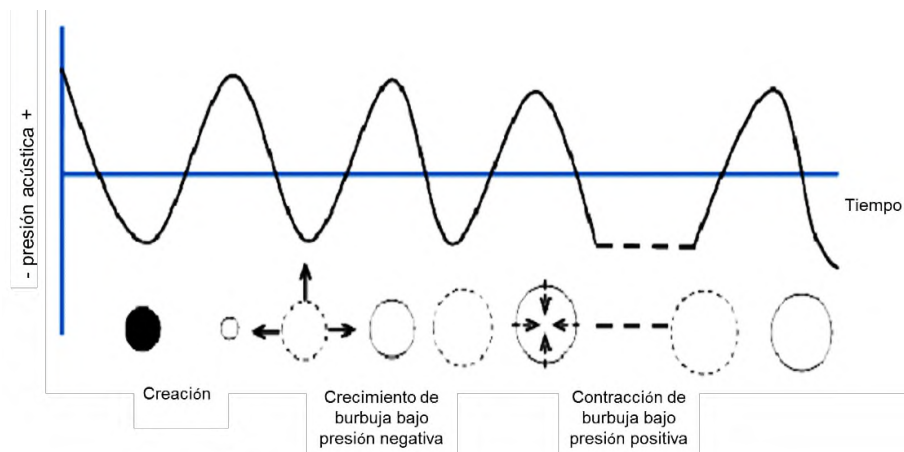
---

esquileo, que se mueven de forma perpendicular a tal ordenamiento; y las tipo Rayleigh, que viajan muy cercanas a la superficie (Mulet *et al.*, 2002).

Esta tecnología actualmente es considerada como emergente (Joyce y Mason, 2008; Chemat *et al.*, 2011) y se fundamenta en la aceleración de la transferencia de masa y calor de manera que interaccionan con el material alterando sus propiedades físicas y químicas provocando un fenómeno conocido como cavitación, lo cual favorece la liberación de los compuestos en materia vegetal debido al rompimiento de la pared celular durante un proceso de extracción.

La cavitación es un fenómeno que se encarga de la formación y la evolución del tamaño de las burbujas ya que cuando una onda ultrasónica se propaga en un medio líquido de forma longitudinal, se crea ciclos de compresión y expansión alternados. Cuando la presión negativa en el líquido, creada por el ciclo de expansión alternativo, es lo suficientemente menor para superar las fuerzas intermoleculares (fuerza de tensión), se forman pequeñas burbujas. Posteriormente en el ciclo de expansión-compresión se generan burbujas que se expanden y contraen simultáneamente. La fuerza de tensión en líquidos puros es muy alta y difícil de superar, sin embargo se sabe que los líquidos contienen burbujas de gas que pueden actuar como núcleos de cavitación.

En la Figura 1 se muestran los cambios que sufren las burbujas de líquido durante la cavitación, mientras que la presión negativa que se genera causa el rompimiento en el medio líquido, provocando la generación de burbujas o cavitación. Durante la fase de presión negativa, las burbujas (incluyendo las presentes de forma inherente en el medio líquido), crecerán y crearán un vacío, causando la disolución de gases en el líquido. De tal manera que mientras la fase negativa avance, la presión se reduce hasta alcanzar la atmosférica, escogiendo las burbujas. Siempre que un ciclo de compresión inicie y existe una presión positiva, el gas difundido en las burbujas será nuevamente introducido al medio líquido, para que de esta manera las burbujas crezcan más en cada ciclo ultrasónico (Zheng y Sun, 2006).



---

**Figura.1** Proceso de cavitación (Zheng y Sun, 2006)

El ultrasonido se encuentra en la región de frecuencias entre 16 kHz y 100 kHz; puede dividirse en ultrasonido de alta intensidad, con frecuencias bajas, entre 20 kHz y 100 kHz y ultrasonido de diagnóstico entre 1 y 10 MHz (Bendicho y Lavilla, 2000).

En general, la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia o alta intensidad, incrementa la eficiencia de la extracción y reduce el tiempo de ésta (Thongson *et al.*, 2004; Proestos y Komaitis, 2006). También disminuye el riesgo de degradación térmica, cuando la extracción se realiza a temperaturas menores a 25 ° C (Kimbaris *et al.*, 2006).

Shat *et al.*, (2005) realizaron una extracción de aceite a partir de semillas de *Jatropha curcas L.* mediante la combinación de ultrasonicación y extracción enzimática acuosa del aceite. Obteniendo un rendimiento máximo de 74%, mediante el uso del ultrasonido durante 5 min seguido de la extracción enzimática acuosa usando una proteasa alcalina a un pH de 9,0. Dicho complejo enzimático contenía: Pectinex Ultra SP-L, Promozyme, Cellulase y Protizyme.

Cravotto *et al.*, (2008) lograron mejorar la extracción de aceites vegetales utilizando el ultrasonido de alta intensidad y microondas, para lo cual realizaron tratamientos combinados, tales como sonicación doble simultánea (19 y 25 kHz), con la ayuda de estas combinaciones se obtuvieron mejoras en el rendimiento, en comparación con los métodos convencionales, los tiempos de extracción se redujeron hasta 10 veces y el rendimiento aumentó entre 50 a 500%.

De esta forma el uso del ultrasonido ha atraído el interés de la industria de los alimentos ya que al ser una metodología innovadora que puede aplicarse para desarrollar procesos modernos, mejorando la calidad y seguridad de los alimentos.

### **2.2.2.3 Extracción con microondas**

Los procesos asistidos por microondas (MAP) pertenecen a una familia de tecnologías de alta eficiencia. En este contexto, el uso del MAP para la extracción de aceites comestibles a nivel industrial es interesante ya que son procesos planteados que utilizan la energía de los microondas para mejorar o acelerar procesos físicos, químicos o biológicos.

El principio básico de los procesos asistidos por microondas, es utilizar la fase líquida, con el hecho de utilizar la irradiación de microondas y que se aplique a una muestra que posteriormente es sumergida en un solvente, esto a su vez provoca movimientos moleculares de migración de iones y de rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al solvente y material vegetal (Gao y Liu, 2005).

---

## **2.3 Tratamientos previos al proceso de extracción**

Los procesos industriales para extracción de aceites comestibles por lo regular se les realizan tratamientos previos con la finalidad de optimizar dicho proceso, alcanzando un máximo rendimiento de aceite.

Para tales procesos es importante recurrir a tratamientos físicos: como el uso de microondas y ultrasonidos, mientras que los químicos, requieren del uso de solventes o la aplicación de calentamiento, sin embargo también se cuenta con el uso de tratamiento biológicos como lo es el utilizar enzimas que son específicas. Por último están los tratamientos convencionales como: molienda, acondicionamiento, laminado y expandido según sea el tipo de muestra. Estos tratamientos surgen con la finalidad de provocar una rápida ruptura en la pared celular vegetal, ya que el aceite se encuentra alojada en vacuolas dentro de las semillas y para poder disponer del aceite es necesario romper estas vacuolas, de tal forma que una buena preparación de la semilla nos garantiza una máxima recuperación de aceite.

Dicha preparación consta: 1) operar a niveles de humedad deseables para el tipo de semilla y que también se han las requeridas por el equipo a extraer; 2) romper la semilla; 3) realizar un calentamiento con la finalidad de ablandar los cuerpos lipídicos o proteicos de la materia vegetal; 4) aplastar o aplanar la materia vegetal según sea el tipo de semilla.

### **2.3.1 Acondicionamiento**

El acondicionamiento consiste en obtener una harina libre de agentes patógenos o una buena producción de la misma se procede a deshidratar las semillas ya que lo que se busca es disminuir el tamaño de partícula y que la humedad no sea un factor de contaminación, posteriormente se realiza un desvainado una vez obtenida la semilla se acondiciona para obtener la muestra molida en contenidos muy finos (Fetzer, 1998).

### **2.3.2 Molienda**

Después de la limpieza se procede a quebrar las semillas utilizando morteros o algún utensilio adecuado. Se obtienen semillas quebradas en 4-6 partes (Ong, 2002). El objetivo de esta molienda es reducir el tamaño de las partículas y adaptarlas a las condiciones necesarias.

### **2.3.3 Laminado**

Las semillas quebradas y acondicionadas son laminadas por presión y fuerzas de cizalla a través del paso por rodillos laminadores lisos de velocidades diferenciales. Durante esta operación

---

las células son d00eformadas y rotas y es liberado el aceite contenido en los esferosomas. El objetivo del laminado es producir láminas de 4,5 mm de espesor aproximado, de tal que favorezca la extracción por ruptura celular y el drenaje del lecho en el extractor (Singh *et al.*, 1999).

## 2.4 Enzimas

En las últimas décadas se ha propuesto el uso de enzimas para la extracción de aceite en medio acuoso. La utilización de agua como solvente de extracción resulta, para el medio ambiente, no perjudicial y menos costoso.

Los estudios de extracción enzimática emplean diferentes condiciones de extracción, tales como pH, temperatura, tiempo de incubación de la enzima, composición del sustrato, velocidad de agitación y métodos de separación del aceite. El empleo de enzimas resulta importante por ser un tratamiento eficiente al incrementar el rendimiento global del aceite. Químicamente las enzimas son proteínas con una estructura química especial, contienen un centro activo, denominado apoenzima y algunas veces no proteico, denominado coenzima. Toda la molécula (apoenzima y coenzima) recibe el nombre de haloenzima (Passos *et al.*, 2009).

Se sabe que las enzimas pueden clasificarse en 6 grupos en función de su acción catalítica específica. Las hidrolasas se encuentran en la clase 3 según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) y International Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), como se muestra en la Tabla 7.

**Tablas 7. Clasificación de las enzimas según la Internacional Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).**

<b>Clasificación</b>	<b>Tipo de reacción catalizada</b>
Oxidorreductasas	Reacciones de óxido-reducción
Transferasas	Transferencias de grupos funcionales
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Eliminación de grupos para formar enlaces dobles
Isomerasas	Isomerización
Ligasas	Formación de enlaces con ruptura de ATP

Fuente: Schlegel, 1993; Shoham *et al.*, 1999.

---

De esta manera se eligió el complejo enzimático ACCELLERASE® 1500 que contiene una combinación potente de las enzimas hidrolíticas principalmente: exoglucanasa, endoglucanasa, hemicelulasa y  $\beta$ -glucosidasa. La actividad catalítica de estas enzimas se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8. Actividad catalítica del complejo enzimático ACCELLERASE® 1500.**

<b>Enzima</b>	<b>Tipo de reacción catalizada</b>
Endoglucanasa	Hidrolizan al azar regiones de celulosa amorfa liberando polisacáridos de menor tamaño.
Exoglucanasa	Actúan de forma ordenada en extremos no reductores de la macromolécula liberando tanto glucosa como residuos de celobiosa.
$\beta$ -glucosidasa	Inician la hidrólisis del disacárido liberando dos moléculas de glucosa.
Hemicelulasa	Hidrolizan enlaces glucosídicos.

Este complejo enzimático posee enzimas que modifican de manera efectiva el material de interés, debido a que la biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa, y  $\beta$ -glucanos que se asocian entre sí y también con la lignina, pectinas, proteínas, almidón y lípidos. ACCELLERASE® 1500 es capaz de hidrolizar de manera eficiente y sinérgicamente la biomasa lignocelulósica en monosacáridos fermentables.

La concentración óptima del complejo enzimático Accellerase® 1500 varía considerablemente con diferentes sustratos, sus tecnologías y las condiciones de pretratamiento.

Actualmente existen enzimas con diferentes especificidades, es por ello que es uno de los procesos de extracción sobre el cual se han reportado más trabajos en los últimos años ya que se caracteriza por ser un proceso libre de solvente que además permite recuperar las proteínas, producto de la reacción hidrolítica. Rosenthal *et al.* (2001) implementaron la extracción acuosa enzimática del aceite y proteína de soya, en el cual, evaluaron diferentes celulasa y proteasa comerciales, y encontraron que las proteasas son las únicas que muestran un incremento significativo en la eficiencia de la extracción del aceite de 48.5 a 58.7%. Posteriormente, Freitas *et al.* (2003) realizaron el mismo método para la extracción del aceite de coco, usando diferentes enzimas comerciales de tipo: Celluclast, Cellubrix, Termamyl, Viscozyme, Neutrasa y Proteasa y



---

El tratamiento enzimático puede incorporarse a la extracción de aceite durante el procesado acuoso al que son sometidas las semillas sin excesivos cambios en el proceso, pues las condiciones operacionales (contenido en agua, pH, temperatura y agitación) durante el batido son compatibles con los valores óptimos para la acción enzimática (Fullbrook, 1983 y 1984).

Abdulkarim *et al.*, (2005) estimaron las propiedades físico-químicas del aceite de semilla de *Moringa oleífera* extraído con solvente (hexano) y pretratamientos acuosos enzimáticos. En la extracción de aceite con solvente se obtuvo 67.9% de ácido oleico en comparación con 70% en la extracción con enzimas. Otros ácidos grasos predominantes obtenidos fueron: ácido palmítico (7.8% y 6.8%), ácido esteárico (7.6% y 6.5%), y ácido behénico (6.2% y 5.8%) para extracción del aceite con solvente y extracción con enzimas, respectivamente. las enzimas que fueron evaluadas durante el proceso fueron: Termamyl, Nutreasa, Celluclast Y Pectinex ultra-SP-L, y encontraron que la enzima comercial con mayor rendimiento fue la Nutreasa. Los parámetros de calidad fueron el índice de yodo, índice de refracción, ácidos grasos libres e índice de saponificación, los cuales arrojaron un 3.5% más que los ya reportados. Se encontró que los puntos de fusión estimados por calorimetría diferencial de barrido fueron de 19.0 y 18.9 °C tanto para el aceite extraído con solvente como para el enzimático. Ellos concluyeron que los métodos de extracción pueden influir ligeramente en las cantidades relativas de los ácidos grasos en el aceite ya que los métodos que se utilizaron fueron diferentes.

Más tarde Khashyap *et al.* (2007) reportaron para la extracción de aceite de soja con hexano una eficiencia superior al 99% después de usar el pretratamiento enzimático y una disminución apreciable en el tiempo de extracción (de 28 a 14 h). Para mejorar la disponibilidad del aceite se utilizó la metodología de superficie de respuesta con el fin de obtener las condiciones óptimas para el proceso de los laminados y expandidos de soja donde se obtuvo un 24.6% de base húmeda durante la hidrólisis. Se desarrollaron modelos matemáticos para describir la cinética de extracción para ambas muestras tanto enzimáticas y los no hidrolizados. Obtuvieron las condiciones óptimas de operación que fueron: humedad de la muestra durante la hidrólisis de, 14.2%, el volumen por peso de la muestra 7.1%(v / w) en base a la concentración de la enzima, los tiempos de hidrólisis de 13.3 y 13.9 h, respectivamente.

Por otro lado Najafian *et al.* (2009) emplearon las enzimas industriales Pectinex Ultra SP-L y Pectinase-16021 para incrementar la eficiencia en la extracción acuosa del aceite de oliva virgen de 0.9 a 2.4%. En el mismo año, Moreau *et al.* (2009) optimizaron la extracción acuosa del aceite de germen de maíz utilizando enzimas celulasas ácidas y proteasas alcalinas para obtener eficiencias de 80-90% para germen de maíz molido.

---

## 2.4.2 Factores que afectan la actividad enzimática

La planta de moringa al igual que otras semillas, requiere de ciertas operaciones de pretratamiento para facilitar la extracción del aceite. Debido a esto se analizará qué factores estarán inmersos en dicho proceso de extracción ya que se ocuparán varios métodos y técnicas.

Por lo tanto, el grado de hidrólisis y la velocidad del proceso dependen de muchos factores ya que la etapa hidrolítica puede ser la etapa limitante de la velocidad del proceso global, sobre todo tratando residuos con alto contenido en sólidos incluso en casos donde las fases acidogénicas o metanogénicas son consideradas como pasos limitantes.

La hidrólisis puede afectar el conjunto del proceso debido a que está limitada por varios factores: la cristalinidad, el grado de polimerización, el contenido de humedad, área superficial disponible y el contenido de lignina. Otro de los problemas que se presentan es que el tamaño de poro en relación con el tamaño de las enzimas es el principal factor limitante en la hidrólisis enzimática. La remoción de la hemicelulosa se incrementa debido al tamaño de poro por lo que aumenta la probabilidad de que la celulosa sea hidrolizada. El secado es otro inconveniente ya que el material pretratado puede causar un colapso de la estructura del poro, resultando en una disminución de la digestibilidad enzimática. Otro fenómeno que puede ocurrir es que las celulasas queden atrapadas en el poro si el área interna del material es mayor que la externa lo cual sucede para muchas biomásas lignocelulosicas. La lignina limita la velocidad y extensión de la hidrólisis evitando que parte de la biomasa se han digeridas en la actividad hidrolítica.

Algunos investigadores decidieron estudiar la aplicación de esta técnica por ejemplo Sineiro *et al.* (1988) optimizaron el tratamiento enzimático acuoso durante la extracción de aceite a partir de semillas de girasol, estableciendo la condiciones óptimas para el proceso de la hidrólisis, encontraron la reducción del tamaño de partícula de 10-7  $\mu$ l, el cual les permitió una extracción hasta del 60 % ya que las semillas fueron molidas, el pH de trabajo fue ajustado de acuerdo a la enzima, con un tiempo de extracción de 2 h.

## 2.5 Optimización

En la mayoría de los estudios, las condiciones del proceso se han optimizado simplemente mediante el comportamiento óptimo de un sistema que puede depender de una o más variables respuesta (Passos *et al.*, 2009), ya que para encontrar un óptimo global se requiere del apoyo de diversas técnicas de diseño experimental.

---

La metodología de superficie de respuesta (MSR) ha demostrado ser una herramienta poderosa para conocer y evaluar, como uno o varios factores de un proceso pueden afectar de manera directa una variable de respuesta, así como también las posibles interacciones entre los factores, esto permite optimizar un proceso de manera efectiva (Liu *et al.*, 2009). En este estudio fue utilizada la MSR para optimizar el pretratamiento enzimático (ACCELLERASE 1500), antes del proceso de extracción de aceite a partir de semillas de moringa (*Moringa oleífera*) asistido con ultrasonido.

Dicha alternativa consiste en encontrar los niveles óptimos de un factor sobre una respuesta. Se realizan pocos experimentos y se enfoca la atención sobre los niveles donde la respuesta es óptima por lo que se considera una experimentación secuencial. Su nacimiento se desarrolló alrededor de la ingeniería química, por la necesidad de encontrar un modelo que correlaciona los diversos factores que influyen en los procesos de reacción química.

### **2.5.1 Metodología empleada para optimizar el proceso**

A raíz de los estudios realizados se ha observado que los métodos estadísticos que utilizan no arrojan resultados meramente asertivos ya que sus análisis están basados en pruebas de  $t$  de Student con programas como SAS acompañados con pruebas de rangos como Dunnett, Tukey entre otros, con solo tres replicas; otros ocupan un paquete estadístico SPSS 12.0. Por tal motivo se eligió un diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta, ya que ofrece un mejor análisis estadístico modelando y analizando la variable de interés donde el objetivo es optimizar las condiciones de operación del sistema, empleando un software conocido como Design expert 7.0.

Con el programa antes mencionado se puede generar un diseño experimental con diferentes condiciones para las variables en cuestión y como resultado se registran los valores de interés para una o varias respuestas específicas. Un experimento adecuado puede generar condiciones óptimas de un proceso. De estos resultados experimentales se genera un modelo matemático que generalmente es de segundo orden. El modelo permite optimizar la variable respuesta. Los resultados de este diseño son presentados en gráficas la superficie de respuesta de tres (gráficas de sabanas) o dos dimensiones (gráficas de contornos), esto permite evaluar el efecto combinado de dos variables y en la respuesta de interés.

La diferencia entre MSR y un diseño experimental cualquiera radica, en que un diseño experimental por si solo tiene como objetivo localizar el tratamiento “idóneo” entre todos aquellos que se han probado. En cambio en la MSR se obtienen condiciones óptimas de operación del proceso dentro de un intervalo concreto de estudio, lo cual representa de una estrategia completa,

---

de menor costo y de mayor rapidez en la experimentación. Además incluye la posibilidad de efectuar varios experimentos secuenciales y uso de técnicas matemáticas más avanzadas (Mani *et al.*, 2007).

#### **2.5.1.1 Características de la metodología empleada**

La característica del sistema de superficie de respuesta (máximo, mínimo, o punto silla) (Mani *et al.*, 2007):

- Genera una distribución satisfactoria de los puntos experimentales sobre la región experimental.
- Requiere un número mínimo de corridas experimentales.
- Permite que otros diseños de orden mayor se construyan a partir de él.
- Permite la detección de la falta de ajuste, para lo cual se requieren repeticiones al menos en el centro del diseño.
- Proporciona un estimador puro de la varianza del error, lo cual se logra con repeticiones al menos en el punto central.

#### **2.5.1.2 Finalidad de la metodología de superficie de respuesta (MSR)**

Es optimizar la variable de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema. La metodología de superficies de respuesta es la estrategia experimental que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto.

#### **2.5.1.3 Ventajas y desventajas de la metodología de superficies de respuestas**

A pesar de las bondades del método también existen algunas dificultades que se presentan durante el análisis. A continuación las ventajas y desventajas de MSR (ver Tabla 9).

---

**Tabla 9. Ventajas y desventajas de la metodología de superficie de respuesta.**

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso	Tiene un nivel de complejidad elevado al de un diseño experimental simple.
Ofrece por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad de un producto	

Como se muestra en la tabla anterior es necesario estar consciente de que se requiere conocimiento teórico acerca del tema de superficie de respuesta ya que es necesario conocer los elementos de la MSR debido a que la respuesta implica tres aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo y dependen del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. De manera específica, el modelo puede ser de primero o segundo orden (plano o con curvatura).

También es importante no olvidar que al momento de localizar los puntos óptimos de operación se consideren las técnicas de optimización. Una vez que se tiene el modelo debidamente ajustado y validado se procede a explorar la superficie descrita por el modelo para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado un valor óptimo de la respuesta, o bien, para determinar la dirección óptima de movimiento en la que se debe experimentar en el futuro.

#### **2.5.1.4 Principales propiedades de superficie de respuesta**

Una vez encontrado el punto óptimo de operación y habiendo realizado la validación del modelo se prosigue al análisis de las gráficas de sabanas o de contornos, las cuales deben cumplir con algunas propiedades por ejemplo:

- a) **Ortogonalidad:** se considera que un diseño es ortogonal cuando los coeficientes estimados en el modelo ajustado no están correlacionados entre sí, lo cual hace que el efecto de cada término, representado por el parámetro correspondiente, se estime de manera más precisa. Un experimento es ortogonal si en la matriz de diseño todos los vectores columna son independientes entre sí.
  
- b) **Rotabilidad:** un diseño se llama rotable si la varianza de  $\hat{Y}(x)$  sólo depende de la distancia del punto  $(x)$  al centro del diseño y no de la dirección en la que se encuentra. Es decir, si

---

pensamos en la variable  $\text{var}[\hat{Y}(x)]$  como otra respuesta, su gráfica de contornos tiene la forma de círculos concéntricos alrededor del centro del diseño. La rotabilidad del diseño asegura que la calidad de la predicción, medida por  $\text{var}[\hat{Y}(x)]$ , sea invariante a cualquier rotación del diseño alrededor del centro del mismo; de aquí se deriva el nombre de esta propiedad.

## **2.5.2 Diseño experimental para el análisis por metodología de superficie de respuesta (MSR)**

El diseño experimental está basado en la metodología de superficies de respuesta (MSR). Esta es una técnica estadística muy utilizada para investigar procesos complejos. Consiste en un grupo de procedimientos matemáticos y estadísticos que pueden usarse para estudiar la relación entre una o más respuestas (variables dependientes) y un cierto número de factores (variables independientes) (Montgomery, 1991).

Existen diseños para realizar ensayos para esta metodología por ejemplo:

- a) Diseño de primer orden
  - Diseños factoriales  $2^k$
  - Diseños factoriales fraccionados  $2^{k-p}$
  - Diseño de Plackett-Burman
  - Diseño simplex
  
- b) Diseños de segundo orden
  - Diseño de Box-Behnken
  - Diseño central compuesto o de composición central

### **2.5.2.1 Diseños de primer orden**

En principio, al proponer un diseño de primer orden se supone que sólo son importantes los efectos principales. Estrictamente hablando, para estimar los  $k + 1$  parámetros del modelo de primer orden se requiere un mínimo de  $k + 1$  puntos experimentales (Montgomery, 1991). Los diseños que satisfacen este criterio son los que tienen la propiedad de ortogonalidad.

---

### 2.5.2.2 Diseños de segundo orden

Se llaman diseños de segundo orden aquellos que permiten ajustar un modelo de segundo orden para así estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura. Por consiguiente, estos diseños se emplean cuando se quiere explorar una región que se espera sea más compleja o cuando se cree que el punto óptimo ya se encuentra dentro de la región experimental. El modelo de segundo orden está dado por:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Ec. 1}$$

El diseño debe tener al menos tres niveles en cada factor para estimar la curvatura de la superficie en la dirección de cada factor. Es deseable que estos diseños sean ortogonales, pero a veces no es fácil que cumplan esta propiedad y se admite alguna dependencia entre las columnas de los contrastes. Los más utilizados tienen la propiedad de ser rotables.

A continuación se presentan el diseño de Box-Behnken y el diseño central compuesto o de composición central.

#### a) Diseño de Box-Behnken

Este diseño se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas. Es un diseño rotable o casi rotable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental.

#### b) Diseño de composición central

El diseño de composición central (DCC) es el más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden debido a su gran flexibilidad: se puede construir a partir de un diseño factorial completo  $2^k$  o fraccionado  $2^{k-p}$  agregando puntos sobre los ejes y al centro, además de otras propiedades deseables.

Este tipo de diseño actualmente ha sido muy utilizado, debido a que es una técnica que se centra en localizar las condiciones óptimas de operación de proceso, es por ello que muchos autores se han centrado en utilizar esta técnica a modo de incrementar el rendimiento de extracción de aceites tal es el caso de Mani *et al.*, (2007) quienes optimizaron el proceso de extracción de aceite por solvente, a partir de semillas de *Moringa Oleífera*, utilizando metodología de superficie de respuesta a través de un diseño central compuesto rotatorio donde las variables fueron: tamaño de partícula, tiempo de extracción y temperatura, los solventes que se evaluaron

---

fueron éter de petróleo, hexano y acetona, siendo el hexano el que obtuvo un mejor rendimiento (33.1%), mientras que de las variables del proceso fue el tamaño de partícula el que más efecto significativo arrojó. Los valores óptimos que se encontraron para el proceso de extracción de aceite fue: tamaño de partícula de (0.62 mm), temperatura de extracción (56.5 °C) y tiempo de residencia (7 h), obteniendo un máximo rendimiento de 33.5%, usando hexano. Analizando las variables en la gráfica de contornos se aprecia claramente el efecto que presenta la variable de tamaño de partículas en contraste con las otras variables combinadas, ya que la temperatura y tiempo de residencia no presentan un efecto contundente. Con estos resultados ellos llegaron a la conclusión de que el aceite de las semillas de moringa tiene amplias oportunidades para la industria oleaginosa.

Más tarde Daneshvand *et al* (2012) evaluaron la comparación de extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción asistida con ultrasonido a partir de quince ácidos grasos de las semillas de *Cydonia oblonga* Miller usando metodología de superficie de respuesta apoyándose del diseño central compuesto (DCC). Los parámetros de SFE son la temperatura, presión, solvente y extracción dinámica y estática se optimizaron después de utilizar un DCC y un diseño factorial de 2<sup>5</sup>. La presión, el tiempo y la extracción dinámica tuvieron un efecto significativo en el rendimiento, mientras que las otras variables (temperatura, extracción estática y el solvente) no presentaron un efecto contundente durante las combinaciones. Los resultados que arrojaron el análisis de la quimiometría indican que la extracción con SFE fue la mejor obteniendo un rendimiento de 24.32% que se obtuvo a una presión de 353 bar, temperatura de 35 °C, a un volumen de 150 µl y tiempos de extracción estática y dinámica de 10 a 60 min. A diferencia de la SFE la extracción asistida con ultrasonido se realizó utilizando un DCC Rotacional, las condiciones óptimas fueron: volumen del solvente (hexano 22 ml), tiempo de residencia (30 min) y temperatura de extracción (55 °C). Los resultados obtenidos indican que el uso de SFE mejora la calidad del aceite obtenido a diferencia del aceite obtenido por ultrasonificación (19.5%) ya que este debe ser sometido a una transesterificación para obtener un mayor rendimiento.

## 2.6 Síntesis de antecedentes

A pesar de los trabajos previos presentados no se han encontrado publicaciones relacionados sobre la optimización de la extracción de aceite con semillas de *Moringa oleifera* utilizando pretratamiento enzimático y ultrasonificación. Por esta razón se tomó como referencia los trabajos que están altamente relacionados de otras fuentes oleaginosas por ejemplo Rosenthal *et al.*, (2001) evaluó el efecto de las variables operacionales y actividad de la enzima en la extracción enzimática acuosa del aceite y proteína de la soya, observando que el rendimiento de aceite fue favorable debido a la manipulación de las condiciones como pH, temperatura y concentración de

---

enzimas. Shah *et al.*, (2005) realizó extracción de aceite a partir de semillas de *Jatropha curcas L.* mediante la combinación de ultrasonificación y extracción enzimática acuosa del aceite y encontró que el uso del método de ultrasonificación mejora el rendimiento del aceite en un 74%.

Mientras que Abdulkarim *et al.*, (2005) estimaron las propiedades físico-químicas del aceite de semilla de *Moringa oleífera* extraído con solvente (hexano) y pretratamientos acuosos enzimáticos. En la extracción de aceite con solvente se obtuvo 67.9% de ácido oleico en comparación con 70% en la extracción con enzimas. Otros ácidos grasos predominantes obtenidos fueron: ácido palmítico (7.8% y 6.8%), ácido esteárico (7.6% y 6.5%), y ácido behénico (6.2% y 5.8%) para extracción del aceite con solvente y extracción con enzimas, respectivamente.

Zúñiga *et al.*, (2007) realizaron un pretratamiento enzimático de *Guevina avellana* mol para la extracción de aceite por prensado se apoyaron de la metodología de superficie de respuesta, se controlaron la temperatura y humedad utilizaron una mezcla enzimática que contenía: Ultrazym, Celluclast y Olivex; obtuvieron un rendimiento global del 98 % además el residuo lignocelulósico se le realizó una determinación por Soxhlet y cuantificaron 15 % de aceite.

Ghazali *et al.*, (2005) estimaron las propiedades físico-químicas del aceite de semilla de moringa oleífera extraído con solvente (hexano) y pretratamientos acuosos enzimáticos. En la extracción de aceite con solvente se obtuvo 67.9% de ácido oleico en comparación con 70% en la extracción con enzimas. Otros ácidos grasos predominantes obtenidos fueron: ácido palmítico (7.8% y 6.8%), ácido esteárico (7.6% y 6.5%), y ácido behénico (6.2% y 5.8%) para extracción del aceite con solvente y extracción con enzimas, respectivamente. Los parámetros de calidad fueron mejores en la extracción asistida con enzimas que con solvente, muestra de esto fue el bajo porcentaje de ácidos grasos libres.

Posteriormente Li *et al.*, (2012) optimizaron un pretratamiento enzimático con hexano para la extracción de aceite de semillas de *Silybum Marianum* usando RSM, donde desarrollaron un diseño central compuesto (DCC) que consto de una matriz operacional de 32 experimentos, las variables de operación fueron temperatura (42.8 ° C), tiempo (5-6 h), pH (4.8) Y concentración enzimática (20 %) utilizaron un complejo enzimático que contenía: Celulasa, xilanasa y pectinasa, dicho pretratamiento incremento el rendimiento del aceite hasta de un 10.46% a diferencia del rendimiento global que fue de 45.70%.

Por lo antes mencionado moringa es una planta altamente nutricional que no ha sido estudiada ampliamente. En el caso del aceite que ha sido extraído de las semillas de moringa se han realizado estudios que usan extracciones convencionales en combinación con métodos químicos del cual han obtenido buenos rendimientos. Sin embargo se ha observado que aún hay pérdidas significativas a la hora de utilizar extracción con solvente. Por tal motivo se ha planteado una nueva alternativa para optimizar el rendimiento en el proceso de extracción del aceite a partir

---

de semillas de *Moringa oleífera*, se utilizara la combinación del pretratamiento enzimático y la ultrasonificación con el fin de obtener mejor rendimiento del aceite, manipulando las condiciones de operación, disminuyendo el tiempo considerablemente a diferencias de las otras técnicas de operación.

### III. JUSTIFICACIÓN

Uno de los motivos para usar la semilla de moringa (*Moringa oleífera*) para la extracción de aceite es por su alta concentración de lípidos (55- 60%), el cual presenta una elevada composición de ácidos grasos de gran calidad como el palmítico, oleico, linoleico, mirístico, esteárico, behénico y lignocérico.

El aceite de las semillas de moringa puede ser muy conveniente, especialmente con la situación actual de los aceites vegetales poliinsaturados. Dicho aceite presenta alta estabilidad oxidativa, ya que en la gama de ácidos grasos presentes contiene un valor representable de ácido behénico, siendo el aceite de moringa en donde se puede encontrar con mayor disponibilidad, además es extremadamente rico en fitonutrientes y puede tener un gran impacto en cuestiones de salud.

La semilla de moringa se considera equivalente al aceite de oliva en términos de sus propiedades químicas, además contiene una gran cantidad de tocoferoles. Otra ventaja que presenta es que, a diferencia del aceite de oliva, el aceite de moringa es menos costoso, por lo que representa una alternativa nutricional.

Por esta razón se plantea realizar la extracción de aceite a partir de semillas de moringa (*Moringa Oleífera*) mediante pre tratamiento enzimático asistido por ultrasonificación. Cabe resaltar que dicha semilla compite por su contenido de aceite sobre las oleaginosas de exportación actual, por lo que se espera obtener un buen rendimiento de extracción de aceite.

### IV. HIPÓTESIS

El pre-tratamiento enzimático y el ultrasonido permitirán mejorar el rendimiento de aceite durante el proceso de extracción a partir de semillas de moringa (*Moringa Oleífera*).

---

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Establecer y optimizar el pretratamiento enzimático utilizado en el proceso de extracción de aceite a partir de semillas de *Moringa oleifera* asistido con ultrasonido.

### 5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el contenido químico proximal de las semillas de moringa.
- Obtener y acondicionar la materia prima previa a la extracción de aceite.
- Establecer y optimizar las condiciones del pretratamiento enzimático en función de la concentración, temperatura y tiempo de hidrólisis.
- Determinar el tamaño de partícula y morfología de la muestra con y sin pretratamiento enzimático.
- Evaluar el efecto de la ultrasonicación sobre el rendimiento de la extracción de aceite de moringa.
- Determinar la calidad del aceite en función de los índices de acidez, de yodo, de saponificación, de peróxido, ácidos grasos libres.
- Evaluar la estabilidad térmica del aceite obtenido mediante calorimetría diferencial de barrido.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materia prima

Las vainas de *Moringa oleifera* fueron cosechadas a partir de los ejemplares localizados en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec. Las semillas fueron extraídas de las vainas, clasificadas y posteriormente acondicionadas antes de ser empleadas para el proceso de extracción de aceite. Únicamente las semillas que no presentaban daño fueron almacenadas en condiciones de baja humedad y temperatura hasta su uso posterior.

---

## 6.2 Materiales y reactivos

La mezcla de enzimas ACCELLERASE ® 1500 de la marca comercial Sigma, conteniendo una combinación de enzimas hidrolíticas (exoglucanasa, endoglucanasa, hemicelulasa y  $\beta$ -glucosidasa), fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNPA.

Todos los reactivos como sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), ácido clorhídrico (HCl), óxido de mercurio (HgO), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), fenolftaleína ( $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ), tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) y los disolventes como cloroformo, metanol y éter de petróleo utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

## 6.2 Metodología

### 6.2.1 Acondicionamiento de la materia prima

#### 6.2.1.1 Limpieza y deshidratación de las semillas

Una vez cosechadas las vainas, el siguiente paso, previo a la extracción del aceite, consistió en remover las semillas y retirar la cáscara que las recubría en forma manual. Posteriormente, las semillas fueron deshidratadas en un secador convectivo a una temperatura de 50 °C durante 10 h, empleando una velocidad de aire de 1.5 m/s, con el objetivo de disminuir el contenido de humedad de las muestras antes de someter las semillas al proceso de molienda y lograr obtener un mejor rendimiento de aceite durante el pretratamiento enzimático, ya que si la humedad es excesiva se producen escurrimientos y rociado irregulares (Domínguez *et al.*, 1995b).

#### 6.2.1.2 Molienda

Una vez limpias y deshidratadas, las semillas fueron trituradas en forma manual con ayuda de mortero y pistilo de porcelana para reducir el tamaño de partícula hasta obtener una harina. Las muestras pulverizadas fueron almacenadas en frascos de plástico herméticamente cerrados hasta uso posterior.

### 6.2.2 Análisis químico proximal

Los contenidos de humedad, de proteína (micro-Kjeldahl), de lípidos (micro-Soxleth) y de cenizas de la harina obtenida a partir de las semillas de moringa, fueron determinados de acuerdo

---

a los métodos descritos en la AOAC (1995). El contenido total de carbohidratos fue calculado por diferencia.

Estas determinaciones están altamente relacionadas con los efectos de conservación y procesamiento, mejoramiento de la calidad proteica, el desarrollo de alimentos de alto valor nutritivo, para propósitos de control de calidad.

#### **6.2.2.1 Determinación del contenido de humedad**

El contenido de humedad en todas las muestras, fue determinado por pérdida de peso de acuerdo al método de la AOAC (1995). Se tomaron muestras de aproximadamente  $1 \pm 0.1$  g y se colocaron en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante. Posteriormente se introdujeron en una estufa de vacío (Marca: SHEL-LAB, mod. 1425) a  $60$  °C y  $6 \times 10^4$  Pa hasta llegar a peso constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado. El contenido de humedad fue reportado como la diferencia entre el peso inicial y final de muestra en base seca (gramos de agua por gramos de sólido seco). El contenido de humedad se determinó por la Ec. 1.

$$\% \textit{Humedad} = \frac{(PC+PMH)-(PC+PMS)}{PMH} \times 100 \quad \text{Ec.1}$$

donde:

PC= peso de la charola

PMH= peso de la muestra humeda

PMS= peso de la muestra seca

#### **6.2.2.2 Determinación del contenido de proteína**

La determinación se realizó por la cuantificación del nitrógeno total utilizando el método de micro-Kjeldahl, de acuerdo con al método (955.45) reportado por la AOAC (1995). Se colocó  $1 \pm 0.1$  g de muestra en el matraz, se le adicionaron 10g de sulfato de potasio, 0.7g de óxido de mercurio y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, se colocó en el matraz digestor, y posteriormente se calentó a ebullición hasta que la solución se viera clara. Se dejó enfriar; durante el enfriamiento se adicionó poco a poco alrededor de 90 mL de agua destilada. Una vez enfriado, se adicionaron 25 mL de solución de sulfato de sodio y se mezcló, se adicionaron 80 mL de la solución de hidróxido de sodio al 40% manteniendo inclinado el matraz. Una vez formadas dos capas,

---

posteriormente se conectó el matraz, se calentó y se colectaron 50 mL del destilado. Se utilizó un factor de conversión de 6.25 para la determinación de proteína cruda como se muestra en la Ec. 2.

$$\text{Contenido de proteína (\%)} = \left[ \frac{A \times B}{C} * 0.014 \right] * 100 \quad \text{Ec.2}$$

donde:

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

A = Ácido clorhídrico usado en la titulación (ml)

B = Normalidad del ácido estándar

C = Peso de la muestra (g)

### 6.2.2.3 Determinación del contenido de lípidos

El contenido de grasas puede estar formado por lípidos "enlazados " o lípidos "libres" los cuales están constituidos básicamente por grasas neutras y ácidos grasos libres que son extraídos por disolventes como éter etílico. Existen dos tipos principales de extracción directa de disolventes, el tipo Bolton o Baiyle-Walter con extracción continua y tipo Soxhelt, el cual proporciona una extracción intermitente (AOAC, 1995). Para la extracción de los lípidos se utilizó éter de petróleo como disolvente, empleando un sistema de extracción Soxhelt para 1-2 g de muestra que fueron evaluadas como porcentaje del peso después de evaporarse el solvente. La cuantificación del aceite se realizó por medio de la Ec.3.

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \left[ \frac{B-A}{C} \right] x 100 \quad \text{Ec.3}$$

donde:

A = Peso del matraz limpio y seco (g)

B = Peso del matraz con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

---

#### 6.2.2.4 Determinación del contenido de cenizas

La ceniza de un alimento es el residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. Su determinación consiste en llevar la muestra a una carbonización para después realizar la incineración en una mufla. El total de cenizas se obtuvo por diferencia de peso de acuerdo al método reportado por la AOAC (1995). Fue determinado calculando la pérdida en peso de 1 g de muestra colocada en un crisol de porcelana, después de su incineración a 500 °C durante 4 h en una mufla. Posteriormente, la muestra se dejó enfriar y se colocó en un desecador, para pesar el contenido de cenizas es necesario alcanzar la temperatura ambiente antes de registrar el peso nuevamente.

$$\text{Contenido de cenizas (\%)} = \left[ \frac{A-B}{C} \right] \times 100 \quad \text{Ec.4}$$

donde:

A = Peso del crisol con muestra (g)

B = Peso del crisol con ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

#### 6.2.2.5 Determinación del contenido de fibra

La fibra dietaria se puede considerar esencialmente como polisacáridos y ligninas resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del hombre. Este método permite determinar el contenido de fibra en 1 g de muestra, después de ser digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo. La diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra presente (AOAC, 1995).

$$\text{Contenido de fibra cruda (\%)} = \left[ \frac{A-B}{C} \right] \times 100 \quad \text{Ec.6}$$

donde:

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

B = Peso del crisol con la ceniza (g)

---

C = Peso de la muestra (g)

### **6.2.3 Pretratamiento enzimático**

En esta etapa se realizó la hidrólisis enzimática en medio acuoso de la harina obtenida a partir de las semillas de moringa, donde dicho pretratamiento se realizó de la siguiente manera:

#### **Incubación enzimática**

Se utilizó un complejo enzimático (ACCELLERASE 1500 endoglucanasa, exoglucanasa, hemicelulasa, beta-glucanasa). En base a la metodología empleada se realizaron los distintos experimentos con diferentes condiciones para cada ensayo. El pH de 4.6 se mantuvo constante durante todo el período de reacción (Fetzer, 1998).

#### **Pretratamiento de la muestra**

Consistió en un tratamiento hidrotérmico para mejorar la extracción de aceite con las enzimas del complejo enzimático en el material a extraer. Las mismas que pueden generar, después de la extracción, reacciones de hidrólisis lipídicas, con el consiguiente deterioro de la calidad del aceite liberado. El proceso se llevó a cabo mezclando la cantidad de harina de semillas de moringa en solución buffer al pH requerido, las condiciones de operación empleadas fueron en función de la matriz operacional del modelo propuesto.

#### **Inactivación de la enzima**

Una vez concluido el tiempo de hidrólisis, se procedió a inactivar la enzima con NaOH al 0.1 N; las cantidades fueron establecidas de acuerdo a la cantidad de muestra.

### **6.2.4 Extracción del aceite**

Una vez aplicado el pretratamiento enzimático, el aceite fue extraído a partir de 2 diferentes métodos, los cuales fueron comparados en base al rendimiento obtenido.

#### **6.2.4.1 Extracción asistida por ultrasonido**

La muestra fue sometida a un proceso de extracción asistido por ultrasonido empleando una mezcla de disolvente cloroformo: metanol en proporción (2:1). El proceso de extracción se llevó a cabo en forma continua durante 20 min a la única frecuencia permitida por el equipo de ultrasonido variando la potencia, tiempo y amplitud.

---

#### 6.2.4.2 Extracción tipo Soxhlet

En este tipo de extracción se empleó éter de petróleo como disolvente y se realizó el procedimiento según el método estándar de la AOAC (1995).

#### 6.2.5 Caracterización morfológica empleando microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la morfología de la harina de moringa con y sin pretratamiento enzimático, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (FEI Helios NanoLab 600 Dual-Beam). Con esta técnica fue posible observar la microestructura de los componentes presentes en la harina de moringa previamente hidrolizada. Las muestras se depositaron sobre una cinta de carbono, la cual fue recubierta con una delgada capa de oro de 30 nm de espesor colocada al vacío (10<sup>-5</sup> Torr). Se observó la forma y los componentes de la superficie que se registraron en el microscopio electrónico de barrido

#### 6.2.6 Determinación de la calidad del aceite

Ordinariamente este análisis se refiere a determinaciones convencionales, las cuales sirven para calificar su valor como una primera aproximación, desde el punto de vista nutricional. Sin embargo este tipo de caracterizaciones sirve para evaluar la estabilidad oxidativa de los lípidos o de lo contrario su deterioro.

La calidad del aceite extraído se determinó a través de la medición de índice de acidez, índice de yodo, índice de saponificación e índice de peróxido.

##### 6.2.6.1 Índice de acidez

La acidez es una expresión convencional del contenido en porcentaje de ácidos grasos libres, que normalmente se expresa como porcentaje de ácido oleico. También se denomina grado de acidez y es una medida del deterioro de una grasa por hidrólisis química o enzimática. Para la determinación, fue necesario disolver adecuadamente la muestra de aceite empleando una mezcla neutra de disolventes y posteriormente se valoraron los ácidos grasos libres presentes por neutralización con hidróxido de potasio etanólico empleando fenolftaleína como indicador (Métodos Analíticos en Alimentaria, 1987).

El índice de acidez fue calculado según la Ec.7:

$$I. \text{ acidez} = \frac{V.C.PM}{10.P} \quad \text{Ec.7}$$

---

Dónde:

V = volumen en mL de la solución valorada de KOH etanólico gastados en la titulación

C = concentración en molesL<sup>-1</sup> de la solución de KOH empleada,

M = peso molecular del ácido graso en el que se expresa la acidez (para el caso de ácido oleico es 282)

P = peso de la muestra empleada

### 6.2.6.2 Índice de yodo

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa. Será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas. Se expresa en términos del número de centigramos de yodo absorbidos por gramo de muestra. Se basa en la reacción del monobromuro de yodo, en medio acético, sobre los lípidos, y en medir la cantidad de yodo que está presente libremente, en función de éste se determina el grado de insaturación del aceite. Para calcular el porcentaje en peso del yodo absorbido (Índice de yodo) se empleó la Ec.8:

$$I. \text{ yodo} = \frac{((VB-VM)N \times 12.69)}{\text{g de muestra}} \quad \text{Ec.8}$$

Dónde:

VB =es el volumen de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> expresado en mL gastados en la titulación del blanco

VM =es el volumen de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> expresado en mL gastados en la titulación de la muestra

N es la normalidad de la solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### 6.2.6.3 Índice de saponificación

Es una determinación química muy común, que se define como la cantidad de hidróxido de potasio expresado en miligramos, necesario para saponificar un gramo de aceite o grasa. Se basa en la reacción química de los triglicéridos con un álcali, formándose jabones o sales alcalinas de los ácidos grasos y glicerina. Este índice varía entre 160 y 250. Para los aceites vegetales, en general, oscila alrededor de 190. A mayor índice de saponificación corresponde un mayor

---

contenido de ácidos grasos de bajo peso molecular. El aceite se saponifica calentándolo con un exceso de base alcohólica. El índice de saponificación está definido como el peso de hidróxido en mg que se requieren para saponificar 1 g de aceite (Pearson, 1981). Para calcular el índice de saponificación se empleó la Ec.9:

$$\text{I. saponificación} = \frac{28.05 (VB-VM)}{PM} \quad \text{Ec.9}$$

Dónde:

VB = volumen en mL de la solución 0,5 N de HCl gastados en la valoración del blanco

VM = volumen en mL de la solución 0,5 N de HCl gastados en la valoración de la muestra

PM= peso de la muestra

#### 6.2.6.4 Índice de peróxido

Este método se basa en la capacidad de los peróxidos, productos de la oxidación de las grasas, de oxidar el ión yoduro, del yoduro de potasio, al ser agregado a la muestra y producir yodo que se valora posteriormente con una solución de tiosulfato de sodio y solución de almidón como indicador, para neutralizar los iones yodo y producir yoduro de sodio. El índice de peróxidos es la cantidad, (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico (Métodos Analíticos en Alimentaria, 1987. Pearson, 1981). Para calcular el índice de peróxido se empleó la Ec.10:

$$\text{I. peróxido} = \frac{V.N.1000}{PM} \quad \text{Ec.10}$$

Dónde:

V = volumen en mL de la solución valorada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastados en la titulación de la muestra

N = normalidad exacta de la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  empleada (la solución debe titularse siempre antes de usarse o puede corregirse su normalidad llevando un ensayo blanco en paralelo al tratamiento de la muestra)

PM= peso de la muestra

#### 6.2.7 Determinación de la estabilidad térmica del aceite por calorimetría diferencial de barrido (CDB).

Las propiedades térmicas del aceite de moringa con pretratamiento enzimático y sin pretratamiento fueron estudiadas usando un calorímetro diferencial de barrido. En el estudio se

evaluaron propiedades como temperatura, cristalización y entalpías de fusión. Se pesaron 2 mg de muestra (en base seca, mínimo tres réplicas) dentro de una charola de aluminio, posteriormente las muestras se colocó en una charola que fue sellada herméticamente y se dejó equilibrar durante 1 h antes de realizar el análisis. La prueba se realizó empleando un programa de calentamiento de 20 a 400°C con una velocidad de calentamiento de 10° C/min. Se utilizó una charola de aluminio vacía como referencia.

### 6.3 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño Box-Behnken, del cual se obtuvieron un total de 15 tratamientos con 3 repeticiones en su punto central y con una distancia simétrica al centro de  $\alpha=1.68$ ; se evaluó el efecto de las variables involucradas en el proceso (temperatura, tiempo y concentración enzimática) y su variable respuesta (rendimiento) como se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10. Condiciones para el diseño experimental del pretratamiento enzimático.**

<b>Variables Independientes</b>	<b>Intervalo</b>
Temperatura	40 – 60 (°C)
Enzima	100 – 300 [ $\mu$ L]
Tiempo	60 – 180 (min)

El objetivo de utilizar la MSR fue optimizar las variables involucradas durante el proceso de extracción de aceite con la finalidad de obtener las condiciones más adecuadas. Se realizaron pruebas preliminares en base información reportada en estudios previos para encontrar las condiciones límites del diseño experimental, las cuales se muestran en la Tabla 11. Se empleó el Software Desing Expert versión 7.0.

**Tabla 11. Matriz del diseño experimental para el tratamiento enzimático.**

<b>Experimento</b>	<b>X1</b>	<b>X2</b>	<b>X3</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Enzima [ <math>\mu</math>L ]</b>	<b>Tiempo (min)</b>
15	0	0	0	50	200	120
7	-	0	+	40	200	180
12	0	+	+	50	300	180

---



---

8	+	0	+	60	200	180
6	+	0	-	60	200	60
10	0	+	-	50	300	60
5	-	0	-	40	200	60
14	0	0	0	50	200	120
1	-	-	0	40	100	120
11	0	-	+	50	100	180
2	+	-	0	60	100	120
9	0	-	-	50	100	60
13	0	0	0	50	200	120
3	-	+	0	40	300	120
4	+	+	0	60	300	120

---

#### 6.4 Optimización del proceso

Una vez seleccionada la matriz operacional, fue importante tener en cuenta si los datos se linealizaron en caso contrario era necesario realizar un modelo matemático. La finalidad de esto fue optimizar el pretratamiento enzimático de la semilla de moringa antes del proceso de extracción de aceite asitido con ultrasonido. La variable respuesta que en este caso fue el rendimiento de aceite (RA). Con la finalidad de optimizar dicho proceso se utilizó la MSR, empleando un modelo de segundo orden el cual se presenta a continuación

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Ec.11}$$

En donde:  $Y$  es la respuesta,  $\beta_i$  es el coeficiente de regresión para los términos de primer orden,  $\beta_{ii}$  es el coeficiente de regresión para los términos cuadráticos,  $\beta_{ij}$  es el coeficiente para los términos de las interacciones,  $\varepsilon$  es el término del error aleatorio.

---

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Composición química proximal de la harina obtenida de semillas de moringa

Los resultados obtenidos del análisis químico proximal de la harina de las semillas de moringa se muestran en la Tabla 12. Los valores más relevantes fueron el contenido de grasas y proteínas, mientras que el valor obtenido de humedad fue 7.1 %, este valor es semejante al reportado por Abdulkarim *et al.* (2005) en harinas de semillas de moringa (7.3 %) mientras que el reportado por Compaoré *et al.* (2011) fue menor (2.14 %).

La variación observada con respecto al contenido de humedad podría atribuirse a las condiciones ambientales y de cultivo de la región. Debido a las condiciones ambientales de elevada humedad en la región de San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., fue necesario que las semillas de moringa se deshidrataran a un secado moderado durante 10 h a 50 °C con lo cual se logró evitar el crecimiento de microorganismos durante su almacenamiento.

**Tabla 12. Analisis químico proximal de la harina obtenida a partir de semillas de moringa.**

Componente	Presente trabajo (%)	Abdulkarim <i>et al.</i> , 2005 (%)
Grasa	34.46 ±1.72	30.8±2.19
Humedad	7.1±0.37	7.9±1.00
Cenizas	3.63±0.64	6.5±0.15
Proteinas	34.5 ± 0.023	38.3 ±1.03

\* Promedio de tres repeticiones ± estándar

Con respecto al contenido de lípidos, se obtuvo un valor de 34.46 %, este resultado fue mayor al 33.50% reportado por Abdulkarim *et al.* (2005). Esta característica de alto porcentaje lipídico permite que esta semilla pueda ser considerada de uso potencial para la industria aceitera; cabe mencionar que los rendimientos de las semillas maduras pueden alcanzar de 22-38% (Jamieson, 1939).

---

Sin embargo, la variación en el rendimiento de aceite puede ser debido a las diferencias en la variedad de la planta, clima, la época de cosecha de las semillas, la etapa de maduración y el método de extracción que se haya utilizado. Mientras que la variación en el contenido de proteínas (34.5%), y cenizas (7.1%) no se vieron afectadas por las altas concentraciones de salinidad que algunas ocasiones se presenta. Se ha reportado un perfil de 30.07% y 33,26% de proteína para semillas maduras de *Moringa oleifera* cultivadas en Pakistán y Brasil, respectivamente (Manzoor *et al.*, 2007).

## 7.2 Pretratamiento enzimático

Antes de realizar el proceso de extracción del aceite de moringa asistido con ultrasonido fue necesario establecer las condiciones óptimas para el pretratamiento enzimático. Esto se realizó con la finalidad de facilitar la degradación de la pared celular, disminuir el tamaño de partícula y facilitar la extracción de aceite de la muestra. Para lograr con esto incrementar el rendimiento de la misma. Primero se realizaron pruebas preliminares tomando en cuenta trabajos previamente reportados para encontrar las condiciones límites del diseño experimental (MSR).

El diseño experimental utilizado fue el de Box-Behnken y consistió de 15 determinaciones experimentales, dentro de estas, 3 fueron replicas en su punto central. Las variables independientes del proceso fueron la temperatura (T), tiempo (t) y concentración de enzima [enzima], mientras que la variable de respuesta o dependiente analizada fue el rendimiento de aceite (RA). Para la generación del diseño y análisis se empleó el Software Design Expert v.7.0. Una vez obtenido el mejor resultado de los experimentos, se procedió a realizar la extracción del aceite.

En la tabla 13 se presenta la matriz del diseño experimental y resultados de cada experimento para la variable de respuesta (rendimiento de aceite). Una vez realizadas las determinaciones necesarias para cada ensayo se lograron encontrar las condiciones óptimas para el proceso de hidrólisis enzimática las cuales fueron: tiempo de 174 min, temperatura de 60 °C y concentración de enzima de 300 µL. Estas condiciones óptimas de hidrólisis enzimática presentaron un efecto favorable sobre el proceso de extracción tal como se puede observar en RA. La mayoría de los ensayos presentó un valor de RA superior en comparación con el control.

---

**Tabla 13.** Matriz experimental del tratamiento enzimático

Experimentos	T ( °C)	Enzima [μL ]	Tiempo (min)	RA
15	50	200	120	64.17
7	40	200	180	20.41
12	50	300	180	82.64
8	60	200	180	80.49
6	60	200	60	97.00
10	50	300	60	90.21
5	40	200	60	25.79
14	50	200	120	64.00
1	40	100	120	19.15
11	50	100	180	56.74
2	60	100	120	85.43
9	50	100	60	46.28
13	50	200	120	65.37
3	40	300	120	23.97
4	60	300	120	100.0

Cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor será el área superficial de las partículas y menor resistencia para penetrar en la muestra. Esto quiere decir que un tratamiento enzimático antes del proceso de extracción de aceite sería una alternativa factible para la extracción de aceite de moringa bajo condiciones controladas en comparación con el método de extracción convencional.

El RA fue alta en los principios y mediados niveles de tiempo de residencia y no mostró ningún incremento. El rendimiento de aceite fue alto en la combinación del tiempo de residencia de entre 1 a 2 h mientras que la temperatura de extracción fue la misma (60°C), sin embargo la diferencia radica en la concentración de la enzima ya que para el experimento 4 fue de 300 μL a diferencia del experimento 6 que fue de 200 μL. Esto refleja la gran importancia que tiene el utilizar complejos enzimáticos ya que mejoran en gran medida el rendimiento de aceite.

---

Los resultados obtenidos en la Tabla 13 y los estudios descritos por Zúñiga, 2001a; Zúñiga, 2001b motivan a recomendar el uso de la hidrólisis enzimática como un estudio más detallado que incluya evaluar otros parámetros y condiciones durante el tratamiento enzimático, tales como la disminución del tamaño de partícula y el descascarado; el tiempo de hidrólisis enzimática y la relación entre E/S, temperatura y humedad de reacción, como también otras condiciones.

En la mayoría de los estudios realizados concluyen que el utilizar un pretratamiento enzimático resulta ampliamente satisfactorio ya que eleva los altos niveles de rendimientos de aceite en la mayoría de los casos (Shah *et al.*, 2005).

La adición de enzimas ha sido utilizada ampliamente en procesos de extracción de aceite de semilla de uva obteniéndose un aumento del 27 % (Zuñiga *et al.*, 2003). De igual forma en la semilla de uva, se realizó un prensado en frío, dicho tratamiento incrementó el contenido de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos de la harina desgrasa residual, hasta cuatro veces en comparación con el control sin enzima (Tobar *et al.*, 2005). En otros estudios reportados, en semillas de girasol y un híbrido, con pectinasa 2 % m/m se obtuvo un aumento de 13.6% para la semilla de girasol y 1.6 para el híbrido (Freccero *et al.*, 2006). Aplicando un tratamiento enzimático previo a extracción de aceite con fluidos supercríticos se obtuvo un aumento del 44% (Passos *et al.*, 2009).

Los resultados de los efectos del pretratamiento enzimático para la extracción de aceite de semillas de *Moringa oleífera* muestran diferencia significativa en cuanto a los rendimientos de aceite y la microestructura mostraron que el pretratamiento enzimático no afecta los componentes principales del aceite.

Tal como lo indica Abdulkarim *et al.*, (2005) donde estimaron las propiedades físico-químicas del aceite de semilla de *Moringa oleífera* extraído con disolvente (hexano) y pretratamientos acuosos enzimáticos, para la extracción de aceite con disolvente se obtuvo 67.9% de ácido oleico en comparación con 70% en la extracción con enzimas.

## **7.3 Extracción de aceite**

### **7.3.1 Extracción por ultrasonificación**

La ultrasonificación se aplica en diferentes modalidades de alta y baja intensidad así como alta y baja frecuencia. De esta manera, variando su longitud de onda, frecuencia e intensidad es que se promueven mejores tiempos y formas de mezclado, al igual que transferencia de energía y masa, para reducir tiempos de extracción e incrementar la producción y elaboración de

alimentos. Una vez aplicado el pretratamiento enzimático se lograron establecer los puntos óptimos de las variables del proceso y habiendo optimizado la variable respuesta se procedió a realizar la extracción de aceite utilizando la ultrasonificación como método alternativo ya que como se sabe esta es una de las tecnologías emergentes altamente satisfactorias.

Actualmente, el empleo de ultrasonido (US) en el procesamiento de alimentos está basado en la ventaja que representa sobre los procesos tradicionales, al reducir tiempos de proceso y mejorar atributos de calidad. Además es considerada una tecnología limpia y de gran potencial de aplicación en procesos como secado, congelado, descongelado y ampliamente utilizado en la extracción entre otros. Fundamentalmente está establecido que el efecto de cavitación gaseosa es el que produce el efecto conservador del ultrasonido, ya que de esta manera se promueve la implosión de microburbujas las cuales generan la liberación de energía. De tal manera que para evaluar los efectos del pretratamiento enzimático sobre el RA, se realizó la extracción de aceite tomando en cuenta los parámetros (Potencia y amplitud) del equipo de ultrasonido (Ultrasonic Processor, mod. UP200St). Antes de someter la muestra al proceso de extracción primeramente se depositó cada muestra en un vial adicionando NaOH al 0.1N con la finalidad de inactivar el complejo enzimático (endoglucanasa, exoglucanasa, hemicelulasa y beta-glucanasa) de marca comercial que se utilizó (ACCELLERASE 1500).

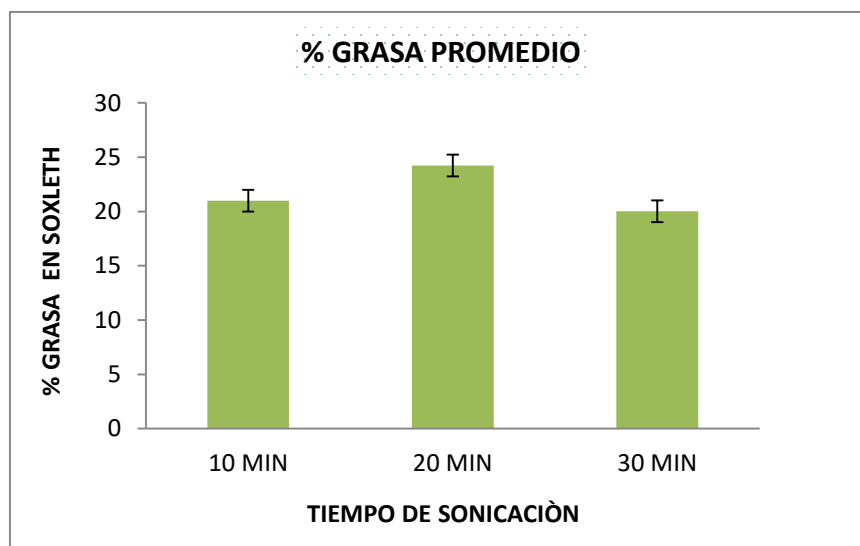
Posteriormente cada uno de los experimentos fueron sometidos al ultrasonido (Tabla 14), sin embargo para poder determinar el tiempo, potencia y amplitud adecuada, las muestras fueron sometidas a varias pruebas preliminares para definir estas variables ya que como se sabe el fenómeno de cavitación puede generar aumento de temperatura durante el proceso de sonicación, lo cual puede favorecer diferentes cambios como: físicos, químicos y bioquímicos en el microentorno de las células de los diferentes productos procesados.

**Tabla 14.** Tiempos de sonicación en muestras con y sin hidrólisis

<b>TIEMPOS</b>	<b>% GRASA SIN ENZ</b>	<b>% GRASA ENZ + US</b>
10 MIN	20,99±0.21	70.58±0.15
20 MIN	24,23±0.47	72.89±0.39
30 MIN	20,02±0.19	71.11±0.02

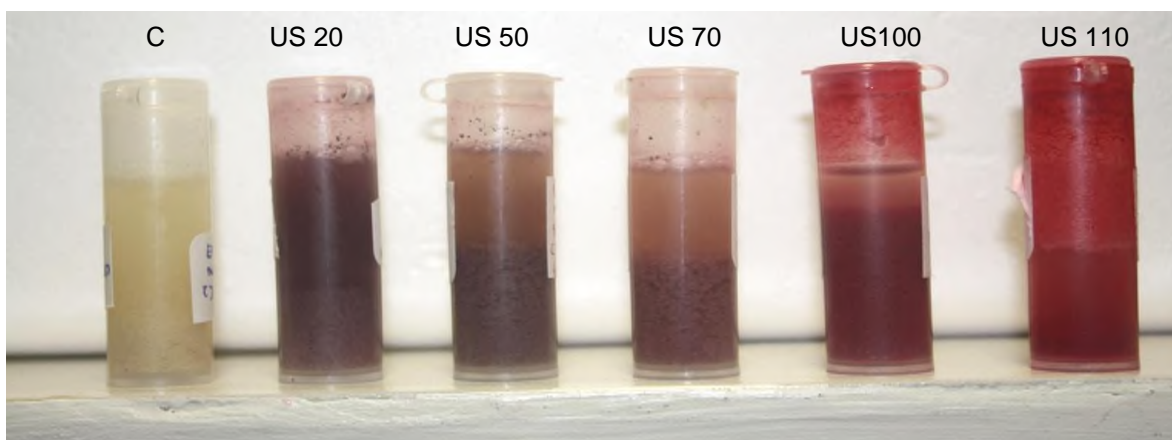
\*Promedio de tres repeticiones ± estándar

Para lograr determinar con exactitud el tiempo adecuado para el proceso de sonicación de la muestra pretratadas, fue necesario evaluar tres diferentes tiempos de sonicación (10, 20 y 30 min) y realizar una cuantificación del contenido de grasa (extracción por Soxhlet). Estos resultados se presentan en la Figura 3.



**Figura 3.** Porcentaje de grasas obtenidos apartir de la harina de moringa utilizado tratamiento enzimático y ultrasonido.

El valor más alto en el porcentaje de grasa fue observado en la muestra sonicada por 20 min, a pesar de que también fue evaluado un tiempo mayor (30 min). El porcentaje de grasas disminuye despue de los 20 min. Esto indica que ha tiempos muy prolongados (30 min) las grasas se ven afectadas por proceso de sonicación debido al aumento de la temperatura y su degradación (Figura 4) .



**Figura 4.** Muestras de harina de moringa con pre-tratamiento enzimático y sometidas a ultrasonido utilizando diferentes potencias (20, 50, 70, 100 y 110 W).

Por esta razón se establecieron los siguientes parámetros para el equipo ultrasónico; amplitud de 50, potencia 70/20 W y un tiempo de 30 s. Se realizaron pruebas, en base a los

---

parámetros ya establecidos y se concluyó que no hubo diferencias significativas al emplear 20, 50, y 70 W. De acuerdo con lo reportado por Zhang *et al.* (2014), con la onda ultrasónica de mayor amplitud viajando a través del disolvente de extracción, se crearían más burbujas y más colapso y una onda de choque violenta con una mayor velocidad podrían generarse para romper las paredes celulares. Por lo tanto, la penetración del disolvente de extracción en las células se hizo más fuerte, dando como resultado una mayor liberación de componentes de las células. Como resultado se obtuvo una mayor transferencia de masa lo cual incrementó y condujo a un aumento apropiado del rendimiento.

Por otro lado el incremento del rendimiento también se debió al disolvente que se eligió, que en este caso fue hexano que ha sido ampliamente utilizado con otras fuentes oleaginosas y en donde se han obtenido resultados muy interesantes.

El rendimiento obtenido usando hexano fue menor (19.4%) comparada al que se obtuvo utilizando una mezcla de disolventes. Tsaknis *et al.* (1999) estudiaron la extracción por solvente de aceite de semilla de moringa utilizando hexano y reportó un 35.7%, que es inferior a los valores (38-42%) reportados por otros investigadores (Lalas y Tsaknis, 2002 y Anwar y Bhangar, 2003). Además reportó que el contenido de aceite de semilla de moringa y sus propiedades mostró una variación significativa dependiendo principalmente de las especies y las condiciones ambientales.

Por esta razón se planteó la posibilidad de utilizar la mezcla de disolvente cloroformo: metanol (2:1), que ha sido reportado como un disolvente con alta afinidad y en estudios que emplean ultrasonido (Zhang *et al.*, 2014). Este proceso de extracción se llevó a cabo a la única frecuencia permitida por el equipo de ultrasonido tomando en cuenta la amplitud de 50, potencia 70/20 W y un tiempo de 20 min.

### **7.3.2. Extracción por Soxhlet**

Una vez concluida la etapa de extracción asistida por ultrasonido se procedió a realizar la extracción por Soxhlet ya que se pretendió comparar el rendimiento de aceite en ambos métodos de extracción. Se utilizaron muestras de la harina obtenida a partir de las semillas de moringa molidas, se depositaron 5 g de muestra en un cartucho de celulosa y se colocaron al extractor Soxhlet durante 5 h, empleando como disolvente éter de petróleo (AOAC, 1984). El aceite se recuperó por evaporación del disolvente en una estufa a 60 ° C durante 1 h.

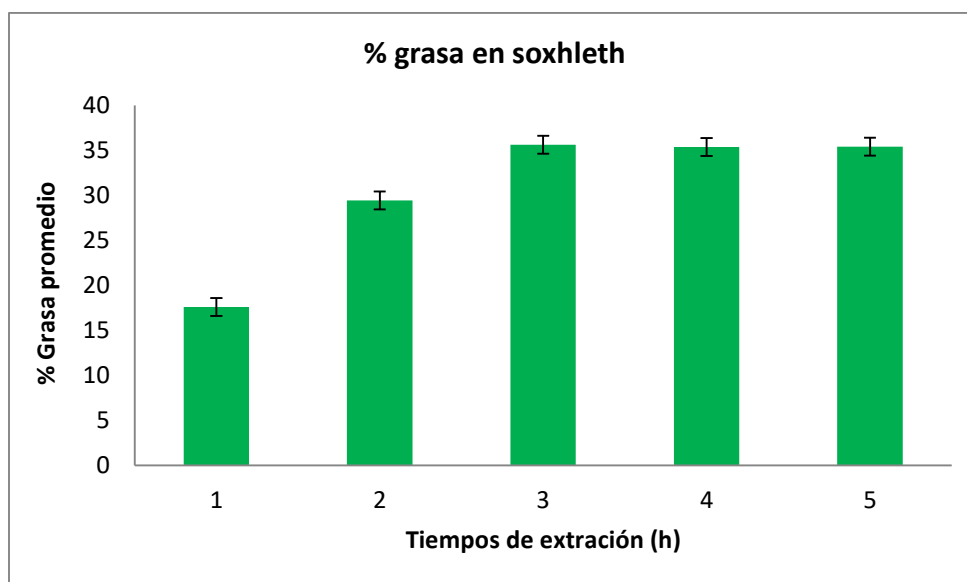
La diferencia entre el rendimiento de aceite obtenido con el método de ultrasonido y el obtenido por Soxhlet, utilizando el proceso de extracción clásica fue del 35.6% (Figura 5). Cuando el tiempo de reacción se aumentó a 2 h, la diferencia de rendimiento varió ligeramente. En comparación entre el rendimiento y el tiempo de extracción para la extracción usando una mezcla de disolventes y aplicando ultrasonificación a la muestra, el porcentaje alcanzado fue de 72.89 %.

Es evidente que en la Figura 5, en el proceso de extracción asistido por ultrasonido hubo un mayor aumento en el rendimiento de aceite, en comparación al utilizar una mezcla de disolventes. El uso de pretratamiento enzimático, mostró un aumento en el rendimiento de extracción de aceite a diferencia del método convencional, como se muestra en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Contenido total de grasa en cuantificación por soxhleth

Tiempos	% Grasa
1	17.60±0.22
2	29.44±0.46
3	35.63±0.32
4	35.38±0.36
5	35.42±0.33

\*Promedio de tres repeticiones ± estándar  $p \leq 0.05$



**Figura 5.** Porcentajes de grasa obtenidos apartir de la harina de moringa sin ningún tratamiento y cuantificada a diferentes tiempos de extracción (1, 2, 3, 4 y 5 h).

La selectividad de la mezcla de disolvente generó una alta potencia de extracción en comparación al que convencionalmente se utiliza, que es el caso del éter de petróleo, el cual es comúnmente empleado para la extracción de aceite de aceite. Sin embargo como se muestra en la Figura 5, el rendimiento de aceite varió desde 17.6% hasta 35.6% con un valor medio de 35.2%, estos valores variaron de acuerdo a la matriz de operación que se planteó durante el

---

pretratamiento enzimático, se evaluó cada ensayo para verificar si en efecto la combinación de métodos que en este caso fue una hidrólisis enzimática asistida por la ultrasonificación utilizando una mezcla de disolventes podría incrementar la eficiencia de la extracción.

Como se esperaba, la combinación de técnicas de operación arrojaron positivamente resultados muy satisfactorios, ya que el rendimiento de la extracción de aceite de las semillas de moringa que se obtuvo fue de 72.89% en comparación al que se realiza de forma convencional.

## **7.4 Caracterización morfológica**

### **7.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se prepararon 2 experimentos, para lo cual se utilizó 1 g de muestras (b.s) y fue agregada en un matraz erlenmeyer que contenía 10 mL de una solución de buffer de fosfatos, enseguida la solución fue ajustada a un pH de 4.6 y se adicionaron 0.168  $\mu$ L enzima. La suspensión fue incubada a 55 ° C durante 60 min. Al término del proceso de hidrólisis la suspensión fue neutralizada hasta alcanzar un pH de 7.0. Lo anterior fue realizado con la finalidad para que la enzima siguiera teniendo actividad sobre la muestra. Después de esto la muestra fue secada durante 1 h a una temperatura de 45 °C, una vez secas fueron colocadas en viales para su posterior análisis. El mismo procedimiento fue seguido para el análisis de la muestra control.

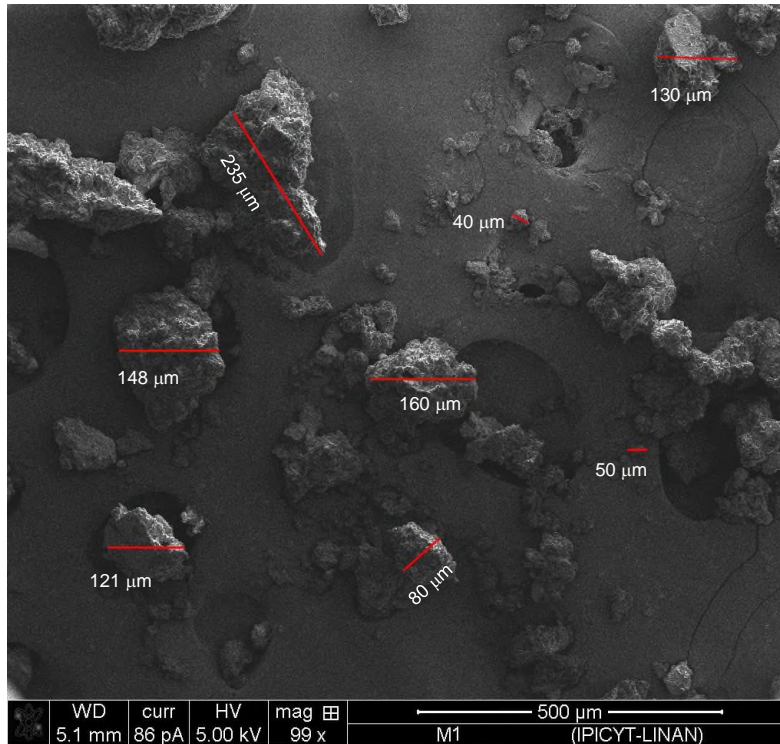
El efecto que presentó el pretratamiento enzimático sobre la pared celular del material vegetal se logró observar a través de las micrografías obtenidas por SEM (Figura 6). Las imágenes que se presentan son de la muestra control (M1) y la muestra que recibió pretratamiento enzimático (M2). En la Figura 6a se presenta la micrografía de la muestra control, en ésta se pueden observar fragmentos de forma irregular, compuestos agregados de material vegetal de la semilla de moringa con tamaños muy variados que van de 40 a 235  $\mu$ m. En contraste las micrografías para la muestra sometida al pretratamiento enzimático (Figura 6b,) no fue posible contrastarla a la misma resolución del control (101x), debido a sus diferencias de tamaños. Por esta razón las imágenes fueron tomadas a 2500 x, con la finalidad de observar la muestra con claridad después del proceso de hidrólisis enzimática. La morfología de estos fragmentos son diferentes y de menor tamaño en comparación con la muestra control, se observan superficies lisas y fragmentos de material vegetal que van de 1 a 18  $\mu$ m.

Esto es lo que se esperaba, ya que al ser una muestra hidrolizada el tamaño de partícula tendería a disminuir. Lo anterior significa que, en un proceso con pretratamiento enzimático, el

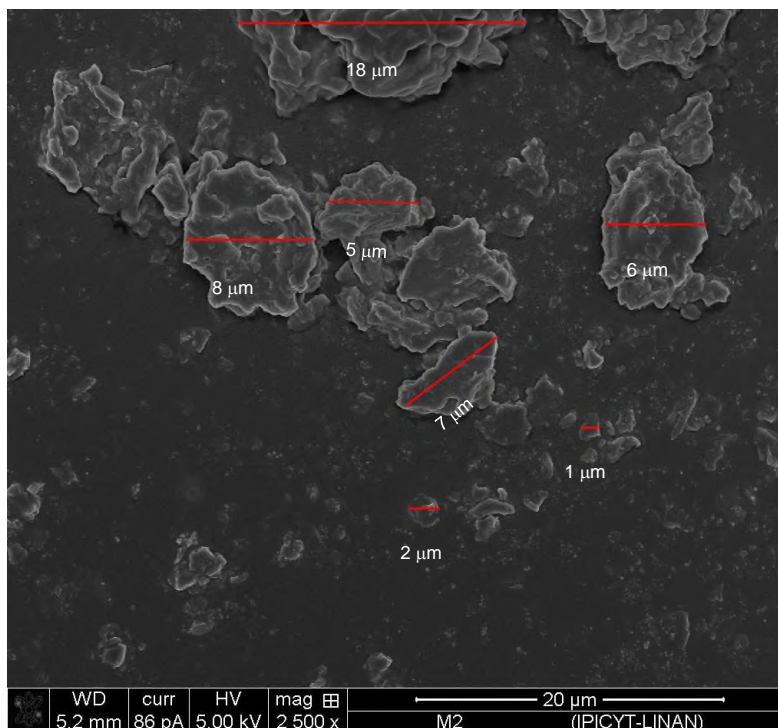
---

tiempo de obtención de aceite sería mucho más fácil y rápido, lo cual se traduciría en mayor eficiente para la industria aceitera. Aunado a lo anterior el uso de un pretratamiento enzimático asistido por ultrasonido potencializa más el rendimiento de extracción. El uso de enzimas de acuerdo con su especificidad y actividad catalítica tendrían un efecto positivo sobre la extracción de aceite al facilitar la ruptura de los compartimentos celulares donde ésta almacenado el aceite, facilitando su liberación.

a)



b)

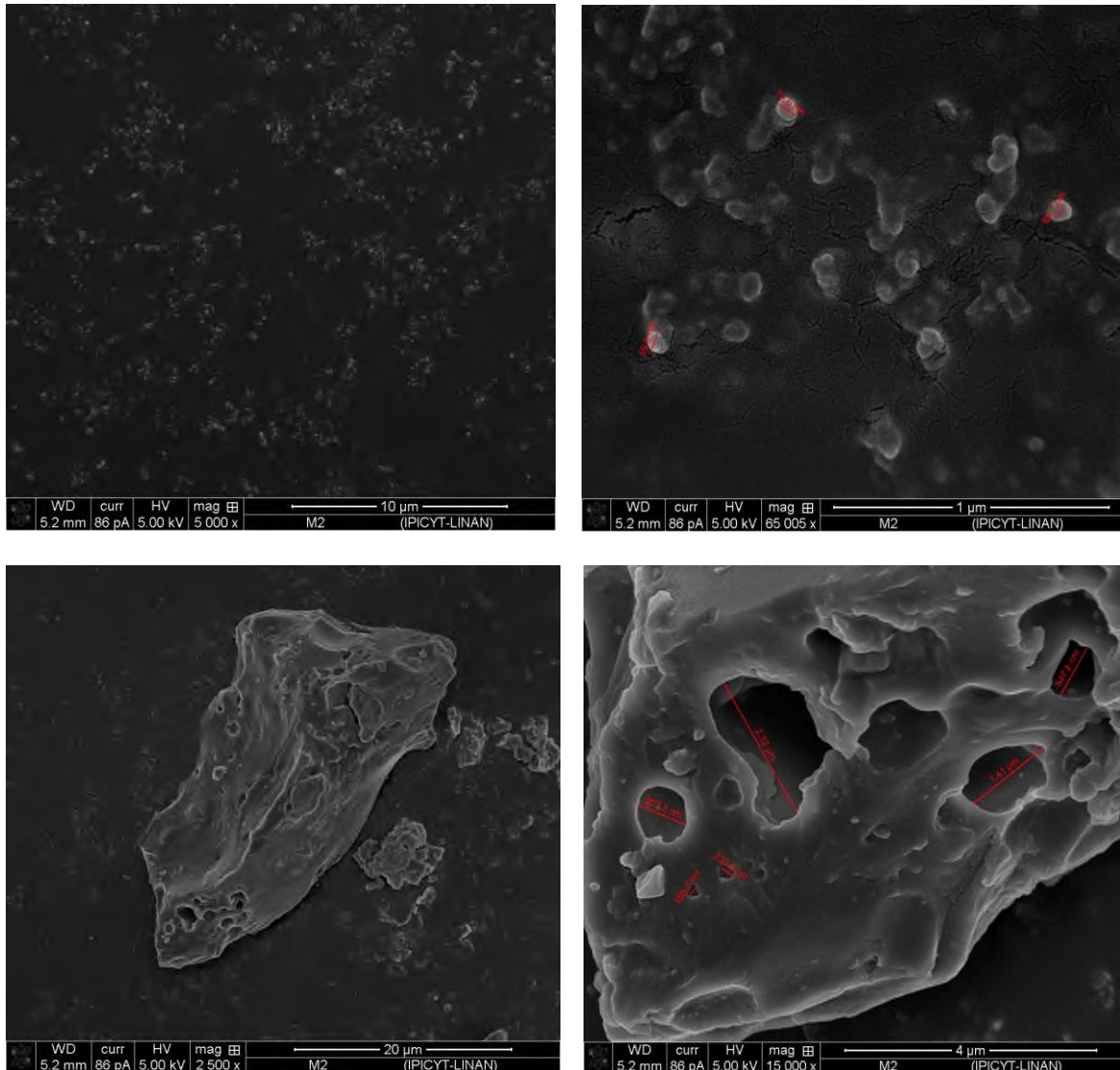


**Figura 6.** Micrografía de una muestra de harina obtenida de semillas de moringa sin pretratamiento enzimático (a) y con pretratamiento enzimático (b).

Por esta razón en el caso de la muestra control (M1) se puede observar que el aceite no fue liberado ya que al no utilizar enzimas no es posible romper los compartimentos donde se encuentra almacenado el aceite, de manera que los cuerpos oleosos se encuentran enredados en proteínas, compuestos celulósicos o inclusive en las paredes de la hemicelulosa (Rosenthal *et al.*, 1996).

Además de esto en la figura 6b se alcanzan a observar también pequeños cuerpos más opacos de menor dimensión por lo cual se decidió amplificar más las micrografías para la muestra M2 con la finalidad de obtener mas información sobre la morfología de esta.

En la figura 7 se observa que el aceite comienza a desprenderse de los cuerpos lipídicos y como consecuencia del uso de un complejo enzimático, el tamaño de la partícula de las harinas disminuyó considerablemente; ya que el aceite en la superficie de la muestra había desaparecido, esto se pudo lograr con la temperatura de extracción y el tiempo en que la muestra permaneció en contacto con la enzima ya que la finalidad de esta es colapsar las estructuras vegetales para que el aceite sea liberado de la semilla.



**Figura 7.** Micrografías de SEM de harina de moringa hidrolizada con la mejor condición del pretratamiento enzimático. Magnificaciones: a) 5000x, b) 65005x, c) 2500x y d) 15000x.

## 7.5 Determinaciones químicas

Las propiedades fisicoquímicas de los aceites revelaron que existía una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el aceite de *M. oleífera* extraído en comparación con los ya reportados en cuanto a su índice de saponificación, peróxido, yodo, ácidos grasos libres y acidez.

La importancia de las propiedades químicas de los aceites es que determinan la calidad oxidativa del aceite, por esta razón, los valores de ácidos grasos libres y peróxido son medidas valiosas de la calidad del aceite. El valor de yodo es la medida del grado de insaturación del aceite. Mientras que a mayor índice de saponificación corresponde un mayor contenido de ácidos grasos de bajo peso molecular. Uno de los valores obtenidos en el aceite de *M. oleífera* fue el valor de

---

yodo (63.34%), como se sabe el índice de yodo es una medida directa de la cantidad de dobles enlaces (Allen *et al.*, 1982; NM, 1981; Matissek *et al.*, 1998).

Uno de los valores obtenidos en el aceite de *M. oleífera* fue el valor de yodo (63.34%), como se sabe el índice de yodo es una medida directa de la cantidad de dobles enlaces (Allen *et al.*, 1982; NM, 1981; Matissek *et al.*, 1998). Los valores de índice de yodo de los aceites extraídos de *Moringa oleífera* reportados son 68.63% (abdulkarim *et al.*, 2006), este valor es relativamente mayor, lo cual indica que en comparación al resultado obtenido en el presenta trabajo es ligeramente menor, esto puede ser debido a la baja salinidad presente en el obtenido por otros autores, un decrecimiento del IY puede ser atribuido a la destrucción de los dobles enlaces por la oxidación, escisión y polimerización (Anwar *et al.*, 2005).

**Tabla 16.** Analisis químicos de la calidad del aceite de la harina de las semillas de *Moringa Oleífera*.

<b>Pruebas</b>	<b>Presente trabajo</b>	<b>Reportado (Abdulkarim <i>et al.</i>, 2006)</b>
<b>I. Saponificación</b>	161.36±0.47	184.00±3.10
<b>I. Iodo</b>	63.34±0.58	68.63±2.00
<b>I. Acidez</b>	2.64±0.02	0.50±0.04
<b>I. Peróxido</b>	3.62±0.27	1.97±0.12

\* Promedio de tres repeticiones ± estándar de la harina de las semillas de *Moringa Oleífera*

AGL: ácidos grasos libres.

En la **Tabla 16** se muestra el índice de peróxido del aceite de moringa ( 3.62% ), expresados en miliequivalentes de O<sub>2</sub> activo por K de grasa. Este parametro determina el contenido de hidroperóxidos y ofrece una medida de la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Allen *et al.*, 1982; NM, 1987b; Matissek *et al.*, 1998). En las muestras estudiadas, el aceite extraído de la harina de moringa utilizando un pretratamiento enzimático asistido por la ultrasonicación acompañado de una mezcla de disolventes: cloroformo: metanol (2:1) presentó mayor índice ( $p < 0,05$ ) en comparación con los aceites obtenidos con hexano sin calor y por centrifugación (Ogbunugafor *et al.*, 2011).

---

El valor del peróxido no solo es unos parámetros que determina el grado de deterioro de grasas y aceites. Esto quiere decir que el valor obtenido en el aceite de moringa probablemente exista una mayor formación de peróxidos debido a la oxidación, sin embargo se sabe que los peróxidos son inestables, esta alteración quizás se deba a las condiciones climáticas o a los periodos de inducción en donde se llevó a cabo el presente estudio. Esta es la razón por la cual la cantidad de peróxidos en el aceite no puede usarse para estimar el grado de deterioro del aceite, debido a que al aceite de *M. Oleifera* se le ha atribuido una elevada IP y estabilidad oxidativa en el presente análisis, comparada con las de los aceites vegetales convencionales.

Sin embargo, los peróxidos en condiciones de fritura, presentan factores que se encargan de la alteración de los peróxidos ya que a mayor temperatura en las frituras, provoca la formación de hidroperóxidos que se descomponen formando compuestos carbonilo y aldehídicos (Anwar *et al.*, 2006). Además, se podría explicar una alta resistencia a la oxidación del aceite de *M. Oleifera* debido a la presencia de altos contenidos de  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferoles, también informaron que el aceite de la semilla de la familia Moringácea era altamente estable (Ogbunugafor *et al.*, 2011).

Por otro lado, el índice de acidez, es una medida de la cantidad de ácidos grasos libres en el aceite (Allen *et al.*, 1982; NM, 1987a; Matissek *et al.*, 1998). El aceite que se extrajo utilizando un pretratamiento enzimático aplicando ultrasonificación, obtuvo mayor índice de acidez (2.64 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite) que los extraídos con disolvente sin calor y por centrifugación (0.50 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite) (abdulkarim *et al.*, 2006). De igual manera estos valores fueron menores en comparación al valor publicado por Ortiz-Moreno *et al.* (2003) de 10,68 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite para la misma variedad. Los aceites presentaron un mínimo grado de oxidación de sus ácidos grasos insaturados. Sin embargo, el ácido graso libre y el contenido de materia insaponificable del aceite extraído por disolventes asistido por enzimas fueron significativamente mayores (P <0,05) que los del aceite extraído de forma convencional.

Los valores de saponificación (161.84 mg de KOH / g de aceite) evaluados en el presente estudio, pudieron ser comparables con los del aceite de oliva, maíz, Níger, colza, soja, girasol, cártamo entre otras. Aunque el valor encontrado en el presente análisis, haya sido un valor muy bajo, el aceite de *M. Oleifera* no deja de ser un aceite con una buena calidad oxidativa ya que los aceites con menor peso molecular de ácidos grasos presentan índices de saponificación mayores.

Por lo tanto, se espera que dicho aceite contribuya a una excelente estabilidad oxidativa y protección al aceite de *M. oleifera* durante el almacenamiento y procesamiento. (Anwar *et al.*, 2005)

Finalmente los resultados obtenidos de las determinaciones químicas del aceite de *M. oleifera* revelaron que existía una diferencia significativa (p <0,05) en comparación con los estudios antes realizados por Abdulkarim *et al.*, 2005. Los valores reportados mostraron diferencias

---

arrojando un menor valor de yodo, mientras que los estudios realizados por Anwar *et al.*, 2005, obtuvo valores de punto de fusión, saponificación, peróxido y un valor de ácido más altos (Tabla 16). La alta estabilidad oxidativa del aceite de *M. oleífera*, en comparación con los aceites vegetales convencionales, se podría atribuir al alto nivel de ácido oleico en particular, que es menos propenso a la oxidación que otros compuestos.

## 7.6 Análisis térmico

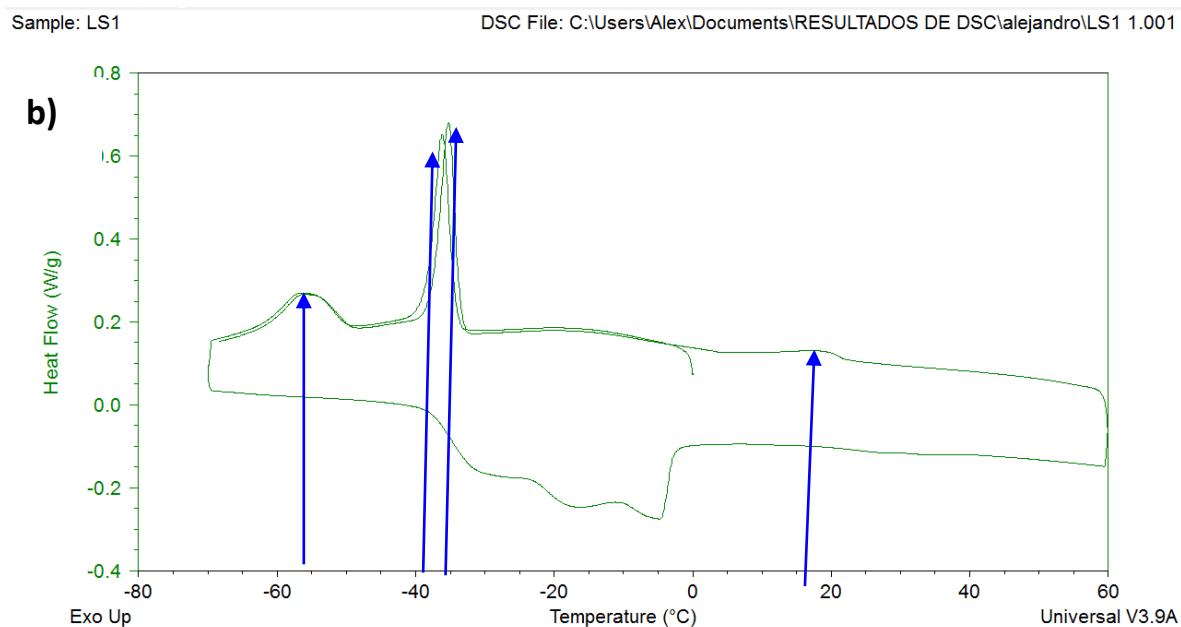
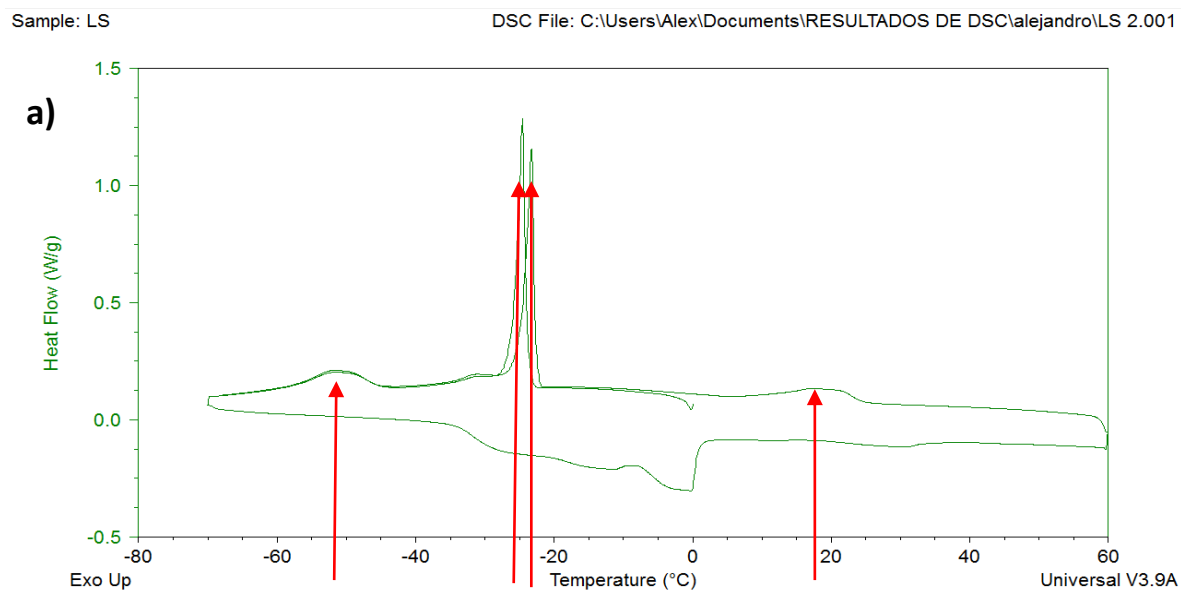
Las transiciones físicas de fases como cristalización, fusión y evaporación que presentan en algunos materiales pueden ser evaluadas o monitoreadas por la técnica de calorimetría diferencial de barrido (CDB), la cual es ampliamente utilizada para el análisis de los procesos termoxidativos y transiciones de fases en aceites y grasas (Rudnik *et al.*, 2000). Por tal motivo, esta técnica fue utilizada para caracterizar las transiciones de fase y perfil térmico del aceite de moringa extraído por el método convencional (LS) y con pretratamiento óptimo (LS1).

En la Figura 8 de las secciones a) y b) se muestran los termogramas obtenidos por CDB para LS y LS1. Las curvas de flujo de calor fueron obtenidas desde una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En estos termogramas se pueden apreciar los procesos de cristalización y de fusión, para ambas muestras (LS y LS1), las cuales presentan tres picos exotérmicos correspondientes a tres temperaturas de transición distintas, los primeros dos bien definidos y el tercero muy similar a los de la muestra control. El primer pico exotérmico ( $T_{pA}$ ) se puede observar alrededor de  $-51$  a  $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el segundo pico fue de mayor magnitud ( $T_{pB}$ ) y se observó alrededor de  $-23$  a  $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por último el tercer pico ( $T_{pC}$ ) fue observado alrededor de  $18$  a  $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al comparar LS contra LS1 (a) y b) se puede apreciar que la temperatura e intensidad del primer pico de transición ( $T_{pA}$ ), es más alto para LS1, esto se puede ser confirmado también con el valor de  $\Delta H$  (Ver tabla 17) el cual fue de  $5.05\text{ J/g}$  para LS y  $9.21\text{ J/g}$  para LS1. Pues como se ha sabe entre mayor es el área bajo la curva, mayor será el valor de  $\Delta H$ .

Chiavaro *et al.*, (2014) observó picos exotérmicos muy similares a los observados en esta investigación, ellos asociaron este fenómeno al proceso de solidificación de triacilglicéridos presentes en aceite de oliva, estos picos exotérmicos pronunciados fueron observados alrededor de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , así como un menor pico exotérmico a  $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con un valor de entalpía de  $65\text{ J/g}$ . Maggio *et al.* (2014) por otro, lado analizó 69 diferentes muestras de aceite de oliva y observó que las temperaturas de cristalización se presentaban entre  $-46$  a  $-32\text{ }^{\circ}$ . El valor ( $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) encontrado para la temperatura de cristalización ( $T_{pB}$ ) en esta investigación cae dentro del intervalo de valores reportados por estos autores.

Por otro lado Wetten *et al.*, (2014) realizó un estudio por CDB con diferentes velocidades de enfriamiento ( $-1$  a  $-300\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ ) en aceite de oliva y girasol. Ellos también observaron tres picos,

uno exotérmico y dos endotérmicos con valores de  $\Delta H$  en la temperatura de cristalización que van de los 0.07 a los 0.97 mJ, estos valores son muy bajos en comparación con los encontrados para esta investigación en cualquiera de los picos (A, B y C).



**Figura 8.** Termogramas de aceite de moringa: a) extraído por el método convencional (LS) y b) extraído con pretratamiento óptimo (LS1).

Estos autores antes mencionados concluyen que el proceso de cristalización para ambos aceites no es afectado sustancialmente por velocidad de enfriamiento, ya las temperaturas de transición son muy similares. Sin embargo, la velocidad de enfriamiento puede afectar significativamente la temperatura de fusión haciendo que esta cambie a temperaturas más bajas.

Las curvas de flujo de calor para ambas muestras (LS y LS1) presentan una transición exotérmico (pico B) con alta intensidad, en LS esta transición se presentó en  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tabla 17), por el contrario en LS1 esta transición fue observada a menor temperatura ( $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), lo cual indico diferencias significativa entre una y otra muestra. Esta transición se relaciona con el fenómeno de cristalización en aceites, tres eventos diferentes están implicados durante una cristalización isotérmica: 1) inducción de cristalización (nucleación), 2) Crecimiento de cristales y 3) perfección de cristales (maduración). Estos eventos ocurren simultáneamente a diferentes velocidades. Sin embargo, la condición termodinámica que inicia la solidificación es el enfriamiento a temperaturas alrededor de los  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lo cual es fundamental para iniciar la nucleación (Toro-Vázquez *et al.*, 2002). La posición y magnitud de las transiciones exotérmicas en el fenómeno de cristalización dependen de la velocidad de enfriamiento y generalmente presentan la misma tendencia, es decir, se producen a temperaturas más bajas cuando la velocidad de enfriamiento aumenta (Man y Tan, 2002).

**Tabla 17.** Transiciones térmicas del aceite de moringa extraído por método convencional (LS) y con pretratamiento (LS1) \*.

Muestra	Pico A		Pico B		Pico C	
	$T_{pA}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H\text{ (J/g)}$	$T_{pB}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H\text{ (J/g)}$	$T_{pC}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H\text{ (J/g)}$
LS	$-51.55 \pm 0.07^a$	$5.05 \pm 0.66^b$	$-23.15 \pm 0.07^a$	$20.41 \pm 0.13^a$	$18.90 \pm 1.13^a$	$18.30 \pm 0.14^a$
LS1 1	$-56.80 \pm 0.14^b$	$9.21 \pm 0.55^a$	$-35.55 \pm 0.78^b$	$15.65 \pm 0.83^b$	$18.30 \pm 0.14^a$	$0.96 \pm 0.11^b$

Letras diferentes en la misma comuna indican diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

\*Promedio de dos repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

---

LS: Aceite de moringa extraído por el método convencional.

LS1: Aceite de moringa extraído con pretratamiento.

$T_{pA}$ ,  $T_{pB}$  y  $T_{pC}$ : Temperaturas de pico.

$\Delta H$ : Entalpía

Con lo que respecta al tercera transición (pico C), esta fue observada en una temperatura (18.9 y 18.3 °C) similar para ambas muestras. Nassu y Gonçalves (1999), reportaron temperaturas de cristalización (-23 a -20°C) y de fusión (20 a 25 °C) en muestras de aceite de soya (desodorizado e hidrogenado) y aceite de palma, estas son muy parecidas a las obtenidas por el aceite de moringa.

### **7.7 Optimización del proceso del proceso de extracción de aceites de la harina de las semillas de *Moringa oleífera*.**

Se aplicó la MSR con la finalidad de optimizar el proceso de extracción de aceite de la harina de las semillas de *M. oleífera* utilizando pretratamiento enzimático asistido con ultrasonificación para obtener un buen rendimiento de aceite. Este proceso combinado fue modelado y optimizado con éxito usando un diseño de Box-Behnken con la metodología de superficie de respuesta (MSR).

Este diseño se presentó como una alternativa razonable ante el diseño central compuesto, ya que este correlaciona los tres niveles de los factores, por esta razón, se sugiere utilizar un diseño que sea rotatable, es decir, que nos permita analizar un conjunto de experimentos entre sus niveles inferiores y superiores, mientras los demás factores experimentales se centran en el nivel medio (Montgomery, 2000).

La matriz operacional que se obtuvo del diseño factorial Box-Behnken fue obtenida a partir del software conocido como Design Expert versión 7.0, el cual consistió de 15 determinaciones experimentales, cada uno de los ensayos fueron evaluados por triplicados, las variables implicadas en el proceso diseño experimental fueron temperatura (T), tiempo (t) y concentración de enzima [enzima], la variable de respuesta fue el rendimiento de aceite (RA).

Se encontró que los resultados de los experimentos realizados durante el pretratamiento enzimático ajusta a una función polinómica de la temperatura y concentración de enzima, por lo tanto, la función (Ec.12) es:

$$RA = 64.52 + 34.20T + 11.15C - 2.38t + 2.44TC - 2.7Tt - 4.5Ct - 10.21T^2 + 2.84C^2 + 1.62t^2$$

Por otro lado, el coeficiente de correlación (88.96%) infiere que tanto la temperatura como la concentración enzimática tienen una gran relación positivamente alta con la variable respuesta ya que a mayor temperatura mayor rendimiento de aceite se extraerá, mientras que el coeficiente de determinación nos indica un 96.39% de probabilidad de que el modelo obtenido se ajusta al conjunto de datos recabados mostrando la relación que existe entre ambas variables.

A partir de los resultados del análisis podemos afirmar que el ajuste del modelo es bueno, sin embargo, si añadimos información cuantitativa en la que basamos nuestro análisis, la representación de los datos de la ANOVA (Tabla 18) se observa una diferencia significativa y que existen otras variables que están afectando nuestro resultado.

En la Tabla 18, el modelo indica para un valor ``P`` de 14.84 asegurando que el modelo es altamente significativo. Sin embargo existe un 0.42 % de probabilidad de un valor de ``F`` que nos indica que alguna de nuestras variables está causando un probable ajuste del modelo. Sin embargo el resto de los valores de ``F`` son inferiores a 0.05 indicando que los términos del modelo son significativos que en este caso las variables A y B (temperatura y concentración enzimática) presentan una estrecha relación.

**Tabla 18.** Análisis de varianza (ANOVA) de RSM para pretratamiento enzimático

<b>ANOVA Para modelo de superficie de respuesta</b>					
<b>Source</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>F-Fisher</b>	<b>VALOR P</b>
Modelo	10984.32	9	1220.48	14.84	0.0042
A-Tem	9357.43	1	9357.43	113.74	0.0001
B-Conc	994.80	1	994.80	12.09	0.0177
C-Tiempo	45.22	1	45.22	0.55	0.4918
AB	23.76	1	23.76	0.29	0.6141
AC	30.89	1	30.89	0.38	0.5668
BC	81.22	1	81.22	0.99	0.3660

---

A <sup>2</sup>	385.06	1	385.06	4.68	0.0828
B <sup>2</sup>	29.72	1	29.72	0.36	0.5740
C <sup>2</sup>	9.68	1	9.68	0.12	0.7455
Residual	411.34	5	82.27		
Lack of Fit	410.22	3	136.74	244.09	0.0041
Pure Error	1.12	2	0.56		
Cor Total	11395.66	14			

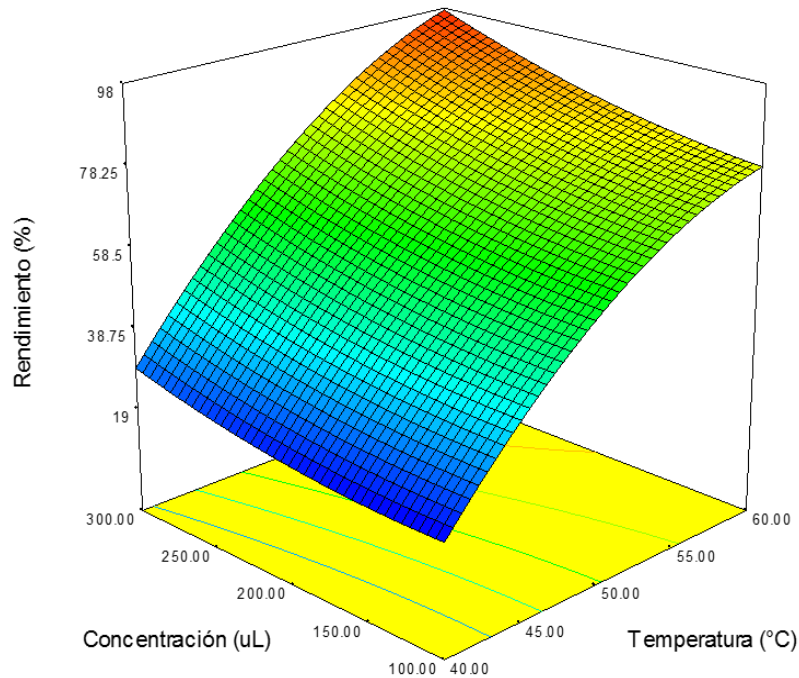
---

Probablemente los resultados obtenidos de este análisis de varianza sugieren realizar un ajuste al modelo matemático aplicado ya que alguno de los valores indica que existe varios términos del modelo que son significativos, lo cual supone una reducción del modelo para su posible mejora. Por esta razón el modelo arroja un 0.41% de probabilidad de que existe un factor que este alterando estos resultados, posiblemente sea necesario considerar la reducción de este modelo. Por otro lado su relación de 12.248 indica una señal adecuada.

### 7.7.1 Análisis de gráficos de MSR

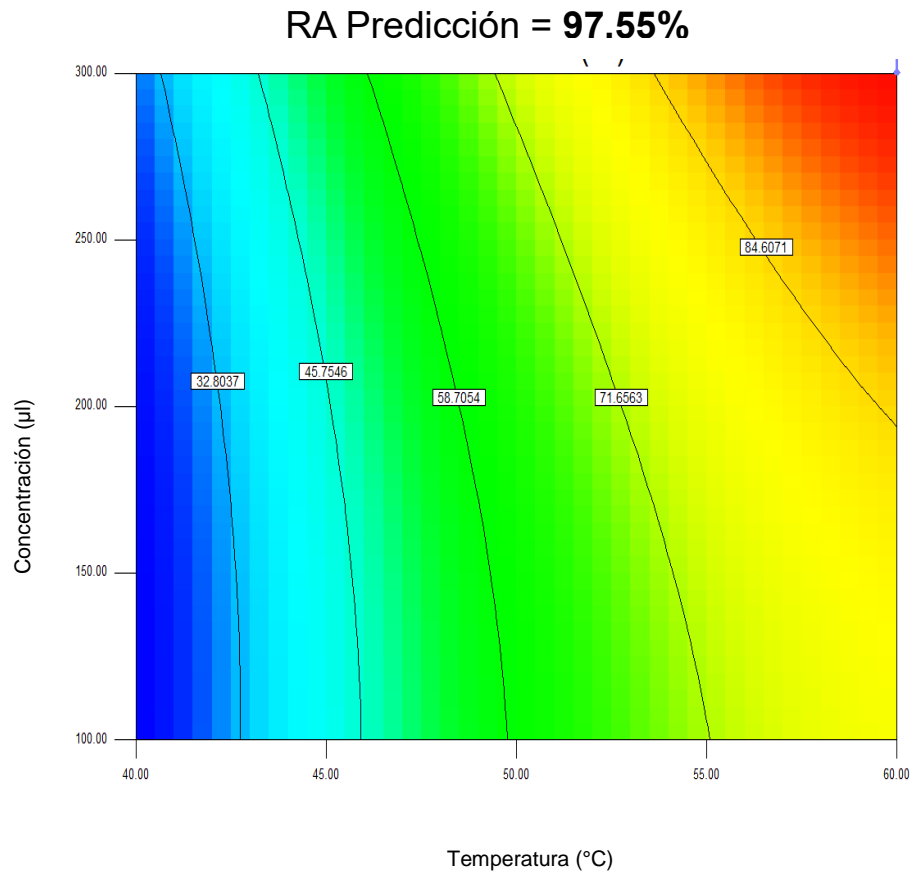
Las gráficas de contornos que se generaron de la MSR predicha para el rendimiento de la extracción de aceite de las semillas de moringa utilizando la combinación de un pretratamiento enzimático con ultrasonido fueron generadas en función de los parámetros significativos como se muestran en la Figura 9. Como puede observarse, el rendimiento en aceite se incrementa con el aumento de cada parámetro, lo cual implica la existencia de un máximo. Las condiciones adecuadas para determinar el máximo rendimiento es utilizando una temperatura de 60 °C y un tiempo de residencia de 174 min para la incubación enzimática de 300 µL qI cual tiene un valor de 97.55% de rendimiento teórico en aceite.

La concentración enzimática y la temperatura presentan un efecto contundente en cuanto al rendimiento del aceite, ya que al manipular estas variables el rendimiento del aceite incrementa, de tal manera que la actividad hidrolítica de la enzima aumenta, como se puede observar en las Figura 9 y Figura 10.



**Figura 9.** Gráfica de superficie de respuesta tridimensional en la que se observa el rendimiento de aceite esperado en función de la temperatura y la concentración de la enzima.

En la Figura 10 se muestra la gráfica de contornos la cual nos permitió observar que existe una relación estrecha entre la concentración enzimática y la temperatura, se logra determinar que el incremento del rendimiento del aceite de moringa se debe al efecto que representa la temperatura sobre la concentración enzimática, aunque el tiempo se ha otra de las variables, no provoca grandes cambios durante el proceso de extracción de aceite, a diferencia del tiempo, la temperatura influye de manera satisfactoria incrementando el rendimiento de la variable respuesta, sin embargo, realizando un análisis en sus puntos centrales se observó que los valores obtenidos en cuanto al rendimiento del aceite no reflejaron un efecto significativo en cuanto al incremento del mismo, también se observaron que los puntos inferiores arrojaron un menor rendimiento de aceite, debido a que el tiempo y la concentración enzimática no representan un mayor impacto, sin embargo si incrementamos la temperatura y la concentración de la enzima habrá un mayor efecto significativo sobre el rendimiento predicho por el modelo (97.55%).



**Figura 10.** Gráfica de contornos de la MSR correspondiente al rendimiento de aceite en función de la temperatura y concentración de la enzima.

---

## VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se realizó la optimización de un tratamiento enzimático acompañado del uso de ultrasonido, con el fin de mejorar la eficiencia de extracción de aceite a partir de las semillas de moringa. El aceite extraído de las semillas de *M. oleifera* se comparó con el aceite de olivo en términos de sus características fisicoquímicas y su estabilidad oxidativa. De acuerdo con los resultados, se encontró que el aceite obtenido a partir de las semillas de moringa presentó menor índice de peróxido ( $3.62. \pm 0,07$  mMol / kg) en comparación con el aceite de olivo (10.89 mMol / kg) lo que indica que dicho aceite puede ser más estable frente a la degradación oxidativa. Además, los resultados del análisis químico proximal mostraron que el aceite de moringa contiene 32.60% de lípidos y 42.58 % de proteína, ambos parámetros confirman el potencial que presentan las semillas de moringa para de la industria aceitera. Mientras que los valores de humedad (6.5%) y cenizas (3.16) fueron muy similares a los reportados por otros autores.

La combinación de métodos alternativos ha mejorado en gran medida la extracción de aceites. Por lo que el aceite obtenido durante la hidrólisis enzimática asistido por ultrasonido mostró un incremento significativo con respecto al rendimiento (72.89%), en comparación al reportado por Abdulkaim *et al.*, 2005. La ventaja de la extracción enzimática sobre la extracción convencional se ha destacado en varios estudios, pues facilita la separación de los componentes extraídos de los vegetales, mejorando las condiciones del proceso y asegurando que los componentes extraídos se conserven sin cambios.

Con la ayuda de la MSR, los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, el porcentaje de aceite fue de 97.55% lo que indica que dicho aceite podría ser una alternativa para los aceites de alto contenido en ácido oleico, tales como el aceite de olivo y el aceite de girasol. Se lograron optimizar las variables involucradas para el pretratamiento enzimático y se establecieron las condiciones óptimas para el proceso de hidrólisis enzimática con un tiempo de residencia de 174 min, una temperatura de 60 °C y una concentración de enzima de 300  $\mu$ L. Las determinaciones morfológicas resaltaron la importancia que tiene la disminución del tamaño de partícula en la muestras de la harina de moringa para remover el mayor contenido de aceite posible.

Finalmente, el análisis de varianza (ANOVA) para la ecuación de regresión lineal mostró que el modelo fue significativo con un coeficiente de correlación de 88.96% y una determinación de 96.39% lo que indica que la función podría ser viable.

---

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC, 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., USA.
2. Abdulkarim, S.M., Long, K., O.M., Long, C S., Muhammad, K.S., Ghazali, H.M. 2005. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil. Food Chemistry 93 253–263.
3. Alfaro, V., Martínez, N.W. 2007. Informe proyecto rendimiento y uso potencial de *Moringa oleifera* Lam en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para su utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimentario-nutricional de Guatemala, proyecto FODECYT No. 26.
4. Anwar, F., Bhanger R, 2003. Analytical Characterization of *Moringa oleifera* Seed Oil Grown in Temperate Regions of Pakistan, J. Agric. Food Chem, 51, 6558-6563.
5. Anwar, F., Ashraf, M., Bhanger M. 2005. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oil seeds from Pakistan. J. Am. Oil Chem. Soc. 82(1), 45-51.
6. Aparna, S., Khare, S. K., & Gupta, M. N. 2002. Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. Journal of the American Oil Chemists Society, 79, 215–218.
7. Bendicho, C., y Lavilla, I. 2000. Ultrasound Extraction. En I. D. Wilson, E. R., Adlard, M. Cooke, Y Poole, C. F. Encyclopedia of separation science. Academic press. Reino Unido. 1448-1454.
8. Chiavaro, E., Vittadini, E., Rodríguez-Estrada, M., Cerretani L. and Bendini, A. 2008. Differential canning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil, Food Chemistry, 110, 248-256.
9. Dominguez, H., Núñez, M.J., Lema, J.M.1995a. Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados Grasas y Aceites, 46, 11.
10. Dominguez, H., Nuñez, M.J., Lema, J.M. 1995b. Enzyme-assisted hexane extraction of soja bean oil. Food Chemistry. 54, 223.
11. Daneshvand, B., Ara, K.M., Raofie F. 2012. Comparison of supercritical fluid extraction and ultrasound-assisted extraction of fatty acids from quince (*Cydonia oblonga* Miller) seed using response surface methodology and central composite design. Journal of Chromatography A, 1252: 1– 7.
12. Fetzer, W. 1998. Planta de preparación de semillas combinadas. Aceites y Grasas., 32, 436.
13. Foidl, N., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2001. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses, in: Fugii, L. 2001 "the miracle tree: the multiple attributes of Moringa. CTA Wageningen/CWS Dakar.19

- 
14. Folkard, G., Sutherland, J. 1996. *Moringa oleifera*, un árbol con enormes potencialidades, Agroforestry today, volumen 8, N° 3, 5 -8, Turrialba, Costa Rica.
  15. Fullbrook, P. D. 1983. The use of enzymes in the processing of oilseeds». J. Am. Oil Chem. Soc, 60, 476-478.
  16. Fullbrook, P. D. 1984. «Extraction of vegetable oils. UK Patent Application» GB 2 127 425A. No 8227661.
  17. Fuglie, L. J. 2002. The Miracle Tree *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics. Training Manual. 2001. Church World Service, Dakar, Senegal.
  18. Gao, M. y Liu, C. 2005. "Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *saussurea medusa maxim*". *World journal of microbiology & biotechnology*. 21: 1461-1463.
  19. Gilbert, P. B., Gegler, R., Merraiz, H. 1996. "Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation solvent extraction device", *Food Chem.* 56, 439.
  20. Ghasemi, E., Raofie, F., Najafi, N.H. 2011. Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry* 126: 1449–1453.
  21. Jahani, M., Alizadeh, \*, M. Pirozifard a, A. Qudsevali
  22. Karnofsky, R. 2001. Diseño de extractores para semillas oleaginosas. *Aceites y Grasas*, 42, 109.
  23. Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., y Polissiou, M. G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *ultrasonics sonochemistry*. 13:54-60.
  24. Latif, S., Anwar, F. 2011. Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food Chemistry* 125 (2011) 679–684.
  25. Li, F., Yang, L., Zhao, T., Zhao, J., Zou, Y., Zou, Y., Wu, X. 2012. Optimization of enzymatic pretreatment for n-hexane extraction of oil from *Silybum marianum* seeds using response surface methodology *Food and bioproducts processing* 90: 87–94
  26. Liu, S., Yang, F., Zhang, C., Ji, H., Hong, P., Deng, C. 2009. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil by response surface methodology. *J. Supercrit. Fluids*, 48, 9–14.
  27. Maggio, R., Barnaba, Cerretani, C. L. Paciulli, M. and Chiavaro, E. Study of the influence of triacylglycerol composition on DSC cooling curves of extra virgin olive oil by chemometric data processing. 2014. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*, 115, 2037-2044.
  28. Mani, S., Jaya S., Vadivambal R. 2007. optimization of solvent extraction of moringa (*Moringa Oleifera*) seed kernel oil using response surface methodology, *Food and Bioproducts Processing*.
-

- 
29. Métodos Analíticos en Alimentaria, Aceites y Grasas. 1999. Determinación del grado de acidez. Editado por Panreac Química S. A. Sevilla. 14.
  30. Métodos Analíticos en Alimentaria, Aceites y Grasas.1999. Determinación del índice de peróxidos, pp15. Editado por Panreac Química S.A. Sevilla.
  31. Métodos Analíticos en Alimentaria, Aceites y Grasas.1999. Determinación del índice de yodo, pp54. Editado por Panreac Química S.A. Sevilla.
  32. Montgomery, D.C. 1991. Design and analysis of experiment, 467-509, Wiley Inc, New York, USA.
  33. Mohammed, A.S; Lai, O.M; Muhammad, S.K.S; Long, K. and Ghazali, H.M. 2003. Moringa oleifera, Potentially a New Source of Oleic Acid-type oil for Malaysia. Investing in Innovation. V3. Bioscience and Biotechnology. Universiti Putra Malaysia. 137-140.
  34. Mustakas, G.C. 1980. Recovery of oil from soybeans. In: Handbook of Soy Oil.
  35. Nassu R. T. and Gonçalves G. L. A. 1999. Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique, Grasas y Aceites, 50, 16-22.
  36. Núñez, C. 2008. Extracciones con Soxhlet. <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
  37. Ong, J.T.L. 2002. El impacto de las condiciones de preparación de las semillas de soja sobre la calidad y el rendimiento del aceite. Aceites y Grasas, 47, 237.
  38. Oliveira, J. T. A., Silveira, S. B. 1999. Compositional and nutritional attributes of seeds from multiple purposes tree *Moringa oleifera* Lamarck. *J. Sci. Food Agric.* 79 (6), 815-820.
  39. Olson, M. E. y Fahey, J.W. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. Revista Mexicana de Biodiversidad.
  40. Ogbunugafor, H.A., Eneh, F.U., Ozumba, A.N., Igwo-Ezikpe, M.N. 2011. Physico-chemical and Antioxidant Properties of Moringa oleifera Seed Oil. Pakistan Journal of Nutrition 10 (5): 409-414.
  41. J. Okpuzor<sup>4</sup>, I.O. Igwilo<sup>1</sup>, S.O. Adenekan<sup>3</sup> and O.A. Onyekwelu<sup>1</sup>
  42. Parrotta, J. A. 1993. *Moringa oleifera* Lam. Resedá, horseradish tree. SO-ITF-SM-61. New Orleans, LA U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. p 6.
  43. Passos, P. C., Yilmaz, S., Silva, M.C., Coimbra, M. A. 2009. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry.* 115:48-53.
  44. Patel, S., Thakur, A. S., Chandy, A. y Manigauha, A. 2010. *Moringa oleifera*: A review of their medicinal and economic importance to the health a nation. *Drug Invention Today.* 2(7), 339-342.
  45. Pedrotti, S. y F, Boling.1999. Uso de los expanders en la preparación moderna de soja. Aceites y Grasas 35, 300.

- 
46. Pérez, R. 2010. *Moringa*: Una alternativa forrajera de bajo costo. Fundación produce Sinaloa. p 3
  47. Proestos, C. y Komaitis, M. 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction techniques. *Quality Journal of Food*. 29-567.
  48. Ramachandran, C., Peter, K. V., y Gopalakrishnan, P. K. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany*, 34, 276–283.
  49. Rosenthal, A D., Pyle, L. K., Nirvanjan, S. Gilmour y Trinca, L. 2001. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from *soybean*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 499.
  50. Rovaris, A. A., Diasa, C. D., Da Cunha, I.P., Cirra Scaff, R.M., Francisco, A., Petkowicz, C.L.O., Amantea, E.D. 2012. Chemical composition of solid waste and effect of enzymatic oil extraction on the microstructure of soybean (*Glycine max*). *Industrial Crops and Products* 36: 405–414.
  51. Rudnik E.; Szczucinska A.; Gwardiak H.; Szulc A. y Winiarska A. (2000) Comparative studie of oxidative stability of linseed oil. *Thermochimica Acta*. 370 (1-2). 135-140.
  52. Sánchez-Machado, D.I., Núñez-Gastélum, J. A., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Wong, B., López-Cervantes J. 2010. Nutritional Quality of Edible Parts of *Moringa oleifera*. *Food Anal. Methods* 3:175–180.
  53. Singh, P.P., Maier, D.E., Okos, M.R., Cattanach, E., Trumble, K.P. 1999. Effects of physical properties and operating parameters and *soybean* flaking. *JAOCS*, 76, 981.
  54. Sutherland, J. P., Folkard, G. K., Grant, W. D., 1989. Seeds of *Moringa* species as naturally occurring flocculants for water treatment. *Science, Technology and Development*. 7.3, 191–197.
  55. Siddhuraju, P. and K. Becker, 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *J. Agric Food Chem.*, 15- 2144-2155.
  56. Sharma, G.K. and Rains; V. 1982. Propagation techniques of *Moringa oleifera* Lam: En: Khosia, P.K, ed. Improvement of forest biomass: Proceedings of a Symposium. Solan, India. Indian Society of Tree Scientist: 175-181.
  57. Shweta, S., Aparna, S., Gupta, M.N. 2005. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. *Bioresource technology*. 96: 121-123.
  58. Tano-Debrah, K. y Y, Ohta. 1995a y b. Enzyme-assisted aqueous extraction of shea fat: a rural approach. *JAOCS*, 72, 251-1409.
  59. Toro-Vazquez, V., Herrera-Coronado, E., Dibildox-Alvarado, M., Charo-Alonso, C., Gomez-Aldapa. 2002. Induction Time of Crystallization in Vegetable Oils, Comparative
-

- 
- Measurements by Differential Scanning Calorimetry and Diffusive Light Scattering. *Food Engineering and Physical Properties*. 67(3), 1057-165
60. Teixeira, C., Macedo, G.A., Macedo, J.A., M. da Silva, L.E., Da C. Rodrigues, A.M. 2013. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. *Bioresource Technology* 129: 575–581.
61. Thongson, C., Davison, P.M., Mahakarnchanakul, W. y Weiss, J. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in applied Microbiology*. 39:401-406.
62. Vásquez, O., Alva, A. y Marreros, J. 2001. Extracción y caracterización del aceite de je *Engineering*. Elsevier. Nueva York. EE.UU. 707.
63. Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*. N.º8: 303-313.
64. Ward, O. P., Singh A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, Issue 12, Pages 3627-3652.
65. Y. B. Che Man and C. P. Tan. 2002. Comparative Differential Scanning Calorimetric Analysis of Vegetable Oils: II. Effects of Cooling Rate Variation. *Phytochemical Analysis*, 13, 142–151.
66. Zhang, Q., Zhang, Z., Yue, X., Fan, X., Li, T., Chen, S. 2009. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chem*. 116, 513–518.
67. Zúñiga, M.E., Soto, C., Mora, A., Chamy, R., Lema, J.M. 2003. Enzymic pre-treatment of *Guevina avellana mol* oil extraction by pressing. *Process Biochemistry*. 39- 51-57.